

(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 lantivíricas 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).

15 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.

20 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 30 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 40 45 50 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 retrovírico 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 viríônico no se empaquetará dentro de estas partículas. El componente de complementación en un sistema de vector retrovírico 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 retrovírica. Sin embargo, la infección es un proceso final, por lo que no debería ocurrir ninguna replicación o propagación posterior del vector.

55 60 65 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.

70 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.

75 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.

80 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*.

5 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*.

10 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.

15 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.

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

25 El documento WO 00/15819 se refiere a líneas celulares de empaquetamiento para producir una partícula retrovírica derivada de lentivirus independiente de proteínas víricas auxiliares que comprende una secuencia codificante del lentivirus *gagpol* 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*.

30 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.

40 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 retrovírica cadena arriba del codón de inicio de *gag*, en contraste con Sodroski y Verma, sin comprometer significativamente la seguridad.

Exposición de la invención

45 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:

50 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
 55 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.

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

65 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.

15 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 retrovírico o una partícula retrovírica individual.

Descripción detallada de la invención

20 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 retrovírico. 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, 30 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.

40 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.

45 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.

50 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 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 primos 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 sistemas, 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 transcrita 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 transfecan 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 retrovírica de *gag-pol* modificada que se ha codones optimizados para la expresión en una productora de elección. Los componentes opcionales serían entonces (a) una construcción de genoma retrovírico 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 retrovírica", "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 retrovírico 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 mieloide.

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 espermatocto, 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 retrovírico, 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 provírica 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 retrovírico 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 retrovírico 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 retrovírico. Esto hace al vector retrovírico 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.

55 Por lo tanto, un genoma retrovírico 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 retrovírico en una célula hospedadora/célula de empaquetamiento también incluirá secuencias de control reguladoras de la transcripción unidas de forma operativa al genoma retrovírico 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 retrovírica 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.

65 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 retrovírico. En un retrovirus, el promotor se sitúa en la región U3 de LTR 5' del provirus. En los vectores retrovíricos, el promotor que conduce la expresión de un gen terapéutico puede ser el promotor retrovírico 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 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 retrovírico. 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 (HRE) también se han resultado estar en asociación con un número de genes, incluyendo el gen de la eritropoyetina (EPO) (9; 10). Otros HRE 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 (HRE1), 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' retrovírica 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 retrovíricos 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 heterólogo, 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 vírica para conducir la expresión génica. En un vector retrovírico, 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 retrovírico regulado de la presente invención es un vector retrovírico regulado por ILRE.

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

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

10 Preferentemente, el vector retrovírico 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 promocional de vectores retrovíricos 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*).

20 El vector retrovírico 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 retrovíricos 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 de un oncogén endógeno.

30 Como se ha tratado anteriormente, los vectores retrovíricos de replicación defectuosa se propagan normalmente, por ejemplo, para preparar títulos adecuados del vector retrovírico 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, que las tres proteínas de empaquetamiento se pueden proporcionar en trans.

35 En general, una "línea celular de empaquetamiento" contiene uno o más de los genes retrovíricos *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 retrovírico, 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.

40 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.

45 La línea celular de empaquetamiento retrovírico 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 retrovírico son tóxicos para las células. Los componentes usados normalmente para generar vectores retrovíricos 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

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 retrovírico 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 retrovírico. 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 retrovírico 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.

5 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*.

10 Las líneas celulares de empaquetamiento son útiles para proporcionar los productos génicos necesarios para encapsidar y proporcionar una proteína de membrana para un vector retrovírico regulado de título elevado y la producción de vehículo de suministro génico nucleico regulado. Cuando se introducen secuencias retrovíricas 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.

15

20 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.

25 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 administrarse *ex vivo* tras lo que se vuelven a administrar las células de empaquetamiento autólogas.

30 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.

35 El proceso de producción de un vector retrovírico 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).

40 40 Como se usa en el presente documento, la expresión "título elevado" significa una cantidad eficaz de un vector retrovírico o partícula retrovírica que es capaz de transducir un sitio diana tal como una célula.

45 Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad eficaz" significa una cantidad de un vector retrovírico o lentivírico 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 retrovíricas por ml, tal como de 10^6 a 10^7 por ml, más preferentemente al menos 10^7 partículas de retrovirus por ml.

50 50 De acuerdo con la presente invención, es posible manipular el genoma vírico o la secuencia nucleotídica del vector retrovírico regulado de forma que los genes víricos se reemplacen o complementen con uno o más NOI que pueden ser NOI heterólogos.

55 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.

60 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.

65 65 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.

5 Se han usado muchos marcadores seleccionables diferentes con éxito en vectores retrovíricos. 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 puromicina 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*.

20 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.

25 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 antivíricas, 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.

30 35 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).

40 45 Los ejemplos de profármacos incluyen, pero sin limitación, fosfato de etopósido (usado con fosfatasa alcalina; 5-fluorocitosina (con citosina desaminasa); doxorribin-N-p-hidroxifenoxiacetamida (con penicilin-V-amidasa); glutamato de para-N-bis(2-cloroetil)aminobenzoilo (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).

50 Los NOI adecuados para su uso en el tratamiento o en la prevención de la enfermedad cardiaca 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).

55 60 65 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- β 1, insulina, IFN- γ , IGF-I, IGF-II, IL-1 α , IL-1 β , 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-1 α , MEP-1 β , MIP-3 α , MIP-3 β , MIP-4, factor-1 inhibidor del progenitor de mieloide (MPIF-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, SDF1 α , SDF1 β , SCF, SCGF, factor de células madre (SCF), TARC, TGF- α , TGF- β , TGF- β 2, TGF- β 3, 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 retrovírico 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 retrovírico". Los vectores víricos, incluyendo los vectores retrovíricos, se han usado para transferir NOI eficientemente aprovechando el proceso de transducción vírica. Los NOI clonados en el genoma retrovírico 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 retrovírico. Los vectores introducen nuevo material genético en una célula, pero son incapaces de replicarse.

El vector retrovírico 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, anfífilos 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 retrovírico, 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 retrovíricos, 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 retrovíricas 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 retrovírico 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 suppositorio 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 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 forma de comprimidos o grageas que se pueden formular de manera convencional.

10 15 Se cree que la presente invención tiene una aplicabilidad terapéutica amplia - dependiendo, entre otros, de la selección del uno o más NOI.

20 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 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 inyerto contra hospedador, enfermedad autoinmunitaria, lesión por reperfusión, meningitis, migraña y antitrombosis dependiente de la aspirina; crecimiento, invasión y propagación tumoral, angiogénesis, metástasis, tumor maligno, ascitis y efusión pleural maligna; isquemia cerebral, enfermedad cardiaca 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.

35 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, 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 transplantes 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 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 trombólica (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; 40 moduladores de, por ejemplo, el metabolismo o comportamiento; como analgésicos; para tratar trastornos de deficiencia específicos; en el tratamiento de, por ejemplo, la soriasis, en medicina humana o veterinaria.

45 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 antiinmunitaria, es decir, efectos inhibidores contra una respuesta inmunitaria celular y/o humorar, 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, 50 incluyendo la artritis reumatoide, inflamación asociada con la hipersensibilidad, reacciones alérgicas, asma, lupus eritematoso sistémico, enfermedades de colágeno y otras enfermedades autoinmunitarias, inflamación asociada con aterosclerosis, arteriosclerosis, enfermedad cardiaca aterosclerótica, lesión por reperfusión, parada cardíaca, infarto de miocardio, trastornos inflamatorios vasculares, síndrome disneico u otras enfermedades cardiopulmonares, 55 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, 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 epididímo-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 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 fondus degenerativa, componentes inflamatorios de traumatismo ocular, inflamación ocular causada por infección, vitreoretinopatías 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, encefalomielitis, neuropatía aguda, neuropatía subaguda, neuropatía crónica, síndrome de Guillain-Barre, corea de Sydenham, miastenia grave, seudotumor 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 atrofias 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, transplante de médula ósea u otras complicaciones y/o efectos secundarios del transplante, 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 transplante de células, tejido y órganos naturales o artificiales, tales como córnea, médula ósea, órganos, lentes, marcapasos, tejido de piel natural o artificial.

25 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:

30 Descripción de las figuras

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

35 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;

40 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;

45 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 retrovírico;

50 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);

55 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;

60 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;

65 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;
- 10 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;
- 25 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;
- 35 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 pClneoERev;
- 45 la Figura 36 es una representación esquemática de pESYNREV;
- 45 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;
- 50 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.

10 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.

15 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 sondar 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.

20 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 (\pm 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 kDa). 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.

30 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* (\pm 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.

45 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.

50 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 sondar 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.

60 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 Δ ATG*: 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 la 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. pH81nZ, 6. pH82nZ, 7. pH83nZ, 8. pH84nZ, 9. pH85nZ, 10. pH86nZ, 11. pH87nZ, 12. pH88nZ, 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 pH83nZ (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 pH 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 pH 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 pH expresa Rev, y solo pH81nZ, pH83nZ, pH87nZ y pH6.1nZ 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;
 20 SEQ ID NO: 7 muestra la secuencia de pESYNGPRRE;
 SEQ ID NO: 8 muestra la secuencia de LpESYNGPRRE;
 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;
 25 SEQ ID NO: 12 muestra la secuencia de pONY3.1;
 SEQ ID NO: 13 muestra la secuencia de pClneoERev;
 SEQ ID NO: 14 muestra la secuencia de pESYNREV;
 SEQ ID NO: 15 muestra la secuencia de *gag-pol* de VIH con codones optimizados;
 30 SEQ ID NO: 16 muestra la secuencia de *gag-pol* de EIAV codones optimizados;
 SEQ ID NO: 17 muestra la secuencia de pIRES1hygESYNGP;
 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).

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 procedimiento 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

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 pClneo (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

5 10 Se amplificó la secuencia de RRE de VIH-1 (bases 7769-8021 de la secuencia de HXB2) mediante PCR a partir del clon provírico pWI3 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).

15 Partículas víricas pseudotipificadas

20 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 anfotrópico (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

25 30 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 *Spel* (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.

35 40 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 *Spel* (cebadores 3'). Se insertaron los productos de PCR en pH6Z en los sitios de *NarI-Spel*. Los vectores resultantes se denominaron pH51nZ (que contiene las secuencias del VIH-1 hasta *gag* 40), pH52nZ (que contiene las secuencias del VIH-1 hasta *gag* 260), pH53nZ (que contiene las secuencias del VIH-1 hasta *gag* 360), pH54nZ (que contiene las secuencias del VIH-1 hasta *gag* 625), pH55nZ (igual que pH51nZ, pero con un SD mutante), pH56nZ (igual que pH52nZ, pero con un SD mutante), pH57nZ (igual que pH53nZ, pero con un SD mutante) y pH58nZ (igual que pH54nZ, pero con un SD mutante).

45 50 Además, se insertó la secuencia de RRE (los nucleótidos 7769-8021 de la secuencia de HXB2) en el sitio de *Spel* (lleno) de pH6.1nZ, pH51nZ, pH53nZ y pH57nZ, dando lugar los plásmidos pH6.1nZR, pH51nZR, pH53nZR y pH57nZR, respectivamente.

55 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

60 65 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 transfecaron 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

65 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).

5 Análisis de ARN

10 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 µg 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 *Spel*-*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).

20 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 µg 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.

30 Análisis de proteínas

35 40 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 µm, 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 µl) 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 sondar 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).

45 50 Expresión de productos génicos de *gag-pol* y producción de partículas vectoriales

55 60 65 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 citoplasmática 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 clón 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* romo (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-βgal (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* dI 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* del 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.

15 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 pH3nZ) 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 pH3nZ, 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 pH3nZ, dio como resultado una reducción de 10 veces en los títulos (compárense los títulos para pH3nZ y pH7nZ 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 pH1nZ (carril 5), pH2nZ (carril 6) y pH3nZ (carril 7), mientras que los títulos fueron de 5 a 8 veces superiores para pH3nZ. Es posible que eliminaciones adicionales (de las encontradas en pH3nZ) 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 pH3nZ 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

5 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.

10 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, pH51nZ, pH3nZ y pH7nZ, dando lugar a los plásmidos pH6.1nZR, pH51nZR, pH3nZR y pH7nZR, respectivamente. Los títulos de las partículas vectoriales se determinaron con pSYNPG 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), pH3nZR (6 veces en comparación con pH3nZ) y pH7nZR (2,5 veces en comparación con pH7nZ). 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 pH3nZR (5×10^5) y pH6.1nZR (2×10^5). Los títulos no se restablecieron para pH7nZR en presencia de Rev. Esto apoya la hipótesis de que la mutación de SD en pH7nZ 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 pH3nZR y pH6.1nZR, pero no puede afectar a la estructura secundaria de la señal de empaquetamiento. Para el vector pH51nZ, la inclusión del RRE no condujo a una reducción en los títulos. Esto se podría deber al hecho de que pH51nZ 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 pH6nZ, que da títulos iguales a pH51nZ. Rev fue capaz de restablecer parcialmente los títulos para pH51nZR (aumento de 10 veces en comparación con pH51nZ, y 8 veces menor que pH6nZ), pero no completamente como en el caso de pH3nZ. 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 pH51nZR en presencia de Rev.

30 Además, se determinaron los títulos de punto final para pH3nZ y pH6nZ con pSYNPG 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 pH3nZ que para pH6nZ (véase la Figura 10). Finalmente, se determinó la eficiencia de la transducción del vector producido con pH3nZ o pH6nZ y diferentes cantidades de pSYNPG o pGP-RRE3 a diferentes mdi (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 pSYNPG 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 mdi, tanto si se usaron cantidades elevadas o bajas de pSYNPG, y con pH6nZ o pH3nZ. Para una mdi 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.

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

50 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 interrumriendo 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 de 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)

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

15 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 *Xba*I-*Not*I desde un plásmido que contiene un gen *gag/pol* de EIAV con codones optimizados, sintetizado por Operon Technologies Inc., Alameda, CA, en pClneo (Promega). El gen se suministró en una estructura plasmídica patentada, GeneOp. El fragmento transferido a pClneo incluye secuencias que flanquean el ORF de *gag/pol* de EIAV con codones optimizados: tctagaGAATTGCCACCATG-**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 *Xba*I y *Not*I se muestran en minúsculas.

20 25 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: pClneoEREV (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 pClneo (Promega) que se obtuvo introduciendo el fragmento de *Eco*RI a *Sal*I 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 *Eco*RI y *Sal*I 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 pClneo. En las transfecciones en las que se omitió un plásmido de expresión de Rev, se usó en su lugar una masa similar de pClneo (Promega) (carriles marcados con pClneo). 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 antisero polyclonal 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.

40 45 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 *Sna*BI-*Not*I 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 pClneo, 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/GTAAG**ATG**, 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 5 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 (pClneoERev) (Figura 35) o con codones optimizados (pESYNREV) (Figura 36). Este resultado confirma la funcionalidad del plásmido de expresión de Rev con codones optimizados.

10 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-Ihyg 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.

20 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 transfecaron 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 35).

30 35 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.

40 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-Nhel 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-Nhel 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 AATTCAGG TAAG AT-GGGCGATCCCCTCACCTGG] y SD INVERSO [TTGGGTACTCCTCGCTAGGTTC]. 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 CAGGTAAAG, 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 transfecadas transitoriamente usando una versión a base de 45 50 55 60 65 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.

5 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 transfecaron 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 μm) y se titularon mediante transducción de D17, células de osteosarcoma canino, en presencia de 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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.

10 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).

15 20 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 *Hind*III presentes en *env*.

25 30 35 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.

40 45 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 llenas. 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.

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

55 60 65 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 transfecaron 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 *Nsi*I, se preparó pIRES1hygro para la unión con este fragmento mediante digestión con *Nsi*I, los extremos se recortaron mediante tratamiento con ADN polimerasa de T4, y después se digirieron con *Nsi*I. Antes de la transfección en células HEK 293, se digirió pIRES1hyg ESYNGP con *Ahd*I, que linealiza el plásmido.

65 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

5 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

10 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.

15 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

20 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.

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

30 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.

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

40 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.

45 50 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.

55 60 65 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 transfeció 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 transcrit o 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. Mebatison *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.
- 10 35. Kim, S. Y., R. Byrn, J. Groopman y D. Baltimore. 1989. *J. Virol.* 63:3708-3713.
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.
- 15 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.
- 10 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
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.
- 10 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.
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. Strelbel. 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.
- 55 72. Pollard, V. y M. Malim. 1998. *Annu. Rev. Microbiol.* 52:491-532.
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 aaaatataaa ttaaaacata tagtatggc aagcaggag 120
 ctagaacat tcgcagttaa tcctggcctg ttagaaacat cagaaggctg tagacaata 180
 ctggacagc tacaaccatc cttcagaca ggatcagaag aacttagatc attatataat 240
 acatagcaa ccctctattg tgcgtatcaa agatagaga taaaagacac caaggaagct 300
 ttagacaaga tagaggaaga gcaaaaacaaa agtaagaaaa aagcacagca agcagcagct 360
 gacacaggac acagcaatca ggtcagccaa aattacccta tagtgcagaa catccagggg 420
 caaatggtagc atcaggccat atcacctaga actttaaatg catggtaaa agtagtagaa 480
 gagaaggctt tcagcccaga agtgatacc ctttttcag cattatcaga aggagccacc 540
 ccacaagatt taaacaccat gctaaacaca gtggggggac atcaagcagc catcaaattg 600
 ttaaaagaga ccatcaatga ggaagctgca gaatggata gtagtgcattc agtgcattc 660
 gggcatttg caccaggcca gatgagagaa ccaagggaa gtgacatagc aggaactact 720
 agtacccttc aggaacaaat aggatggatg acaaataatc cacctatccc agtaggagaa 780
 atttataaaa gatggataat cttggattt aataaaatag taagaatgtt tagccctacc 840
 agcattctgg acataagaca aggaccaaag gaaccctta gagactatgt agaccggttc 900
 tataaaactc taagagccga gcaagcttca caggaggtt aaaaattggat gacagaaacc 960
 ttgttgcacaaaatgcgaa cccagattgt aagactattt taaaagcatt gggaccagcg 1020
 gctacactag aagaaatgtt gacagcatgt cagggagtag gaggacccgg ccataaggca 1080
 agagtttgg ctgaagcaat gagccaagta acaaattcag ctaccataat gatgcagaga 1140
 ggcaatttta ggaaccaaag aaagattgtt aagtgttca attgtggcaa agaaggcacc 1200
 acagccagaa attgcaggc ccttaggaaa aaggctgtt ggaaatgtgg aaaggaagga 1260
 caccaaatga aagattgttac tgagagacag gctaatttt taggaaagat ctggcattcc 1320
 tacaaggaa ggcaggaa ttcttcag agcagaccag agccaacagc cccaccagaa 1380
 gagagcttca ggtctgggt agagacaaca actccccctc agaagcagga gccgatagac 1440
 aaggaactgt atccttaac ttccctcagg tcactcttg gcaacgcacc ctcgtcacaa 1500
 taaagatagg gggcaacta aaggaagctc tattagatac aggagcagat gatacagtat 1560
 tagaagaaat gagtttgcga ggaagatgga aaccaaaaat gataggggaa attggaggtt 1620
 ttatcaaagt aagacagtat gatcagatac tcatagaaat ctgtggacat aaagctatag 1680
 gtacagtatt agtaggacat acacctgtca acataattgg aagaatctg ttgactcaga 1740
 ttgttgcac tttaatttt cccattagcc ctattgagac tgcgttcaaaatggac 1800
 caggaatgga tggccaaaaa gtaaacaat ggcattgac agaagaaaaa ataaaagcat 1860
 tagtagaaat ttgtacagag atggaaaagg aaggaaaaat ttcaaaaatt gggctgaaa 1920
 atccatacaa tactccagta ttgcataa agaaaaaaaaga cagtactaaa tggagaaaaat 1980
 tagtagatt cagagaactt aataagagaa ctcaagactt ctggaaaggta caattaggaa 2040
 taccacatcc cgcaaggta aaaaagaaaa aatcagtaac agtactggat gtgggtatg 2100
 catattttc agtccctta gatgaagact tcaggaagta tactgcatt accataccta 2160
 gtataacaa tgagacacca gggatttagat atcagtaaa tgcgttcca caggatgga 2220
 aaggatcacc agcaatattc caaagttagca tgacaaaaat cttagagctt tttagaaaaac 2280
 aaaatccaga catagttatc tatcaataca tggatgatgtt gtatgttaga tctgacttag 2340
 aaatagggca gcatagaaca aaaatagagg agctgagaca acatctgtt aggtggggac 2400
 ttaccacacc agacaaaaaa catcagaaag aacctccatt ctttggatg gtttatgaac 2460
 tccatcctga taaatggaca gtacagccata tagtgcgtcc agaaaaagac agctggactg 2520
 tcaatgacat acagaagttt gttttttttt tgaattggc aagtcagatt taccaggaa 2580

ttaaagtaag gcaattatgt aaactcctta gaggaaccaa agcactaaca gaagtaatac 2640
 cactaacaga agaagcagag ctagaactgg cagaaaaacag agagattcta aaagaaccag 2700
 tacatggagt gtattatgac ccatcaaaag acttaatagc agaaaatacag aagcaggggc 2760
 aaggccaatg gacatatacaa atttatcaag agccatttaa aaatctgaaa acaggaaaat 2820
 atgcagaatg gaggggtgcc cacactaatg atgtaaaaca attaacagag gcagtgc当地 2880
 aaataaccac agaaaagcata gtaatatggg gaaagactcc taaaatttaaa ctgcccatac 2940
 aaaaggaaac atgggaaaca tggggacag agtattggca agccacctgg attcctgagt 3000
 gggagtttgt taataccctt cccttagtga aattatggta ccagtttagag aaagaaccca 3060
 tagtaggagc agaaacccctc tatgttagatg gggcagctaa caggagact aaatttaggaa 3120
 aagcaggata tgttactaat agaggaagac aaaaagttgt cacccttaact gacacaacaa 3180
 atcagaagac tgagttacaa gcaatttata tagcttgca ggattcggga ttagaagtaa 3240
 acatagtaac agactcacaa tatgcattag gaatcattca agcacaacca gatcaaagtg 3300
 aatcagagtt agtcaatcaa ataatacago agttaataaaa aaaggaaaag gtctatctgg 3360
 catgggtacc agcacacaaa ggaattggag gaaatgaaca agtagataaa ttagtcagtg 3420
 ctggaatcag gaaagtacta ttttagatg gaatagataa ggcccaagat gaacatgaga 3480
 aatattcacag taattggaga gcaatggcta gtgattttaa cctgccacct gtagtagcaa 3540
 aagaaatagt agccagctgt gataaaatgtc agctaaaagg agaagccatg catggacaag 3600
 tagactgttag tccaggaata tggcaactag attgtacaca ttttagaaggaa aagtttatcc 3660
 tggtagcagt tcatgttagcc agtggatata tagaagcaga agttattcca gcagaaaacag 3720
 ggcaggaaac agcatatttt cttttaaaat tagcaggaag atggccagta aaaacaatac 3780
 atactgacaa tggcagoaat ttccccgggtc ctacggtag ggccgcctgt tgggtggcgg 3840
 gaatcaagca ggaatttggaa attccctaca atccccaaag tcaaggagta gtagaatcta 3900
 tgaataaaga attaaagaaa attataggac aggttaagaga tcaggctgaa catcttaaga 3960
 cagoagtaca aatggcagta ttcatccaca attttaaaag aaaagggggg attggggggt 4020
 acagtgcagg gggaaagata gtagacataa tagcaacaga catacaaact aaagaattac 4080
 aaaaacaaat tacaaaattt caaaaattttc gggtttatta cagggacagc agaaattcac 4140
 tttggaaagg accagcaaag ctccctctgga aaggtgaagg ggcagtagta atacaagata 4200
 atagtgcacat aaaagtatgt ccaagaagaa aagcaaagat cattagggat tatggaaaac 4260
 agatggcagg ttagtattgt gtggcaagta gacaggatga ggattag 4307

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

<220>
 <223> pSYNGP
 <400> 2

tcaatattgg ccattagccca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta 60
ttggccattg catacggtgt atctatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc 120
aatatgaccg ccatgttggc attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg 180
gtcatttagtt catagcccat atatggagtt cgcgttaca taacttacgg taaaatggcc 240
gcctggctga ccgcggcaacg acccccggcc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat 300
agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggttaaactgc 360
ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaagtccg ccccttattt acgtcaatga 420
cggttaaatgg cccgcctggc attatgcccc gtacatgacc ttacggact ttcttacttg 480
gcagtacate tacgtttagt tcatcgctat taccatggtg atgcgggttt ggcagtacac 540
caatggcggt ggatagcggt ttgactcagc gggatttcca agtctccacc ccattgacgt 600
caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaacaactg 660
cgatcgcccc ccccggttgcac gcaaaatgggc ggtaggcggt tacggtgaaa ggtctatata 720
agcagagctc gtttagtgaa ccgtcagatc actagaagct ttattgcgggt agtttatcac 780
agttaaattt ctaacgcagt cagtgccttct gacacaacag tctcgaactt aagctgcagt 840
gactctctta aggtgcctt gcagaagttt gtcgtgaggc actgggcagg taagtatcaa 900
ggttacaaga cagggtttaag gagaccaata gaaaactgggc ttgtcgagac agagaagact 960
cttgcgtttc tgataggcac ctattggctc tactgacatc cacttgcct ttctctccac 1020
aggtgtccac tcccagtctca attacagctc ttaaggctag agtacttaat acgactcaact 1080
ataggcttagc ctgcgagaatt cgccaccatg ggcgcggcgcg ccagcgtgtc gtcgggcccgc 1140
gagctggacc gctgggagaa gatccgcctg cgccccggcg gcaaaaagaa gtacaagctg 1200
aagcacatcg tggggccag ccgcgaactg gagcgcctcg ccgtgaaccc cgggctctg 1260
gagaccagcg aggggtgcgc ccagatcctc gccaactgc agcccaagctt gcaaaccggc 1320
agcggaggagc tgcgcagcct gtacaacacc gtggccacgc tgtactgcgt ccaccagcgc 1380
atcgaaaatca aggatacgaa agaggccctg gataaaaatcg aagaggaaca gaataagagc 1440

aaaaagaagg cccaacaggc cgccgcggac accggacaca gcaaccaggt cagccagaac 1500
taccccatcg tgcagaacat ccagggcag atggtgcacc aggcacatctc ccccccacg 1560
ctgaacgcct gggtaaggt ggtggaagag aaggcttta gcccggaggt gataccatg 1620
tttcagccc tgcagaggg agccacccccc caagatctga acaccatgtc caacacagt 1680
ggggacacc accgcgcct gcaagatctg aaggagacca tcaatgagga ggctggcga 1740
tggatctgt tgcacatcggt gcaacgcaggg cccatcgac cggggccagat gctgagcca 1800
cggggctcag acatcgccgg aacgactgt acccttcagg aacagatcg gttggatgacc 1860
aacaacccac ccatcccggt gggagaaatc tacaacacgt ggatcatctt gggcctgaac 1920
aagatctgtc gcatgtatag ccctaccagg atcctggaca tccgccaagg cccgaaggaa 1980
cccttcgcg actacgttga ccgggttctac aaaacgctcc ggcgcgagca ggctagccag 2040
gaggtgaaga actggatgac cggaaacccctg ctggccaga acgcgaaccc ggactgcaag 2100
acgatctgtc aggccctggg cccagcggtt acccttagagg aaatgtatgc cgcctgtcag 2160
ggagtggcgcg gaccgcgcgca caaggcacgc gtcctggctg aggccatgtt ccaggtgacc 2220
aactccgcta ccatcatgt gcaacgcggc aactttcgga accaacgcgaa gatgtcaag 2280
tgcttcaact gtggcaaaa agggcacaca gcccgcactt gcaaggcccc tagaaaaaag 2340
ggctgttggaa aatgtgaaa ggaaggacac caaatgaaag attgtactga gagacaggct 2400
aatttttttag ggaagatctg gccttccac aagggaaggc cagggaaattt tcttcagagc 2460
agaccagagc caacagcccc accagaagag agcttcaggt ttggggaaaga gacaacaact 2520
cccttcgcg aacggggatc gatagacaag gaactgtatc cttagcttc ctcagatca 2580
ctcttggca gcgacccttc gtcacaataa agataggggg gcaagtcgaaag gaggctctcc 2640
tggacaccgg agcagacgc accgtgtcg aggagatgtc gttggccaggc cgctggaagc 2700
cgaagatgtt cggggaaatc ggcgtttca tcaagggtcg ccagtatgtc cagatcctca 2760
tgcggatctg cggccacaag gctatcggtt ccgtgtcggtt gggccccaca cccgtcaaca 2820
tcatcgacgtt caaccctgtt acccgatgtc gttgcacgtt gaaacttcccc attagcccta 2880
tgcggatctg accgggttgcg ctgaagcccg ggtggacgg cccgaaggctt aagcaatggc 2940
cattgacaga ggagaagatc aaggcactgtt tggagatggt cacagatgtt gaaaaggaaag 3000
ggaaaatctc caagatggg cctgagaacac cgtacaacac gcccgtgtt gcaatcaaga 3060
agaaggactt gacgaaatgg cgcggatgtt gggacttccg cgagctgaaac aagcgcacgc 3120
aagacttctg ggaggttcag ctgggcaccc cgcacccccc gggctgaaag aagaagaaat 3180
ccgtgaccgtt actggatgtt ggtgtatgtt acttctccgt tccctggac gaagacttca 3240
ggaagttacac tgccttcaca atcccttgcg tcaacaacga gacacccggg attcgatata 3300
agtacaacgt gctccccccag ggctggaaag gctctcccg aatcttccag agtagcatga 3360
ccaaaatctt ggagccccc cgcggatgtt gggacttccg cgtcatctt cagatcatgg 3420
atgacttctg tgcggatctt gatctagata tagggcagca cccgcaccaag atcgaggagc 3480
tgcggccagca cctgttgcagg tggggactgtt ccacaccccgca caagaaggcac cagaaggagc 3540
ctcccttcctt ctggatgggt tacgagctgc accctgacaa atggaccgtt cagccatctg 3600
tgcgtccaga gaaagacagc tgactgtca acgacataca gaagctgggtt gggaaatttga 3660
actggccagc tcaagatttac ccaggatttta aggtgaggca gtcgtcaaa ctccctcccg 3720
gaaccaaggg actcacagag gtatccccca taacccgggaa ggcggatgtt gaaactggcag 3780
aaaaccggaa gatccctaaag gagcccgatgtt acggcgatgtt ctatgacccc tccaggacc 3840
tgcgtccaga gatccctaaag cagggggcaag gcccgtggac ctatcagatt taccaggagc 3900
cctcaagaa cctgaagacc ggcggatgtt ccggatgtt ggggtccccactaaccggacg 3960
tcaaggcagttt gaccggggcc gtcggatgtt tcaaccacca aacatcgatgtt atctggggaa 4020
agacttctaa gttcaagatgtt cccatccaga agggaaacccgtt gggaaacccgtt tggacagagt 4080
atggcaggcc cacctggatt cctgagttttt agttcgatgtt cacccttcctt ctggatggc 4140
tgcgttacca gtcgtggaaag gagccctatgtt tggggccggaa aacatcgatgtt gtggatgggg 4200
ccgcttaacag ggagactaag ctggggaaatcccgatgtt cactaaccgg ggcggatgtt 4260
agggtgtcac cctcaactgtt accaccaacc agaaggactgtt gtcgtggcc accatcgatgtt 4320
cttgcagga ctggggccgtt gaggttgcacca tgcgttgcacca ctctcgtt gcccctggca 4380
tcattcaagc ccagccagac cagatgttccgtt ccggatgtt caatcgatgtt atcgaggagc 4440
tgcgttacca gggaaatccgtt ttcgttgcacca ttcgttgcacca ctccctcccg 4500
atgagcaggtt cgacaaatccgtt gtcgtggccgtt gtcgttgcacca ttcgttgcacca 4560
tgcgttacca ccaggacggc caccatccgtt accacacccgtt ctggggccgtt atggatggc 4620
acttcaaccc ttcgttgcacca ttcgttgcacca ttcgttgcacca ttcgttgcacca 4680
tcaaggccgtt gacccatgtt gggccggccgtt ttcgttgcacca ttcgttgcacca 4740
gcacccatctt ggagggcaag gtatccgtt tagccgttca ttcgttgcacca ttcgttgcacca 4800
aggccggatgtt cttcccgcc gaaacacccgtt accacacccgtt ctggggccgtt atggatggc 4860
caggccgggtt gcccgtggaa accatccgtt ccggatgtt caatcgatgtt ttcgttgcacca 4920
cggtttaaggcc ggcctgttccgtt ttcgttgcacca ttcgttgcacca ttcgttgcacca 4980
cccaaggatgtt gggccgttccgtt gtcgttgcacca ttcgttgcacca ttcgttgcacca 5040
tcaagatgtt ggcgttccgtt ttcgttgcacca ttcgttgcacca ttcgttgcacca 5100
tcaaggccgtt gggggggatgtt ggggggttaca ttcgttgcacca ttcgttgcacca ttcgttgcacca 5160
cgaccggatgtt ccaggactaag gacgttgcacca accatccgtt ccggatgtt caatcgatgtt 5220
tctactacatgtt ggacacccgtt aatcccttcgtt gggccgttccgtt ttcgttgcacca 5280

gtgagggggc agtagtgatc caggataata gcgacatcaa ggtggtgcggc agaagaaaagg 5340
 cgaagatcat tagggattat ggcaaaacaga tggcgggtga tgattgcgtg gcgagcagac 5400
 aggatgagga ttaggaattt ggctagagcg gccgctccc tttagtgagg gttaatgttt 5460
 cgagcagaca tgataagata cattgtatgg tttggacaaa ccacaacttag aatgcagtga 5520
 aaaaaatgtt ttatgttgc aatttgcgtat gctattgttt tatttgtaac cattataagg 5580
 tgcaataaaac aagttaacaa caacaattgc attcatttt tggttcagggt tcagggggag 5640
 atgtggggg ttttttaaag caagtaaaaac ctctacaaaat gtggtaaaaat ccgataaagga 5700
 tcgatccggg ctggcgtaat aegcaagagg cccgcacccga tcgccttc caacagtgc 5760
 gcagcctgaa tggcgaatgg acgcgcctt tagcggcgca ttaagcgcgg cgggtgtgg 5820
 gttacgcgc aegcggtaccc ctacacttgc cagcgcctt ggcggcgtc ctttcgttt 5880
 ctccccctt tttctcgcca cgttgcggg ctttccccgt caagcttata atcgggggct 5940
 ccctttaggg ttccgattta gagcittacg gcacctcgac cgcaaaaaac ttgatttggg 6000
 ttagtgcgtca cgtatgggc catgccttgc atagacggtt ttgcgcctt tgacgttgg 6060
 gtcacgttc ttaatagtg gactttgtt ccaaactgg aacaacactca accctatctc 6120
 ggtctattt tttgatttt aaggatttt gccgatttcg gcttattggg taaaaaatgaa 6180
 gctgatattaa caaatattta acgcgaattt taacaaaata ttaacgttta caatttcgaa 6240
 ttagtgcggta ttttctcctt acgcatctgt gcggtatttc acacccgata cgccgatctg 6300
 cgccagcacca tggcctgaaa taacctctga aagaggaact tggtaggtt cttctgagg 6360
 cgaaaagaac cagctgttgc atgtgtgtca gttagggtgt gggaaagtccc caggctcccc 6420
 agcaggcaga agtagtgcata gcatgcattt caatttagtca gcaaccagggt gtggaaagtgc 6480
 cccaggctcc ccagcaggca gaagttatgc aagcatgcattt ctcattttttt cagcaaccat 6540
 agtcccgcgc ctaactccgc ccatccgc cctaaactccg cccagttccg cccatctcc 6600
 gccccatggc tgactaattt ttttattttt tgcagaggcc gaggccgcctt cggcccttgc 6660
 gctattccag aagtagtgag gaggctttt tggaggccta ggcttttgc aaaaagcttgc 6720
 ttcttctgac acaacagtct cgaacttaag gcttagagcc acaatgttgc acaagatgg 6780
 ttgcacgcag gttctccggc cgcttgggtg gagaggctat tggctatgc ctggccacaa 6840
 cagacaatcg gctgtctgc tgccgcgtg ttccggctgt cagcgcagggt ggcggcggtt 6900
 cttttgtca agaccgaccc gtcgggtgcctt ctqaatgaaac tgcaggacga ggcaggcg 6960
 ctatcggtgc tggccacgc gggcggttgc tgcgcagctg tgctcgacgt tgcactgaa 7020
 gcgccaaaggg actggctgtt attggggcgaat gtcgggggc agatcttgc tgcatttcac 7080
 cttgtctctg ccgagaaagt atccatcatg gtcgtatgc tgcggccgtt cgcatacgctt 7140
 gatccggcta cctggccattt cgaccacccaa gcaacatgc gcatcgagcg agcactact 7200
 cggatggaaag cccgtttgtt cgtatcgatg gatctggacg aagagcatca ggggtcg 7260
 ccagccgaac tggccggccat gtcggccat gtcgtatgc tgcggccgtt tgcgtcg 7320
 acccatggcg atgcgtctt gtcggccat gtcgtatgc atgggtggaa atggccgtt ttctgtattt 7380
 atcgactgtg gccggctggg tggccggac cgctatcgagg acatagcgat ggcgttccgt 7440
 gatattgtg aagagcttgc cggcgaatgg gtcggccgtt tcctcgatgtt ttacgttac 7500
 gcccgtcccg attcgcagcg catgccttgc ttcgcgttgc ttgcggccgtt ttcgttgc 7560
 ggactctggg gttcgaaatg accgaccaag cgacgcccac ctcgttgc tgcgtccgc 7620
 aataaaatat ctttattttt attacatctg tgggtttttt ttttgcgttgc atcgatagcg 7680
 ataaggatcc gctgtatggc cactctcgtt acaatctgtt ctgtatgcgc atagttaaagc 7740
 cagccccgac acccgccaaac acccgctgac ggcgcctgac gggcttgc ttcgttgc 7800
 tccgcttaca gacaagctgtt gaccgtctcc gggagatgc tgggttgc ttcgttgc 7860
 tcacacccga aacgcgcgag acgaaaggcc gtcgttgc ttcgttgc ttcgttgc 7920
 gtcgtatgaa taatgggttgc ttagacgtca ggtggcactt ttcggggaaa tggccggc 7980
 accccttattt gtttattttt ctaaatacat tcaaatatgtt atccgttcat gagacaataa 8040
 ccctgataaa tgcttcaata atattgaaaaa aggaagatgtt tgcgttgc acatttcgt 8100
 gtcggcccttta ttccctttt tgcggcattt tgccttcgtt ttttgcgttgc cccagaaacg 8160
 ctgtgtggaaag taaaagatgc tgaagatcg tgggttgcac gagggttttgc catcgactg 8220
 gatctcaaca gcggttaagat ctttgcgttgc ttcgttgc ttcgttgc ttcgttgc 8280
 agcacttttta aagttctgtt atgtggccgc gtttgcgttgc ttcgttgc ttcgttgc 8340
 caactcggtc gccgcataca ctattctcgtt gtcgttgc ttcgttgc ttcgttgc 8400
 gaaaagcattt ttacggatgg catgcgttgc agagaattt gtcgttgc ttcgttgc 8460
 agtgtataaca ctgcggccaa ctacttgc ttcgttgc ttcgttgc ttcgttgc 8520
 gcttttttgc ttcgttgc ttcgttgc ttcgttgc ttcgttgc ttcgttgc 8580
 aatgaagccaa taccaaacgc gtcgttgc ttcgttgc ttcgttgc ttcgttgc 8640
 ttgcgcacaaat tattttttttt ttcgttgc ttcgttgc ttcgttgc ttcgttgc 8700
 tggatggagg cggataaaatg ttcgttgc ttcgttgc ttcgttgc ttcgttgc 8760
 tttattgttgc ataaatctgtt atgggttgc ttcgttgc ttcgttgc ttcgttgc 8820
 gggccagatg gtaaggccctt ctcgttgc ttcgttgc ttcgttgc ttcgttgc 8880
 atggatgttgc gaaatagaca gtcgttgc ttcgttgc ttcgttgc ttcgttgc 8940
 ctgtcagacc aagtttactt ataaatctgtt atgggttgc ttcgttgc ttcgttgc 9000
 aaaaggatctt aagtttgc ttcgttgc ttcgttgc ttcgttgc ttcgttgc 9060
 ttttgcgttcc actgcgttgc agacccgtt gaaatgttgc ttcgttgc ttcgttgc 9120

tttttctgc gcgtaatctg ctgcttgaa aaaaaaaaaac caccgctacc agcgggtgtt 9180
tggggccgg atcaagagct accaactctt ttccgaaagg taactggctt cagcagagcg 9240
cagataccaa atactgtcct tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt caagaactct 9300
gtgcaccgc ctacataacct cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc 9360
gataagtcgt gtcttacccgg gttggactca agacgatagt taccggataa ggcgcagcgg 9420
tcgggctgaa cgggggggttc gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa 9480
ctgagataacc tacagcgtga gctatgagaa agcgccacgc ttcccgaagg gagaaaaggcg 9540
gacaggtatc cggtaagcgg cagggtcgga acaggagagc gcacgaggga gcttccaggg 9600
ggaaacgcct ggtatcttta tagtctgtc gggtttcgccc acctctgact tgagcgtcga 9660
tttttgtat gtcgtcagg ggggcggagc ctatggaaaa aegccagcaa cgccgcctt 9720
ttacggttcc tggcctttt ctggcctttt gtcacatgg ctcgacagat ct 9772

<210> 3

<211> 2571

5

<212> ADN

<213> Virus de la Inmunodeficiencia Humana

<400> 3

atgagagtga aggggatcg gaggaattat cagcaactggt ggggatgggg caogatgctc 60
 cttgggttat taatgatctg tagtgctaca gaaaaattgt gggtcacagt ctattatggg 120
 gtacctgtgt ggaaagaagc aaccaccact ctattttgtg catcagatgc taaagcatat 180
 gatacagagg tacataatgt ttgggccaca caagcctgtg tacccacaga ccccaaccca 240
 caagaagtag aattggtaaa tgtgacagaa aattttaca a tggaaaaaa taacatggta 300
 gaacagatgc atgaggatat aatcagttt tggatcaaa gcctaaagcc atgtgaaaa 360
 ttaacccac tctgtgtac tttaaattgc actgattga ggaatactac taataccaat 420
 aatagtactg ctaataacaa tagtaatagc gagggAACaa taaaggggagg agaaatgaaa 480
 aactgctt tcaatattcac cacaagcata agagataaga tgcagaaaga atatgcactt 540
 ctttataaac ttgatatagt atcaatagat aatgatagta ccagctatag gttgataagt 600
 t gtaatacct cagtcattac acaagcttgc ccaaagatat ccttgagcc aattccata 660
 cactattgtg ccccgctgg ttttgcatt ctaaaatgt acgataaaaaa gttcagtgg 720
 aaagatcat gtaaaaatgt cagcacagta caatgtacac atggaattag gccagtagta 780
 tcaactcaac tgctgttaaa tggcagtcta gcagaagaag aggttagtaat tagatctgag 840
 aatttcactg ataatgctaa aaccatcata gtacatctga atgaatctgt acaaattaat 900
 tgtacaagac ccaactacaa taaaagaaaa aggatacata taggaccagg gagagcattt 960
 tatacaacaa aaaatataat aggaactata agacaagcac attgtacat tagtagagca 1020
 aaatggaatg acactttaag acagatagtt agcaaaattaa aagaacaatt taagaataaa 1080
 acaatagtct ttaatcaatc ctcaggaggg gacccagaaa ttgtaatgca cagtttaat 1140
 tgtggagggg aatttttcta ctgtataca tcaccactgt ttaatagtac ttggaatgg 1200
 aataatactt ggaataatac tacagggtca aataacaata tcacacttca atgcaaaata 1260
 aaacaaatta taaacatgtg gcaggaagta ggaaaagcaa t gtaatgcccc tccattgaa 1320
 ggacaaatta gatgttcatc aaatattaca gggctactat taacaagaga tggtgtaag 1380
 gacacggaca cgaacgacac cgagatcttc agacctggag gaggagatat gaggacaat 1440
 tggagaagtg aattatataa atataaagta gtaacaattt aaccattagg agtagcaccc 1500
 accaaggcaa agagaagagt ggtgcagaga gaaaaagag cagcgtatgg agctctgttc 1560
 cttgggttct taggagcagc aggaagact atgggcgcag cgtcagtgc gctgacggta 1620
 caggccagac tattattgtc tggatagtg caacagcaga acaatttgc gaggggcatt 1680
 gagggcgaac agcatatgtt gcaactcaca gtctgggca tcaagcagct ccaggcaaga 1740
 gtcctggctg tggaaagata cctaaaggat caacagetcc tgggttttg gggttgtct 1800
 ggaaaactca ttgcaccac tactgtgcct tggatgcta gttggagtaa taaatctctg 1860
 gatgatattt ggaataacat gacctggatg cagtggaaa gagaatttgc caattacaca 1920
 agcttaatat actcattact agaaaaatcg caaaccacaa aagaaaagaaa tgaacaagaa 1980
 ttatttggat tggataaatg ggcaagttt tggatggat ttgacataac aaatttggctg 2040
 tggatataa aaatattcat aatgatagta ggaggcttgg taggttaag aatagtttt 2100
 gctgtacttt ctatagtgaa tagagttgg cagggatact caccattgtc gttcagacc 2160
 cgcggcccgat ttccgggggg acccgacagg cccgaaggaa tcgaagaaga aggtggagag 2220
 agagacagag acacatccgg tcgattagtg catggattct tagcaattat ctgggtcgac 2280
 ctgcggagcc tggatctt cagctaccac cacagagact tactcttgc tgcagcgggg 2340
 attgtggaaat ttctgggacg caggggggtgg gaagtccctca aatattggat gaaatctctt 2400
 cagtattggat gtcaggaact aaagagtagt gctgttagct tgcttaatgc cacagctata 2460
 gcagtagctg aggggacaga tagggttata gaagtactgc aaagagctgg tagagctatt 2520
 ctccacatac ctacaagaat aagacaggc 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

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

10 <220>
<223> pESYNGP
<400> 5

tcaatattgg ccatttagcca tattattcat tggttatata gcataaaatca atattggcta 60

ttggccattg catacggtgt atctatatca taatatgtac atttatattt gctcatgtcc 120
 aatatgaccg ccatgttggc attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg 180
 gtcattagtt catagccat atatggagt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc 240
 gcctggctga ccgccccacg acccccggcc attgacgtca ataatgacgt atgttccat 300
 agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggttaaactgc 360
 ccacttggca gtacatcaag tgcattatca gccaagtcgg ccccttattt acgtcaatga 420
 cggttaaatgg cccgcgttgc attatgccc gtaatgtacc ttacggact ttcttacttg 480
 gcagtacatc tacgtatttag tcatgttat taccatgggtg atgcgggtt ggcagtacac 540
 caatggcggt ggtatggcgt ttgactcagc gggatttcca agtctccacc ccattgacgt 600
 caatggaggt ttgtttggc accaaaatca acgggacttt caaaatgtc gtaacaactg 660
 cgatecgcccg ccccggttgc gcaaattggc ggttagggcgt tgcgttggg ggtctatata 720
 agcagagcgc gtttagtgaa ccgtcagatc actagaagct ttattgcggt agtttatcac 780
 agttaaattt ctaacgcagt cagtgtttt gacacaacag ttcgtcaact aagctgcagt 840
 gactcttta aggttgcctt gcaaaatgtt gtcgttgcg acggggcagg taagtatcaa 900
 ggttacaaga cagggttaag gagaccaata gaaactggc ttgtcgagac agagaagact 960
 ctgcgtttc tgataggcacttattttt tactgacatc cactttgcct ttcttccac 1020
 aggtgtccac tcccaggatc attacagtc ttaagcttag agtacttaat acgactcact 1080
 ataggctaga gaatttgcac ccattggcga tcccctcacc tggtccaaag ccctgaagaa 1140
 actggaaaaaa gtcacccgttcc agggtagcaca aaagcttacc acaggcaatt gcaactggc 1200
 attgtccctg gtggatctt tccacgcac taatttcgtt aaggagaaag attggcaact 1260
 cagagacgtt atccccctt tggaggacgt gacccaaaca ttgtctggc aggagcgcga 1320
 agcttcgag cgcacccgtt ggccatcag cgcgtcaaa atggggctgc aaatcaacaa 1380
 cgtgggttgc ggttaaagcta gcttcaact gtcggcgtt aagtacgaga agaaaaaccgc 1440
 caacaagaaa caatccgaac ctatcgagga gtacccaattt atgatcgacg ggcggcggca 1500
 taggaacttc cggccactga ctcccagggg ctataccacc tgggtcaaca ccattccagac 1560
 aaacggactt ttgaacgaag cctcccaagaa cctgttgcgc atcctgtctg tggactgcac 1620
 ctcccgaagaa atgaatgtt ttctcgacgt ggtgcagga caggctggac agaaacagat 1680
 cctgctcgat gcaatttgcata agatcgccga cgactggat aatcgccacc ccctgcca 1740
 cggccctctg gtggctcccc cacagggggc tatccctatg accgcttagt tcattagggg 1800
 actgggggtt ccccgcaac gcaatgtt ggcagcattt gaccaatttta ggcagaccta 1860
 cagacagtgg atcatcgaaatccatgatcgatc ggggattaaa gtcgtatcg gaaagccaa 1920
 ggcacagaaac atcaggcagg gggccaaggaa accataaccctt ggtttgtcg acaggcttct 1980
 gtcccagatt aaatccgaag gcaaccctca ggagatctcc aagttcttga cagacacact 2040
 gactatccaa aatgcataatg aagagtgcag aaacgccttgcg aggacactca gacgttca 2100
 taccctggag gagaaaatgt aegcatgtcg cgacatttgcg actaccacaa aaaaagatgt 2160
 gctgctcgcc aaggctctgc aaaccggcctt ggctggcata ttcaaaaggag ggcactgaa 2220
 gggaggttca ttgaaagctg cacaacatgtt ttataattgtt gggaaagccag gacatttttc 2280
 tagtcaatgt agagcaccta aagtctgttt taaatgtaaa cagcctggac atttctcaaa 2340
 gcaatgcaga agtgttccaa aaaacgggaa gcaaggggctt caagggaggc cccagaaaca 2400
 aactttcccg atacaacaga agagtgcac caacaaatctt gttgtacaatg agactctca 2460
 gactcaaaat ctgttaccccg atctgagcga aataaaaaaaatgaaataatgt tcaaggagaa 2520
 ggtcaagta gaggatctca acctggacatg tttgtggag taacatacaa tctcgagaag 2580
 agcccaacta ccattgttca gatcaatgcac acccccttta atgtgttgcg ggacaccggc 2640
 gccgacacca gcttctcacttactgatcgatc tataacagac tggaaatatacg aggaaggaaa 2700
 taccaggggca caggcatcat cggcggttggc ggcaacgtcg aaaccttttc cactctgtc 2760
 accatcaaaa agaaggggag acacattaaacc accagaatgc tggtcggcga catccccgtc 2820
 accatccttgc gcaagacat ttcaggacat cttggcgatc aactcgatcg ggcacaactg 2880
 tctaaggaaa tcaagttccg caagatcgatc ctgaaagagg gcacaatggg tccaaaaatc 2940
 ccccaacttgc ccctgaccaaa agagaagctt gggggcgatc agggaaatctgtt gcaaggccctg 3000
 ctttctgttgc gcaagatgtt cggggccatc gacaataacc cttacaacatc ccccatctt 3060
 gtgatataaga aaaggagccg caaatggaga ctccctgcagg acctggggaa actcaacaag 3120
 accgttccagg tggaaacttgc gatctctcgatc ggactgttgc accccggccg cctgattttt 3180
 tgcacatcgatc tgacatgttgc gacgttattt ttaccatccc cctcgatctt 3240
 gaatttgcgc cctataactgc ttttaccatc cccagcatca atcaccatgg gcccataaaa 3300
 cgctatgtgtt ggaatgttgcctt ccccccaggaa tttgtgttgc gccccttacat ttaccatgg 3360
 aacttcaagatc acatcgatc acccttccgc gaaagatacc cagagggttca actctacaa 3420
 tatatggacatc acctgttcatt ggggttccaaac ggggttcaaga agcagcacaatg ggaactctatc 3480
 atcgatcgatc gggcaatctt cctggggatggaaatggatc ggttgcgatc caccggacatc caagctgcac 3540
 gaagtttccctt catatgttgc gttgggttgc cagtttgcctt cttggggatggaaatggatc gaaagtccatc 3600
 aagatcgatc tggatatgtt caagaacccaa acactgttgc ggttgcggc gtcatggc 3660
 aatattacatc ggtatgttgc cggaaatccatc gggcttaccatc ttaagtcacat tgcggcaact 3720
 acaaaaaggat gcttggatggatc gaaatggatggatc gtcatttgc gttggggatggatc gaaatggatc 3780
 ctggaggaga ataatggatggatc gtcatttgc tccaaatacta caatccccgaa 3840
 gaagaaatgtt tggatgttgc gaaatcttgc aagacttgc gtcatggc 3900

cagtccaaag gcattttgtg ggcggaaaag aaaatcatga aggccaaaca aggctggtoc 3960
accgttaaaa atctgatgt cctgctccag cacgtcgcca ccgagcttat caccgcgtc 4020
ggcaagtgcc ccaccttcaa agttcccttc actaaggagc aggtgatgtg ggagatgcaa 4080
aaaggcttgt actactctt gcttcccgag atcgcttaca cccaccaagt ggtcacgac 4140
gactggagaa tgaagcttgt cgaggagccc actagcgaa ttacaatcta taccgacggc 4200
ggaaagcaaa acggagaggg aatcgctgca tacgtcacat ctaacggccg cacaagcaa 4260
aagaggctcg gcctgtcac tcaccagggt gctgagagga tggctatcca gatggccctt 4320
gaggacacta gagacaagca ggtgaacatt gtgactgaca gctactactg ctggaaaaac 4380
atcacagagg gccttggcct ggagggaccc cagtctccct ggtggcttat catccagaat 4440
atcccgaaaa agggaaattgt ctatttcgcc tgggtgcctg gacacaaaagg aatttacggc 4500
aaccactcg ccatgaaagc cgccaaaatt aaagaggaaa tcatgcttgc ctaccagggc 4560
acacagatta aggagaagag agacgaggac gctggcttgc acctgtgtgt gccatacgac 4620
atcatgattc cggtagcga cacaagatc attccaaccc atgtcaagat ccaggtgcac 4680
cccaattcat ttgggtgggt gaccggaaag tccagcatgg ctaagcaggg tcttctgatt 4740
aacggggaa tcattgtga aggatacacc ggcgaaatcc aggtgatctg cacaatatac 4800
ggcaaaagca atattaagct tatkgaaggg cagaagttcg ctcaactcat catcctccag 4860
caccacagca attcaagaca accttggac gaaaacaaga ttagccagag aggtgacaag 4920
ggcttcggca gcacaggtgt gttctgggt gagaacatcc aggaagcaca ggacgagcac 4980
gagaattggc acacccccc taagatttg gcccgcattt acaagatccc actgactgt 5040
gctaaggaga tcacacagga tgcacccac tgcacccaaac aaggttctgg cccggccggc 5100
tgcgtatga ggtcccccac tcaactgcag gcagatttca cccacccctga caacaaaatt 5160
atccctgaccc tcgtggagag caattccggc tacatccacg caacactctt ctccaaggaa 5220
aatgcattgt gcaactccct cgcaattctg gaatgggcca ggctgttctc tccaaaatcc 5280
ctgcacaccc acaacggcac tcaacttgcg gctgaacccctg tggtaatctt gctgaagttc 5340
ctgaaaatcg cccacaccac tggcatccc tatkccctg aaagccaggg cattgtcgag 5400
agggccaaaca gaactctgaa agaaaagatc caatctcaca gagacaatac acagacattt 5460
gaggccgcac ttcagctcgc ctttatcacc tgcacccaaag gaagagaaag catggggggc 5520
cagaccctt gggaggctt catcaactaac caggcccgag tcatccatga aaagctgctc 5580
ttgcagcagg cccagtcctc caaaaagttc tgcctttata agatccccgg tgagcacgac 5640
tggaaaggc tcacaagagt gttgtggaa ggagacggcg cagttgtgtt gaacgatgag 5700
ggcaagggga tcatcgctgt gcccctgaca cgcaccaagg ttctcatcaa gccaaactga 5760
acccggggcg gcccgttcc ttagtgagg gtaatgtt cggcagacca tgataagata 5820
cattgtatgg tttggacaaa ccacaactag aatgcagttt aaaaatgt ttatttgc 5880
aatttgcatt gctattgtt caaatgttca cattataagg tgcaataaaac aagttaacaa 5940
caacaaatgc attcatttt tggtaggtt ctagggggag atgtgggggat tttttaaag 6000
caagtaaaaac ctctacaaat gtggtaaaaatcc cggataaggc tggatccggg ctggcgtat 6060
agcgaagagg cccgcacccg tggcccttc caacagttc gcagctgaa tggcaatgtt 6120
acgcgcctc tagggcgca ctacacttgc cagcccttca gcccgttcc ttccctcc 6180
cggccgttcc cttcccccgtt caagcttcaa atcgggggat ccctttaggg ttccgatatt 6240
gagcttacg gcacccctgac ttaagcgggg cgggtgttgc gtttacgcgc acgcgtgacc 6300
catcgccctg atagacggtt gactcttgc cccagcttcc tttcccttcc 6360
tttcgcctt tgacgttgc gtcacgttca gtttacgttgc tttatagtg 6420
gactcttgc cccaaactgga acaacactca acctatctc ggttattct ttttgcattt 6480
aagggatttt gccgatttgc gcttattgtt taaaaatgt gctgatattaa caaatattta 6540
acgcgaattt taacaaaata ttaacgttta caatttcgc ttagtgcgtt ttttcttcc 6600
acgcattctgt gcggtatttc taaaccttgc acaacactca acctatctc ggttattct ttttgcattt 6660
taaccttgc aagaggaact ggtttaggtt ctttgcatttgc tggaaaggatcc cggccatggc 6720
atgtgtgtca gtttaggtgt ggaaagttcc caggctcccc agcaggcaga agtgcaccc 6780
gcatgcattt caatttgcgaa gcaaccagggtt gttggaaagtc cccagctcc ccagcaggca 6840
gaagtatgca aagcatgcat ctcattttgc cccagttcc cccatttgc gcccatttgc tgactaattt 6900
ccatcccgcc cctaacttgc tttttatgtt tgccagaggcc gaggcccttgc gcttattccag aagtagttag 7020
gaggctttt tggaggccca ggttttgcgaaa aaaaatgttgc ttcttctgac acaacacttgc 7080
cgaaacttgc gcttagagccca ccatgatttgc acaagatgttgc ttgcacgcag gtttctccggc 7140
cgcttgggtt gagaggctat tggctatgtt cttggccacaa cagacaatcg gtttgcatttgc 7200
tgccgcctgttcccttgc gcttgcatttgc tggcccttgc gggcccttgc tttttgtca agaccgaccc 7260
gtccgggttcccttgc gcttgcatttgc tggcccttgc gggcccttgc tttttgtca gatccggctt 7320
gggggttcccttgc gcttgcatttgc tggcccttgc gggcccttgc tttttgtca gatccggctt 7380
atggggcgaa gtggccggggc aggatcttgc gtcatttgc gatccggctt 7440
atccatcatg gtcatttgc gtcggccgtt gtcatttgc gatccggctt 7500
cgaccacccaa gggaaacatc gcatcgatgc agcactacttgc 7560
cgatcaggat gatctggacg aagagcatca ggggttgcggc ccagccgaac ttttgcatttgc 7620
gctcaaggcgccatccatg gtcatttgc gtcggccgtt gtcatttgc accccatggc gatccggctt 7680
qccqaatatac atgggtqaaa atggcccttgc ttttgcatttgc attcactgttgc ggggggttgggg 7740

tgtggccggac	cgttatcagg	acatagcgtt	ggctaccgg	gatattgctg	aagagcttgg	7800
cggcgaatgg	gctgaccgct	tcctcggtct	ttacggtata	gcgcgtcccg	attcgcagcg	7860
catcgcccttc	tatcgcccttc	ttgacgagtt	cttctgagcg	ggactctggg	gttcgaaatg	7920
accgaccaag	cgacgccccaa	cctgccccatca	cgatggccgc	aataaaatat	ctttatTTTC	7980
attacatctg	tgtgttggtt	ttttgtgtga	atcgatagcg	ataaggatcc	cggtatggtg	8040
cactctcagt	acaatctgct	ctgatgccgc	atagttaa	cagccccgac	acccgccaac	8100
acccgctgac	gccccctgac	gggcttgc	gctccggca	tccgcttaca	gacaagctgt	8160
gaccgtctcc	gggagctgca	tgtgtcagag	gttttacccg	tcataccga	aacgcgcgag	8220
acgaaagggc	ctcggtata	gcctattttt	ataggttaat	gtcatgataa	taatggttc	8280
tttagacgtca	gggtggcactt	ttcggggaaa	tgtgcggga	accccttattt	gtttatTTTT	8340
ctaaaatacat	tcaaataatgt	atccgctcat	gagacaataa	ccctgataaaa	tgcttcaata	8400
atattgaaaa	aggaaagagta	tgagtattca	acatttccgt	gtcgccctta	tccctttt	8460
tgcggcattt	tgccttcctg	tttttgc	cccagaaacg	ctggtaaag	taaaagatgc	8520
tgaagatcag	ttgggtgcac	gagtgggtt	catcgaaact	gatctcaaca	gcggtaagat	8580
cottgagagt	tttcggcccg	aagaacgttt	tccatgat	agcactttt	aagttctgt	8640
atgtggcgcg	gtattatccc	gtattgacgc	cgggcaagag	caactcggtc	gccgcataca	8700
ctattctcag	aatgacttgg	ttgagttactc	accagtca	gaaaagcatc	ttacggatgg	8760
catgacagta	agagaattat	gcagtgc	cataaccat	agtgataaca	ctggcccaa	8820
cttacttctg	acaacgatcg	gaggaccgaa	ggagctaacc	gttttttgc	acaacatggg	8880
ggatcatgta	actcgccctt	atcggtggg	accggagct	aatgaagcca	taccaaaca	8940
cgagcgtgac	accacgatgc	ctgttagcaat	ggcaacaacg	ttgcgcaaaac	tattaactgg	9000
cgaactactt	actctagctt	cccgcaaca	attaatagac	tggatggagg	cggataaaagt	9060
tgcaggacca	tttctgcgt	cgcccccttc	ggctggctgg	tttattgctg	ataaatctgg	9120
agccggtgag	cgtgggtctc	gccccatcat	tgcagact	gggcccagat	gtaaagccctc	9180
ccgtatcgta	gttatctaca	cgacggggag	tcaggcaact	atggatgaac	gaaatagaca	9240
gatcgctgag	ataggtgcct	cactgattaa	gcattggtaa	ctgtcagacc	aagtttactc	9300
atataatactt	tagattgatt	taaaacttca	tttttaattt	aaaaggatct	aggtaagat	9360
cctttttgtat	aatctcatga	ccaaaatccc	ttaacgtgag	ttttcggtcc	actgagcg	9420
agaccccgta	gaaaagatca	aaggatctt	ttgagatct	tttttctgc	gcgtatctg	9480
ctgcttgc	aaaaaaaac	cacccgttacc	agcgggtgg	tgttgcgg	atcaagagct	9540
accaactctt	tttccgaagg	taactggctt	cacccgttacc	atactgtct	gtacatcac	9600
tctagtgttag	ccgttagtt	gccaccactt	caagaact	gtacatcac	gtacatcac	9660
cgctctgtca	atccctgtac	cagtggctgc	tgccagtggc	gataagtcgt	gtcttaccgg	9720
gttggactca	agacgatagt	tacccggataa	ggcgcagcgg	tcgggctgaa	cgggggggtc	9780
gtgcacacag	cccaagcttgg	agcgaacgcac	ctacaccgaa	ctgagatacc	tacagcgt	9840
gctatgagaa	agcgcacgc	ttcccgaaagg	gagaaaggcg	gacaggtatc	cggtaagcgg	9900
cagggtcgga	acaggagagc	gcacgaggga	gttcccgagg	ggaaacgcct	ggtatctt	9960
tagtctgtc	gggtttcgcc	acctctgtact	tgagcgtcga	tttttgc	gtctcg	10020
ggggcggagc	ctatggaaaa	acgcccacaa	cgccggctt	ttacggtcc	tggccctt	10080
ctggcccttt	gctcacatgg	ctcgacagat	ct			10112

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

10 <220>
<223> LpESYNGP

<400> 6

tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta 60
ttggccattt catacgtgt atctatatca taatatgtac atttatattt gctcatgtcc 120
aatatgaccg ccatgttggc attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg 180
gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaaatggccc 240
gcctggctga cggcccaacg acccccgccc attgaegtca ataatgacgt atgttccat 300
agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc 360
ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaagtccg ccccctattt acgtcaatga 420
cggtaaatgg cccgcctggc attatgcccgttacatgacc ttacgggact ttcctacttg 480
gcagtacatc tacgtatttag tcatcgctat taccatggtg atgcgggtttt ggcagtgacac 540
caatggcgt ggatagcggt ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt 600
caatggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt caaaaatgtc gtaacaactg 660
cgatcgcccg ccccggttgac gcaaatggc ggttaggcgtg tacgggtggga ggtcttatata 720
agcagagctc gtttagtcaa ccgtcagatc actagaagct ttattgcggg agtttatcac 780

agttaaattt ctaacgcagt cagtgcctt gacacaacag ttcgcactt aagctgcagt 840
 gactcttta aggttagcctt gcagaagttt gtcgtgaggg actggggagg taagtatcaa 900
 ggttacaaga cagggttaag gagaccaata gaaactggc ttgtcgagac agagaagact 960
 cttgcgttcc ttagatggcac ctatggct tactgacatc cactttgcct ttctctccac 1020
 aggtgtccac tcccaggtaa attacagctc ttaaggcttag agtacttaat acgactca 1080
 ataggctaga gaattcgaga ggggcgcaga ccctacatgt tgaacctggc tgatcgtagg 1140
 atccccggg cagcagagga gaacttacag aagtcttctg gaggtgttcc tggccagaac 1200
 acaggaggac aggttaagatg ggcgatcccc tcacctggtc caaagccctg aagaactgg 1260
 aaaaagtcaac cgttcagggt agccaaaaggc ttaccacagg caattgcaac tgggcattgt 1320
 ccctgggtgg tctttccac gacactaatt tcgttaagga gaaagattgg caactcagag 1380
 acgtgatccc cctcttggag gacgtgaccc aaacattgtc tggcaggag cgcaagctt 1440
 tcgagcgcac ctggtggcc atcagcgcag tcaaaatggg gtcgcaaatc aacaacgtgg 1500
 ttgacggtaa agctagctt caactgctcc ggcgtaagta cgagaagaaa accgccaaca 1560
 agaaacaatc cgaacccatgc gaggagttacc caattatgtt cgacggcgcg ggcaatagga 1620
 acttccggcc actgactccc aggggctata ccacccctgtt caacaccatc cagacaaacg 1680
 gacttttggaa cgaagccccc cagaacccatgt tcggcatcct gtctgtggac tgcacccctcg 1740
 aagaatgaa tgcttttcc gacgtgggtc caggacaggc tggacagaaa cagatcctgc 1800
 tcgatgccc tgcataatgc ggcgacact gggataatcg ccacccctgtt ccaaaacgccc 1860
 ctctgggtgg tccccccacag gggcctatcc ctatgaccgc taggttcatg aggggactgg 1920
 ggggtcccccg cgaaccccgat atggagccag catttgcacca attaggcag acctacagac 1980
 agtggatcat cgaaggccatgc agcgaggggta taaaatgtcat gatcgaaaag cccaaaggcac 2040
 agaacatcag gcaggggggc aaggaacat accctgatgt tgccgacactt ctctgttccc 2100
 agattaaatc cgaaggccac cctcaggaga tcttcaagttt cttgcacagac acactgacta 2160
 tccaaaatgc aaatgaagag tgcaaaaaacg ccatgaggca cctcagaccc gaagataccc 2220
 tggaggagaa aatgtacgca tgccgcacca tggcactact cagcaaaaatc atgatgtgc 2280
 tcgccaaggc tctgcaccc ggcctggctg gtccattcaaa agggaggca ctgaaggggag 2340
 gtcattgaa agtgcaccaaa acatgttata attgtggaa gccaggacat ttatctgtc 2400
 aatgttagagc acctaagtc tttttaaat gtaaaacagcc tggacatttc tcaaagcaat 2460
 gcagaagtgt tccaaaaaac ggaagcaag gggctcaagg gaggccccag aaacaaactt 2520
 tcccgatatac adagaagatc cagcacaaca aatctgttgc acaagagact cctcagactc 2580
 aaaaatctgtt cccagatctg agcggaaataa aaaaggaaataa caatgtcaag gagaaggatc 2640
 aagtagagga tctcaacccctg gacagttgtt gggagtaaca tacaatctg agaagaggcc 2700
 cactaccatc gtcctgatca atgacaccccc tcttaatgtc ctgcggaca ccggagccga 2760
 caccagcgat ctcactactg ctcaactataa cagactgaaa tacagaggaa ggaaatacc 2820
 gggcacaggc atcatcgccg tggaggca cgtcggaaacc tttccactc ctgtcaccat 2880
 caaaaagaag gggagacaca taaaaccag aatgtggc gcccacatcc ccgtcaccat 2940
 cctggcaga gacatttcc aggacctggg cgctaaactc gtgcggcac aactgtctaa 3000
 ggaatcaag ttccgcaaga tcgagctgaa agagggcaca atgggtccaa aaatccccca 3060
 gtggccctg accaaagaga agcttgaggc cgcttaaggaa atctgtcage gcctgtttc 3120
 tgagggcaag attagcgagg ccagcgacaa taacccttac aacagccccca tctttgtat 3180
 taagaaaagg agcggcaaat gggacttgc gcaggacctg agggactca acaagaccgt 3240
 ccagggtcgga actgagatct ctcgcggact gcctcaccctt ggccggctga taaaatgc 3300
 gcacatgaca gtcattgaca tggagacgc ttatccatc atccccctcg atctgtcaatt 3360
 tcgccccctat actgttttca ccatccccatc catcaatcact caggagccccg ataaacgcta 3420
 tgggtggaaat gtcctcccccc agggattttgt gtcattttcc tacatttacc agaagacact 3480
 tcaagagatc ctccaaatctt tccgcggaaat atacccttgc gttcaactctt accaatat 3540
 ggacgacactg ttcatgggg tccacgggtc taagaagcag cacaagggaaat tcattcatcga 3600
 actgaggggca atcctcttgg agaaaaggctt cgagacaccc gacgacaagc tgcaagaat 3660
 tcctccatat agctggctgg gtcattttgc ttgccttgc aactggaaat tccagaagat 3720
 gcagttggat atggtcaaga acccaacactt gaaacgacgtc cagaagctca tggcaat 3780
 tacctggatg agctccggaa tccctggctt taccgttaag cacattggcgg caactacaaa 3840
 aggtatgcctg gagttgaacc agaaggctt tggacagag gaaagctcaga aggaactgg 3900
 ggagaataat gaaaagatc agaatgtca agggctccaa tactacaatc ccgaagaaga 3960
 aatgttgtc gaggtcgaaa tcaactaagaa ctacgaagcc acctatgtca tcaaacagtc 4020
 ccaaggccatc ttgtggcccg gaaagaaaaat catgaaggcc aacaaaggctt ggtccaccgt 4080
 taaaaatctg atgtctctgc tccagcactgt cgccaccggat tctatccatc ggtcgccaa 4140
 gtggcccccacc ttcaaaatgtt ctttcactaa ggagcagggt atgtgggaga tgcaaaaagg 4200
 ctgttactac tcttgcatttcc cctcaggatctt ctacaccatc caagtggcgc acgacactg 4260
 gagaatgaag ctgtcgagg agcccaactt cggattaca atctataccg acggggggaaa 4320
 gcaaaaacggc gagggaatcg ctgcataatgtt cccatctaaac ggccgcacca agcaaaagag 4380
 gctcgccctt gtcactccacc aggtggctga gaggatggctt atccagatgg cccttggag 4440
 cactagagac aagcaggatgtt acattgttgc tgacagactac tactgttggaa aaaaatccac 4500
 agagggccctt ggcctggagg gaccccaactt tccctggctt octatccatc agaataatccg 4560
 cgaaaaaggaa attgtcttatt tcgcctgggtt gtcctggacac aaaggaattt acggcaacca 4620

actcggccgat gaagcccgcca aaattaaaga ggaatcatcg ctgccttacc agggcacaca 4680
gattaaggag aagagagacg aggacgctgg ctttgacctg tgggtccat acgacatcat 4740
gattcccggtt agcgacacaa agatcattcc aaccgatgtc aagatccagg tgcaccccaa 4800
ttcattttgtt tgggtgaccg gaaagtccag catggctaag cagggtcttc tgattaaacgg 4860
gggaatcatt gatgaaggat acaccggcga aatccagggtg atctgcacaa atatcgccaa 4920
aagcaatatt aagcttatcg aaggcagaa gtgcgtcaa ctcatcatcc tccagcacca 4980
cagcaattca agacaacctt gggacgaaaa caagattagc cagagaggtg acaagggtt 5040
cgccagcaca ggtgttctt gggtgagaa catccaggaa gcacaggacg agcacgagaa 5100
ttggcacacc tcccttaaga ttttggccg caattacaag atcccactga ctgtggctaa 5160
gcagatcaca caggaatgcc cccactgcac caaaacaaggt tctggcccg cccgctgcgt 5220
gatgagggtcc cccaaatcaact ggcaggcaga ttgcacccac ctcgacaaaca aaattatct 5280
gaccctcggt gagagcaatt cccgtacat ccacgcaaca ctcctctcca agggaaatgc 5340
attgtgcacc tccctcgcaa ttcttggaaatg ggccaggctg ttctctccaa aatccctgca 5400
caccgacaac ggcaccaact ttgtggctga acctgtggtg aatctgtga agttctgaa 5460
aatcgcccac accactggca ttccctatca ccctgaaage cagggcattt cgagagggc 5520
caacagaact ctgaaagaaa agatccaatc tcacagagac aatacacaga cattggagc 5580
cgcaacttcag ctgcddcttia tcacctgcaa caaaggaaga gaaagcatgg gcccacagac 5640
cccctgggag gtcttcatca ctaaccaggc ccaggctcatc catggaaagc tgctcttgc 5700
gcaggcccag tcctccaaaaa agttctgtt ttataagatc cccggtgagc acgactggaa 5760
aggctctaca agagttttgt gggaaaggaga cggcgcagtt gtggtaacg atgagggcaa 5820
ggggateatc gctgtgeccc tgacacgcac caagcttctc atcaagccaa actgaacccg 5880
gggcggccgc ttccctttag tgagggttaa tgcttgcagc agacatgata agatacattt 5940
atagagtttg acaaaccaca actagaatgc agtaaaaaaaaa atgctttatt tggaaattt 6000
gtgatgtat tgctttattt gtaaccatta taagctgcaa taaaacaagtt aacaacaaca 6060
attgcattca tttatgttt caggttcagg gggagatgtg ggagggtttt taaagcaagt 6120
aaaacctcta caaatgttgtt aaaaatccgat aagatcgat cccggcttgc gtaatagcga 6180
agaggcccgc accgatcgcc cttcccaaca gttgcgcagc ctgaatggcg aatggacgcg 6240
ccctgttagc ggcatttaag cgggggggt gtgggtgtt cggcagcgt gaccgctaca 6300
cttgcacagc cccatgcgc cgttcttcc gtttttttcc cttcccttct cggccacgtt 6360
gcccgttcc cccgtcaagc totaaatcgg gggctccct tagggtccg atttagact 6420
ttacggcacc tgcacccgcaa aaaactttagt ttgggtgtat gttcaagttag tggccatcg 6480
ccctgataga cggtttttcg cccttgcacg ttggagttca cgttctttaa tagtggact 6540
ttgttccaaaa ctgaaacaac actcaacccct atctcggtct attcttttga ttataaagg 6600
attttgcga ttccggcta ttggttaaaa aatgagctga tttaaacaat attaacgcg 6660
aattttaaaca aaatattaaac gtttacaatt tgcctgtat cggatatttc tcttacgc 6720
tctgtcggtt attcacacc gcatacgegg atctgcgcag caccatggcc tgaataaacc 6780
tctgtaaagag gaacttgggtt aggtacccctc tgaggcgaa agaaccagct gtggatgtg 6840
tgtcagttag ggtgtggaaa gttcccgagc tcccccagc gcaagatgtat gcaacccatc 6900
catctcaatt agtcagcaac cagggtgtgga aagtccccag gcccctaacc tccgcccatt 6960
atgcaaaagca tgcatttcattt ttagtcagca accatagtc atggctgact aattttttt 7020
ccggccctaa ctcgcggccag ttcggcccat tttccggcccc atggctgact aattttttt 7080
atttatgcag agggcgaggc cggcttcggcc tctgagctat tccagaagta gtgaggagc 7140
ttttttggag gcttaggtt ttgcaaaaag cttgattttt ctgacacaac agtctcgaac 7200
ttaaggcttag agccacatg attgaacaag atggattgca cgcagggttct cggcccgctt 7260
gggtggagag gctattccgc tatgacttggg cacaacagac aatcggtgc tctgatgcg 7320
ccgtgttccg gctgtcagcg caggggcgcc cgggtttttt tgcacccatc gacccatc 7380
gtgcctcgaa tgaactgcag gacgaggcag cggggctatc gttccggcc tggctggcc 7440
ttccttgcgc agctgtgtc gacgttgcac ttgaagccgg aaggactgg ctgtatttg 7500
gcgaagtgc gggcaggat ctctgtcat ctcaaccttgc tcttgcgag aaagttatcca 7560
tcatggctga tgcattgcgg cggctgcata cgttgcattt ggttacccatc 7620
accaagcgaa acatcgatc gagcgagcac gtactcgat ggaagccggt ctgtgcgatc 7680
aggatgtatct ggacgaagag catcaggggc tgcgcacccg cgaactgttcc gccaggctca 7740
aggcgccat gcccgcacggc gaggatctcg tcgtgaccca tggcgatgcc tgcgttgcga 7800
atatcatggt gaaaaatggc cgctttctg gatcatcgat tgcacccatc 7860
cgaccgcta tcaaggacata gctgtggcta cccgtatcatc tgcacccatc 7920
aatggctga cccgttctc gtgttttacg gtatcgccgc tcccgattcg cagcgatcg 7980
ccttctatcg cttcttgcac gaggatctcg gageggact tggggttcg aaatgaccga 8040
ccaagcgacg cccaaacctgc catcagatc ggcacataa aatatctta tttcattac 8100
atctgtgtt tggttttttt tgcgttgcata tagcgataag gatccgcgtt tgggtgcactc 8160
tcagtacaat ctgtctgtat gccgcataatg taagccagcc cggacacccg ccaacacccg 8220
ctgacgcgc ctcgacgggtt tgcgttgcac cggcatccgc ttacagacaa gctgtgaccg 8280
tctccggag ctgcattgtgtt cagagggtttt caccgtcatc accgaaacgc gcgagacgaa 8340
agggcctcgat gatacgccat ttttataagg ttaatgtcat gataataatg gttctttaga 8400
cgtcaggtgg cacttgcq gggaaatgtqc qcggaaacccc tatttgcattt ttttctaaa 8460

tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg ataaatgctt caataatatt 8520
 gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt tccgtgtcgcc ccttattccc tttttgcgg 8580
 catttgcct tcctgtttt gctcacccag aaacgcgtgt gaaagtaaaa gatgtgaag 8640
 atcagttggg tgcacgagtg ggttacatcg aactggatct caacagcggg aagatccctg 8700
 agagtttccg ccccgaaagaa cgttttccaa tggatgagcac tttaaagtt ctgtatgtg 8760
 ggcgggtatt atcccgatt gacgcccggc aagagcaact cggtcgcccgc atacactatt 8820
 ctcaaatga cttgggttag tactcaccag tcacagaaaa gcatcttacg gatggcatga 8880
 cagtaagaga attatgcagt gctgccataa ccatgagtga taacactgcg gccaacttac 8940
 ttctgacaac gatcgaggaa cggaaaggagc taaccgcctt tttgcacaac atggggatc 9000
 atgtaaactcg ctttgcgtt tggaaaccgg agctgaatga agccataacca aacgacgagc 9060
 gtgacaccac gatgcctgta gcaatggcaa caacgttgcg caaactatta actggcgaac 9120
 tacttactt agcttcccg caacaattaa tagactggat ggaggcggat aaagtgcag 9180
 gaccacttct ggcgtcgcc cttccggctg gctggtttat tgctgataaaa tctggagccg 9240
 gtgagcgtgg gtctcgccgt atcattgeag cactggggcc agatggtaag ccctcccgta 9300
 tcgttagttt ctacacgacg gggagtcagg caactatgga tgaacgaaat agacagatcg 9360
 ctgagatagg tgcctcaactg attaagcatt ggttaactgtc agaccaagtt tactcatata 9420
 tacttttagat tgatttaaaa cttcattttt aatttaaaag gatcttagtg aagatccctt 9480
 ttgataatct catgacccaaa atcccttaac gtgagtttc gttccactga ggcgtcagacc 9540
 ccgtagaaaa gatcaaagga ttttttgag atccctttt tctgcgcgtta atctgtgt 9600
 tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgcggatca gagctaccaa 9660
 ctcttttcc gaaggttaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gtcctctag 9720
 ttagccgtt gttaggccac cacttcaaga actctgttagc accgcctaca tacctcgctc 9780
 tgctaatact gttaccagtg gtcgtgtccca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg 9840
 actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg gttcgtgca 9900
 cacagcccgat cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat 9960
 gagaaagcgc cacgctccc gaagggagaa aggccgacag gtatcccgta agccgcagg 10020
 tcggAACAGG agagcgcacg aggagatcc cagggggaaa cgcctggat cttatagtc 10080
 ctgtcgggtt tcgccaccc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgtcg tcaggggggc 10140
 ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg ctttttacg gtcctggcc ttttgcggc 10200
 cttttgcgtca catggctcga cagatct 10227

5 <210> 7
 <211> 10815
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> pESYNGPRRE
 <400> 7

tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaaatca atattggcta 60
ttggccattg catacggtgt-atttatata taatatgtac atttatattt gtcatgtcc 120
aatatgaccg ccatgttggc attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg 180
gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggcc 240
gcctggctga cgcggcaacg acccccgccc attgacgtca ataatgacgt atgttccat 300
agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtattac ggtaaactgc 360
ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaagtcgg cccccttattt aogtcaatga 420
cggtaaatgg cccgcctggc attatgccc gtacatgacc ttacgggact ttcttacttg 480
gcagtagatc tacgtattag tcatcgctat taccatggtg atgcggtttt ggcagtacac 540
caatggcgt ggatagcggt ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt 600
caatggagt ttgtttggc accaaaatca acgggacttt caaaaatgtc gtaacaactg 660
cgatcgcccg ccccggttgc gcaaaatggc ggttaggcgtg tacgggtggga ggtctatata 720
agcagagctc gtttagtgaa cgcgtcagatc actagaagct ttattgcggt agtttatcac 780
agttaaattt ctaacgcagt cagtgcattt gacacaacag ttcgaactt aagctgcagt 840
gactcttta aggttagcctt gcagaagttt gtcgtgaggc actgggcagg taagtatcaa 900
ggttacaaga cagggttaag gagaccaata gaaactggc ttgtcgagac agagaagact 960
cttgcgttcc ttagtggcac ctattggct tactgacatc cactttgcct ttctctccac 1020
agggttccac tcccagttca attacagctc ttaaggctag agtacttaat acgactcact 1080
ataggctaga gaattcgcca ccatgggcga tcccctcacc tggtccaaag ccctgaagaa 1140
actggaaaaaa gtcaccgttc aggtagccaa aagcttacc acaggcaatt gcaactggc 1200
attgtccctg gtggatcttt tccacgacac taatttcgtt aaggagaaag attggcaact 1260
cagagacgtg atccccctct tggaggacgt gaccctaaaca ttgtctggc aggagcgcga 1320
agcttcgag cgcacctggc gggccatcag cgcagtcaaa atggggatgc aaatcaacaa 1380

cgtggttgac ggtaaagcta gctttcaact gctccgcgt aagtacgaga agaaaaccgc 1440
 caacaagaaa caatccgaac ctacgcaggg gtacccaatt atgatcgacg ggcgcggcaa 1500
 taggaacttc cgccccactga ctcccagggg ctataccacc tgggtcaaca ccatccagac 1560
 aaacggactt ttgaacgaag cctcccgagaa cctgttcggc atctctgtctg tggactgcac 1620
 ctccgaagaa atgaatgtt ttctcgacgt ggtgcagga caggctggac agaaacagat 1680
 cctgctcgat gccattgaca agatcgccga cgactggat aatcgccacc ccctgccaaa 1740
 cgccccctcg gtggctcccc cacaggggccc tatccctatg accgcttaggt tcattagggg 1800
 actgggggtg ccccgcgaac gccagatggc gccagcattt gaccaattt ggcagaccta 1860
 cagacagtgg atcatcgaaag ccatgagcga ggggattaaa gtcatgtcg gaaagcccaa 1920
 ggcacagaac atcaggcagg gggccaaagga accataccct gagtttgcg acaggcttct 1980
 gtccccagatt aaatccgaag gccacccctca ggagatctcc aagtttcttga cagacacact 2040
 gactatccaa aatgcaaatacg aagagtgcag aaacgccttgcg aggacactca gacctgaaga 2100
 taccctggag gagaaaatgt acgcattgcg cgacattggc actaccaagc aaaagatgt 2160
 gctgctcgcc aaggctctgc aaaccggcct ggctgtcca ttcaaaggag ggcactgaa 2220
 gggaggtcca ttgaaagctg cacaacatcg ttataattgt gggaaagccag gacatttattc 2280
 tagtcaatgt agagcaacta aagtctgttt taaatgtaaa cagcctggac atttctcaaa 2340
 gcaatgcaga agtgttccaa aaaacgggaa gcaagggctt caagggaggg cccagaaaca 2400
 aactttcccg atacaacaga agagtgcgca caacaaatct gttgtacaag agactcctca 2460
 gactcaaaaat ctgtaccccg atctgagcga aataaaaaag gaataacaatg tcaaggagaa 2520
 ggtatcaagta gaggatctca acctggacag tttgtggag taacatacaa tctcgagaag 2580
 aggcccacta ccatcgctt gatcaatgcg accccttta atgtgtctgtt ggacacccgga 2640
 gccgacacca gctgttcac tactgtcgcg tataacagac tggaaatacag aggaaggaaa 2700
 taccaggcga caggcatcat cgccgttggc ggcaacgtcg aaaccttttc cactctgtc 2760
 accatcaaaa agaaggggag acacattaaa accagaatgc tggcgccgc catccccgtc 2820
 accatcccttgcg acagagacat tccctcaggac ctggcgctt aactcggtgtt ggacacaactg 2880
 tctaaggaaa tcaagtccg caagatcgag ctggaaagagg gcacaatggg tccaaaaatc 2940
 ccccgatggc ccctgaccaa agagaagctt gaggccgttca aggaaatctgtt gcagccgtc 3000
 ctttctgagg gcaagattag cgaggccgc gacaataacc cttacaacag ccccatctt 3060
 gtgatataaga aaaggagccg caaatgggaa ctccctgcagg acctcgaggaa actcaacaag 3120
 accgtccagg tcggactgt gatctctcgcc ggactgtcgc accccggccgg cctgataaa 3180
 tgcagcaca tgacagtcg tgcatttggc gacgcttatttacatccc cctcgatcct 3240
 gaatttcgcg cctataactgc ttttaccatc cccagcatca atcaccaggaa gcccgtataaa 3300
 cgctatgtgtt ggaagtgctt ccccccaggaa tttgtctta gcccctatcat ttaccagaag 3360
 acacttcaag agatccca acctttccgc gaaagataacc cagaggatcacttca actctaccaa 3420
 tataatggcgc acctgttcat ggggttccaa gggcttaaga agcagcaca ggaactcatac 3480
 atcgaactga gggcaatctt cttggagaaa ggcattcgaga cacccgcgcga caagctgcac 3540
 gaagttccctc catatacgatc gctgggtctac cagcttgcgc ctgaaaactg gaaagtccag 3600
 aagatgcagt tggatatgtt caagaacccca acactgaacg acgtcccgaa gctcatggc 3660
 aatattacct ggtatggcgc cggaaatccctt gggcttacog ttaagcatacat tgccgcaact 3720
 acaaaaaggat gcctggagtt gaaccagaag gtcatttggc cagaggaagc tcagaaggaa 3780
 ctggaggaga ataataaaaa gattaagaat gctcaaggcc tccaaataacta caatccgaa 3840
 gaagaaaatgt tgcgtcgagg tggaaatcactt aagaactacg aagccaccta tgcgtatcaa 3900
 cagtcggccaa gcatctgtt gggccggaaag aaaatcatga aggccaaacaa aggctggc 3960
 accgttaaaa atctgtatgtt ctgttcacccg cactgtcgcc accgacttcat caccggcg 4020
 ggcaggatgcg ccaccccttca agtcccttc actaaggagc aggtgtatgtt ggagatgca 4080
 aaaggctggt actactcttgc gcttcccgag atcgatctaca cccaccaagt ggtgcacgac 4140
 gactggagaa tgaagctgtt cgaggagccg actagccggaa ttacaatcta taccgacggc 4200
 ggaaaaggccaa acggaggggg aatcgatgcg tgcatttgcgc ctttttttttgc gatggccctt 4260
 aagaggctcg gcccgttcac tcaaccagggtt gctggatggaa tggctatccca gatggccctt 4320
 gaggacacta gagacaagca ggtgaacattt gtgactgaca gctactactg ctggaaaaac 4380
 atcacagagg gccttggccctt ggagggaccc cactgtccctt ggtggcttcat catccagaat 4440
 atccgcgaaa agggaaattgtt ctatccgtcc tgggtgcctt gacacaaagg aatttacggc 4500
 aaccaactcg ccgtatgcgac cgccaaaattt aaagaggaaa tcatgttgc ctaccaggcc 4560
 acacagatta aggagaagag agacgaggac gctggctttt acctgtgtgtt gccatacgac 4620
 atcatgattt cccgttgcgca cacaacatgc attccaaaccg atgtcaagat ccagggtcc 4680
 cccaaatccat ttgggtgggtt gacccggaaag tccagcatgg ctaaggccggg ttttctgtt 4740
 aacgggggaa tcatgtatgcg aggatatacc ggcggaaatcc aggtgtatgtt cacaatatac 4800
 ggaaaaggca atattaagct tgcgtatgcg tggaaatcc gtcacttcat catccctccag 4860
 caccacagca attcaagaca accttggac gaaaacaaga ttagccagag aggtgacaag 4920
 ggcttcggca gcacagggtgtt gttctgggtt gagaacatcc aggaagcaca ggacgagc 4980
 gagaatttgcg acaccccccataatggatggt gcccggaaatcc acaagatccc actgactgt 5040
 gctaaaggcaga tgcacacagga atgcacccac tgcacccaaac aaggttctgg ccccgccggc 5100
 tgcgtatgcg ggtcccccac tcaacttgcg gcaatgtca cccacccatcga caacaaaatt 5160
 atccgtacccat tgcgtatgcg caattccggc tacatccacg caacactcctt ctccaaaggaa 5220

aatgcattgt gcacccctcg caacttctg gaatggccca ggctgttctc tccaaaatcc 5280
 ctgcacacccg acaacggcac caacttctg gctgaacctg tggtaatct gctgaagttc 5340
 ctgaaaatcg cccacaccac tggcatccc tatcacccctg aaagccaggg cattgtcgag 5400
 agggccaaaca gaactctgaa agaaaaagatc caatctcaca gagacaatac acagacattg 5460
 gagggccgcac ttcatcgcc ccttattacc tgcaacaaag gaagagaaaag catggccgc 5520
 cagacccctt gggaggtctt catcaactaac caggcccagg tcattccatga aaagctgctc 5580
 ttgcagcagg cccagtcctc caaaaagttc tgctttata agatccccgg tgagcacgac 5640
 tggaaagggtc ctacaagagt tttgtggaaa ggagacggcg cagttgtggt gaacgatgag 5700
 ggcaagggga tcatcgctgt gcccctgaca cgcaccaagc ttctcatcaa gccaaactga 5760
 acccgacgaa tcccaggggg aatctcaacc cctattaccc aacagtctaga aaaatctaag 5820
 tgtgaggaga acacaatgtt tcaacccctat tggtaataa atgacagtaa gaacagcatg 5880
 gcagaatcga aggaagcaag agaccaagaa atgaacctga aagaagaatc taaagaagaa 5940
 aaaagaagaa atgactgggtg gaaaataggt atgtttctgt tatgcttagc cagggccctc 6000
 tggaaagggtg ccagtgggtc agggcttcc ggcagtcgtt acctgaagaa aaaattccat 6060
 cacaacatcg catcgcgaga agacacccctgg gaccaggccc aacacaacat acaccatgca 6120
 ggcgtgaccg gtggatcagg ggacaaatac tacaaggcaga agtactccag gaacgactgg 6180
 aatggagaat cagaggaga caacaggccg ccaaagagct gggtaagtc aatcgaggca 6240
 tttggagaga gctatatttc cggagaacacc aaaggggaga ttctcagcc tggggccggct 6300
 atcaacacgc acaagaacgg ctctggggg aacaatctc accaagggtc cttagacctg 6360
 gagatcgaa gcgaaaggagg aaacattttt gactgttgca taaaagccca agaagaact 6420
 ctgcctatcc cttgctgtgg atttccctta tggctattt ggggtcgccc gggccgcctt 6480
 cccttttagtg agggtaatg cttcgagcag acatgataag atacattgtat gagtttggac 6540
 aaaccacaaac tagaatcgag tgaaaaaaat gctttatgg tggaaatttgt gatgttattg 6600
 ctttatttgc aaccattata agtgcataa aacaagttaa caacaacaat tgcatcatt 6660
 ttatgtttca gtttcagggg gagatgtggg aggttttta aagcaagtaa aacctctaca 6720
 aatgtgtaa aatccgataa ggatcgatcc gggctggct aatagcgaag aggcccac 6780
 cgatcgccct tcccaacagt tgccgcgcct gaatggcgaa tgacgcgcgc ctgtagcggc 6840
 gcattaagcg cgggggggtgt ggtggtaacg cgcagcgtga ccgctacact tgccagcgc 6900
 cttagcgcccg ctcccttcgc tttcttcct tcctttctcg ccacgttcgc cggcttccc 6960
 cgtaagctc taaatcgggg gtccttcata gggttccgtt ttagagctt acggcacctc 7020
 gaccgcaaaa aacttgattt gggtgatggg tcacgtatgt ggcacatcgcc ctgatagacg 7080
 gttttcgcc ctttgacgtt ggagtccacg tcttttaata gtggactctt gttccaaact 7140
 ggaacaacac tcaacccctat ctcggcttat tcttttgcatt tataagggtt tttgcgcatt 7200
 tcggctatt gttaaaaaaa ttagctgatt taacaaatat ttaacgcgaa ttttaacaaa 7260
 atattaacgt ttacaatttc gctgtatgcg gtatttctc cttacgcata tttgcggat 7320
 ttcacaccgc atacgcccgt ctgcgcgcga ccatggctcg aaataaccctc tggaaagagga 7380
 acttggtag gtaccttcgt aggccggaaag aaccagctgt ggaatgtgtg tcagttagg 7440
 tgtggaaagt ccccgagctc cccagcaggg agaagtagatgc aaagcatgca tctcaattag 7500
 tcagcaacca ggtgtggaaa gtcggccagc tccccagcag gcagaagttt gcaaaagcatg 7560
 catctcaatt agtcagaacac ctagtcccc cccctaactc cggccatccc gcccctaact 7620
 cccggccagg cccgcattc tccggcccat ggctgactaa ttttttttat ttatgcagag 7680
 gcccggcccg cctcggccct ttagctattc cagaagtagt gaggaggctt ttttggaggg 7740
 cttaggtttt gcaaaaagct tgattcttgc gacacaacag ttcgcactt aaggetagag 7800
 ccaccatgtat tgaacaagat ggattgcacg caggttctcc ggcgcgttgg gtggagaggg 7860
 tattcggtca tgactggca caacagacaa tccgctgcgc tgatggcgcgc gtgttccggc 7920
 tgtcagcgcga gggggcccg gtttttttgc tcaagacccg cctgtccggt gcccgtaatg 7980
 aactgoagga cgaggcagcg cgctatcggt ggcgttgcac gacggggcggtt cttgcgcac 8040
 ctgtgcgtca cgttgcact gaagcgggaa gggactggct gctatgggc gaagtgcgg 8100
 ggcaggatct cttgtcatct caccttgcgc ctggccgagaa agtacccatc atggctgtat 8160
 caatgcggcg gtcgcatacg ctgtatccgg ctacccatccc attcgaccac caagcgaaac 8220
 atcgcatcgaa gogagcacgt actcgatgg aagccggctc tttgcgtatcg gatgtatctgg 8280
 acgaagagca tcaggggctc ggcgcgcgc aactgtcgca caggctcaag ggcgcgcgc 8340
 cccgacggcgaa ggatctcgca gtgacccatc ggcgttgcgc ctggccgat atcatggc 8400
 aaaatggcccg cttttctgaa ttcatcgact gttggccggct ggtgtggcg gaccgtatc 8460
 aggacatagc gttggctacc cgtgatatttgc tgaagatgc tggccggcgaa tgggtcgacc 8520
 gcttcctcgat gctttacggt atcgccgtc cccatttcgc ggcgcgcgc ttctatcgcc 8580
 ttcttgcgtca gttttctgtca gggggactct ggggttcgaa atgacccatc aagcgacgc 8640
 caacccgtca tcacgtatggc cggccatccaa tatctttattt ttcattacat ctgtgtgtt 8700
 gtttttgcgtca tgaatcgata gggataagga tccgctatcg tttgcacttc agtacaatct 8760
 gcttcgtatgc cgcatacgatc agccagcccc gacaccggcc aacaccccgct gacgcgcct 8820
 gacggggcttgc tttgtcccg gcatcgatcc acagacaaac tttgtggcg tccggggatc 8880
 gcatgtgtca gagggtttca cccgtatccac cggccatccgc gacacggaaag ggcctcgat 8940
 tacgcctat tttataggat aatgtcatgc taataatggt ttcttagacg tcagggtggca 9000
 ctttccggggaaatgtgcgc ggaaccccta tttgtttattt tttctaaataa cattcaaataa 9060

tgtatccgt catgagacaa taaccctgat aaatgttca ataatattgaaaaggaaga 9120
 gtatgagtat tcaacatttc cgtgtcgccc ttattccctt tttgcggca tttgccttc 9180
 ctgttttgc tcacccagaa acgctggtga aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg 9240
 cacgagtggg ttacatcgaa ctggatctca acagcggtaa gatcctttag agtttcgccc 9300
 ccgaagaacg tttccaatg atgagcactt ttaaagttct gctatgtggc gcggtattat 9360
 cccgtattga cgccgggcaa gagcaactcg gtcgcccgt acactattct cagaatgact 9420
 tgggttagta ctcaccagtc acagaaaagc atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat 9480
 tatgcagtgc tgccataacc atgagtgata acactgcggc caacttactt ctgacaacga 9540
 tcggaggacc gaaggagcta accgctttt tgcacaacat gggggatcat gtaactcgcc 9600
 ttgatcggtt ggaaccggag ctgaatgaag ccataccaaa cgacgagcgt gacaccacga 9660
 tgcctgttagc aatggcaaca acgttgcgc aactattaac tggcgaacta cttactctag 9720
 ctccccggca acaattaata gactggatgg aggcggataa agttgcagga ccacttctgc 9780
 gctcgccct tccggctggc tggtttattt ctgataaattc tggagccggt gacggtgggt 9840
 ctcgcgtat cattgcagca ctggggccag atggtaagcc ctcccgatc gtagttatct 9900
 acacgacggg gagtcaggca actatggatg aacgaaatag acagatcgct gagataggtg 9960
 cctcaactgat taagcattgg taactgtca accaagttt ctcataatata ctttagattt 10020
 attaaaaact tcattttaa tttaaaagga tcttagtgaa gatcctttt gataatctca 10080
 tgacccaaaat cccttaacgt gagtttctgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaaga 10140
 tcaaaggatc ttcttgagat ccttttttc tgcgcgtaat ctgcgtgcctt caaacaaaaa 10200
 aaccaccgtt accagcgggtg gttgtttgc cggatcaaga gctaccaact cttttccga 10260
 aggttaactgg cttcagcaga ggcagataac caaatactgt cttcttagt tagccgtat 10320
 taggcccacca ctcaagaac tctgttagcac cgcctacata ctcgcctcg ctaatccgt 10380
 taccagtggc tgctgcacgt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttggac tcaagacgt 10440
 agttaccggta taaggcgcag cggtcgggctt gaacgggggg ttcgtgcaca cagcccgat 10500
 tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagcg ttagctatga gaaagcgcga 10560
 cgcttcccgaa agggagaaaag gcccgcggat atccggtaag cggcagggtt ggaacaggag 10620
 agcgcacgag ggagcttcca gggggaaacg cctggatctt ttagtgcctt gtcgggtttc 10680
 gccacacctcg acttgagcgt cgattttgtt gatgctcgcc agggggggcgg agcctatgg 10740
 aaaacgcacaa caacgcggcc ttttacggt tccctggcctt ttgtggcctt tttgtcaca 10800
 tggctcgaca gatct 10815

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

<220>
 <223> LpESYNGPRRE
 <400> 8

tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta 60
ttggccattg catacggtgt atctatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc 120
aatatgaccg ccatgttggc attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg 180
gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc 240
gcctggctga cgcggcaacg acccccggcc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat 300
agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtattac ggtaaactgc 360
ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaagtccg ccccctatg acgtcaatga 420
cggttaatgg cccgcctggc attatgccc gtacatgacc ttacgggact ttccctacttg 480
gcagtagatc tacgtatttag tcatcgctat taccatggtg atgcgggtt ggcagtacac 540
caatggcgt ggatagcggt ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccaattgacgt 600
caatggagt ttgtttggc accaaaatca acgggacttt caaaaatgtc gtaacaactg 660
cgatcgcccg ccccggttgac gcaaattggc ggtaggcgtg tacgggtggg ggtctatata 720
agcagagctc gtttagtgaa cgctcagatc actagaagct ttattgcgtt agtttatacac 780
agttaaattg ctaacgcagt cagtgccttct gacacaacag tctgaactt aagctgcagt 840
gactcttta aggttagcctt gcagaagttg gtcgtgaggc actgggcagg taagtatcaa 900
ggttacaaga caggtttaag gagaccaata gaaactggc ttgtcgagac agagaagact 960
cttgcgttcc ttagaggcac ctattggct tactgacatc cactttgcct ttctctccac 1020
agggttccac tcccgaggtaa attacagctc ttaaggcttag agtacttaat acgactcact 1080
ataggctaga gaattcgaga ggggcgcaga ccctacctgt tgaacctgac tgatcgtagg 1140
atccccggga cagcagagga gaacttacag aagtcttctg gaggtgttcc tggccagaac 1200
acaggaggac aggttaagatg ggcgatcccc tcacctggc caaagccctg aagaaactgg 1260
aaaaaagtca cgttcagggt agccaaaagc ttaccacagg caattgcaac tggcattgt 1320
ccctgggtga tctttccac gacactaatt tcgttaagga gaaagattgg caactcagag 1380

- - -

acgtgatccc cctcttggag gacgtgaccc aaacattgtc tgggcaggag cgcaagctt 1440
 tcgagcgcac ctgggtggcc atcagcgcag tcaaaaatggg gctgcaaatt aacaacgtgg 1500
 ttgacggtaa agctagctt caactgctcc ggcgtaagta cgagaagaaa accgccaaca 1560
 agaaaacaato cgaaccttgc gaggagtacc caattatgtt cgacggcgc ggcataatgg 1620
 acttccgccc actgactccc aggggctata ccacctgggt caacaccatc cagacaaacg 1680
 gactttgaa cgaagcctcc cagaacctgt tcggcatctt gtctgtggac tgacactccg 1740
 aagaaatgaa tgctttctc gacgtggtgc caggacaggg tggacagaaa cagatctgc 1800
 tcgatgccc tgacaagatc ggcgacgact gggataatcg ccacccctg ccaaacgccc 1860
 ctctgggtgc tcccccacag gggctatcc ctatgaccgc taggttcat tggactgg 1920
 gggtgccccg cgaacgcccag atggagccag catttgcacca atttaggcag acctacagac 1980
 agtggatcat cgaagccatg agcgagggga ttaaagtcat gatcgaaag cccaaaggcac 2040
 agaacatcag gcagggggcc aaggaaccat accctgagtt tgtcgacagg cttctgtccc 2100
 agattaaatc cgaaggccac cctcaggaga tctccaagtt ttgacagac acactgacta 2160
 tccaaaatgc aaatgaagag tgcagaaaac ccatgaggca cctcagaccc gaagataccc 2220
 tggaggagaa aatgtacgca tgcgcgaca ttggcactac caagcaaaag atgatctgc 2280
 tcgccaaggc tctgcaaacc ggctggctg gtccattcaa aggaggagca ctgaagggag 2340
 gtccattgaa agctgcacaa acatgttata attgtggaa gccaggacat ttatcttagc 2400
 aatgttagagc acctaagtc ttttttaat gtaaacagcc tggacatttc tcaaagcaat 2460
 gcagaagtgt tccaaaaaac ggaagcaag gggctcaagg gaggccccag aaacaaactt 2520
 tcccgatatac acagaagagt cagcacaaca aatctgttgc acaagagact cctcagactc 2580
 aaaatctgtc cccagatctg agcgaataaa aaaaggaata caatgtcaag gagaaggatc 2640
 aagtagagga tctcaacctg gacagttgtt gggagtaaca tacaatctcg agaagaggcc 2700
 cactaccatc gtcctgatca atgacacccc tcttaatgtc ctgcggaca cggagccga 2760
 caccagcgtt ctcaactactg ctcaactataa cagactgaaa tacagaggaa gaaaatacc 2820
 gggcacaggg atcatcgccg ttggaggca cgtgaaaacc tttccactc ctgtcaccat 2880
 caaaaagaag gggagacaca tttaaaaccag aatgtggc gccgacatcc cctgacccat 2940
 cctggcaga gacattctcc aggacctggg cgctaaactc gtgcggcac aactgtctaa 3000
 gggaaatcaag ttccgcaaga tcgagctgaa agagggcaca atgggtccaa aaatccccca 3060
 gtggccctcg accaaagaga agcttgaggg cgctaaaggaa atctgtgcgc gctgttttc 3120
 tgaggggcaag attagcgagg ccagcgcacaa taacccttac aacagccccca tctttgtgt 3180
 taagaaaaagg agcggcaaat gggactctt gcaggacactg agggaaactca acaagacgt 3240
 ccaggcggaa actgagatct ctgcgggact gcctcaccgg ggcggccctga taaaatgca 3300
 gcacatgaca tgccttgcata ttggagacgc ttattttacc atccccctcg atctgtcaatt 3360
 tcgcccctat actgcttttca ccatccccca catcaatcac caggagccccca ataaacgcta 3420
 tgggtggaaag tgcctcccccc agggattttgctt gettagcccc tacatttacc agaagacact 3480
 tcaagagatc ctccaaacctt tccgcgaaag ataccagag gttcaactct accaataat 3540
 ggacgacctg ttcatggggt ccaacgggtc taagaagcag cacaaggaac tcatcatcga 3600
 actgagggca atctctctgg agaaaaggctt cgagacaccc gacgacaagc tgcaagaagt 3660
 tccctccat atgctggctt gctaccagct ttgcctgaa aactggaaag tccagaagat 3720
 gcagttggat atggtaaaga acccaacact gaacgacgtc cagaagctca tggcaat 3780
 tacctggatg agctccggaa tccctgggt taccgttaag cacattgccc caactacaaa 3840
 aggtgcctg gagttgaacc agaaggctcat ttggacagag gaagctcaga aggaactgg 3900
 ggagaataat gaaaagatta agaatgctca agggctccaa tactacaatc ccgaagaaga 3960
 aatgttgc gaggtgaaa tcaactaagaa ctacgaagcc acctatgtca tcaaacagtc 4020
 ccaaggcatc ttgtggccg gaaagaaaaat catgaaggcc aacaaaggct ggtccaccgt 4080
 taaaaatctg atgctctgc tccagcacgt cgccaccgg tctatcaccc gcgtggcaa 4140
 gtgccccacc ttcaaaggatc ctttcaactaa ggacgagggt atgtggaga tgcaaaaagg 4200
 ctggactac tcttggcttc ccgagatctg ctacacccac caagtggcgc acgacgactg 4260
 gagaatgaag ttgtcgagg agcccactag cggaaattaca atctataccg acggccggaaa 4320
 gcaaaacggaa gagggatcg ctgcatactgtt cccatctaaac ggccgcacca agcaaaagag 4380
 gctcgccct gtcactcacc aggtggctga gaggatggctt atccagatgg cccttggagga 4440
 cactagagac aagcagggtga acattgtac tgacagctac tactgtggaa aaaacatcac 4500
 agaggccctt ggcctggagg gaccccagtc tccctgggtt cctatcatcc agaatatccg 4560
 cggaaaaggaa attgtctatt tccctgggtt gcctggacac aaaggaatt acggcaacca 4620
 actcgccat gaagccgcca aaattaaaga ggaaatcatg tttgcctacc agggcacaca 4680
 gattaaggag aagagagacg aggacgctgg ctggacactt tttgtggccat acgacatcat 4740
 gattcccgat agcgacacaa agatcttcc aaccgtatgc aagatccagg tgccacccaa 4800
 ttcattttgtt tgggtgaccg gaaagtccag catggtaag cagggttcc tgattaaacgg 4860
 gggaaatcatt gatgaaggat acaccggcga aatccaggat atctgcacaa atatcgccaa 4920
 aagcaatatt aagcttatecg aagggcagaa gttcgctaa ctcatcatcc tccagcacca 4980
 cagcaattca agacaacccctt gggacgaaaaa caagattagc cagagagggt acaagggtt 5040
 cggcagcaca ggtgtgttctt ggggtggagaa catccaggaa gcacaggacg agcagcagagaa 5100
 ttggcacaccc tcccccttaaga ttttggcccg caattacaag atcccactga ctgtggctaa 5160
 gcagatcaca caggaatgcc cccactgacca caaacaaggat tctggccccc cccggctgcgt 5220

gatgaggc cccaaatcact ggcaggcaga ttgcacccac ctgcacaaca aaattatcct 5280
 gacccctcgat gagagcaatt ccggctacat ccacgcaaca ctccctctcca agggaaatgc 5340
 atttgtcacc tccctcgaa ttctggaatg gcccaggctg ttctctccaa aatccctgca 5400
 caccgacaac ggcaccaact ttgtggctga acctgtgggt aatctgctga agttcctgaa 5460
 aatcgcccac accactggca ttccctatca ccctgaaaagc cagggcattt tcgagaggc 5520
 caacagaact ctgaaaagaaa agatccaatc tcacagagac aatacacaga cattggaggc 5580
 cgcacttcag ctgcctta tcaacctgcaaa caaaggaaaga gaaagcatgg gggccagac 5640
 cccctgggag gtcttcatca ctaaccaggc ccaggtcattt catgaaaage tgctttgca 5700
 gcaggcccag tccctccaaa agttctgtt ttataagatc cccgggtgagc acgactggaa 5760
 aggttctaca agagtttgg gggaaaggaga cggcgcagtt gtgtgtaaacg atgaggc 5820
 ggggatcatc gctgtgggg tgcacacgc caagtttctc atcaagccaa actgaacccg 5880
 acgaatccca gggggaaatct caacccttat tacccaaacag tcagaaaaaaat ctaagtgtga 5940
 ggagaacaca atgtttcaac ctattgtta taataatgac agtaagaaca gcatggcaga 6000
 atcgaaggaa gcaagagacc aagaaatgaa cctgaaaagaa gaatctaaaag aagaaaaaaag 6060
 aagaatgac tggtggaaa taggtatgtt tctgttatgc tttagccaggg ccctctggaa 6120
 ggtgaccagt ggtgcagggt cctccggcag tcgttacctg aagaaaaaaat tccatcaca 6180
 acatgcacatcg cgagaagaca cctgggacca ggcaccaacac aacatacacc tagcaggcgt 6240
 gacgggtgga tcaggggaca aatactacaa gcagaagtttcc tccaggaacg actggaaatgg 6300
 agaatcagag gatcacaaca ggcggccaaa gagctgggtg aagtcaatcg aggcatgg 6360
 agagagctat atttccgaga agaccaaagg ggagatttct cagcctgggg cggctatcaa 6420
 cgagcacaag aacggctctg gggggaaacaa tcctcaccat gggtccttag acctggagat 6480
 tcgaagcgaa ggagaaaca ttatgtactg ttgcattttt gcccaagaag gaactctcgc 6540
 tattcccttgc tggatatttcc ctttatggctt attttgggg tcggggcggc cgctttccct 6600
 tagtgagggt taatgttctg agcagacatcg ataagatata ttgatgatgt tggacaaacc 6660
 acaactagaa tgcagtggaaaaaatgtt atttgtgaaa ttgtgtatgc tattgtttta 6720
 tttgttaacca ttataagctg caataaaacaa gtttacaaca acaatttgcat tcattttatg 6780
 tttcagggttcc agggggagat gtgggagggtt tttttaagca agtaaaacccctt ctacaaatgt 6840
 ggtaaaatcc gataaggatc gatccgggctt ggcgttaatag cgaagaggcc cgacccgatc 6900
 gcccctccca acagtggcgc agcctgaatg gcaatggac gcccctgtt gggccgcatt 6960
 aagcgccggcg ggtgtgggtt ttacgcgcag cgtgaccgctt acacttgcca gccccttagc 7020
 gcccgccttctt ttcgccttctt ttcgcacccg ttcgccttgc ttcccggttca 7080
 agctctaaat cgggggctcc ctttaggggtt ccgattttaga gctttacggc acctcgaccg 7140
 caaaaaactt gatttgggtt atgggttccacg tagtgggcac tgccttgcgtt agacgggttt 7200
 tcgccttgc acgttgggtt ccacgttctt taatagtggc ctcttgcgttcc aaacttggaaac 7260
 aacactcaac cctatctcgg tctatttttt tgatttataa gggattttgc cqatttgc 7320
 ctattggta aaaaatgacg tgatttaaca aatatttac gcaattttta aaaaaatattt 7380
 aacgtttaca atttgccttgc atgcgttattt ttctccttac gcatctgtgc ggtatttcc 7440
 accgcatacg cggatctgcg cagcaccatcg gcctgaaata acctctgaaa gaggaacttg 7500
 gttaggttcc ttctgaggcg gaaagaacca gctgtggat gtgtgtcagt tagggtgtgg 7560
 aaagtccccca ggtccccccag caggcagaag tatgcaaagc atgcacatcatttca attagtacgc 7620
 aaccagggtt gggaaatccc caggctcccc agcaggcaga agtatgcaaa gcatgcattt 7680
 caattagtca gcaaccatag tcccgccccctt aactccgccc atcccgcccc taactccgccc 7740
 caggccgc cattctccgc cccatggctg actaattttt ttttattttatg cagaggccga 7800
 ggcgcctcg gctctgagc tattccagaa gtatgtggaa ggcttttttgg gaggctttagg 7860
 cttttgcataa aagcttgattt ctctgtacac aacagctctg aactttaaggc tagaggccacc 7920
 atgattgttacg aagatgttcc gacacgcaggat tctccggccg cttgggtggaa gaggcttattc 7980
 ggcgtatgttcc gggcacaaca gacaatcgcc tgctctgtat ccggcgtgtt ccggcgttca 8040
 ggcgcaggggc gcccggcttctt ttttgcataa accggacctgtt ccgggtccctt gaaatgaaatgt 8100
 caggacgaggc cagcggcttctt atcgtggctg gccacgacgg gcttcccttgc cgcagctgtg 8160
 ctgcacgttgc tcactgaage gggaaaggac tggctgttat tgggtggaaat gcccggccag 8220
 gatctctgtt catctcacct tgctctgtcc gagaaggatcc ccatcatggc tgcataatgt 8280
 cggcggctgc atacgttgc tccggcttcc tgccttgc accaccaaggc gaaacatcg 8340
 atcgacgaggc cacgtactcg gatggaaagcc ggttttgcgttcc atcaggatgt tctggacgaa 8400
 gagcatcagg ggcgcgcgc agccgaactt ttcgcacccg tcaaggcgcg catgcggc 8460
 ggcgaggatc tgcgtgtac ccacgtggcgtt ggcgtgttgc cgaatatcat ggtggaaaat 8520
 ggcgccttcc ctggatcat cgtactgtggc cggctgggtt tggcggacccg ctatcaggac 8580
 atacgttgc tttccgttgc tatttgcataa gagcttgcgttcc gcaatgtggc tgaccgtttc 8640
 ctctgttcc acggatctgc cgttcccgat tgcacgcgc tgccttcttgc tgccttcc 8700
 gacgagttct tctgagccggg acctctgggtt tcgaaaatgac cggaccaaggc acggcccaacc 8760
 tgcacatcagc atggccgaa taaaatatctt tttttttcat tacatgtgtt ggttggttt 8820
 ttgtgtgaat cgtatgttgcgat aaggatccgc gttatgttgc tgccttccatc aatctgttct 8880
 gatgcgcat agttaagccaa gcccggacac cggccaaacac cggctgcacgc gcccgtacgg 8940
 gcttgcgttgc tcccgccatc cgttacaga caagctgtga cggcttccgg gaggctgc 9000
 tgcacatcagc tttccacgttcc atcaccgaaa cggcggagac gaaaggccctt cgtgatacgc 9060

ctattttat aggttaatgt catgataata atggtttctt agacgtcagg tggcactttt 9120
 cggggaaatg tgcgcggAAC cccttattgt ttatTTTCTT aaatacattc aaatatgtat 9180
 ccgcctcatga gacaataacc ctgataaaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg 9240
 agtattcaac atttccgtgt cgcccttatt ccctttttg cggcattttg ctttctgtt 9300
 tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagg ggggtcacga 9360
 gtgggttaca tcgaactgga tctcaacage ggttaagatcc ttgagagtt tcgccccgaa 9420
 gaacgttttc caatgtatg cactttaaa gttctgtat gtggcgcggt attatcccgt 9480
 attgaacgccc ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttgggt 9540
 gagtactcac cagtcacaga aaagcatttt acggatggca tgacagtaag agaattatgc 9600
 agtgcgtccca taaccatgag tgataaacact gcccgcact tacttctgac aacgatcgga 9660
 ggaccgaagg agctaaccgc tttttgcac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat 9720
 cggtggaaac cggagctgaa tgaagccata ccaaaccgacg agcgtgacac cacgatgcct 9780
 gtagcaatgg caacaacgtt geccaaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc 9840
 cggcaacaat taatagactg gatggaggcg gataaaagtg caggaccact tctgcgcctcg 9900
 gcccctccgg ctggctgggtt tatttgcgtat aaatctggag ccgggtgagcg tgggtctcgc 9960
 ggtatcattt cagcaactggg gccagatgggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg 10020
 acggggagtc aggcaactat ggtgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca 10080
 ctgattaagg attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta 10140
 aaacttcatt ttaatttaa aaggatcttag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc 10200
 aaaatccctt aacgtgagtt ttcttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa 10260
 ggtatcattt gagatccctt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaaacc 10320
 ccgcgtaccag cgggtgggtt tttgcggat caagagctac caactctttt tccgaaggta 10380
 actggcttca gcagagcgcgataccaaat actgtccctc tagttagcc gtagtttaggc 10440
 caccacttca agaactctgt agcaccgcct acataacctcg ctctgctaatt cctgttacca 10500
 gtggctgtcg ccagtggcgta taagtctgtt cttaccgggt tggactcaag acgatagtt 10560
 ccggataagg cgcagcggtc gggctgaacg ggggggttcgt gcacacagcc cagcttggag 10620
 cgaacgaccc acaccgaact gagataccca cagcgtgagc tatgagaaag cggccacgcct 10680
 cccgaaggga gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggtcggaaac aggagagcgc 10740
 acgaggggagc ttccagggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgcac 10800
 ctctgacttg agcgtcgatt ttgtgtatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac 10860
 gccagcaacg cggccctttt acggttccctg gccttttgct ggccttttgc tcacatggct 10920
 cgacagatct 10930

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

<220>
 <223> pONY4.0Z

5

10

<400> 9

ctaaattgt a agcgtaata tttgttaaa attcgctta aattttgtt aaatcagctc 60
attttaac caataggccg aaatcgcaa aatccctat aaatcaaaag aatagaccga 120
gatagggtt agtgttgc cagttggaa caagatcca ctattaaaga acgtggactc 180
caacgtcaaa gggcaaaaaa ccgtctatca gggcgatggc ccactacgtg aaccatcacc 240
ctaatacg ttttgggt cgaggtgccg taaagcacta aatcgaaacc ctaaaggag 300
ccccgattt agagcttgc gggaaagcc aacctggctt atcggaaattt atacgactca 360
ctataaggag accggcagat cttaataat aaaatgtgtg tttgtccgaa atacgcttt 420
tgagattct gtcgcccact aaattcatgt cgccgatag tgggtttat cgccgataga 480
gatggcgata ttggaaaaat tgatatttga aaatatggca tattgaaaat gtcgcccgtg 540
tgagttctg tctaactgtat atcggcattt ttccaaaagt gattttggg catacgcgat 600
atctggcgat agcgcttata tcgttacgg gggatggcga tagacgactt tggacttg 660
ggcgattctg tggcgccaa atatcgcaat ttcgatatacg tggacagacg atatgaggct 720
atatcgccga tagaggcgac atcaagctgg cacatggcca atgcatatcg atctatacat 780
tgaatcaata ttggccattt gccatattat tcattggta tatagcataa atcaatattg 840
gctattggcc attgcatacg ttgtatccat atcgtaataat gtacatttat attggctcat 900
gtccaaacatt accggccatgt tgacattgtat tattgacttag ttattaaatg taatcaatta 960
cggggtcatt agttcatagc ccatatatgg agttccgcgt tacataactt acggtaaatg 1020
gccccctgg ctgaccggcc aacgacccccc gcccattgac gtcaataatg acgtatgttc 1080
ccatagtaac gccaataggg actttccatt gacgtcaatg ggtggagttat ttacggtaaa 1140
ctgcccactt ggcagtacat caagtgtatc atatgccaag tcggccccctt attgacgtca 1200
atgacggtaa atggcccgcc tggcattatg cccagtacat gacccctacgg gactttccta 1260

cttggcagta catctacgta ttagtcatcg ctattaccat ggtgatgccc ttttggcagt 1320
 acaccaatgg gcgtggatag cggtttgact cacggggatt tccaagtctc caccatttgc 1380
 acgtcaatgg gagtttgcgtt tggcaccaaa atcaacggga ctttccaaat tgcgtaaaca 1440
 actgcgatcg cccgcggcgt tgacgcaaat gggcggtagg cgtgtacggc gggaggtcta 1500
 tataaggcaga gtcgttttag tgaaccgggc actcagattc tgcgtctga gtcccttctc 1560
 tgcgtggctg aaaaggccct tgaataaaat ataattctct actcagtcctc tgcgtcttagt 1620
 ttgcgtgttgc gagatccatc agttggcgc cgaacaggga cctgagaggg ggcgacgacc 1680
 tacctgttgc acctggctga tgcgttagatc cccggacacg cagaggagaa cttacagaag 1740
 tcttctggag gtgttcttgc ccagaacacca ggaggacagg taagatggga gacccttgc 1800
 catggagcaa ggcgctcaag aagtttagaga aggtgacggt acaagggtct cagaattaa 1860
 ctactggtaa ctgttaatttgc ggcgttaatgc tagtagactt atttcatgtatccacttttgc 1920
 taaaagaaaaa ggactggcag ctgaggatgc tcatttccatt gtcggaaat gtaactcaga 1980
 cgctgtcagg acaagaaaaa gggccttttgc aagaacatg gtgggcaatt tctgtgtaa 2040
 agatggccctt ccagattatc aatgttagtag atggaaaggc atcattccag ctccaaagag 2100
 cggaaatatga aaagaagact gtcataataaaatc agcgtctga gccccttgcgaa gaatatctc 2160
 agaactatgc gatccccgg gtcggcaggag tggggaggca cgatggccgc tttggtcgag 2220
 gcccgtccgg ccattagcca tattttatcat tggttatata gcataaaatca atattggcta 2280
 ttggccatttgc catacggttgc attccatatacata taatatgtac atttataatgc gtcgtatgtcc 2340
 aacattaccg ccattgttgc attgattatttgc gactatgttgc taatatgtatc caattacggg 2400
 gtcattatgc catagccat atatggatgc tcgcgttaca taacttacgg taaatggccc 2460
 gcctggctga ccgcggcaacg accccccccc attgcgttaca ataatgcgt atgttccat 2520
 agtaacgcga ataggggactt tcatttgcgtc tcaatgggtg ggttatttgc ggttaactgc 2580
 ccacttggca gtacatcaatgc tgatcatat gccaagttacg ccccttgcgttgc acgtcaatgc 2640
 cggttaatgg cccgccttgc attatggccca gtacatgcatttgc ttatggact ttcctacttgc 2700
 gcagttacatc tacgtttagt tcattgcgttgc taccatgggtg atgcgttttgc ggcgttacat 2760
 caatgggggtt ggatagcggt ttgcatttgcgttgc gggatttccaa agtctccacc ccatttgcgt 2820
 caatggggatgt ttgttttgc accaaaaatca acgggacttttgc cccaaatgtc gtaacaactc 2880
 cggcccttgc acgcataatgg ggggttgcgttgc tgcgttgcgttgc ggggttgcgttgc 2940
 tcgttttagtgc aaccgttca tgcgttgcgttgc acgcatttgc cgcgttttgc accttccatgc 3000
 aagacacccgg gaccgttca gcttccggc cccaaatgcgttgc cgcgttgcgttgc 3060
 gatccggggatgttccatgc acgcataatgg ggggttgcgttgc tgcgttgcgttgc 3120
 cgtgacttggggatgttccatgc acgcataatgg ggggttgcgttgc tgcgttgcgttgc 3180
 gcccgttgc gtaatagcga agaggccgc accgttgcgttgc tgcgttgcgttgc 3240
 ctgtatggcg aatggcgatgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc 3300
 ctggagttgcgttgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc 3360
 gtttacgtatgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc 3420
 gtttccacgg agaatccgac ggggttgcgttgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc 3480
 ctacagggatgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc 3540
 tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc 3600
 agcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc 3660
 ggcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc 3720
 ttgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc 3780
 gatccatgcgttgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc 3840
 ctacgggttgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc 3900
 ttcggccgttgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc 3960
 aacgttgcgttgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc 4020
 gaacttgcgttgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc 4080
 gaggttgcgttgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc 4140
 gtttacgttgcgttgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc 4200
 caggatatttgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc 4260
 aaccatccgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc 4320
 aatatttgcgttgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc 4380
 cccacggcat tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc 4440
 cccggcatgttgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc 4500
 tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc 4560
 acggccacccgttgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc 4620
 gtcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc 4680
 atcccttgcgttgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc 4740
 caggatccgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc 4800
 tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc 4860
 gatacgttgcgttgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc 4920
 catccatgcgttgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc 4980
 caaaccatccgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc 5040
 tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc tgcgttgcgttgc 5100

ccacaaggta aacagttgat tgaactgcct gaactaccgc agccggagag cgccggggcaa 5160
 ctctggctca cagtacgctg agtgcaacccg aacgcgaccg catggcaga agccggggcac 5220
 atcagcgctt ggcagcagtg gctgtggcg gaaaacctca gtgtgacgct ccccgccg 5280
 tcccaacgcca tcccgcatct gaccaccaggc gaaatggatt ttgcatacg gctgggtaat 5340
 aagcgttggc aatttaacccg ccagtcaaggc ttctttcac agatgtggat tggcgataaaa 5400
 aaacaactgc tgacgcccgt ggcgatcag ttccacccgtg caccgctgga taacgacatt 5460
 ggcgtaagtg aagcgacccg cattgaccct aacgcctggg tcgaacgctg gaaggcggcg 5520
 ggccattacc agggcgaagc agcggttgc cagtgcacgg cagatacact tgcgtatgcg 5580
 gtgtgatttgcgacccgatcttgcatacgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcg 5640
 aaaacctacc ggattgtatgg tagtggtcaa atggcgatgttgcgatgttgcgatgttgcg 5700
 agcgatcacac cgcatccggc gggattggc ctgaactgcg agctggcgca ggtacgagag 5760
 cggtaaaact ggctcgatttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcg 5820
 tggggatcttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcg 5880
 gaaaacggtc tgcgctcggttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcg 5940
 gacttccagt tcaacatcag ccgttacatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcg 6000
 catctgtgc acgcggaaaga aggcacatgg ctgaatatcg acggtttccatgcgatgttgcg 6060
 ggtggcgacg actccctggatcccgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcg 6120
 taccattacc agttggtgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcg 6180
 atccggctgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcg 6240
 agaagtatgc aaagcatgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcg 6300
 cgagggggggggcccgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcg 6360
 tatttatacataatcaagca caagtaatac atgagaaaact ttactacag caagcacaat 6420
 cctccaaaaatccatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcg 6480
 ggggtgtgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcg 6540
 ctgtaccatttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcg 6600
 caagacccaaatccatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcg 6660
 atgcttccatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcg 6720
 ctcataatatttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcg 6780
 gcatcgcatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcg 6840
 aaaaatctaaatccatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcg 6900
 agaaacgcatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcg 6960
 ctaaagaagaatccatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcg 7020
 caggaactacttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcg 7080
 ggttggggatccatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcg 7140
 ggggttccttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcg 7200
 gcatcgatcatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcg 7260
 tataaataacatccatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcg 7320
 ttacatcttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcg 7380
 aagtgcataatccatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcg 7440
 ttatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcg 7500
 agaaaatagtatccatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcg 7560
 tatgattcttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcg 7620
 gacatccatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcg 7680
 ctggaaatccatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcg 7740
 aatggaaatccatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcg 7800
 acaatccatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcg 7860
 gagtcatatttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcg 7920
 gttttgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcg 7980
 ggtgaccatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcg 8040
 acatcgatccatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcg 8100
 gaccgggtggatccatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcg 8160
 agaatacgatccatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcg 8220
 agagagctatccatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcg 8280
 cgagcacaatccatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcg 8340
 tccatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcg 8400
 tatcccttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcg 8460
 catagcgatccatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcg 8520
 aaatccatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcg 8580
 tggcacaatccatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcg 8640
 gttttatgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcg 8700
 ataaccatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcg 8760
 gcatccatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcg 8820
 agtgcgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcg 8880
 ggcttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcgatgttgcg 8940

tgttcgagat cctacagagc tcatgccttg gcgtaatcat ggtcatagct gttcctgtg 9000
 taaaattgtt atccgctcac aattccacac aacatacagag cggaaagcat aaagtgtaaa 9060
 gcctgggtg cctaattgagt gagctaactc acattaattt cggtgcgtc actgcccgt 9120
 ttccagtcgg gaaacctgtc gtgccagctg cattaatgaa tcggccaaacg cgggggaga 9180
 ggccgttgc gtattggcg ctcttcgct tcctcgctca ctgactcgct gcgcctggc 9240
 gttcggtgc ggcgagcggt atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggtt atccacagaa 9300
 tcagggata acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaaggcc agcaaaaaggc caggaaccgt 9360
 aaaaaggccg cggtgcgtgc gttttccat aggctccgcc cccctgacga gcacacaaa 9420
 aatcgacgt caagtcaagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccagcggtt 9480
 cccccctggaa gtccttcgt gcgtctcct gttccgaccc tgccgcttac cggatacctg 9540
 tcgccttc tcccttcggg aagcgtggcg cttdtcata gtcacgctg taggtatctc 9600
 agttcggtgt aggtcggtcg ctccaaagctg ggctgtgtc acgaacccccc cggtcagccc 9660
 gaccgctgcg ctttatccgg taactatcg tttgagtcac accccggtaaag acacgactta 9720
 tcgcactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt aggccgtgt 9780
 acagagttt tgaagtggtg gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggtata 9840
 tgcgcctgc tgaagccagt taccttcggg aaaagagttt gtagctctt atccggcaaa 9900
 caaaccaccg ctggtagcgg tggttttt gtttgcaga acgagattac gcgcagaaaa 9960
 aaaggatctc aagaagatcc tttgatctt tctacgggt ctgacgctca gtggAACGAA 10020
 aactcacgtt aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctatgtcctt 10080
 ttaaattaaa aatgaagttt taaatcaatc taaagttat atgagtaaac ttggctgac 10140
 agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcgttcatcc 10200
 atagttgcct gactccccgt cgtgtagata actacgatac gggagggctt accatctggc 10260
 cccagtgcgt caatgatacc gggagaccca cgctcacccgg ctccagatt atcagcaata 10320
 aaccagccag ccggaaaggcc cgagcgcaga agtggctctg caactttatc cgcctccatc 10380
 cagtctatta atttgtcgg ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa tagttgcgc 10440
 aacgttggtg ccattgtac aggcatacgta gtgtcacgt cgtcggtttg tatgcttca 10500
 ttcaagtcgg gttcccaacg atcaaggcga ttacatgtat ccccatgtt gtgcaaaaaaa 10560
 gcggttagct ctccgggtcc tccgatcggt gtcagaagta agttggccgc agtggttatca 10620
 ctcatggta tggcagcaact gcataattt cttactgtca tgccatccgt aagatgttt 10680
 tctgtactg gtgagtagtca aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt 10740
 tgccttcgc cggcgtaat acggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg 10800
 ctcatcattt gaaaacgttc ttccccccgca aaactctcaa ggatcttacc gctgttgcg 10860
 tccagttcga tggtaaccac tcgtgcaccc aactgtatctt cagcatctt tacttcacc 10920
 agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg caaaatgcgg caaaaaaagg aataagggcg 10980
 acacggaaat gttgaataact catactttc cttttcaat attattgaag catttatcg 11040
 ggttattgtc tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataagg 11100
 gttccgcga cattttcccg aaaaagtgcac c 11131

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

<220>
 <223> pONY8.0Z
 <400> 10

agatcttcaa taataaaaatg tgggtttgtc cgaaatacgc gttttgagat ttctgtcgcc 60
gactaaattc atgtcgcgcg atagtgggt ttatcgccga tagagatggc gatattggaa 120
aaatttgcata ttgaaaatat ggcattttgtaa aatgtcgccg gatgtgagtt tctgtgttaac 180
tgatatcgcc atttttccaa aagtgtttt tgggcatacg cgatatctgg cgatagcgt 240
tatatcggtt acggggatg gcgatagacg actttgggtga cttgggcgtat tctgtgtgtc 300
gcaaaatatcg cagtttgcgt atagggtgaca gacgatatgtaa ggctatatcg cggatagagg 360
cgacatcaag ctggcacatg gccaatgtat atcgatctat acattgtatc aatattggcc 420
attagccata ttatccattt gttatatacg ataaatcaat attggctatt ggccattgtca 480
tacgttgcgtat ccatatcgta atatgtacat ttatattggc tcatgtccaa cattaccgccc 540
atgttgcgtat tgattattgtt ctagtttata atagtaatca attacgggtt cattagttca 600
tagcccatat atggagttcc gctttacata acttacggta aatggcccgcc ctggctgacc 660
gccccaaacgac cccccccat tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag taacgccaat 720
agggacttcc cattgacgtc aatgggtggta gtatggcgtt taaactgccc acttggcgt 780
acatcaagtg tatcatatgc caagtccggcc ccctattgtac gtcaatgtacg gtaaaatggcc 840
cgcttggcat tatgcccagt acatgaccctt acgggacttt cctacttggc agtacatcta 900
cgtattagtc atcgcttattt ccatgggtat gctgggtttgg cagttacacca atgggcgtgg 960

gactcacaaggatttccaagttccacccattgacgtcaatgggagttt020
ggactttccaaaatgtcgtaacaactgcgatcgcccgcc1080
taggcgtgtaaatgtggggggctatataagcagagtcgt1140
attctgcgttctqagtcctctatataagcagagtcgt1200
ctctacttcagtcctgtctctatataagcagagtcgt1260
gggacctgaggggggcgacccctacccgttgaacctgg1320
acagcagaggagaacttacaaggtttctctgaggtgttc1380
caggttaagatgggagaccctttgacatttgacaggcg1440
gacggtacaaaggcttcagaattaaactactggtaactgt1500
agacttatttcatgataccactttgtaaaagaaaaggac1560
tccattgtgtaaagatgtaaatctcagacgtgtcaggacaa1620
aacatggtggcaatttctgttataagatggcttccag1680
aaaggcatca ttccagctctaagagcgaatataaaaaag1740
gtctgagccctctgaagaatatctctagaaatctgtgatc1800
gaggcacgtggccgttgcaggaggatccggat1860
tatatagcataatcaatattgttgcatttgccattgtcata1920
atgtacatttatttgctcattgttccacaacttgcgtat1980
gttacatttataatgttataatgttataatgttgcata2040
gttacataac ttacggtaaaatggccctgttgcgttgcgt1800
acgtcaataatgttgcgtatgttccatagtaacgcaatag2160
ggactttcca ttgacgtcaatgggttgcgttgcgttgcgt2220
atcaagtgtatcatatgttgcgttgcgttgcgttgcgt2280
cctggcattatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt2340
tattagtcatcgcttattaccatgttgcgttgcgttgcgt2400
agcggtttga ctcacgggatatttccaagttccacccatcgttgcgt2460
tttggcaccaaaatcaacgggactttccaaatgtcgtaaaactccgcatttgcgt2520
aaatggggggtaggcgtgtacggtgggaggcttatataagcagactcgatgttgcgt2580
gtcagatcgcctggagacgcgttccacgttgcgttgcgttgcgt2640
gatccagccctcggggccccaaagttcagtcgttgcgttgcgttgcgt2700
cccagtcaccaatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt2760
ccctggcggttacccaaacttacgttgcgttgcgttgcgttgcgt2820
tagcgaagagggccgcacccatgttgcgttgcgttgcgttgcgt2880
gctgtttccctgggttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt2940
tcctgaggccgatactgtcgctgtccctaaactggcagatgcacgcgttgcgttgcgt3000
catctacaccaaacgttaacccatccatttgcgttgcgttgcgttgcgt3060
tccgacgggttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt3120
gacgcgaattttttgtatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt3180
ggtcgggttacggccaggacacgttgcgttgcgttgcgttgcgt3240
cgccggagaaaacgcctcgatgttgcgttgcgttgcgttgcgt3300
agatcaggatatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt3360
gactacacaaatcagcgatttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt3420
tgtactggaggtctgaatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt3480
ttctttatggcagggtgaaaatgttgcgttgcgttgcgttgcgt3540
tatogatgagcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt3600
gaaactgtggcgcggacgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt3660
cgacggcactgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt3720
aaatggctgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt3780
gcatcatactctgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt3840
gatgaagcagaacaactttatgttgcgttgcgttgcgttgcgt3900
gtacacgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt3960
cggttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt4020
ccatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt4080
acgcgttaacgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt4140
ggggaaatgaaatggccacgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt4200
cgatccttcccgccgggttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt4260
tatttgccttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt4320
gtccatcaaaatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt4380
cgccccacgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt4440
gtatccccgtttacaggcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt4500
tgatgaaaaacggcaaccgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt4560
tcgcccgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt4620
ggaagcaaaaaaccacgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt4680
gaccagcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt4740
ggatggtaagccgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt4800
gttattgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt4880

acgcgttagtgc aaccggaaacgc cgaccgcattgc gtcagaagcc gggcacatca ggcgcctggca 4860
gcagtggcgt ctggcgaaa accatctgacc accaggcggaaa tggatttttgc acctcagtgt gacgctcccc gccgcgtccc acgcctatccc 4920
taaccggccag tcagggcttgc gccgcgtgcgc gatcagggttca tttcacagat ttgcgatttggc gataaaaaaac aactgctgac 5040
gacccgcatt gaccctaaccg cgaaggcggcgt ttgttgcagt cgctcagcgg tggatttttgc gatcagggttca aactgctgac 5100
ggatctgcca ttgtcagaca ctggcagcatttc gatcagggttca cctgggttgcg acgctggaa gggcgccggcc attaccaggc 5160
ctgcgggacg cgccgaaatttgc catcagccgc tacagtcaac ggaagaaggc acatggctga ctggagcccg tcagttatcg
ggtctgggtgt caaaaataat ttttttaca aaatccctgg ggtatgggtgtcag tttaggtgtg catgcctgca ggaatttgc
gtacccagct ttgttccct caagcacaag taatacatga gaaacttttgc tgaacatgat tgaaggggac
aggactaagt tactaataaa accaaatttgc ttttttaca aaatccctgg ggtatgggtgtcag tttaggtgtg catgcctgca ggaatttgc
cattgtcagc ttttttaca aaatccctgg ggtatgggtgtcag tttaggtgtg catgcctgca ggaatttgc ttttttaca aaatccctgg
ggaaatctca accccttata cccaaacagtc agaaaaatct gtttcaacccat tattgttata ataatgacag taagaacacgc
aagagaccaa gaatgaacccat ttttttaca aaatccctgg ggtatgggtgtcag tttaggtgtg catgcctgca ggaatttgc
tggaaaatag gtatgtttct gttatgttataa gaccccttataa gttatgttataa gttatgttataa gttatgttataa
tatgaaggac tcccacagca acattatata ggttgggtgg gttatgttataa gttatgttataa gttatgttataa gttatgttataa
ggatctggcc aatcaaatttgc ctttttaca aaatccctgg ggtatgggtgtcag tttaggtgtg catgcctgca ggaatttgc
caaaatttac ttttttaca aaatccctgg ggtatgggtgtcag tttaggtgtg catgcctgca ggaatttgc ttttttaca aaatccctgg
ttattttagaa cttttaacccttataa gttatgttataa gttatgttataa gttatgttataa gttatgttataa gttatgttataa
ggaagtttagt aaagacttct ggttgggttataa gttatgttataa gttatgttataa gttatgttataa gttatgttataa
gacttaatttgc acataagaga gtttgggttataa gttatgttataa gttatgttataa gttatgttataa gttatgttataa
ctactgttat ttttttaca aaatccctgg ggtatgggtgtcag tttaggtgtg catgcctgca ggaatttgc ttttttaca aaatccctgg
taatggaaatcataatcccttataa gttatgttataa gttatgttataa gttatgttataa gttatgttataa gttatgttataa
taatagaacg aaaaataaaatcccttataa gttatgttataa gttatgttataa gttatgttataa gttatgttataa gttatgttataa
aactgtttaaa gggaaagaccaa gttatgttataa gttatgttataa gttatgttataa gttatgttataa gttatgttataa
gaacacatgt attttgcatttgc ttttttaca aaatccctgg ggtatgggtgtcag tttaggtgtg catgcctgca ggaatttgc
agtcaacaca atgggatgac ttttttaca aaatccctgg ggtatgggtgtcag tttaggtgtg catgcctgca ggaatttgc
ctacacttca tggagccagg atagttatgc ttttttaca aaatccctgg ggtatgggtgtcag tttaggtgtg catgcctgca ggaatttgc
tgggagcgttca ctttttaca aaatccctgg ggtatgggtgtcag tttaggtgtg catgcctgca ggaatttgc ttttttaca aaatccctgg
cttgccttataa gtttgcatttgc gtttgggttataa gttatgttataa gttatgttataa gttatgttataa gttatgttataa
gtcggttacccat ttttttaca aaatccctgg ggtatgggtgtcag tttaggtgtg catgcctgca ggaatttgc ttttttaca aaatccctgg
aggcccaaca caacatacac agcagaagta ctccaggaaac agagctgggt gaaatgttataa gttatgttataa gttatgttataa
gggagatttgc ttttttaca aaatccctgg ggtatgggtgtcag tttaggtgtg catgcctgca ggaatttgc ttttttaca aaatccctgg
atccctcaccat ttttttaca aaatccctgg ggtatgggtgtcag tttaggtgtg catgcctgca ggaatttgc ttttttaca aaatccctgg
gttgcatttataa gtttgggttataa gttatgttataa gttatgttataa gttatgttataa gttatgttataa gttatgttataa
tattttgggg actatgttataa gttatgttataa gttatgttataa gttatgttataa gttatgttataa gttatgttataa
ctgttataat aaggattttgc ttttttaca aaatccctgg ggtatgggtgtcag tttaggtgtg catgcctgca ggaatttgc ttttttaca aaatccctgg
tgcttgcatttataa gtttgggttataa gttatgttataa gttatgttataa gttatgttataa gttatgttataa gttatgttataa
atgttttagaa aaaaagggg gtttgggttataa gttatgttataa gttatgttataa gttatgttataa gttatgttataa gttatgttataa
taagagtaaa aagaaatgttgc ttttttaca aaatccctgg ggtatgggtgtcag tttaggtgtg catgcctgca ggaatttgc ttttttaca aaatccctgg
catgttgcataatcccttataa gttatgttataa gttatgttataa gttatgttataa gttatgttataa gttatgttataa gttatgttataa
acgcgtttaac ttcttgcatttgc gtttgggttataa gttatgttataa gttatgttataa gttatgttataa gttatgttataa gttatgttataa
agattctgcg gtttgggttataa gttatgttataa gttatgttataa gttatgttataa gttatgttataa gttatgttataa gttatgttataa
ttctctacttca agtccctgttca ttttttaca aaatccctgg ggtatgggtgtcag tttaggtgtg catgcctgca ggaatttgc ttttttaca aaatccctgg
ggcgttaatca ttttttaca aaatccctgg ggtatgggtgtcag tttaggtgtg catgcctgca ggaatttgc ttttttaca aaatccctgg
caacatacac gtttgggttataa gttatgttataa gttatgttataa gttatgttataa gttatgttataa gttatgttataa gttatgttataa
cacattaatt qcggttgcgttca ttttttaca aaatccctgg ggtatgggtgtcag tttaggtgtg catgcctgca ggaatttgc ttttttaca aaatccctgg

gcattaatga	atcgcccaac	gcgcggggag	aggcggtttg	cgtattggc	gctcttccgc	8700
ttcctcgctc	actgactcgc	tgcgctcggt	cgttcggctg	cgcgagcgg	tatcagctca	8760
ctcaaaggcg	gtaataacggt	tatccacaga	atcagggat	aacgcaggaa	agaacatgtg	8820
agcaaaaaggc	cagcaaaaagg	ccaggaaccg	taaaaaggcc	gcgttgcgg	cgttttcca	8880
taggctccgc	ccccctgacg	agcatcacaa	aaatcgacgc	tcaagtca	ggtggcggaa	8940
cccgcacagga	ctataaagat	accaggcgtt	tccccctgga	agctccctcg	tgcgctctcc	9000
tgttccgacc	ctgccgctta	ccggataacct	gtccgcctt	ctcccttcgg	gaagcgtggc	9060
gctttctcat	agctcacgct	gtaggtatct	cagttcggtg	tagtctgtt	gctccaagct	9120
gggctgtgtg	cacgaacccc	cggttcagcc	cgaccgctgc	gccttatcog	gtactatatcg	9180
tcttgagtcc	aacccggtaa	gacacgactt	atcgccactg	gcagcagcca	ctggtaacag	9240
gattagcaga	gcgaggtatg	taggcgggtc	tacagagtcc	ttgaagtgg	ggcctaacta	9300
cggtcacact	agaaggacag	tatttggtat	ctgcgtctg	ctgaagccag	ttaccttcgg	9360
aaaaagagtt	ggtagctctt	gatccggcaa	acaaaccacc	gtggtagcg	gtggttttt	9420
tgttgcgaaag	cagcagatta	cgcgagaaa	aaaaggatct	caagaagatc	ctttgatctt	9480
ttctacgggg	tctgacgctc	agtggAACGA	aaactcacgt	taagggattt	tggcatgag	9540
attatcaaaa	aggatcttca	cctagatctt	tttaaattaa	aaatgaagtt	ttaaatcaat	9600
ctaaagtata	tatgagtaaa	cttggctctga	cagttaccaa	tgcttaatca	gtgagggcacc	9660
tatctcagcg	atctgtctat	ttcggtcattc	catagttgc	tgactccccg	tcgtgttagat	9720
aactacgata	cgggaggggct	taccatctgg	ccccagtgc	gcaatgatac	cgcgagaccc	9780
acgctcaccc	gctccagatt	tatcagcaat	aaaccagcc	gcccggaaagg	ccgagcgcag	9840
aagtggctct	gcaactttat	ccgcctccat	ccagtctatt	aattgttgc	gggaagctag	9900
agtaagtagt	tcgcccgtta	atagttgcg	caacgttgg	gcatttgc	caggcatctg	9960
gggtgtcacgc	tgcgttgg	gtatggctt	attcagctcc	gttcccaac	gatcaaggcg	10020
agttacatga	tccccatgt	tgtgcaaaaaa	agcggtagc	tccttcggc	ctccgatctg	10080
tgtcagaagtt	aagttggccg	cagtgttato	actcatggt	atggcagcac	tgcataattc	10140
tcttactgtc	atgccccatcc	taagatgtt	ttctgtgact	ggtgagttact	caaccaagtc	10200
attctgagaa	tagtgtatgc	ggcgaccgg	ttgtctttgc	ccggcgtcaa	tacgggataa	10260
taccgcgcca	catagcagaa	ctttaaaagt	gctcatcatt	ggaaaacgtt	cttcggggcg	10320
aaaactctca	aggatcttac	cgctgttgc	atccagttcg	atgtaaacc	ctcggtcacc	10380
caactgatct	tcagcatctt	ttactttcac	cagcggttct	gggtgagcaa	aaacaggaag	10440
gcaaaatgcc	gcaaaaaagg	gaataaggc	gacacggaaa	tgttgaatac	tcataacttt	10500
ccttttcaa	tattattgaa	gcatttatca	gggttattgt	ctcatgagcg	gatacatatt	10560
tgaatgtatt	tagaaaaata	aacaaatagg	ggttccgcgc	acatttcccc	gaaaagtgc	10620
acctaaatttgc	taagcgtaa	tattttgtt	aaatcgcgt	taaatttttgc	ttaaatcagc	10680
tcatttttta	accaataggc	cgaaatcgcc	aaaatccctt	ataaaatcaa	agaatagacc	10740
gagatagggt	ttagtgcgtt	tccagttgg	aacaagagtc	cactattaaa	gaacgtggac	10800
tccaaacgtca	aaggcgaaaa	aaccgtctat	caggcgatg	gcccactacg	tgaaccatca	10860
coctaataccaa	gtttttggg	gtcgaggtgc	cgtaaaagcac	taaattcgaa	ccctaaaggg	10920
agccccccgat	ttagagcttgc	acggggaaag	ccaaacctggc	ttatcgaaat	taatacgact	10980
cactataqqq	aqaccqgc					10998

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

<220>
<223> pONY8.1Z

<400> 11

agatcttcaa taataaaatg tgtgtttgtc cgaaatacgc gttttgagat ttctgtcgcc 60
gactaaattc atgtcgcgat atagtgggtt ttatcgccga tagagatggc gatattggaa 120
aaattgatat ttgaaaatat ggcatttttttttga aaatgtcgcc gatgtgagtt tctgtgttaac 180
tgatatcgcc atttttccaa aagtgtttt tgggcatacg cgatatctgg cgatagcgct 240
tatatcgttt acgggggatg gcgatagacg actttggta cttgggcgtat tctgtgtgtc 300
gcaaatatcg cagtttcgtat ataggtaaca gacgatatga ggctatatcg ccgatagagg 360
cgacatcaag ctggcacatg gccaatgcattt atcgatctat acattgaatc aatattggcc 420
attagccata ttatttcattt gttatatacg ataaatcaat attggctatt ggccattgca 480
tacgttgtat ccatatcgta atatgtacat ttatattggc tcatgtccaa cattaccgcc 540
atgttgcacat tgatttttta ctagtttta atagtaatca attacgggtt cattagttca 600
tagcccatat atggagttcc gcttacata acttacggta aatggcccgcc ctggctgacc 660
gccccaaacgac ccccgcccat tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag taacgccaat 720
agggactttc cattgacgtc aatgggttggaa gtatttacgg taaaactgccc acttggcagt 780

acatcaagt tatcatatgc caagtcggcc ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc 840
 cgccctggcat tatgcccagt acatgacett acgggacttt cctacttggc agtacatcta 900
 cgtattagtc atcgcttata ccatggtgat gcgggtttgg cagtagaccca atggggctgg 960
 atageggttt gactcacggg gatttccaag tctccacccc attgacgtca atgggagtt 1020
 gttttggcac caaaatcaac gggactttcc aaaatgttgt aacaactgacg atcgccggcc 1080
 ccgttgcacgc aaatggccgg taggcgtgtc cgggtggagg tctatataag cagagcttgt 1140
 ttatgtgaacc gggcactcag attctcggt ctgagtcct tctctgtgg gctgaaaagg 1200
 cctttgtaat aaatataatt ctctactcag tccctgtctc tagttgtct gttcgagatc 1260
 ctacagttgg cggccgaaca gggacctgag aggggcgcag accctacctg ttgaacctgg 1320
 ctgatcgttag gatccccggg acagcagagg agaacttaca gaagtcttct ggaggtgttc 1380
 ctggccagaa cacaggagga cagtagaagat tgggagaccc tttgacattt gagcaaggcg 1440
 ctcaagaagt tagagaaggt gacggtacaa gggctcaga aattaactac tggtaactgt 1500
 aattgggcgc ctaagtctagt agacttattt catgatacca actttgtaaa agaaaaggac 1560
 tggcagctga gggatgtcat tccattgtgtc gaagatgtaa ctcagacgct gtcaggacaa 1620
 gaaagagagg cctttgaaag aacatggtgg gcaatttctg ctgtaaaagat gggcctccag 1680
 attaataatg tagtagatgg aaaggcatca ttccagctcc taagagcgaa atatgaaaag 1740
 aagactgtca ataaaaaagca gtctgagccc tctgaagaat atctctagaa ctatgtggatc 1800
 ccccccggctg caggagttggg gaggcacgt ggcgcgttt gtcgaggcg gatccggccat 1860
 tagccatatt attcatttgtt tatatacgat aaatcaat atggcttataat tggctattgg ccattgtcata 1920
 cgttgtatcc atatcataat atgtacattt atattggctc atgtccaaaca ttaccggccat 1980
 gttgacattt attattgtact agtatttaat agtaatcaat tacggggtca tttagttcata 2040
 gcccataat gtagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggccgcct ggctgaccgc 2100
 ccaacgaccc ccccccattt acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag 2160
 ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta aactgcccac ttggcagttac 2220
 atcaagtgtatc tcatatgcata agtacgcccc ctattgacgtt caatgacggt aaatggcccg 2280
 cctggcatta tgcccagttac atgacattt gggactttcc tacttggcag tacatctac 2340
 tattagtcat cgcttattttcattt atgtgtatgc gttttttggca gtacatcaat gggcgtggat 2400
 agcggtttga ctcacggggg tttccaaatcgttccaa aatgtcgtaa caactccgc ccattgacgc 2460
 tttggcacca aaatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa caactccgc ccattgacgc 2520
 aaatggccgg taggcgtgtc cgggtggagg tctatataag cagagcttgtt ttagtgaacc 2580
 gtcagatcgc ctggagacgc catccacgtt gttttgaccc tccatagaaga caccgggacc 2640
 gatccagccctt ccggggcccc aagtttccgt tgcgtcgatc tctgcggatc cggggaaattc 2700
 cccagtttca ggatccacca tgggggatcc cgctgttttta caacgtcgatc actggggaaaa 2760
 ccctggcggtt accccaactt atgccttgc agcacatccc cctttcgccaa gctggcgtaa 2820
 tagcgaagag gccccacccg atgccttgc ccaacagttt cgcagccgtatc atggcgaatg 2880
 ggcgtttccgc tgggttccgg caccagaagc ggtgcggaa agctggctgg agtgcgtatct 2940
 tcctgaggcc gatactgtcg tcgtccccctc aaactggcag atgcacgggtt acgtatgtgc 3000
 catctacacc aacgtaaactt atcccattttc ggtcaatccg cctttgttc ccacggagaa 3060
 tcogacgggt ttttacttgc tcacatttaa ttttgcgttca agtggcttac aggaaggcca 3120
 gacgcgaatt atttttgtatc ggcgttactt cgcgtttcat ctgtgtgc acggggctgt 3180
 ggtcggttac ggccaggaca gtcgtttgc gtcgttgcattt gacctgacgc catttttacg 3240
 cgcggagaa aaccgcctcg cgggtatggt gtcgttgc gtcgttgc gttatctgga 3300
 agatcaggat atgtggcgga tgagcggcat tttccgttgc gtcgttgc tgcataaaacc 3360
 gactacacaa atcagcgatt tccatgttgc cactcgctt aatgtatgtt tcagccgcgc 3420
 tgtactggag gtcgttgc gtcgttgc gtcgttgc gtcgttgc gtcgttgc gtcgttgc 3480
 ttctttatgg cagggtgaaa cgcaggatcg cagggttgc gtcgttgc gtcgttgc gtcgttgc 3540
 tattcgatggat cgtgttgc gtcgttgc gtcgttgc gtcgttgc gtcgttgc gtcgttgc 3600
 gaaactgtgg agcggccaaa tcccgaaatc tcccgaaatc tcccgaaatc tcccgaaatc 3660
 cgacggcaccg ctgatttgc gtcgttgc gtcgttgc gtcgttgc gtcgttgc gtcgttgc 3720
 aaatggctcg ctgtgttgc gtcgttgc gtcgttgc gtcgttgc gtcgttgc gtcgttgc 3780
 gcatcatctt ctgtgttgc gtcgttgc gtcgttgc gtcgttgc gtcgttgc gtcgttgc 3840
 gatgaaggcag aacaacttta acggcgatcg ctgttgc gtcgttgc gtcgttgc gtcgttgc 3900
 gtacacgctg tgcgttgc gtcgttgc gtcgttgc gtcgttgc gtcgttgc gtcgttgc 3960
 cggcatgggtt ccaatgttgc gtcgttgc gtcgttgc gtcgttgc gtcgttgc gtcgttgc 4020
 acggcgtaacg cgaatgttgc agcggatcg tttccgttgc gtcgttgc gtcgttgc gtcgttgc 4080
 gggaaatgaa tcaggccacg ggcgttacca gtcgttgc gtcgttgc gtcgttgc gtcgttgc 4140
 cgatccctcc cggccggatcg agtatgttgc gtcgttgc gtcgttgc gtcgttgc gtcgttgc 4200
 tatttgcctt atgtacgtcg gtcgttgc gtcgttgc gtcgttgc gtcgttgc gtcgttgc 4260
 gtcgttgc gtcgttgc gtcgttgc gtcgttgc gtcgttgc gtcgttgc gtcgttgc 4320
 cggccacgcg atgggttacca gtcgttgc gtcgttgc gtcgttgc gtcgttgc gtcgttgc 4380
 gtatccccgtt ttcacaggccg gtcgttgc gtcgttgc gtcgttgc gtcgttgc gtcgttgc 4440
 ttagtggaaac ggcaacccgtt gtcgttgc gtcgttgc gtcgttgc gtcgttgc gtcgttgc 4500
 tcgcccagttc tttatgttgc gtcgttgc gtcgttgc gtcgttgc gtcgttgc gtcgttgc 4560
 ggaagcaaaa caccaggacg agtttttccca gtcgttgc gtcgttgc gtcgttgc gtcgttgc 4620

gaccagcgaa tacctgttcc gtcatagcga taacgagctc ctgcacttggaa tggtgccgct 4680
 ggttggtaag ccgctggcaa gcgggtaaatg gctctggat gtcgtccac aaggtaaaca 4740
 gtttatttggaa ctgcctgaac taccgcagcc ggagagcgcc gggcaactctt ggctcacagt 4800
 acgcgtatgtt caaccgaacg cgaccgcatg gtcagaagcc gggcacatca ggcgcctggca 4860
 gcagtggcggtt ctggcgaaa acctcagtgtt gacgctcccc gccgcgtcccc aegccatccc 4920
 gcatctgacc accagegaaa tggatttttgc catcgagctg gtaataaagg tttggcaatt 4980
 taaccgcag tcaggttttgc tttcacagat gttggatttggc gataaaaaaaac aactgctgac 5040
 gccgctgcgc gatcagttca cccgtgcacc gctggataac gacattggcg taagtgaagg 5100
 gaccgcatt gaccctaacg cctgggtcga acgctgaag gcccggggcc attaccaggc 5160
 cgaagcagcg ttgttgcagt gcaacggcaga tacacttgc gatgcgggtgc tgattacgac 5220
 cgctcacgcg tggcagcattc agggggaaaaac ttattttatc agccggaaaaa cctaccggat 5280
 tggatggtagt ggtcaaatgg cgattaccgt tgatgttgc gttggcgagcg atacaccgc 5340
 tccggcgccggtt attggcttgc actgcccagctt ggcgcaggta gcaagagcggg taaaatggct 5400
 cggatttaggg cgcgaagaaa actatccgcg cgccttactt gccgcctgtt ttgaccgtg 5460
 ggatctgcctt ttgtcagaca tttatcccc gtaacgttcc cccagcgaaa acggctgcg 5520
 ctgcgggacg cgcgaatttgc attatggccc acaccagtgg cgcggcgactt tccagttcaa 5580
 catcagccgc tacagtcaac agcaactgtt gggaaaccgcg catgcgcacatc tgctgcacgc 5640
 ggaagaaggc acatggctga atatcgacgg tttccatatg gggatttggcg ggcacgactc 5700
 ctggagcccg tcaagtatcgg cggaaatttcc gtttgcggcc ggtcgcttacc attaccagg 5760
 ggtctgtgtt caaaaataat aataaaccggg cagggggat cccagatcc ggctgtggaa 5820
 tggatgttgcg ttaggggtgtt gaaagtcccc aggttccca gcaaggcagaa gttatgttgc 5880
 catgcctgcg ggaatttgcgat atcaagcttgc tgcataaccgtt cgaatttggaa gagctttaaa 5940
 tccggcaca tcttcatgtat caatgcctca gttatgttgc gggaaactgtt 6000
 gggtttttgc tgaggggttt tataaatgtt tataagatg tataagatg aaaaacaagg gggaaactgtt 6060
 ctcaaaactt tttatcaaccgaaaggacttagt ctcatgttgc taggcacta aaccgcaata 6120
 accgcatttgcg tgcgcggatgttcccttgcg tttccattgg tttatgttgcgat tttacaggat 6180
 ataagtgcgtt gtatttgcgat aattgggcac tttatgttgcgat tttatgttgcgat 6240
 ctgggctgaa aaggcccttgc taataaatat aatttcttac tcaatcccttgc tttatgttgcg 6300
 gtctgttgcg gatcctacag agtctcatgcg tttatgttgcgat tttatgttgcgat 6360
 gtgtgaaatttgc tttatgttgcgat cacaatttgcg tttatgttgcgat tttatgttgcgat 6420
 aaaggccctggg tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat 6480
 gctttccatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat 6540
 agagggcggtt tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat 6600
 gtctgttgcg tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat 6660
 gaatcaggggg tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat 6720
 cgtaaaaaggc tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat 6780
 aaaaatcgac tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat 6840
 tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat 6900
 ctgtccgcctt tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat 6960
 ctcaatgttgcg tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat 7020
 cccgcacgtt tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat 7080
 ttatcgccac tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat 7140
 gctacagatgtt tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat 7200
 atctgcgtt tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat 7260
 aaacaaaccca tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat 7320
 aaaaaggat tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat 7380
 gaaaacttccatgtt tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat 7440
 cttttaaattt tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat 7500
 gacagtaccatgtt tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat 7560
 tccatagttt tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat 7620
 ggcggccatgtt tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat 7680
 ataaaccaggc tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat 7740
 atccaggctt tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat 7800
 cgcaacgtt tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat 7860
 tcatttgcgtt tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat 7920
 aaaggcggtt tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat 7980
 tcacttcatgtt tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat 8040
 tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat 8100
 agtgcgtt tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat 8160
 gtgtcgtt tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat 8220
 agatccaggat tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat 8280
 accaggctt tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat 8340
 gcgacacggc tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat 8400
 cagggttattt tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat tttatgttgcgat 8460

ggggttccgc gcacattcc ccgaaaagtgc ccacctaataat tgtaagcggtt aatattttgt 8520
taaaatttcgc gttaaatttt tggtaaatca gtcattttt taaccaatacg gccgaaatcg 8580
gcaaaatccc ttataaatca aaagaataga ccgagatagg gttgagttt gttccagttt 8640
ggaacaagag tccactatta aagaacgtgg actccaaacgt caaagggcga aaaacccgtct 8700
atcaggcga tggcccacta cgtgaaccat caccctaatac aagtttttg gggtcgaggt 8760
gccgtaaagc actaaatcgg aaccctaaag ggagcccccg atttagagct tgacggggaa 8820
agccaacctg gcttatcgaa attaatacga ctcactatacg ggagaccggc 8870

5 <210> 12
 <211> 12481
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> pONY3.1
 <400> 12

agatcttcaa tattggccat tagccatatt attcattggt tatatacgat aaatcaatat 60
 tggctattgg ccattgcata cgttgtatct atatcataat atgtacattt atattggctc 120
 atgtccaata tgaccgcatt gttggcattt attattgact agtttataat agtaatcaat 180
 tacggggtca tttagttcata gcccataat gtagttccgc gttacataac ttacggtaaa 240
 tggcccgctt ggctgaccc ccaacgaccc cccgcattt acgtcaataa tgacgtatgt 300
 tcccatagta acgccaatag ggacttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta 360
 aactgccccac ttggcagttt atcaagtgtt tcatatgcca agtccgcccc ctattgacgt 420
 caatgacggt aaatggcccg cctggcattt tgcccaagtac atgaccttac gggactttcc 480
 tactggcag tacatctacg tattagtcat cgctattacc atgggtatgc ggttttggca 540
 gtacaccaat gggcgtggat agcgggttga ctcacgggta tttccaagtc tccacccat 600
 tgacgtcaat gggagttgt tttggcacca aaatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa 660
 caactgcgtt cggccgcccc gttgacgcaaa atggggcgta ggcgtgtacg gtgggaggtc 720
 tatataagca gagctcggtt agtgaaccgt cagatcacta gaagctttat tgccgttagtt 780
 ttcacacgtt aaattgtcaa cgcagtcgtt gtttctgaca caacagtetc gaacttaagc 840
 tgcagtgtact ctcttaaggt agccttgcag aagttggtcg tgaggcaactg ggcaggtaaag 900
 tatcaagggtt acaagacagg tttaaggaga ccaatagaaa ctgggcttgcg cgagacagag 960
 aagactcttg cgtttctgtt aggcacccat tggctttact gacatccact ttgcctttct 1020
 ctcacacgtt gtccactccc agtcaattt cagctcttaa ggcttagagta cttataacga 1080
 ctcactatag gctagccctcg aggtcgacgg ttcgcggca acagggaccc gagagggcg 1140
 cagacccctac ctgttgaacc tggctgtatcg taggatcccc gggacagcag aggagaactt 1200
 acagaagttt tctggagggtt ttctggccca gaacacagga ggacaggtaa gatgggagac 1260
 ccttgacat ggagcaaggc gctcaagaag tttagagaagg tgacggtaca agggtctcag 1320
 aaattaaacta ctggtaactg taattggcg ctaagtcttag tagacttatt tcatgatacc 1380
 aactttgtaa aagaaaagga ctggcagctg agggatgtca ttccatttgct ggaagatgtt 1440
 actcagacgc tgcctaggaca agaaaagagag gctttgaaa gaacatggtg ggcaattttct 1500
 gctgtaaaga tggccctcca gattaataat gtatgtatgt gaaaggcattt atccagctc 1560
 ctaagagcga aatataaaaaa gaagactgtt aataaaaaagc agtctgagcc ctctgaagaa 1620
 tatccaatca tgatagatgg ggctggaaac agaaaattttt gacctctaaac acctagagga 1680
 tataactt gggtaataac catacagaca aatggcttat taaaatgaagc tagtcaaaac 1740
 ttatttggta tattatcagt agactgtact tctgaagaaa tgaatgttatttttggatgtt 1800
 gtacctggcc aggcaggaca aaagcagata ttacttgcattt caatttgataa gatagcagat 1860
 gattggata atagacatcc attaccgaat gctccactgg tggcaccacc acaaggccct 1920
 attcccatga cagcaagggtt tattagaggt tttaggatgtc cttagagaaag acagatggag 1980
 cctgttttg atcagtttgcgacatcatat agacaatggta taatagaagc catgtcagaa 2040
 ggcataaaag tgatgattgg aaaaacctaaa gctcaaaaata tttaggcaagg agctaaggaa 2100
 ccttacccag aattttgtaga cagactttaa tcccaataaa aaagtgggg acatccacaa 2160
 gagatttcaa aattcttgcac tgatcacttgc actattcaga acgcaaatga ggaatgtttaga 2220
 aatgtatga gacatttaag accagaggat acattagaag agaaaatgtt tgcttgcaga 2280
 gacattggaa ctacaaaaca aaagatgtt ttattggcaaa aagcacttca gactggctt 2340
 gcggcccat taaaagggtgg agccttggaa ggaggccac taaaggcagc acaaacatgt 2400
 tataactgtt ggaaggccagg acatttatct agtcaatgtt gacccatcaa agtctgtttt 2460
 aaatgtaaac agcctggaca ttcttcaaaatg caatgttggaa gtgttccaaa aaacgggaag 2520
 caaggggctc aaggggggcc ccagaaaacaa actttcccga tacaacagaa gagtcagcac 2580
 aacaaatctg ttgtacaaga gactcctcag actcaaaaatc tgcgttccaga tctgagcga 2640
 ataaaaaagg aataacaatgtt caaggagaag gatcaagttagt aggtatctcaa cctggacagt 2700
 ttgttggagttt aacatataat ctagagaaaaa ggcctactac aatagtattt attaatgtt 2760

ctcccttaaa tgtactgtta gacacaggag cagatacttc agtgttgact actgcacatt 2820
 ataatagggtt aaaatataga gggagaaaaat atcaagggac gggataataa ggagtggag 2880
 gaaatgtgaa aacattttct acgcctgtga ctataaagaa aaagggtaga cacattaaga 2940
 caagaatgtc agtggcagat attccagtga ctatttggg acgagatatt ctgcaggact 3000
 taggtgcaaa attgggtttg gcacagctc ccaaggaaat aaaatttaga aaaatagagt 3060
 taaaagaggg cacaatgggg cccaaaattc ctcataatggcc actcactaaag gagaactag 3120
 aaggggccaa agagatagtc caaagactat tgtcagaggg aaaaatatac gaagctagt 3180
 acaataatcc ttataattca cccatatttgc taataaaaaa gaggctgtgc aaatggaggt 3240
 tattacaaga tctgagagaa ttaaacaaaaa cagtacaagt aggaacggaa atatccagag 3300
 gattgcctca cccgggagga ttaattaaat gtaaacacat gactgttatta gatattggag 3360
 atgcataatcc cactataccc tttagatccag agtttagacc atatacagct ttcaactattc 3420
 cctccattaa tcatcaagaa ccagataaaa gatatgtgtg gaaatgttta ccacaaggat 3480
 tcgtgttgag cccatataata ttcagaaaaa cattacagga aattttacaa ccttttaggg 3540
 aaagatatcc tgaagtacaa ttgtatcaat atatggatga ttgttcatg ggaagtaatg 3600
 gttctaaaaa acaacacaaaa gagttaatca tagaattaag ggcgatctt ctggaaaagg 3660
 gttttgagac accagatgtt aaattacaag aagtgcacc ttatagctgg ctaggttattc 3720
 aactttgtcc tggaaattggg aaagtacaaa aaatgcaatt agacatggta aagaatccaa 3780
 cccttaatga tggcaaaaaa ttaatggggg atataacatg gatgagctc gggatcccag 3840
 gggtgacagt aaaacacatt gcagctacta ctaaggatg tttagagttt aatcaaaaag 3900
 taatttggac ggaagaggca caaaaagagt tagaagaaaa taatgagaag attaaaaatg 3960
 ctcaagggtt acaatattat aatccagaag aagaatgtt atgtgaggtt gaaattacaa 4020
 aaaattatga ggcaactt atgttataaaac aatcacaagg aatcctatgg gcaggtaaaa 4080
 agattatgaa ggctaataag ggtggcata cagtaaaaaa tttaatgtt ttgttgcac 4140
 atgtggcaac agaaaagtatt actagagtag gaaaatgtcc aacgtttaag gtaccattt 4200
 ccaaagagca agtaatgtgg gaaatgcacaa aaggatggta ttatttttgc ctcccagaaa 4260
 tagtatatac acatcaagta gttcatgtatg attggagaat gaaatggta gaagaaccta 4320
 catcaggaat aacaatatac actgatgggg gaaaacaaaaa tggagaagga atagcagctt 4380
 atgtgaccag taatggaga actaaacaga aaaggtagg acctgtcaat catcaagttt 4440
 ctgaaagaat ggcaatataa atggcattag aggttaccatg agataaaacaa gtaatatacg 4500
 taactgtatgt ttattttgt tggaaaaata ttacagaagg attaggttta gaaggaccac 4560
 aaagtccctt gttccctata atacaaaata tacgagaaaa agagatagtt tattttgttt 4620
 ggttacctgg tcacaaaaggg atatatggta atcaattggc agatggagcc gcaaaaataa 4680
 aagaagaaat catgttagca tcccaaggca cacaatataa agagaaaaaga gatgaagatg 4740
 cagggtttga cttatgtgtt ctttatgtaca tcatgatacc tttatgtgc acaaaaatca 4800
 tacccacaga tggaaaaattt caagttccct ctaatagttt tggatgggtc actggaaaat 4860
 catcaatggc aaaacagggg ttattataa atggaggaat attgtatgaa ggatatacag 4920
 gagaatatac agtgtatgtt actaatattt gaaaatgttta tattaaattt atagaggac 4980
 aaaaatttgc acaattataattt atactacacg atcaactaaat ttccagacacg ctttggatg 5040
 aaaataaaat atctcaagaa ggggataaaag gatttggaaat tacaggatg ttctggtag 5100
 aaaatattca ggaagcacaatg gatgaacatg agaattggca tacatccaa aagatattgg 5160
 caagaaattt taagataccat ttgactgttag caaaacagat aactcaagaa ttttgcatt 5220
 gcactaagca aggatcagga cctgcaggtt gtgtcatgatg atctcctaaat cattggcagg 5280
 cagattgcac acatltggac aataagatataa tattgtatgtt tttatgtca aattcaggat 5340
 acatacatgc tacattattt tccaaaagaaa atgcattatg tacttcattt gctattttt 5400
 aatgggcaag attgtttca cccaaatgcct tacacacaga taacggact aattttggatg 5460
 cagaaccagt tggaaattttt tggaaatgttcc taaagatagc acataccaca ggaataccat 5520
 atcatccaga aagtcaagggtt atgtatgtt gggcaatataa gacattgtaaa gagaagattc 5580
 aaagtcatag agacaacact caaacactgg aggccatctt acaacttgc ctcattactt 5640
 gtaacaaaagg gggggaaatg atggggaggac agacaccatg ggaagttttt atcactaatac 5700
 aagcacaagt aatacatgtatgtt aacttttgc tacacacaga acaatccccc aaaaatttt 5760
 gtttttacaa aatccctggt gaaatgttattt ggaaggggacc tactagggtt ctgtggagg 5820
 gtgtatgtgc agtagtagttt aatgtatgtt gggggaaatg aattgtatgtt ccattaaacca 5880
 ggactaagttt actaataaaaa cccaaatgtt gtttttgc ggaagcaaga cccaaactacc 5940
 attgtcagct gtgtttccctg aggtctctatg gaaatgttattt cttttatgtt cttttatgtt 6000
 agaagaataa acaaagactg aaggcaatcc aacaaggaaatg acaaccccttcc tattttttat 6060
 aaggtttgc atatggggatg attttgtttt gggggatataa ggttgcacat ggttgcacat 6120
 gggggatccc agggggatcc tcaaccccttta ttacccaaatc gttttttttt tttttttttt 6180
 aggagaacac aatgtttca cccatattttt gttttttttt tttttttttt tttttttttt 6240
 aatcgaagga agcaagagac caagaaatgtt gttttttttt tttttttttt tttttttttt 6300
 gaagaaatgtt gttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 6360
 gaataactttt gttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 6420
 gggggatccc aacccggatct gggccatccaa atgctataga atgctgggtt tccttccccc 6480
 ggtgttagacc atttcaaaaat tacttcattt gttttttttt tttttttttt tttttttttt 6540
 ataataactgc tacattattttaa gaaatataac ccaatataac tgctctataa ataacaaaac 6600

agaatttagaa acatggaagt tagtaaagac ttctggcata actccttac ctatttcttc 6660
 tgaagctaac actggactaa ttagacataa gagagatttt ggtataagtg caatagtggc 6720
 agctattgtt gccgctactg ctattgtgc tagcgctact atgtcttatg ttgctctaac 6780
 tgaggttaac aaaataatgg aagtacaaaaa tcatacttt gaggttagaaa atagtaactct 6840
 aaatggtagt gatttaatag aacgacaaat aaagatatta tatgtctatga ttcttcaaac 6900
 acatgcagat gttcaactgt taaaggaaag acaacaggta gaggagacat ttaatttaat 6960
 tggatgtata gaaagaacac atgtatTTT tcatactggc catccctgga atatgtcatg 7020
 gggacattt aatgagtc acaaattggg tgaactggta agcaaaaatgg aagatttaaa 7080
 tcaagagata ctaactacac ttcatggagc caggaacaat ttggcacaat ccatgataac 7140
 attcatacata ccagatagta tagtcaatt tggaaaagac ctttgagtc atattgaaa 7200
 ttggattcct ggattggag cttccattat aaaatataa gtgatgttt tgcttattta 7260
 tttgttacta accttcttc ctaagatctt cagggccctc tggaaaggta ccagtgtgc 7320
 agggcttcc ggcagtcgtt acctgaagaa aaaattccat cacaacatg catcgccgaga 7380
 agacacctgg gaccaggccc aacacaacat acacctagca ggcgtgaccg gtggatcagg 7440
 ggacaaatac tacaaggcaga agtactccag gaacgactgg aatggagaat cagaggagta 7500
 caacaggccg ccaaagagct gggtaagtc aatcgaggca tttggagaga gctatatttc 7560
 cgagaagacc aaaggggaga ttcttcagcc tggggccgct atcaacgagc acaagaacgg 7620
 ctctgggggg aacaatcttcc accaagggtc cttagacctg gagattcgaa gccaaggagg 7680
 aaacatttat gactgttgc ttaaagccca agaaggaact ctcgctatcc cttgctgtgg 7740
 atttccctt aggctattttt gggactagt aattatagta ggacgcatac caggctatgg 7800
 attacgttgc ctcgctgtt taataaggat ttgttatttga ggcttaaatt tgatatttga 7860
 aataatcaga aaaatgtttt attatattgg aagagcttta aatccctggca catctcatgt 7920
 atcaatgcct cagtagttt agaaaaacaa gggggaaact gtggggtttt tatgaggggt 7980
 tttataatg attataagag taaaaagaaa gttgctgtatg ctctcataac ctgtataac 8040
 ccaaaggact agctcatgtt gctaggcaac taaaccgcaa taaccgcatt tgcacgcga 8100
 gttccccatt ggtgacgcgtt ggtacctcta gagtgcaccc gggccgcgc ttccttttag 8160
 tgagggttaa tgcttcgagc agacatgata agatacattt atgagtttg acaaaccaca 8220
 actagaatgc agtgaaaaaa atgtttttt tttgaaattt gtgatgtat tgccttattt 8280
 gtaaccatta taagctgaa taaacaagtt aacaacaaca attgcattca tttttagttt 8340
 caggttcagg gggagatgtt ggaggtttt taaagcaagt aaaacctcta caaatgtgg 8400
 aaaatccat aaggatcgat ccggctggc gtaatagcga agaggccgc accgatcgcc 8460
 cttcccaaca gttgcgcagc ctgaatggcg aatggacgcg ccctgttagcg ggcattaaag 8520
 cgccgggggt gtgggtgtt cgcgcagcgat gaccgcata cttgcgcagcg ccctagcgcc 8580
 cgctcccttc gtttcttcc cttccctttt cgcacgttc gccggcttcc cccgtcaacg 8640
 tctaaatcgq gggctccctt tagggttccg atttagagct ttacggcacc tgcaccccaa 8700
 aaaacttgc ttgggtgtat gttcacgtat tggccatcg ccctgtataga cggtttttcg 8760
 cccttgacg ttggagtccat cgttctttaa tagtggactt ttgttccaaa ctggaaacaac 8820
 actcaaccct atctcggtctt atttttttga ttataaaggg attttggcga ttccggctt 8880
 ttggtaaaa aatgagctga ttttacaaat atttaacgcg aattttaaaca aaatattaaac 8940
 gtttacaat tgccttcgtat cggttatttc tccttacgca tctgtgcggg atttcacacc 9000
 gcatacgcgg atctgcgcag caccatggcc tggaaataacc tctggaaaggag gaacttgggt 9060
 aggtacccctt tgaggcggaa agaaccagct gttgaatgtg tgcgtttag ggtgtggaaa 9120
 gtccccaggg tccccagcg gcaagaatgat gcaaaagcatc catctcaattt agtcacac 9180
 cagggtgttga aagtccccag gctccccagc aggcagaatg atgcaaaagca tgcacatcaa 9240
 tttagtcgca accatagtc cgccttcaac tccgccttcc cgccttcaaa ctcggcccg 9300
 ttccgccttcc tctccgcctt atggctactt aattttttt atttatgcag aggccgaggc 9360
 cgccttcggcc tctgtatccat tccagaagtgat gtgaggaggc ttttttggag gccttaggtt 9420
 ttgcaaaaat ttgttattttt ctgacacaac agtctcgaac ttaaggctag agccacccatg 9480
 attgaacaag atggatttgc cgcagggttctt cggccgcattt ggggtggagag gcttattggc 9540
 tatgacttggg cacaacagac aatcggttgc tctgtatccat cctgttccg gctgtcagcg 9600
 caggggcgcc cggttctttt tgtaagacc gacctgtccg gtgcctgaa tgaactgcac 9660
 gacgaggccg cgcggctatc gtggctggcc acgacggcg ttccttgcgc agctgtgtc 9720
 gacgttgtca ctgaagccgg aaggacttgc tgcgttattgg gcaaggatgc gggccaggat 9780
 ctcctgtcat ctcaccttgc ttctggccgag aaagtatcca tcatggctga tgcaatgcgg 9840
 cggctgcata cgcgttgcattt ggcttacccgc accaaggcga acatcgatc 9900
 gagcgagcac gtactcgat ggaagccggt ttgtcgatc aggatgtatc ggacgaagag 9960
 catcaggggc tgcgcgcagc cgaactgttc cccaggctca aggccgcgcat gcccgcggc 10020
 gaggatctcg tctgtacca tggcgatggc tgcgttgcga atatcatggt gggaaatggc 10080
 cgctttctg gattcatcg ctgtggccgg ctgggtgtgg cggaccgcata tcaggacata 10140
 gcgttggcta cccgtat tgcgttgcgc aatgggttgc cgcgttgcgc 10200
 gtgttttacg gtatgcgcgc tcccgatttc cagcgcatac ctttctatcg ctttcttgac 10260
 gagttttctt gacggggact ctggggttcg aatgaccga ccaaggcgcacg cccaaactgc 10320
 catcacgtt gccgcaataa aatatcttta ttttatttac atctgtgtgt tggtttttg 10380
 tgtgaatcga tagcgataaag gatccgcgtt tggtgactc tcagtcataat ctgtctgtat 10440

gccgcatagt taagccagcc ccgacacccg ccaacacccg ctgacgcgcc ctgacgggct 10500
 tgttgtcc cggcatccgc ttacagacaa gctgtgaccg tctccggag ctgcatgtgt 10560
 cagaggtttt caccgtcatac accgaaacgc gcgagacgaa agggccttgt gatacgccta 10620
 tttttatagg ttaatgtcat gataataatg gtttctttaga cgtcaggtgg cactttcgg 10680
 gaaaaatgtgc gcggAACCC tatttgtta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg 10740
 ctcatgagac aataacccctg ataaaatgtt caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt 10800
 attcaacatt tccgtgtcgc ccttattccc tttttgcgg cattttgcct tcctgttttt 10860
 gctcaccagg aaacgctgg gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcaacgagtg 10920
 gtttacatcg aactggatct caacacgcgt aagatcctt agagttttcg ccccaagaa 10980
 cgtttccaa tggatgagcac ttttaaagtt ctgctatgtg ggcgggtatt atcccgatt 11040
 gacgccccgc aagagcaact cggtcgcgcg atacactatt ctcagaatga cttgggtttag 11100
 tactcaccag tcacagaaaaa gcatcttacg gatggcatga cagtaagaga attatgcagt 11160
 gctgccataa ccatgagtga taacactgcg gccaacttac ttctgacaac gatggagga 11220
 ccgaaggagc taaccgcctt tttgcacaac atgggggatc atgttaactcg cttgtatcg 11280
 tgggaaccgg agctgaatga agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgt 11340
 gcaatggcaa caacgttgcg caaactattt actggcgaac tacttactt agcttcccg 11400
 caacaattaa tagactggat ggaggcggat aaagttgcag gaccacttct ggcgtcgcc 11460
 ctcccgctg gctggtttat tgctgataaaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcgg 11520
 atcattgcag cactggggcc agatggtaag ccctcccgta tcgttagttat ctacacgacg 11580
 gggagtcagg caactatgga tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgccctcactg 11640
 attaaggcatt ggtaactgtc agaccaagtt tactcatata tacttttagat tgatttaaaa 11700
 cttcattttt aatttaaag gatcttagtg aagatcctt ttgataatct catgacccaa 11760
 atcccttaac gtgagtttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaaa gatcaaagga 11820
 tcttctttag atcctttttt tctgcgcgtt atctgtgtc tgcaaaacaaa aaaaccaccg 11880
 ctaccagcg 11940
 ggcttcagca gagcgcagat accaaataact gtccttctag tgtagccgtt gttaggccac 12000
 cacttcaaga actctgttagc accgccttaca tacctcgctc tgctaatct gttaccagt 12060
 gctgctgcga gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg 12120
 gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgtca cacagcccg cttggagoga 12180
 acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc 12240
 gaagggagaa aggcggacag gtatccgtt agcggcaggg tcggAACAGG agagcgcacg 12300
 agggagctt cagggggaaa cgcctggat ctttatagtc ctgtcggtt tggccacctc 12360
 tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcagggggc ggagcctatg gaaaaacgcc 12420
 agcaacgcgg ctttttacg gttccctggcc ttttgcgtca cttttgcgtca catggctcg 12480
 C
 12481

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

<220>
 <223> pCneoERev

10

<400> 13

tgaataataa aatgtgtgtt tgccgaaat acgcgtttt 60
attcatgtcg cgcgatagtg gtgtttatcg ccgataagaga tggcgatatt ggaaaaattg 120
atatttggaaa atatggcata ttggaaaatgt cgcccgatgtg agtttctgtg taactgatat 180
cgcccatttt cccaaatgtt ttttggca taacgcataat ctggcgatacg cgcttatatc 240
gtttacgggg gatggcgata gacgactttt gtgacttggg cgattctgtg tgtcgaaat 300
atcgagttt cgatatacgat gacagacgat atgaggctat atcgccgata gaggcgacat 360
caagctggca catggccaaat gcatatcgat ctatacattt aatcaatatt ggccattagc 420
catattttt attgggtata tagcataaaat caatattggc tattggccat tgcatacggt 480
gtatccatat cgtaatatgt acatttat tggctcatgt ccaacattac cgccatgtt 540
acattgatta ttgacttagtt attaatagta atcaattacg gggtcattag ttcatagccc 600
atatatggag ttccgcgtt cataacttac ggttaatggc ccgcctggct gaccggccaa 660
cgaccccccgc ccattgacgt caataatgac gtatgttccc atagtaacgc caatagggac 720
tttccattga cgtcaatggg tggagtattt acggtaaact gcccaacttgg cagtacatca 780
agtgtatcat atgccaagtc cgccccctat tgacgtcaat gacggtaaat ggccgcctg 840
gcattatgcc cagtacatga ctttacggga ctttcctact tggcagtaca tctacgtatt 900
agtcatcgct attaccatgg tgatgcgggtt ttggcagtac accaatgggc gtggatagcg 960
gtttgactca cggggatttc caagtctcca ccccaattgac gtcaatggga gtttgggg 1020
gcaccaaaat caacgggact ttccaaaatg tgcgtacaac tgcgtatcgcc cgcccggtt 1080

acgcaaatgg gcggtaggcg tgcgttgtgg gaggtctata taagcagagc tcgttagtg 1140
 aaccgtcaga tcaactagaag ctttattgcg gtagtttatac acagttaat tgctaagca 1200
 gtcagtgcct ctgacacaac agtctcgaa ttaagctgca gtactctct taaggtagcc 1260
 ttgcagaagt tggctgttag gcaactggca ggttaagtatac aaggttacaa gacaggttt 1320
 aggagacca a tagaaactgg gctgtcgag acagagaaga ctcttgcgtt tctgataggc 1380
 acctattggt ctactgaca tccactttgc cttctctcc acagggtgtcc actcccagtt 1440
 caattacagc tcttaaggct agagtaactt atacgactca ctataggcta gtaacggccg 1500
 ccagtgtctt ggaattccgc ttatggcaga atcgaaggaa gcaagagacc aagaaatgaa 1560
 cctgaaagaa gaatctaaag aagaaaaaag aagaaatgac tggtgaaaaa tagatcctca 1620
 gggccctctg gaaggtgacc agtgggtcag ggtcctccgg cagtcgttac ctgaagaaaa 1680
 aattccatca caaacatgca tgcgagaag acacctggga ccaggcccaa cacaacatac 1740
 acctaggcagg cgtgaccggg ggatcagggg acaaatacta caagcagaag tactccagga 1800
 acgactggaa tggagaatca gaggagtaca acaggccggc aaagagctgg gtgaagtcaa 1860
 tcgaggcatt tggagagacg tatattccg agaagaccaa aggggagatt tctcagectg 1920
 gggcggctat caacgagcac aagaacggct ctggggggaa caatcttcac caagggtct 1980
 tagacccgtt gattcgaagc gaaggaggaa acatttatga agccgaattc tgcagatatac 2040
 catcacactg gcccggctt ccctttatgtt agggtaatg ctcgagcag acatgataag 2100
 atacattgtat gagttttggac aaaccacaa tagaatgcag tggaaaaaaat gctttatgg 2160
 tggaaatttgtt gatgttatttgc ctttattttgtt aaccatata agtgcataa aacaagttaa 2220
 caacaadaat tgcatttatttgc ctttattttca ggttcagggg gagatgtggg aggtttttta 2280
 aagaagtaa aaccttatac aatgtggtaa aatccgataa ggatcgatcc gggctggcgt 2340
 aatagcgaag aggcggccac cgatcgccct tcccaacagt tgcgagccct gaatggcga 2400
 tggacccggcc ctgtacggc gcattaaagcg cggcgggtgt ggtgttacg cgcagcgtga 2460
 cccttacact tgcacggcc ctacggcccg ctccttgc tttttccct tcccttcgc 2520
 ccacgttgcg cggctttccc cgtcaagctc taaatcgggg gtcctttaa gggttcccgat 2580
 ttagagctttt acggcacctc gaccgcaaaa aacttgattt ggtgtatgg tcaatgttg 2640
 ggcacatgccc ctgatagacg gtttttcgc ctttgcgtt ggagtccacg ttctttaata 2700
 gtggactctt gttccaaact ggaacaacac tcaaccctat ctcggcttat ttttttgcatt 2760
 tataaggat tttgcogatt tcggcttatt ggtttttttt tgatgttattt taacaaatata 2820
 ttaacgcgaa ttttacaaa atattaacgt ttacaatttc gctgtatgcg gtattttctc 2880
 cttaacgcattc tggcggtat ttacacccgc atacggat ctgcgcagca ccatggctc 2940
 aaataaccc tggaaagagga acttggtagt gtaatcttcg aggcggaaag aaccagctgt 3000
 ggaatgtgtg tcagtttaggg tggaaatgtt ccccaagctc cccagcaggc agaagtatgc 3060
 aaagcatgca tctcaatttgc tcaacccatca ggtgtgaaaa gttccccaggc tccccagcag 3120
 gcaagatgt gcaaaacatg catctcaattt agtcaagcaac catatgtccc cccctaactc 3180
 cgcctatccc gcccctaact cgcggcgtt cgcggccatc tccggcccat ggcgtactaa 3240
 ttttttttat ttagtgcagag gcccggccgc ctcggccctc tgatgttattt cagaagtagt 3300
 gaggaggctt ttttggaggc ctaggctttt gcaaaaagct tgatttttgc gacacaaacag 3360
 tcgtcaactt aaggcttagag ccacccatgtat tgaacaaagat ggattgcacg cagggttctc 3420
 ggccgcttgg gtggagaggg tattcggtca tgactggca caacagacaa tgggtgttgc 3480
 ttagtgcggcc gtgttccggc tgcgttgcgca gggccggccg gttttttttt tcaagaccga 3540
 cctgtccgggt gcccgtatg aactgcaggc cggccggccg cggctatcgt ggcgtggccac 3600
 gacggggctt ctttgcggcc ctgtgcgtca ctttgcgttactt gaaagggaa gggactggct 3660
 gctattttggc gaagtgcggg ggcaggatct cctgtcatct cacccttgcgc tgcggccgaa 3720
 agtattccatc atggctgtatg caatgcggcc gtcgcatacg ctgtatccggc ctacccgc 3780
 attcgaccac caagcggaaac atcgcatcga gcaacatgtt acatggatgg aagccggct 3840
 tgcgtatgcg gatgtatcttgg acgaagagca tcaacccatc ggcggccatc aacttttgc 3900
 caggctcaag ggcgcgtatc cgcacggccg ggcgttgcgc tgcgttgcgc ggcgttgcgc 3960
 ctttgcggat atcatgggtt aaaaatggccg ctttttgcgc ttcatgcact gtcggccgct 4020
 ggggtggccg gaccgtatc aggacatagc gttggctacc ctttgcgttactt gtcggccgct 4080
 tggcgccgaa tgggtgttgc gtttttgcgc ttttgcgttactt atcgccgcgc cccatgc 4140
 ggcacatgccc ttctatgcgc ttcttgcgc gtttttgcgc gggggactct ggggttgc 4200
 atgaccgacc aagcgacgccc caacccatc tcaacatgcgc cgcacatggc tatctttatt 4260
 ttcattacat ctgtgtgttgc gtttttgcgc tgaatgcata gcaacatggc tccgcgtatc 4320
 gtgcactctc agtacaatct gtcgtatgc cgcataatgc acggccggcc gacacccgc 4380
 aacaccgcgt gacggccctt gacgggttgc tctgttgcgc gtcgttgcgc ttcacatgc 4440
 tgcgtatgc tccggggatc gtcgtatgc gtcgttgcgc ttcacatgc cggccatgc 4500
 gagacggaaag ggcgtatc tcaacatgc gtcgttgcgc ttcacatgc ttcacatgc 4560
 ttcttagacg tcaacatgc ttcacatgc gtcgttgcgc ttcacatgc ttcacatgc 4620
 ttcttaataa cattcaataa tgcgtatgc tcaacatgc ttcacatgc ttcacatgc 4680
 ataataattgtt aaaaaggaaat gtcgtatgc tcaacatgc ttcacatgc ttcacatgc 4740
 ttttgcggcc ttttgcgttgc tcaacatgc ttcacatgc ttcacatgc ttcacatgc 4800
 tgcgtatgc gtcgttgc ttcacatgc ttcacatgc ttcacatgc ttcacatgc 4860
 gatccttgcg gtttttgcgc cggacaaacgc ttttccatgc ttcacatgc ttcacatgc 4920

gctatgtggc gcggattat cccgtattga cgccggcaa gagcaactcg gtcggccat 4980
 acactattct cagaatgact tggttgagta ctcaccagtc acagaaaaagc atcttacgga 5040
 tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc atgagtgata acactgcggc 5100
 caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta accgctttt tgacacaacat 5160
 gggggatcat gtaactcgcc ttgatcggtt ggaaccggag ctgaatgaag ccataccaaa 5220
 cgacgagcgt gacaccacga tgcctgttagc aatggcaaca acgttgcgc aactattaac 5280
 tggcgaacta cttaacttag ctcccggca acaattaata gactggatgg aggccgataa 5340
 agttgcagga ccacttctgc gtcggccct tccggctggc tggtttattt ctgataaaatc 5400
 tggagccgtt gagcgtgggt ctcgcggat cattgcagca ctggggccag atggttaagcc 5460
 ctcccgtatc gtagttatct acacgacggg gagtcaaggca actatggatg aacgaaatag 5520
 acagatcgct gagataggtg cctcaactgat taagcattgg taactgtcag accaagtta 5580
 ctcatatata cttagattt attaaaact tcatttttaa ttaaaaaggaa tctaggtgaa 5640
 gatcctttt gataatctca tgacaaaaat cccttaacgt gagtttctgt tccactgagc 5700
 gtcagacccc gtagaaaaaga tcaaaggatc ttctttagat ctttttttc tgccgtaat 5760
 ctgctgttg caaacaaaaa aaccaccgtt accagcgggtg gtttgggtgc cggatcaaga 5820
 gtcaccaact cttttccga agttaactgg cttcagcaga ggcgcagatac caaataactgt 5880
 ctttctagtg tagccgttgt taggcacca cttcaagaac tctgttagcac cgcctacata 5940
 ctcgcgtctg ctaatctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt cgtgtttac 6000
 cgggttggac tcaagacgat agttaccggta aaggcgcag cggtegggtt gaacgggggg 6060
 ttctgtcaca cagcccaact tgagcgaac gacctacacc gaaactgagat acctacagcg 6120
 tgagctatga gaaagcgcac cgttcccgaa agggagaaaag gcccgcaggt atccggtaag 6180
 cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag ggacccca gggggaaaacg cctggtatct 6240
 ttatagtcct gtcgggttgc cccacctctg acttgcgcgt cgattttgtt gatgtcgtc 6300
 agggggccgg agcctatgga aaaacgcgcac caacgcggcc ttttacggt tccctggcctt 6360
 ttgtggcat ttgttcaca tggctcgaca gatct 6395

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

 <220>
 <223> pESYNREV

 <400> 14

5

10

tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaaatca atattggcta 60
 ttgccattg catacgttgt atctatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc 120
 aatatgaccg ccatgttggc attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg 180
 gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc 240
 gcctggctga ccgccccaaacg acccccggcc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat 300
 agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gaggatattac ggttaactgc 360
 ccacttggca gtacatcaag tttatcataat gccaagtcgg ccccttattt acgtcaatga 420
 cggtaaatgg ccggccttggc attatgcccc gtacatgacc ttacgggact ttctctactt 480
 gcagtagatc tacgtatttag tcatcgctat taccatgggtg atgccccgtt ggcagtacac 540
 caatgggcgt ggatagcggg ttgactcagc gggatttcca agtctccacc ccattgacgt 600
 caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaaatgtc gtaacaactg 660
 cgatcgcccc ccccggttgc gcaaatgggg ggttaggggtg tacgggtggg ggtctatata 720
 agcagagctc gtttagtgaa ccgtcagatc actagaagct ttattgcggg agtttatcac 780
 agttaaattt ctaacgcagt cagtgcatttct gacacaacag tctcgaactt aagctgcagt 840
 gactcttta aggttagcctt gcagaagttt gtcgtgaggc actggggcagg taagtatcaa 900
 ggttacaaga cagggttaag gagaccaata gaaactgggc ttgtcgagac agagaagact 960
 cttgcgttcc ttagtggcac ctattggctt tactgacatc cactttgcct ttctctccac 1020
 aggtgtccac tcccaggatca attacagctc ttaaggctag agtacttaat acgactcact 1080
 ataggcttagc ctgcagaatt cgccaccatg gctgagagca aggaggccag ggatcaagag 1140
 atgaacctca aggaagagag caaagaggag aagcggccgca acgactgggt gaaatcgac 1200
 ccacaaggcc ccctggaggg ggaccagtgg tgccgcgtgc tgagacagtc cctggccgag 1260
 gagaagattc ctgcacccatc ctgcacatcgcc agaagacacc tggccccgg tcccacccag 1320
 cacacaccct ccagaaggga taggtggatt agggggcaga ttttgcacgc cgaggcttc 1380
 caagaaaggc tggaaatggag aatttaggggc gtgcacacaag ccgtctaaaga gctgggagag 1440
 gtgaatcgcg gcatctggag ggagctctac ttccgcgagg accagagggg cgatttctcc 1500
 gcatggggag gctaccagag ggcacacaagaa aggctgtggg gcgagcagag cagccccccgc 1560
 gtcttgaggc ccggagactc caaaagacgc cgcaaacacc ttttgcacgc accccggccgg 1620
 ccgttccct ttagtgggg ttaatgcattt gaggcagacat gataagatac attgtatgagt 1680

ttggcacaac cacaactaga atgcagtgaa aaaaatgctt tatttgtaa atttgtgatg 1740
ctattgcctt atttgtaacc attataaagct gcaataaaaca agttaacaac aacaattgca 1800
ttcattttat gttcagggtt cagggggaga tggggaggt ttttaaagc aagtaaaacc 1860
tctacaatg tggtaaaatc cgataaggat cgatccgggc tggcgtata gcgaagaggc 1920
ccgcaccat cgcccttccc aacagttgag cagcctgaat ggcgaatgga cgccctgt 1980
agggcgcat taagegcggc gggtgtggg gttacgcgc ggtgacgc tacacttgc 2040
agggccctag cgccccgtcc ttcgccttc tcccttctc ttctegccac gtcgcccggc 2100
tttccccgtc aagctctaaa tggggggtc ctttaggggt tccgatttag agcttacgg 2160
cacctcgacc gcaaaaaact tagacggttt ttcgccttt caaactggaa caacactcaa ccctatctcg tttttttt 2220
ccgatttcgg cctattgggt aaaaaatggag ctgatTTTaaatattaa cgcgaatttt 2400
aacaatataat taacgtttac aatttcgcct gatgcggtat tttctctta cgcattctgt 2460
cggtatttca caccgcatac gggatctgc gacgcaccat ggcctgaaat aacctctgaa 2520
agaggaactt ggttaggtac tttaggglgtg gaaagtcccc aatggatccca gcaaggcagaa gtagcaaaag catgcatttc 2640
aatttagtcag caaccagggt agcatgcattcaatttagtca cttctgaggc gggaaagaacc agctgtggaa tttttttt 2700
ctaactccgc ccagttccgc ccatttcgg cccatggct gactaatttt tttttttt 2760
gcagaggccg agggcgcctc ggccctctgag ctattccaga agtagtgagg aggctttttt 2880
ggagggcttag gcttttgc当地 agcatggat tttcttgaca caacagtctc gaacttaagg 2940
ctagagccac catgattgaa agaggctatt cggctatgac tgggcacaac agacaatcg gttctgtat gccgcgtgt 3060
tccggctgtc agcgcagggg tgaatgaact gcaaggacgag gcaaggcggc tttttgtcaa gaccgacctg tccggtgccc 3120
gcccgggtgt gtcactgaag cggggaggaa tgggattca tcatctcacc ttgtctctgc cgggtgggt gtggcggacc 3600
ctgatgcaat gggccggctg catacgcttgc atccggctac tggccattc gaccaccaag 3360
cgaaacatcg catcgagcga gcacgtaact ggtatggaaagc cggctttgtc gatcaggatg 3420
atctggacga agagcatcag gggctcgccg cagccgaact tttccggccagg ctcaaggccg 3480
gcatgcccga cggcgaggat ctgtctgtga cccatggcg tgcctctgtt cgaatataca 3540
tgggtggaaaa tggccgtttt gctatcgatg gatccgttgc tttttttt 3840
ctgacccgtt cctctgtctt atccggcttgc atccggcttgc tttttttt 3900
atccggcttct tttttttt 3960
atccggcttct tttttttt 4020
atccggcttct tttttttt 4080
atccggcttct tttttttt 4140
atccggcttct tttttttt 4200
atccggcttct tttttttt 4260
atccggcttct tttttttt 4320
atccggcttct tttttttt 4380
atccggcttct tttttttt 4440
atccggcttct tttttttt 4500
atccggcttct tttttttt 4560
atccggcttct tttttttt 4620
atccggcttct tttttttt 4680
atccggcttct tttttttt 4740
atccggcttct tttttttt 4800
atccggcttct tttttttt 4860
atccggcttct tttttttt 4920
atccggcttct tttttttt 4980
atccggcttct tttttttt 5040
atccggcttct tttttttt 5100
atccggcttct tttttttt 5160
atccggcttct tttttttt 5220
atccggcttct tttttttt 5280
atccggcttct tttttttt 5340
atccggcttct tttttttt 5400
atccggcttct tttttttt 5460
atccggcttct tttttttt 5520

tcctgttacc agtggctgct gccagtggcg ataaagtctgt tcttacccggg ttggactcaa 5580
gacgatagtt accggataag gcgcagcggt cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc 5640
ccagcttggc gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct acagcgttag ctatgagaaa 5700
gcgcacacgt tcccgaaggg agaaaggcgg acaggtatcc gtaagcggc agggtcggaa 5760
caggagagcg caccggggg cttccagggg gaaacgcctg gtatctttat agtctgtcg 5820
ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat ttttgtatc ctcgtcaggg gggcgagcc 5880
tatgaaaaaa cggccagcaac gcggccttt tacggttcct ggcctttgc tggcctttg 5940
ctcacatggc tcgacagatc t 5961

5 <210> 15
<211> 4307
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> *gag-pol* de VIH con codones optimizados
<400> 15

atggggcccc ggcgcagcgt gctgtcgccc ggcgagctgg accgctggga gaagatccgc 60
 ctgcgcggcg gggcaaaaaa gaagtacaag ctgaagcaca tctgtgtggc cagccgcgaa 120
 ctggagcgct tcgcgtgaa cccgggctc ctggagacca gcgagggtg cgcgcagatc 180
 ctgcggcaac tgcagcccgag cctgcaaaacc ggcagcgagg agctgcgcag cctgtacaac 240
 accgtggcca cgctgtactg cgtccaccag cgcacatgaaa tcaaggatac gaaagaggcc 300
 ctggataaaa tcaagagagga acagaataag agcaaaaaga aggcccaaca ggccgcccgcg 360
 gacacccggac acagcaacca ggtcagccag aactacccca tctgtgcagaa catccagggg 420
 cagatgggtgc accaggccat ctccccccgc acgctgaacg cctgggtgaa ggtggtgaa 480
 gagaaggctt ttagccccggaa ggtgataccc atgttctcag ccctgtcaga gggagccacc 540
 ccccaagatc tgaacaccat gtcacacaca gtggggggac accaggccgc catcagatg 600
 ctgaaggaga ccatcaatga ggaggctgcc gaatgggatc gtgtgcattc ggtgcacgca 660
 gggcccatcg caccggggca gatgcgtgag ccacggggct cagacatcg cggaaacgact 720
 agtacccttc aggaacagat cggtctggatg accaacaacc caccatccc ggtgggagaa 780
 atctacaaac gctggatcat cctggccctg aacaagatcg tgcgcatttgc tagccctacc 840
 agcatcctgg acatccggca agggccgaag gaacccttc ggcactacgt ggaccgggttc 900
 tacaacacgc tccgcgcga gcaggctagc caggaggtga agaactggat gaccgaaacc 960
 ctgtggtcc agaacgcgaa cccggactgc aagacgatcc tgaaggccct gggcccaagcg 1020
 gctaccctag agggaaatgtat gaccgcctgt cagggagtgg gggggccgg ccacaagggca 1080
 cgcgtcctgg ctgaggccat gagccaggtg accaactccg ctaccatcat gatgcagcgc 1140
 ggcaacttcc ggaaccaacg caagatcgta aagtgcattca actgtggcaaa agaagggcact 1200
 acagcccgca actgcaggggc ccctaggaaa aagggtgttt gggaaatgtgg aaaggaaagga 1260
 caccaaatga aagattgtac ttagagacag gtcatttttt taggaaagat ctggcccttcc 1320
 cacaaggggaa ggccaggggaa ttttcttcag agcagacccag agccaacacgc cccaccagaa 1380
 gagagcttca ggtttggggaa agagacaaca actcccttc agaaggcagga ggcgatagac 1440
 aaggaactgt atccttttagc ttccctcaga tcactctttg gcaagcgcacc ctgcgcacaa 1500
 taaagatagg ggggcagctc aaggaggctc tccctggacac cggagcagac gacaccgtgc 1560
 tggaggagat gtcgttgcca ggcgcgtgaa agccgaagat gatcgggggaa atcggcggtt 1620
 tcatacaaggat ggcgcagttat gaccagatcc tcatacgaaat ctgcggccac aaggctatcg 1680
 gtaccgtgtt ggtggggccc acacccgtca acatcatcg acgcaacctg ttgacgcaga 1740
 tcggttgcac gtcgaacttc cccattagcc ctatcgagac ggtaccgggtt aagctgaagc 1800
 ccgggatgga cggcccgaaag gtcaagcaat ggccattgac agaggagaag atcaaggcact 1860
 tggggagat ttgcacacagat atggaaaagg aaggggaaaat ctccaagatt gggcctgaga 1920
 acccgatcaa cacggccgggtg ttgcacatca agaagaagga ctgcacgaaa tggcgcaagc 1980
 tggggactt cgcgcagctg aacaagcqca cgcaagactt ctggggaggtt cagctggca 2040
 tccccgcaccc cgcagggtcg aagaagaaga aatccgtgac cgtactggat gtgggtgatg 2100
 cctacttctc cgttccctcg gacgaagact tcaggaagta cactgccttc acaatccctt 2160
 cgatcaacaa cgagacacccg gggattcgat atcagtagcaa cgtgcgtccc caggcgtgga 2220
 aaggctctcc cgcaatcttc cagagtagca tgaccaaaaat cttggagcct ttccgcacaa 2280
 agaaccggca catcgatcata tatcagtaca tggatgactt gtacgtggc tctgatctag 2340
 agatagggca gcacccgcacc aagatcgagg agctgcgcac gcacctgttgcg 2400
 tgaccacacc cgacaagaag caccagaagg agccctccctt cctctggatg ggttacgc 2460
 tgcacccctga caaatggacc gtgcaggctt tctgtgtgc agagaaagac agctggactg 2520
 tcaacgcacat acagaagctg gtggggaaat tgaactggc cagtcagatt taccgggaa 2580
 ttaaggttag gcaactgtgc aaactccctcc gggaaacca ggcactcaca gaggtgatcc 2640
 ccctaaccga ggaggcccgag ctgcactgg cagaaaaaccg agagatccca aaggagcccg 2700

tgcacggcgt gtactatgac ccctccaagg acctgatgcg cgagatccag aagcaggggc 2760
 aaggccagtg gacctatcg atttaccagg agcccttcaa gaacctgaag accggcaagt 2820
 acgcccggat gaggggtgcc cacactaacg acgtcaagca gctgaccgag gccgtgcaga 2880
 agatcaccac cgaaagcatc gtatctggg gaaagactcc taagttcaag ctgcccattcc 2940
 agaaggaaac ctgggaaacc tggtgacag agtattggca gccacactgg attctctgagt 3000
 gggagttcgt caacacccct cccctggta agctgtggta ccagctggag aaggagccca 3060
 tagtgggcgcg cgaaacccctc tacgtggatg gggccctaa cagggagact aagctggca 3120
 aagccggata cgtcaactaac cggggcagac agaagttgt caccctcaact gacaccacca 3180
 accagaagac tgagctgcag gcattttacc tcgcttgca gactctggc ctggaggtga 3240
 acatcgtgac agactctcgat tatgccctgg gcatcatca agcccagcca gaccagagt 3300
 agtccgagct ggtcaatcgat atcatcgagc agtctgatcaa gaaggaaaag gtctatctgg 3360
 cctgggtacc cgccccacaaa ggcatggcg gcaatgagca gtcgacaag ctggtctcg 3420
 ctggcatcgag gaaggtgcta ttctggatg gcatcgacaa gcccaggac gagcacgaga 3480
 aataccacag caactggcg gcatggcta gcgacttcaa cttggccctt gtggggcca 3540
 aagagatcgat ggccagctgt gacaagtgtc agtcaaggcg cgaagccatg catggccagg 3600
 tggactgttag ccccgccatc tggcaactcg attgcacccaa tctggagggc aagtttatcc 3660
 tggtagccgt ccatgtggcc agtggctaca tcgaggccga gtcattccc gcccggaaacag 3720
 ggcaggagac agcctacttc ctcttgaagc tggcaggccg gtggccagtg aagaccatcc 3780
 atactgacaa tggcagcaat ttccaccatgt ctacgttaa gcccgcctgc tggggggcg 3840
 gaatcaagca ggagttcggg atccccatca atccccagag tcagggcgatc gtcgagtcta 3900
 tgaataagga gttaaagaaag attatcgcc aggtcagaga tcaggcttag catctcaaga 3960
 ccgcggtcca aatggcggtt ttcatccaca atttcaagcg gaaggggggg attgggggggt 4020
 acagtgcggg ggagcggatc gtggacatca tcgcgaccga catcccgact aaggagctgc 4080
 aaaagcgat taccaagatt cagaatttcc gggtctacta cagggacacg agaaatcccc 4140
 tctggaaagg cccagcgaag ctcccttggc agggtgaggg ggcagtagtg atccaggata 4200
 atagcgacat caaggtggtg cccagaagaa aggcaagat cattaggat tatggcaaac 4260
 agatggcgagg tgatgattgc gtggcgagca gacaggatga ggattag 4307

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

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

5 <400> 16
 10

atgggcgatc ccctcacctg gtccaaagcc ctgaagaaac tggaaaaagt caccgttcag 60
 ggtagccaaa agcttaccac aggcaattgc aactggcat tgcctctgtt ggatctttc 120
 cacgacacta atttcgttaa ggagaaagat tggcaactca gagacgttat cccctcttg 180
 gaggacgtga cccaaacatt gtctggcag gagcgcgaag cttdcgagcg cacctggtgg 240
 gccatcagcg cagtcaaaat gggctgcaatcaacaacg tggttgacgg taaagctagc 300
 tttcaactgc tccgcgctaa gtacgagaag aaaaccgcca acaagaaaca atccgaacct 360
 agcgaggagt acccaattat gatcgacggc gccggcaata ggaacttcg cccactgact 420
 cccaggggct ataccacctg ggtcaacacc atccagacaa acggacttt gaacaagcc 480
 tcccagaacc tggcggcat cctgtctgtg gactgcacct cccaaagaaat gaatgtttt 540
 ctgcacgtgg tgccaggaca ggctggacag aaacagatcc tgctcgatgc cattgacaag 600
 atcgccgacg actgggataa tcgcaccccc ctgccaaacg cccctctgtt ggctcccca 660
 caggggccta tccctatgac cgcttaggtt attagggac tgggggtgcc cccgcaacgc 720
 cagatggagc cagcattga ccaattttagg cagacactaca gacagtggat catcaagcc 780
 atgagcggagg ggattaaagt catgatcgga aagcccaagg cacagaacat caggcagggg 840
 gccaaggaac cataccctga gttgtcgac aggttctgtt cccagattaa atccgaaggc 900
 caccctcagg agatctccaa gttcttgaca gacacactga ctatccaaa tgcaaatgaa 960
 gagtgcagaa acgccatgag gcacctcaga cctgaagata ccctggagga gaaaatgtac 1020
 gcatgtcgcg acattggcac taccaagcaa aagatgtatgc tgctcgccaa ggctctgca 1080
 accggcctgg ctggtcattt caaaggagga gcactgaagg gaggtccattt gaaagctgca 1140
 caaacatgtt ataattgtgg gaagccagga catttatcta gtcaatgtat agcacctaaa 1200
 gtctgtttt aatgtaaaca gcctggacat ttctcaaaggc aatgcagaag tggccaaaa 1260
 aacgggaagc aaggggctca agggaggccc cagaaacaaa ctttcccgat acaacagaag 1320
 agtcagcaca acaaattctgt tgacaaagag actcctcaga ctcaaaatct gtacccagat 1380
 ctgagcgaaa taaaaaaagga atacaatgtc aaggagaagg atcaagtaga ggatctcaac 1440
 ctggacagtt tggggagta acataacaatc tcgagaagag gcccactacc atcgctctga 1500
 tcaatgacac ccctcttaat gtgctgctgg acacccggagc cgacaccagc gttctcaacta 1560

ctgctcacta taacagactg aaatacagag gaagggaaata ccagggcaca ggcacatcg 1620
 gcgttggagg caacgtcgaa acctttcca ctcctgtcac catcaaaaag aaggggagac 1680
 acattaaaac cagaatgtg gtcgcccaca tccccgtcac catcttggc agagacattc 1740
 tccaggacct gggcgctaaa ctcgtgtgg cacaactgtc taaggaaatc aagttccgca 1800
 agatcgagct gaaagagggc acaatgggtc caaaaatccc ccagtggccc ctgacccaaag 1860
 agaagcttga gggcgctaaag gaaatcgtgc agcgcctgtc ttctgagggc aagattagcg 1920
 aggcacgaga caataacccct tacaacagcc ccatcttgc gattaagaaa aggagccgca 1980
 aatggagact cctgcaggac ctgaggaaac tcaacaagac cgtccaggtc ggaactgaga 2040
 tctctcgccc actgcctcac cccggccggcc tgattaaatg caagcacatg acagtccctg 2100
 acattggaga cgcttatttt accatcccccc tcgatcctga atttcgcctcc tatactgctt 2160
 ttaccatccc cagcatcaat caccaggagc ccgataaaacg ctatgtgtgg aagtgcctcc 2220
 cccagggatt tggcttttagc ccctacattt accagaagac acttcaagag atccctcaac 2280
 ctccccgca aagataccca gaggttcaac tctaccaata tatggacgac ctgttcatgg 2340
 ggtccaaacgg gtctaaagaaag cagcacaagg aactcatcat cgaactgagg gcaatccctcc 2400
 tggagaaagg cttcgagaca cccgacgaca agctgcaaga agttcctcca tatactggc 2460
 tggcttacca gttttggccct gaaaactggg aagtccagaa gatgcagttg gatatggtca 2520
 agaacccaaac actgaacgac gtccagaagg tcatggccaa tattacctgg atgagctccg 2580
 gaatccctgg gcttaccgtt aagcacattt cgcactaacaaaaggatgc ctggagttga 2640
 accagaaggcatttggaca gaggaagctc agaaggaact ggaggagaat aatgaaaaga 2700
 ttaagaatgc tcaagggttc caataactaca atccccgaaga agaaaatgttgc tgccagggtcg 2760
 aaatcaactaa gaactacgaa gccacctatg tcatcaaaca gtccccagggc atcttgggg 2820
 ccggaaaagaa aatcatgaag gccaacaaag gctggccac cgttaaaaat ctgatgctcc 2880
 tgctccagca cgtcgcacc gagtctatca cccgcgtcgcc caagtgcctcc accttcaaaag 2940
 ttcccttcac taaggaggcag gtgatgtggg agatgcaaaaa aggctggta tactcttggc 3000
 ttcccgagat cgtctacacc caccagggttgc tgccacgacg ctggagaatg aagtttgc 3060
 aggagcccac tagcggattt acaatctata ccgcacggggg aaagcaaaaac ggagaggggaa 3120
 tcgctgcata cgtcacatct aacggccgca ccaagcaaaa gaggctcgcc cctgtcactc 3180
 accaggtggc tgagaggatg gctatccaga tggcccttga ggacactaga gacaaggcagg 3240
 tgaacattgt gactgacagc tactactgtc ggaaaaacat cacagaggcc cttggccctgg 3300
 agggacccca gtctccctgg tggccctatca tccagaatat ccgcqaaaag gaaattgtct 3360
 atttcgcctg ggtgccttggc cacaaggaa tttacggcaaa ccaactcgcc gatgaaggccg 3420
 cccaaaattaa agaggaaatc atgcttgcctt accaggggcac acagattaag gagaagagag 3480
 acgaggacgc tggctttgac ctgtgtgtgc catacgacat catgattccc gttacgcaca 3540
 caaaagatcat tccaaaccat gtcaagatcc aggtgccacc caattcattt ggttgggtga 3600
 ccggaaaagtc cagcatggct aagcagggtc ttctgattaa cgggggaatc attgatgaag 3660
 gatacaccgg cggaaatccag gtgatctgca caaatatcgcc caaaaagcaat attaagctt 3720
 tcgaaggggca gaagtgcgtt caactcatca tcctccagca ccacagcaat tcaagacaac 3780
 ctggggacga aaacaagatt agccagagag gtgacaqagg cttccggcagc acaggtgtgt 3840
 tctgggttggc gaacatccag gaagcacagg acgagcacga gaattggcac acctccctca 3900
 agattttggc ccccaattttc aagatcccac tgactgtggc taagcagatc acacaggaat 3960
 gcccccaactg caccaaaacaa ggttctggcc ccgcgggctg cgtgatgggg tcccccaatc 4020
 actggcaggc agattgcacc cacctcgaca acaaaaattat cctgacccctc gtggagagca 4080
 attccggcta catccacgca acactccctc ccaaggaaaaa tgcattgtgc acctccctcg 4140
 caattcttggc atggggccagg ctgttcttc caaaatccctt gcacaccggc aacggccacca 4200
 actttgtggc tgaacctgtg gtgaaatctgc tgaagttccctt gaaaatcgcc cacaccactg 4260
 gcattcccta tcaccctgaa agccaggggc ttgtcgagag ggccaaacaga actctgaaag 4320
 aaaaagatcca atctcacaga gacaatacac agacattggc ggccgcactt cagctgcggcc 4380
 ttatcacctg caacaaaaggc agagaaaagca tggggccca gacccctgg gaggtcttca 4440
 tcactaacca ggcccaggcc atccatgaaa agctgctttt gcagcaggcc cagtcctcca 4500
 aaaaaggcttctg cttttataag atccccgggtt agcagcactg gaaaggctt acaagagttt 4560
 tggggaaagg agacggccca gttgtgtggc acgatgagggg caaggggatc atcgctgtgc 4620
 ccctgacacgc caccacatccatcaagc caaacttga 4658

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

<220>
 <223> pIRESIhygESYNGP

10 <400> 17

aattcgccac catggcgat cccctcacct ggtccaaagc cctgaagaaa ctggaaaaag 60

tcaccgttca gggtagccaa aagcttacca caggcaattg caactggca ttgtccctgg 120
 tggatcttt ccacgacact aatttcgtta aggagaaaaga ttggcaactc agagacgtga 180
 tccccctttt ggaggacgtg acccaaacat tgtctggca ggagcgcgaa gctttcgagc 240
 gcacctggtg ggccatcagc gcagtcaaaa tggggctgca aatcaacaac gtggttgacg 300
 gtaaagctag ctttcaactg cttccgcgta agtacgagaa gaaaaccgc aacaagaaac 360
 aatccgaacc tagcgaggag taccgaattt tgatcgacgg cgccggcaat aggaacttcc 420
 gcccactgac tcccgagggc tataccacat gggtcaacac catccagaca aacggacttt 480
 tgaacgaagc ctccccagaac ctgttccggca tctgtctgt ggactgcacc tccgaagaaa 540
 tgaatgttt totcgacgtg gtgccaggac aggctggaca gaaacagata ctgtcgatg 600
 ccattgacaa gatcgccgac gactgggata atcgccaccc ctggccaaac gcccctctgg 660
 tggctccccc acaggggcct atccatgatca ccgttaggtt cattagggga ctgggggtgc 720
 ccccgogaacg ccagatggag ccagcatttg accaatttag gcagacactac agacagtgg 780
 tcatcgaagc catgagccgag gggattaaag tcatgtatcg aaagcccaag gcacagaaca 840
 tcaggcaggg ggccaaaggaa ccataccctg agtttgcga caggttctg tcccgattt 900
 aatccgaagg ccacccctcg gagatctcca agtttgcac agacacactg actatccaaa 960
 atgcaaatga agagtgcaga aacgcacatga ggcacccatcg accttgcagg accctggagg 1020
 agaaaatgtt cgcacatgtcg gacattggca ctaccaagca aaagatgtatcg ctgtcgcca 1080
 aggctctgca aacccggctt gctggcttcat tcaaaaggagg agcaactgaa ggaggccat 1140
 tgaaagctgc acaaacatgt tataattgtt ggaagccagg acatttatct agtcaatgtt 1200
 gagcacctaa agtctttt aaatgtaaac agcctggaca ttcttcggaa caatgcagaa 1260
 gtgttccaaa aaacgggaag caaggggctc aaggaggcc ccagaaacaa actttcccg 1320
 tacaacagaa gatcagcac aacaaatctg ttgtacaaga gactcctcg actcaaaatc 1380
 tggatccaga tctgagcgaa ataaaaaaagg aatacaatgt caaggagaag gatcaagttag 1440
 aggcacatca cctggacagt ttgtgggagt aacatacaat ctgcgagaaga gggccactac 1500
 catgtctcg atcaatgaca cccctttttaa tctgtctgt gacaccggag ccgacaccag 1560
 cgttctact actgctctact ataacagact gaaatacaga ggaaggaaat accaggccac 1620
 aggcacatc ggggttggag gcaacgtcga aacctttcc actcctgtca ccatcaaaaa 1680
 gaaggggaga cacattaaaa ccagaatgtt ggtcgccgac atccccgtca ccatccttgg 1740
 cagagacatt ctccagggcc tggcgctaa actcgtgtcg gacacaactgt ctaagaaat 1800
 caagttccgc aagatcgagc tggaaagaggg cacaatgggt ccaaaaatcc cccagtggcc 1860
 cctgaccaaa gagaagctt gggcgctaa gggaaatgtt cggccctgtc ttctgaggg 1920
 caagatttgc gaggccagcg acaataaccc ttacaacatcg cccatctttt tgattaagaa 1980
 aaggagccgc aaatggagac tctgtcgagga cctgagggaa ctcaacaaga cctgtccagg 2040
 cggaaacttag atctctcgat gactgcctca ccccgccggc ctgattaaat gcaagcacat 2100
 gacagtctttt gacattggag acgttattt taccatcccc ctgcatectg aatttcgccc 2160
 ctatactgtt ttaccatcc ccagcatca tcaccaggag cccgataaaac gctatgtgt 2220
 gaagtgcctc ccccaggat ttgtgttttgc cccctacatt taccagaaga cacttcaaga 2280
 gatccctccaa ctttcccgcg aaagataacc agaggttcaa ctctaccaat atatggacga 2340
 cctgttcatg gggtccaaacg ggtctaagaa gcaagcacaag gaactcatca tgcactgt 2400
 ggcaatccctc ctggagaaag gttcgagac acccgacgac aagctgcacg aagttccctc 2460
 atatagctgg ctggcttacc agctttgcgg tggaaactgg aaagtccaga agatgcagtt 2520
 ggtatggtc aagaacccaa cactgaacga cgtccagaag ctcatggca atattacctg 2580
 gatgagctcc ggaatccctg ggcttacgt taagcacatt gcccacacta caaaaggatg 2640
 cctggagttg aaccagaagg tcattttggac agaggaagct cagaagggaa tggagggaa 2700
 taatgaaaag attaagaatg ctcaagggtt ccaataactac aatcccgaag aagaatgtt 2760
 gtgcgagggtc gaaatctacta agaactacga agccacctat gtcataaaac agtcccaagg 2820
 catcttgcgg gccggaaaga aaatcatgaa ggcacacaaa ggctggccaa cctgtttttt 2880
 tctgtatgtc ctgtccatcg acgtcgccac cgagtctatc acccgccgtcg gcaagtgc 2940
 caccttccaa gttccctca ctaaggagca ggtgatgtgg gagatgcacca aaggctggta 3000
 ctactcttgg ctccccggaa tctgtctacac ccaccaatgt gtgcacgacg actggagaat 3060
 gaagcttgc gaggagccca ctacggaaat tacaatctat accgcacggcg gaaagcaaaa 3120
 cggagaggga atcgtcgat acgtcacatc taacggccgc accaagcaaa agaggctgg 3180
 cccgtcact caccaggatgg ctgagaggat ggctatccat atggcccttg aggacactag 3240
 agacaagcag gtgaacatttgc tgaactgacag ctactactgc tgaaaaaaca tcacagaggg 3300
 ccttggccgt gaggggcccc agtctccctg gtggccatcc acccagaata tccgcggaaa 3360
 gggaaattgtc tatttcgtt ggggtccctgg acacaaaggaa attacggca accaactcg 3420
 cgatgaagcc gccaaaattt aagaggaaat catgttgc taccaggggca cacagattaa 3480
 ggagaagaga gacgaggacg ctggctttga cctgtgtgtg ccatacgaca tcatgattcc 3540
 cgttagcgac acaaagatca ttccaaacgca tgcataatgc caggtgcaccc ccaatttatt 3600
 tgggtgggtg accggaaatgtt ccagcatggc taagcagggtt ctgttgcattt acggggaaat 3660
 cattgtatgaa ggatacaccg gcaaaatccaa ggtgatctgc acaaataatcg gcaaaagca 3720
 tattaagctt atcgaaggcc agaagttcg tcaactcatc atcctccatc accacagca 3780
 ttcacacacaa ctttggccacg aaaacaatgt tagccagaga ggtgacaagg gtttggcc 3840
 cacagggtgtg ttctgggtgg agaacatcca ggaagcacag gacgacccacg agaattggca 3900

cacctccccct aagattttgg cccgcaatta caagatccca ctgactgtgg ctaagcagat 3960
 cacacaggaa tgcccccaact gcaccaaaca aggttctggc cccgccccgt gcgtgtatgag 4020
 gtcccccaat cactggcagg cagattgcac ccaccccgac aacaaaatta tcctgaccc 4080
 cgtggagagc aatccggct acatccacgc aacactccctc tccaaggaaa atgcattgtg 4140
 cactccctc gcaattctgg aatggggccag gctgttctct cccaaatccc tgacacccga 4200
 caacggcacc aactttgtgg ctgaacctgt ggtgaatctg ctgaagttcc tgaaaatcgc 4260
 ccacaccact ggcattccct atcaccctga aagccaggc atgttcgaga gggccaaacag 4320
 aactctgaaa gaaaagatcc aatctcacag agacaataca cagacattgg agggccact 4380
 tcagctcgcc cttatcacct gcaacaaagg aagagaaaagc atggggccggc agacccctg 4440
 ggaggttcc atcaactaacc agggccaggt catccatgaa aagctgtctc tgccagggc 4500
 ccagtcctcc aaaaagttct gttttataa gatccccggt gggccacgact gaaaagggtcc 4560
 tacaagagtt ttgtggaaag gagacggcgc agttgtggtg aacgatgagg gcaaggggat 4620
 catcgctgtg cccctgacac gcaccaagct tctcatcaag cccaaactgaa cccggggccg 4680
 cccgactaga ggaattcgcc cctccctcc cccccccctc aacgttactg gccgaagccg 4740
 ctggataaa ggccgggtgtg tttttgtcta tatgtgattt tcacccatata tgccgttctt 4800
 tggcaatgtg agggcccgga aacctggcc tgcatttttttgc acggacattc ctaggggtct 4860
 ttccctctc gccaaaggaa tgcacccatgt gttcaatgtc tgcaaggaaag cagtttctct 4920
 ggaagttct tgaagacaaa caacgttctgt aegcaccctt tgccaggcagg ggaacecccc 4980
 acctggcggac aggtgcctct gggccaaaaa gccacgtgta taagatcac acgtccaaaggc 5040
 ggcacaaaccc cagtgcacg ttgtgagttt gatagttgtg gaaagagtca aatggctctc 5100
 ctcaagcgta gtcaacaagg ggtcgaagga tgcccaagaag gtacccattt gtatggaaat 5160
 ctgatctggg gctcgtgtc acatgttta catgtgttta gtcagggtta aaaaagctct 5220
 agggcccccg aaccacgggg acgtgtttt cctttgaaaaa aacacgtat aagctgcca 5280
 caaccccgta ccaaagatgg atagatccgg aaagccgtaa ctacccgcga cgtctgtcg 5340
 gaagtttctg atcgaaaagt tcgacagcgt ctccgcacccgt atgcagctct cggaggccg 5400
 agaatctctg gtttcagct tcgatgttagg agggcggtgg tatgtcctgc gggtaataag 5460
 ctgogccgat gttttctaca aagatgttta tgcattatcg cactttgtcat cggcccgct 5520
 cccgattccg gaagtgcctt acattggggg attcagcggg agccgtacccatttgcattctc 5580
 cccgcgtgca cagggtgtca cgttgcaga cctgcctgaa accgaactgc cccgttctct 5640
 gcagccggcgc ggggagccaa tggatgcgtat cgctcgccgac gatcttagcc agacgagccg 5700
 gttcggccca ttccggaccgc aaggaatcgg tcaatacact acatggcgtg atttcatatg 5760
 cgcgattgtc gatccccatg tgcattactg gcaaaactgtg atggacgaca cccgtcgtgc 5820
 gtcogtcgca caggctctcg atgagctgtat gctttggggc gaggactgc cccgaagtccg 5880
 gcacccctgtg caccggatt tccgcctccaa caatgttctg acggacaatgg gccgcataac 5940
 agccgttattt gactggagcg aggccatgtt cggggattcc caatacggg tgcacccat 6000
 cttctctgg agggccgttgg tgcattgtat ggagcggcggg acggcgactt tgcaggccgg 6060
 gcatccggag cttgcaggat cccgcggct ccggccgtat atgcctgcga ttggcttgc 6120
 ccaactctat cagaccccttgg ttgacggcaa ttgcgtat gcaatgttgg cgcagggtcg 6180
 atgcgacgca atcgatccat cccggacccgg gactgtcggtt cgtacacaaa tgcaccccg 6240
 aagccggcc gtcgtggaccg atggctgtgt agaagttactc gccgtatgtg gaaaccgacg 6300
 ccccaact cgtccggagg caaaggaata gaggatgtc cgacccgaaca agagctgatt 6360
 tcgagaacgc ctcagccacg aactccggcg agccctagca ggcacccatgc agagaacccgc 6420
 cttacgttgc gttgcacccgtt ttcgtccac agttcgctaa gtcgtctgg ctgggtcg 6480
 ggagggccgg tgcgtgtat tcaggccctt ctggattgtg ttggccccca gggccacgatt 6540
 gtcatggcca cgcactccgg tgatctgtat gatcccgacg atggagatc gccgcggctg 6600
 cctggccatt ggggtcagat cttagactcg ctgatcagcc tgcactgtgc ctctagttgc 6660
 cagccatctg ttgtttggcc ctccccccgtg ctttccttgc ccctggaaagg tgccactccc 6720
 actgtccctt cctaataaaa tgaggaaatt gcatcgcat gtcgtgtat gtcgttattct 6780
 attctggggg gtgggggggg gcaggacagg aagggggagg atggggaaa caatagcagg 6840
 catgtggggg atgcgggtgg ctctatggct tctgaggccgg aaagaaccag ctgggctcg 6900
 agtgcattct agttgtgggtt tgcattaaact catcaatgtt tottatacatg tctgtatacc 6960
 gtgcacccctt agctagatgt tggcgtatc atggctcatag ctgtttctgt tgcatttttg 7020
 ttatccgcctc acaattccac acaacatccg agccggacgc ataaaagtgtt aagccctgggg 7080
 tgctcaatgtt gtcgtgtatc tcaatgtt tgcgttgcgc tcactgcctt cttccagtc 7140
 gggaaacccgt tgcgtgtatc tgcattaaatg aatccggccaa cgcggggggg gaggccgttt 7200
 gctctcccg ctccctcgat cactgcgtcg ctgcgtctgg tcgttccgg 7260
 gggccggccgc gtatcgatc actccaaaggc ggtatccatgg ttcgttccatgg aatcggggg 7320
 taacccggaa aagaacatgtt gaggccaaagg ccaggccaaag gccaggaaacc gtaaaaaaggc 7380
 cgccgttgcgt ggcgtttcc ataggctcg ccccccgtac ggcacccatgc aaaaatccgc 7440
 ctcaagtcag aggtggccaa acccgacagg actataaaga tccaggcgtt tttccctgg 7500
 aagcccttccg gtgcgtctc ctgttcccgac ctgcgttccgtt accggatacc tgcgttccgg 7560
 tctcccttcg ggaagccgtgg cgttccatgtca atgcgtccgc tgcgttccgtt tgcgttccgg 7620
 gtaggtcgat cgttccatgc tggcgttccgtt gcaatggccccc cccgttccgtt cccgcgttccgg 7680
 cgccttccatgc ggttccatgc tgcgttccgtt caacccggta agacacgact tgcgttccgtt 7740

ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag agcgaggat gttaggcggtg ctacagagtt 7800
 cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaaggaca gtatggta tctgcgtct 7860
 gctgaagcca gttacctcg gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca aacaaccac 7920
 cgctggtagc ggtgggtttt ttgttgcggc gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc 7980
 tcaagaagat ccttgatct tttctacggg gtctgacgct cagtggAACG aaaaactcacg 8040
 ttaaggatt ttggcatga gattatcaa aaggatctc acctagatcc ttttaaatta 8100
 aaaatgaagt tttaaatcaa tctaaagtat atatgagtaa acttggctcg acagttacca 8160
 atgcctaatac agtgaggcac ctatctcagc gatctgtcta tttcggtcat ccatagttgc 8220
 ctgactcccc gtcgtgtaga taactacgat acgggagggc ttaccatctg gccccagtgc 8280
 tgcaatgata cccgcgagacc cacgctcacc ggctccagat ttatcagcaa taaaccagcc 8340
 agccggaagg gcccggcga gaagtggtcc tgcaacttta tccgcctcca tccagtcata 8400
 taattgtgc cgggaagcta gagtaagttag ttcggcagtt aatagttgc gcaacgttgt 8460
 tgccattgtct acaggcatcg tgggtgcacg ctgcgtctt ggtatggctt cattcagctc 8520
 cggttcccaa cgtcaaggc gagttacatg atccccatg ttgtgcaaaaa aagcggttag 8580
 ctccttcggc ctcggatcg ttgtcagaag taagttggcc gcagtgttat cactcatgg 8640
 tatggcagca ctgcataatt ctcttactgt catgcctatcc gtaagatgtcttctgtgac 8700
 tggtagtac tcaaccaagt cattctgaga atatgtatg cggcgacgca gttgtcttg 8760
 cccggcgtca atacggata atacccgcac acatagcaga actttaaaag tgctcatcat 8820
 tggaaaaacgt tcttcggggc gaaaaactctc aaggatcttta cccgttgc gatccagttc 8880
 gatgttaaccc actcgtgcac ccaactgatc ttcagcatct tttactttca ccagcggttc 8940
 tgggtgagca aaaacaggaa ggccaaaatgc cgccaaaaaag ggaataaggcgacacacggaa 9000
 atgttgaata ctctatactt tccctttca atattattga agcatttatac agggttattt 9060
 tctcatgagc ggatacatat ttgaatgtat ttagaaaaat aaacaaatag gggttcccg 9120
 cacatttccc cggaaatgtgc cactgtacgt cgacggatcg ggagatctcc cgatcccccta 9180
 tggtcactc tcagttacaat ctgtctgtat gcccataatgtaa tggccatgt tctgtccct 9240
 gcttgggtgt tggaggtcgc tgtagtagtgc gcgagaaaa tttaagctac aacaaggc 9300
 ggcttgaccg acaattgtcat gaagaatctg ctttaggttta ggcgtttgc gctgttcgc 9360
 gatgtacggg ccagatatac gctgtacat tgattattga ctgttattt atagtaatca 9420
 attacgggtt cattagttca tagccatata atggagttcc gcttacata acttacggta 9480
 aatggcccgctt ctggctgacc gccaacgac ccccgccat tgacgtcaat aatgacgtat 9540
 gttcccatag taacgccaat agggacttcc cattgacgtc aatgggttgc ctatttacgg 9600
 taaactgccc acttggcagt acatcaagtgt tatcatatgc caagtacgccc ccctatttgc 9660
 gtcaatgacg gtaaatggcc cgccctggcat tatgcccagt acatgacctt atggacttt 9720
 cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgcttata ccatggtgat ggggtttgg 9780
 cagtagatca atggcggtgg atagcggttt gactcacggg gatttccaaatg tctccacccc 9840
 attgacgtca atgggagttt gttttggcac caaatcaac gggactttcc aaaatgttgt 9900
 aacaactccg ccccatggac gccaaatgggc ggtaggcgtg tacgggtggaa ggtctatata 9960
 agcagagctc tctggcttaac tagagaaccc actgcttact ggcttatacg aattaatacg 10020
 actcactata gggagaccca agcttggtac cgagctcgga tccacttagta acggccgcca 10080
 gtgtgtggaa attaatttgc tggctgtcgag gcccacgtgt tgggggtgagt actccctctc 10140
 aaaagcggttc atgacttctg cgttaagatt gtcagttcc caaatcgagg aggatttgat 10200
 attcacctgg cccgcgggtga tgcccttgc ggtggccgccc tccatctggt cagaaaagac 10260
 aatcttttg ttgtcaagct tgagggtgtgg caggcttgcg atctggccat acacttgat 10320
 gacaatgaca tccactttgc ctttctctcc acaggtgtcc actcccaaggc ccaactgcag 10380
 gtcgatcgag ca 10392

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

<220>
 <223> pESDSYNGP

10 <400> 18

ES 2 618 508 T3

tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta 60
ttggccattg catacggtgt atctatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc 120
aatatgaccg ccatgttggc attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg 180
gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc 240
gcctggctga ccgcctaactg acccccgccc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat 300
agtaacgcca atagggactt tecattgacg tcaatgggtg gagtatattac ggtaaactgc 360
ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaagtccg ccccctattg acgtcaatga 420
cggtaaatgg cccgcctggc attatgcccc gtacatgacc ttacgggact ttccctacttg 480

cgacgtacatc tacgttattag tcatcgctat taccatgggt atgcggtttt ggcagttacac 540
caatgggcgt ggatagcggt ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccatggacgt 600
caatgggagt ttgtttggc accaaaatca acgggacttt caaaaatgtc gtaacaactg 660
cgatcgccccg ccccggttgc gcaaatggc ggttggcggt tacgggtggg ggtctatata 720
agcagagctc gtttagtgaa ccgtcagatc actagaagct ttattgcggg agtttatcac 780
agttaaattt ctaacgcagt cagtgcctt gacacaacag tctcaactt aagctgcagt 840
gactcttta aggtggcctt gcagaagttt gtcgtgaggg actggcagg taagtatcaa 900
ggttacaaga cagggttaag gagaccaata gaaactgggc ttgtcgagac agagaagact 960
cttgcgttcc tgataggcac ctattggct tactgacatc cacttgcct ttctctccac 1020
agggttccac tcccggttca attacagctc ttaaggctag agtacttaat acgactca 1080
ataggctaga gaattccagg taagatggc gatcccctca cctggccaa agccctgaag 1140
aaactggaaa aagtccacgt tcagggttgc caaaagctta ccacaggcaa ttgcaactgg 1200
gcattgtccc tgggtggatct ttccacgcg actaatttcg ttaaggagaa agattggcaa 1260
ctcagagacg tgatccccctt cttggaggac gtgaccggaa cattgtctgg gcaggagcgc 1320
gaagcttccg agcgcacccg gtgggcacatc agcgcagtca aatggggct gcaaataaac 1380
aacgtggttg acggtaaaagc tagcttccaa ctgttccgcg ctaagtaacgaa gaagaaaacc 1440
gccaacaaga aacaatccga acctagcgag gagtacccaa ttatgatcga cggcgcggc 1500
aataggaact tccgcccact gactccagg ggttataacca cctgggtcaa caccatccag 1560
acaaacggac ttttgaacga agcctcccg aacctgttccg gcatctgtc tttggactgc 1620
acctccogaag aaatgaatgc ttttctcgac gtgggtggccag gacagctgg acagaaaacag 1680
atccctgtcg atgcccattga caagatcgcc gacgacttggg ataatgcacca cccctgcac 1740
aacgcccctc tgggtggctcc cccacagggg ctatcccta tgacccttag gttcatttag 1800
ggactggggg tgccccggcga acgcccagatc gagccagcat ttgaccaatt taggcagacc 1860
tacagacagt ggtatcatcga agccatggc gaggggattaa aagtcatgtat cggaaagccc 1920
aaggcacaga acatcaggca gggggccaag gaaccataacc ctgagtttgcg cggacaggctt 1980
ctgtcccaga ttaaatccga aggccacccctt caggagatctt ccaagtttgcg gacagacaca 2040
ctgactatcc aaaatgcacaa tgaagagtgc agaaaacgcac tgaggcacctt cagacctgaa 2100
gataccctgg aggagaaaaat gtacgcatgt cgcgcacattt gcaactacca gcaaagatg 2160
atgctgtcg ccaaggctct gcaaaacggc ctggctggc cattcaaaagg aggagactcg 2220
aaggggaggtc cattgaaagc tgcacaaaca ttttataattt gtgggaaagcc aggacattt 2280
tctagtcataat gttagagccat taaagttctgt tttaaatgtt aacaggctgg acatttctca 2340
aagcaatgcac gaaatgttcc aaaaaacggg aagcaagggg ctcaaggag gccccagaaa 2400
caaactttcc cgtatcacaaca gaagagtgcg cacaacaaat ctgttgcaca agagactcct 2460
cagactcaaa atctgtaccc agatctggc gaaataaaaaa aggaataacaa tgcaggaggg 2520
aaggatcaag tagaggatctt caacctggc acgtttgtggg agtaacatac aatctcgaga 2580
agaggcccac taccatcgcc ctgatcataatc acaccctctt taatgtgtc ctggacacccg 2640
gagccgacac cagcggttcc actactgtc actataacag actgaataac agaggaagaga 2700
aataccaggc cacaggcattt atcggcggtt gaggcaacgt cggaaacccctt tccactcctg 2760
tcaccatcaa aaagaagggg agacacattt aaaaaccaat gtcggcgcc gacatccccg 2820
tcaccatctt tggcagagac atttccagg acctggcgcc taaactgtc ctggcacaac 2880
tgtctaagga aatcaagtgc cgcagatc agtggaaaga gggcacaatg gttccaaaaaa 2940
tcccccaatgc gcccctgacc aaagagaagc ttgaggcgcc taaggaaatc gtgcagcc 3000
tgctttctga gggcaagattt agcgaggccca gggacaataaa cccttacaac agccccat 3060
ttgtgattaa gaaaaggaggc ggcaaatggc gacttctgcg ggcacgggg gaaactcaaca 3120
agacgttccca ggttggaaactt gggatcttc gggactgcg tcaccctggc ggcctgat 3180
aatgcacatc catgacatgc cttgcacattt gagacgcattt ttttaccatc cccctcgatc 3240
ctgaatttgc cccttataactt gttttacca tcccccacat caatcaccag gagccccgata 3300
aacgttatgt gtggaaatgc ctccccccagg gattttgtgt tagccccctac atttaccaga 3360
agacacttca agagatcttc caacctttcc gggaaagata cccagagggtt caactctacc 3420
aatatatggc cggacgttcc atgggggttcc acgggtctaa gaagcagcac aaggaactca 3480
tcatcgaaactt gggggcaatc ctccctggaga aaggcttgcg gacacccgac gacaagctgc 3540
aagaaggatcc tccatatacg tggctgggtt accagctttt ccctggaaaac tggaaagttcc 3600
agaagatgcac gtggatatgc gtcagaacc caacactgaa cgacgtccag aagctcatgg 3660
gcaatattac ctggatggc tccggaaatcc ctgggttttcc cgttaagcac attggccgca 3720
ctacaaaagg atgcctggag ttgaaccaga agtgcattttt gacagaggaa gtcagaagg 3780
aacttggagga gaataatgaa aagattaaga atgctcaagg gctccaatac tacaatcccg 3840
aagaagaaaat gttgtgcgag gtcgaaatca ctaagaaactt cgaaggccacc tatgtcatca 3900
aacagttccca aggcatctt tggggccggaa agaaaatcat gaaggccaaac aaaggctgg 3960
ccaccgtttaa aatctgtatc ctccctgtcc agcactgcgc caccgactt atcaccctcg 4020
tcggcaagtgc cccacccctt aaagttccctt tcactaagg gcaaggatgc tgggagatgc 4080
aaaaaggtcg gtactactct tggctttcccg agatgttgcata caccaccaaa gttggcgcac 4140
acgacttggag aatgaagctt gtcgaggagc coactagcgg aattacaatc tataccgac 4200
ggggaaagca aacacggagag ggaatcgctg catacgatc acataacggc cgcaccaagc 4260
aaaaqaggqct cqggccctgtc actcaccatgg tggctqaqaa qatqqtatc caqatqgccc 4320

gtgaccgtct ccgggagctg catgtgtcag aggtttcac cgtcatcacc gaaacgcgcg 8220
 agacgaaagg gcctcgtat acgcctattt ttataggtt atgtcatgtat aataatggtt 8280
 tcttagacgt cagggtggcac ttttcgggaa aatgtgcgcg gaacccctat ttgttttattt 8340
 ttctaaatac attcaaatat gtatccgtc atgagacaaat aacccctgata aatgcttcaa 8400
 taatattgaa aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc gtgtgcgcct tattccctt 8460
 tttgcggcat tttgccttcc tgggtttgtt caccaggaaa cgctggtggaa agtaaaagat 8520
 gctgaagatc agttgggtgc acgagtggt tacatcgaac tggatctcaa cagcggtaaag 8580
 atccttgaga gttttcgccc cgaagaacgt tttccaaatgt tgagcactt taaagtttgc 8640
 ctatgtggcg cggatttatac cctgttgc acggggcaag agcaactcgg tcgccccata 8700
 cactatttctc agaatgactt ggtttagtac tcaccagtca cagaaaagca tcttacggat 8760
 ggcgtacacg taagagaatt atgcagtgc gccataaacc tacgtgataa cactgcggcc 8820
 aacttacttc tgacaacgtt cggaggaccc aaggagctaa cccgtttttt gcacaacatg 8880
 ggggatcatg taactcgctt tgatcggtgg gaaccggagc tgaatgaagc cataccaaac 8940
 gacgagcgtg acaccacgtt gctgttagca atggcaacaa cgttgcgc当地 actattaact 9000
 ggcgaactac ttactcttagt tttccggcaaa caattaatag actggatggg ggcggataaa 9060
 gttgcaggac cacttctgcg ctggccctt ccggctggct gggttatttgc tgataaaatct 9120
 ggagccgggtg agcgtgggtc tcgctgtatc attgcacgc tggggccaga tggtaagccc 9180
 tccgtatcg tagttatcta cacgacgggg agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga 9240
 cagatcgctg agatagggtgc ctcactgtt aagcattggg aactgtcaga ccaagtttac 9300
 tcataatatac tttagatgtt tttaaaactt catttttaat taaaaggat ctaggtgaag 9360
 atccttttg ataatctcat gaccaaaatc ccttaacgtt agttttcggtt ccactgagcg 9420
 tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct tctttagtac ctttttttctt ggcgtataatc 9480
 tgctgttgc aaacaaaaaaa accaccgttca ccagcggtgg tttgtttgcc ggcgtcaagag 9540
 ctaccaactc ttttccgaa ggttaactggc ttcagcagag cgcagataacc aaatactgtc 9600
 cttctagtgt agccgttagtt aggcaccac ttcaagaact ctgttagcacc gcctacatac 9660
 ctcgtctgc taatcctgtt accagtggct gctgccagtgc ggcgtataatc gtgtcttacc 9720
 ggggtggact caagacgata gttaccggat aaggcgccagc ggtcgccgtg aacgggggt 9780
 tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcgt 9840
 gagctatgag aaagcgccac gcttcccgaa gggagaaaagg cggacaggtt tccgtataac 9900
 ggcagggtcg gaacaggaga ggcgtccag gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt 9960
 tatagtccgt tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gatgtttgtt atgctcgatca 10020
 gggggggcgaa gcctatggaa aaacgcccac aacgcggccct ttttacgggtt cctggccctt 10080
 tgctggccctt ttgttcacat ggtcgacag atct 10114

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

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

10

<400> 19

agatcttcaa taataaaaatg tgggtttgtc cgaaatacgc gttttgagat ttctgtcgcc 60
gactaaattc atgtcgcgcg atagtgggtt ttatcgccga tagagatggc gatattggaa 120
aaattgatat ttgaaaatat ggcatattga aaatgtcgcc gatgtgagtt tctgtgtaac 180
tgcatacgcc attttccaa aagtgtttt tgggcatacg cgatatctgg cgatacgct 240
tatatcgttt acgggggatg gcgatagacg actttgggtga cttgggcgtat tctgtgtgtc 300
gcaaatacg cagtttcgtat atagggtgaca gacgatatgaa ggctatatacg ccgatagagg 360
cgacatcaag ctggcacatg gccaatgtat atcgatctat acattgaatc aatattggcc 420
attagccata ttattcattt gttatatacg ataaatcaat attggctatt ggccattgca 480
tacgttgtat ccatatcgta atatgtacat ttatattggc tcatgtccaa cattaccgccc 540
atgttgcacat tgattattgtat ctagtttata atagtaatca attacggggtt cattagttca 600
tagccccat atggagttcc gctttacata acttacggta aatggcccgcc ctggctgacc 660
gccccaaacgac cccccccat tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag taacgccaat 720
agggactttc cattgacgtc aatgggtgga gtatattacgg taaaactgccc acttggcagt 780
acatcaagtgtatcatatgc caagtccgccc ccctattgtac gtcaatgacg gtaaaatggcc 840
cgcttggcat tatgccccatgt acatgacctt acgggactttt cctacttggc agtacatcta 900
cgtattatgtc atcgcttattt ccatgggtat gctgggtttgg cagttacacca atggggctgg 960
atagcggtttt gacttacggg gatttcoaag tctccacccc attgacgtca atgggaggttt 1020
gttttggcac caaaaatcaac gggactttcc aaaatgtcgat aacaactgacg atcgccccggcc 1080
ccgttgcacgc aaatgggcgg taggcgtgtat cgggtggagg tctatataag cagagctcgat 1140
tttagtgaacc gggcactcag attctgcggat ctgagtcct tctctgtgtgg gctgaaaagg 1200

cctgaagaaa aaattccatc acaaacatgc atcgcgagaa gacacctggg accaggccca 5100
 acacaacata cacctagcag gcgtgaccgg tggatcaggg gacaaataact acaagcagaa 5160
 gtactccagg aacgactgga atggagaatc agaggagtc aacaggcggc caaagagctg 5220
 ggtgaagtca atcgaggcat ttggagagag ctatattcc gagaagacca aaggggagat 5280
 ttctcagect gggcggtca tcaacgagca caagaacggc tctgggggg acaatccca 5340
 ccaagggtcc tttagacctgg agattcgaag cgaaggagga aacatttatg actgttgcat 5400
 taaagccaa gaaggaactc tcgctatccc ttgctgtgga tttcccttat ggctattttg 5460
 gggactagta attatagttag gacgcatacg aggtatggc ttacgtggac tcgctttat 5520
 aataaggatt tgtatttagag gcttaaattt gatattgaa ataatcagaa aaatgttga 5580
 ttatattgga agagctttaa atcctggcac atctcatgta tcaatgcctc agtatgttta 5640
 gaaaaacaag gggggactg tggggttttt atgagggtt tataaatgta ttataagagt 5700
 aaaaagaaaag ttgctgatgc ttcataacc ttgtataacc caaaggacta gctcatgtt 5760
 ctaggcaact aaaccgcaat aaccgcattt gtgacgcgag ttccccattt gtgacgcgtt 5820
 aacttcctgt tttacagta tataagtgc tgtattctga caattggca ctcagattct 5880
 gcggtctgag tcccttcctc gctgggctga aaaggccctt gtaataaata taattttct 5940
 ctcagtccct gtctcttagt tgcgtgttcg agatcctaca gagctcatgc cttggcgtaa 6000
 tcatggtcat agctgtttcc tgcgtgaaat tgcgttccgc tcacaattcc acacaacata 6060
 cgagccggaa gcataaaagt taaagectgg ggtgcctaatt gagtgcgtt actcacattt 6120
 attgcgttgc gtcactgcc cgctttccag tggggaaacc tgcgtgtgcgtt gtgtatggcc 6180
 gggggccggag gggccctactg tgaaccatca cccaaatcaa gtttttgcg gtcgagggtc 6240
 cgtaaagctc taaatcgaa ccctaaaggg agccccccat ttagagctt acggggaaag 6300
 ccggcgaacg tggcgagaaa ggaagggaag aaagcggaaag gacggggcgc tagggcgctg 6360
 gcaagtgttag cggtcacgcg gggcgtaacc accacaccccg cccgcgtttaa tgcgcgccta 6420
 caggccgcgt ccattcgcca ttcaaggctgc gcaactgtt ggaaggggcga tcggtgccgg 6480
 ccttttcgtt attacgcccag cccggatcgta tccttatacg atttttaccac atttttagag 6540
 gttttacttg cttaaaaaaa cctccccat ctccttcgtttaa acctgaaaca taaaatgaat 6600
 gcaattgtt tttttaactt gtttattgca gtttataatg gttacaaata aagcaatagc 6660
 atcacaaattt tcacaaataa agcatttttt tcactgcatt ttagttgtt tttgtccaaa 6720
 ctcatcaatg tatcttatca tgcgtgttcg aagcatttaac cctcactaaa gggaaagcggc 6780
 cccccgggtc gacttcacag gttttgcgg ggtcttttgg agtctccggg cctcaagacg 6840
 cgggggctgc tctgcgcgc ccacagcctt ttttgcctt cttgttagcc tccccatgcg 6900
 gagaatcgc ccctctggc ctcgcggaa tagagctccc tccagatgcc gcgatccacc 6960
 tctcccaagct cttagcgcc ttgttgcacg ccccttaattt tccattccag ctttttttgg 7020
 aggacctcggtt ctgcggaaat ctggccctata atccacctat cccttcgtt ggggtgttgc 7080
 tgggtgggac cggggccggag gtttgcgtt ggtgttgcgg tctggcttggg aattttctcc 7140
 tcgggcaggg actgtctcgac cccgcggcact cactgttccc cttccagggg gctttgtggg 7200
 tgcgttcc accagtcgtt gggcgcttc tccttttgc tcttttcctt gaggttcata 7260
 tcttgcgttcc tggccttcctt gtcgttgcgtt atgggtggcgtt attctcgagg ctagccccc 7320
 ggtgggtgggtt cgggtggcctt tggggcagggg ttccttgcgtt ccggacggcgc ccccaaata 7380
 aagaccccccgg agacgggttag tcaatcactt tgaggagacc ctcccaaggaa acacgcgagac 7440
 cacgagtcgg atgcaacacgc aagaggattt attggatata cgggttcccg ggccgacttcg 7500
 tctatcggtt gactggcgcg cccggatggg gtttgcgtt tctttttatag agctccggaa 7560
 gcagaagcgc gccaacacgaa gggggggcggc ggtgttgcgtt ttaattcaaa taaggcaca 7620
 ggtcatttca ggttgcgtt gggggccgtt aacatctgtt ggggtttaaag aaactgttgc 7680
 ggttggggcc atatctgggg accatctgtt tttttttttt ggcggggggc gaaaccgggtt 7740
 gaccatctgt tcttgcgttcc gggggggggc cggggccgtt caccgcgtt atccctgtttt 7800
 gccaacgtt agtgcgtttt ttttttttcc ctttgcgtt aacttctcta ttcttgcgtt 7860
 ggttgcgttcc catgcgttgc aaaaatggcgt tactgcggct atcaggctaa gcaatttttgc 7920
 atctggccga ggcggccatc ttcgttccat tttttttttt gggggggggc gggggggggc 7980
 ttgcgttcc ttttttttcc ctttgcgttcc ctttgcgtt aacttctcta ttcttgcgtt 8040
 ctgcggcgag cgggtatcgat ttttttttcc ctttgcgtt aacttctcta ttcttgcgtt 8100
 gataacgcgtt gaaagaacat gtataacttcc ttttttttcc ctttgcgtt aacttctcta ttcttgcgtt 8160
 gtgagcaaaa ggcggccatc ttttttttcc ctttgcgtt aacttctcta ttcttgcgtt 8220
 ccataggctc cggggccgttcc ctttgcgtt aacttctcta ttcttgcgtt aacttctcta ttcttgcgtt 8280
 aaaccccgaca ggactataaa gatacccgatc ttttttttcc ctttgcgtt aacttctcta ttcttgcgtt 8340
 tcctgttccg accctgcgttcc ttttttttcc ctttgcgtt aacttctcta ttcttgcgtt 8400
 ggcggccgttcc catagctcact ttttttttcc ctttgcgtt aacttctcta ttcttgcgtt 8460
 gctgggtgtt gtttgcgttcc ttttttttcc ctttgcgtt aacttctcta ttcttgcgtt 8520
 tcgttccgtt gtttgcgttcc ttttttttcc ctttgcgtt aacttctcta ttcttgcgtt 8580
 caggatttagc agacggcgatc ttttttttcc ctttgcgtt aacttctcta ttcttgcgtt 8640
 ctacgcgttcc actagaagggc ttttttttcc ctttgcgtt aacttctcta ttcttgcgtt 8700
 cggaaaaaaa gtttgcgttcc ttttttttcc ctttgcgtt aacttctcta ttcttgcgtt 8760
 ttttgcgttcc aaggcggcgttcc ttttttttcc ctttgcgtt aacttctcta ttcttgcgtt 8820
 cttttgcgttcc ggggttgcgttcc ttttttttcc ctttgcgtt aacttctcta ttcttgcgtt 8880

gagattatca aaaaggatct tcacctagat ccttttaaat taaaaatgaa gttttaaatc 8940
 aatctaaagt atatatgagt aaacttggtc tgacagttac caatgcttaa tcagtgaggc 9000
 acctatctca gcgatctgtc tatttcgttc atccatagtt gcctgactcc ccgtcgtgt 9060
 gataactacg atacgggagg gcttaccatc tggcccccagt gctgcaatga taccgcgaga 9120
 cccacgctca ccggctccag atttatcagc aataaaaccag ccagccggaa gggccgagcg 9180
 cagaagtqgt cctgcaactt tatccgctc catccagtct attaattgtt gcccggaaagc 9240
 tagagtaagt agttcgccag ttaatagttt ggcgaacggtt gttccatgtt ctacaggcat 9300
 cgtgggtgtca cgctcggtgt ttggatggc ttcattcagc tccgggttccc aacgatcaag 9360
 gcgagttaca tgatccccca tgggtgtcaaa aaaaggcggtt agctccttcg gtccctccat 9420
 cgttgcaga agtaagttgg ccgcagtgtt atcactcatg gttatggcag cactgcataa 9480
 ttctcttact gtcatgccat ccgtaaagatg cttttctgtg actgggtgagt actcaaccaa 9540
 gtcattctga gaatagtgtt tgccgcgacc gagttgtct tggccggcggtt caatacggga 9600
 taataccgcg ccacatagca gaactttaaa agtgctcattc attggaaaac gttcttcggg 9660
 gcgaaaactc tcaaggatct taccgctgtt gagatccagt tcgatgttaac ccactcggtc 9720
 acccaactga tcttcagcat cttttactt caccagcggtt tctgggtgag caaaaacagg 9780
 aaggcaaaat gccgcaaaaa aggaaataag ggcgacacgg aaatgttggaa tactcatact 9840
 cttccctttt caatattattt gaagcatttta tcagggttat tggctctatgaa gggatacat 9900
 atttgaatgt atttagaaaaa ataaaacaaat aggggttccg cgcacatttc cccggaaaatg 9960
 gccacacccaa ttgtaaagcgt taatattttt taaaatttcg cgtttaaattt ttgttaatc 10020
 agctcatttt ttaaccaata gggcggaaatcc ggcaaaatcc cttataaattc aaaagaatag 10080
 accgagatag ggttgagttgt tggccagtt tggaaacaaga gtccactattt aaagaacgtg 10140
 gactccaaacg tcaaaggcg aaaaaccgtc tatcaggcg atggcccactt acgtgataac 10200
 ttctgtataat gtatgctata cgaagttatc actacgtgaa ccatcacctt aatcaagttt 10260
 tttgggggtcg aggtgccgtt aagcactaaa tcggaaaccctt aaaggggagcc cccgatttag 10320
 agcttgcggg ggaaagccaa cctggcttat cggaaatataat acgactcactt 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
 tctagagaat tcgccaccat 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
 <400> 21
 tgaacccggg gccggccgc 18

25 <210> 22
 <211> 11
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> pEV53B

35 <400> 22
 caggttaatg 11
 <210> 23
 <211> 42

5 <220>
 <223> Cebador
 10 <400> 23
 ggctagagaa ttccaggtaa gatgggcgt cccctcacct gg 42
 15 <210> 24
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Cebador
 <400> 24
 ttgggtactc ctgcgttaggt tc 22
 25 <210> 25
 <211> 4307
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de gag-pol con codones optimizados (pSYNGP)
 30 <400> 25

 atgggcggcc ggcgcagcgt gctgtcgggc ggcgagctgg accgctggga gaagatccgc 60
 ctgcgcggcc gccggcaaaaaa gaagtacaag ctgaagcaca tctgtgtggc cagccgcgaa 120
 ctggagcgt tcgcgtgaa ccccggtc ctggagacca gcgagggttg cgcgcagatc 180
 ctggccaaac tgcagccacag cctgcaaaacc ggcagcgagg agtgcgcag cctgtacaac 240
 accgtggcca cgctgtactg cggtccaccag cgcatcgaaa tcaaggatac gaaagaggcc 300
 ctggataaaa tcgaagagga acagaataag agcaaaaaaga aggcccaaca ggcgcgcgcg 360
 gacaccggac acagcaacca ggtcagccag aactacccca tctgtgcagaa catccagggg 420
 cagatggtgc accaggccat ctccccccgc acgtcgtaaacg cctgggtgaa ggtgggtgaa 480
 gagaaggctt ttagcccgga ggtgataaccc atgttctcag cctgtcaga gggagccacc 540
 ccccaagatc tgaacaccat gctcaacaca gtggggggac accaggccgc catgcagatg 600
 ctgaaggaga ccatcaatga ggaggctgac gaatgggatc gtgtgcaccc ggtgcacgca 660
 gggccatcg caccgggcca gatgcgtgag ccacggggct cagacatcg cggAACGACT 720
 agtacccttc aggaacagat cggctggatg accaacaacc caccatccc ggtggagaa 780
 atctacaaac gctggatcat cctggcctg aacaagatcg tgccatgtt tagccctacc 840
 agcatcctgg acatccgcca aggcccgaag gaacccttc ggcactacgt ggaccgggttc 900
 tacaaaacgc tccgcggcga gcaggcttagc caggaggtga agaactggat gaccgaaacc 960
 ctgctgtcc agaacgcgaa cccggactgc aagacgatcc tgaaggccct gggcccgcg 1020
 gctaccctag agggaaatgtat gaccgcctgt cagggagtgg gcgaccccg ccacaaggca 1080
 cgctcctgg ctgaggccat gagccaggtg accaactccg ctaccatcat gatgcagcgc 1140
 ggcaacttgc ggaaccaacg caagatcgtc aagtgcgttca actgtggcaa agaaggccac 1200
 acagccgcga actgcagggc cccttagaaaa aagggtgtt gggaaatgtgg aaaggaagga 1260
 caccaaatga aagattgtac ttagagacag gctaatttt taggaaatgtt ctggccttcc 1320
 cacaaggaa ggccagggaa ttttctttagt agcagaccat agccaaacagc cccaccagaa 1380
 gagagcttca gttttgggaa agagacaaca actcccttc agaagcaggaa gccgatagac 1440
 aaggaactgt atccctttagc ttccctcaga tcactcttgc gcaagcgcaccc ctcgtcaca 1500
 taaagatagg ggggcagctc aaggaggctc tcctggacac cggaggcagac gacaccgtgc 1560
 tggaggagat gtcgttgcac ggccgttgcgaa agccgaagat gatcgggggaa atcggcggtt 1620
 tcatcaaggat ggcgcgttat gaccagatcc tcatacgaaat ctgcggccac aaggctatcg 1680
 gtaccgtgtt ggtggggccc acacccgtca acatcatcg gcaacccctg ttgacgcaga 1740
 tccgttgcac gtcgtacttc cccattagcc ctatcgatcc ggttaccgggtt aagctgaagc 1800
 cggggatggaa cggccgcgaag gtcgtatccat ggccattgtac agaggagaag atcaaggcgc 1860

tggtgagat ttgcacagag atggaaaagg aaggaaaat ctccaagatt gggcctgaga 1920
 acccgataaa cacgcccgtg ttgcataatca agaagaagga ctcgacgaaa tggcgaac 1980
 tggtgactt ccgcgagctg aacaagcgca cgcaagactt ctgggaggtt cagctggca 2040
 tcccgacccc cgcagggtcg aagaagaaga aatccgtgac cgtactggat gtgggtatg 2100
 octacttetc cgttcccctg gacgaagact tcaagaaatgta cactgcctc acaatccct 2160
 cgcataacaa cgagacacccg gggattcgat atcagatacaa cgtgtgcggc cagggctgga 2220
 aaggctctcc cgcaatcttc cagagtagca tgacccaaat cctggagctt ttccgcaaaac 2280
 agaaccctcgat catcgatcatc tatcagtaca tggatgactt gtacgtggc tctgatctag 2340
 agatagggca gcaccgcacc aagatcgagg agctgcgcac gcacctgttg aggtggggac 2400
 tgaccacacc cgacaaagaag caccagaagg agcctccctt cctctggatg gtttaacgac 2460
 tgcaaccctga caaatggacc gtgcagccca tcgtgtgcc agagaaagac agctggactg 2520
 tcaacgacat acagaagctg gtggggaaat tgaactggc cagtcagatt taccaggga 2580
 ttaaggttag gcaagctgtgc aaactctcc gggaaaccaa gcaactcaca gaggtgatcc 2640
 ccctaaccga ggaggcccgag ctgcgaactgg cagaaaacccg agagatccta aaggagcccg 2700
 tgcaacggcgt gtactatgac ccctccaaagg acctgatcgc cgagatccag aagcaggggc 2760
 aaggccatgt gacctatcag attaccagg agcccttcaa gaacctgaag accggcaagt 2820
 acgccccggat gagggggtgcc cacactaacg acgtcaagca gctgaccggc gccgtgcaga 2880
 agatcaccac cgaaaacccatc gtqatctggg gaaagactcc taagttcaaq ctgccccatcc 2940
 agaaggaaac ctgggaaacc ttgtggacag agtattggca gcccacctgg attctgtgt 3000
 gggagttcgt caacacccct cccctggta agctgtggta ccagctggag aaggagccca 3060
 tagtgggcgcg cggaaacccatc tacgtggatg gggccctaa cagggagact aagctggca 3120
 aagccggata cgtcactaac cggggcagac agaagttgt caccctcaact gacaccacca 3180
 accagaagac tgagctgcag gcatattacc tcgtttgca ggactcgccg ctggaggtga 3240
 acatcgatcag agactctcag tatgcccgtt gcatcattca agccctcaca gaccagatg 3300
 agtcccgatgt ggtcaatcag atcatcgagc agctgatcaa gaaggaaaag gtctatctgg 3360
 cctgggtacc cggccacaaa ggcattggcg gcaatgagca ggtcgacaag ctggtctcgg 3420
 ctggcatcag gaagggtcta ttccctggatg gcatcgacaa gcccaggac gagcacgaga 3480
 aataccacag caactggcg gccatggcta gcgacttcaa cttcccccctt gtggtggccca 3540
 aagagatctgt ggcacgtgt gacaagtgtc agctcaaggg cgaagccatg catggccagg 3600
 tggactgttag ccccgccatc tggcaactcg attgcacccca tctggagggc aagtttatcc 3660
 tggtagccgt ccatgtggcc agtggctaca tcgaggccga gtcattccc gcccggaaacag 3720
 ggcaggagac agcctacttc ctccctgaaatc tggcaggccg gtggccatgt aagaccatcc 3780
 atactgacaa tggcagcaat ttccaccatgt ctacgtttaa ggcggcttcg tggggggcg 3840
 gaatcaagca ggagttcggtt atccccataca atccccagag tcaggccgtc gtcgagtcta 3900
 tgaataagga gttaaagaag attatcgcc aggtcagaga tcaggctgag catctcaaga 3960
 ccccggtcca aatggcggtt ttccatccaca atttcaagcg gaaggggggg attgggggggt 4020
 acagtgcggg ggagcgatc gtggacatca tcgcgacccg catccagact aaggagctgc 4080
 aaaagcagat taccatcgat cagaatttcc gggctacta cagggacagc agaaatcccc 4140
 tctggaaagg cccagcgaag ctccctctggc agggtaggtt ggcagtagtg atccaggata 4200
 atagcgacat caagttgtt cccagaagaa aggcgaagat cattaggat tatggcaaaac 4260
 agatggcggtt tgatgattgc gtggcgacca gacaggatga ggattag 4307

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

<220>
 <223> pGP-RRE3
 <400> 26

atgggtgcga gagcgtcagt attaagcggg ggagaattag atcgatggga aaaaattcgg 60
ttaaggccag ggggaaagaa aaaatataaa ttaaaaacata tagtatggc aagcagggag 120
ctagaacgtat tcgcagttaa tcctggcctg ttagaaacat cagaaggctg tagacaaata 180
ctgggacagc tacaaccatc cttcagaca ggatcagaag aacttagatc attatataat 240
acagttagcaa ccctctattg tttgcataaa aggatagaga taaaagacac caaggaagct 300
ttagacaaga tagaggaaga gcaaaacaaa agtaagaaaa aagcacagca agcagcagct 360
gacacaggac acagcaatca ggtcagccaa aattacccta tagtgcagaa catccagggg 420
caaatggtac atcagggcat atcacctaga actttaaatg catgggtaaa agttagtagaa 480
gagaaggctt tcagccaga agtgataccc atgtttcag cattatcaga aggagccacc 540
ccacaagatt taaacaccat gctaaacaca gtgggggac atcaagcagc catgcaaatg 600
ttaaaagaga ccatcaatga ggaagctgca gaatgggata gagtgcatcc agtgcatacg 660
ggcctattt caccaggcca gatgagagaa ccaagggaa gtgacatagc aggaactact 720

agtacccttc aggaacaaat aggatggatg acaaataatc cacctatccc agtaggagaa 780
 attataaaa gatggataat cctgggatta aataaaatag taagaatgtt tagccctacc 840
 agcattctgg acataagaca aggaccaaaa gaaccctta gagactatgt agaccgggtc 900
 tataaaactc taagagccga gcaagcttca caggaggtt aaaaattggat gacagaaacc 960
 ttgttggtcc aaaatgcgaa cccagattgt aagactattt taaaagcatt gggaccagcg 1020
 gctacactag aagaatgtt gacagcatgt cagggagtag gaggaccgg ccataaggca 1080
 agagtttgg ctgaagcaat gagccaaatg acaaattcag ctaccataat gatgcagaga 1140
 ggcaatttta ggaaccaaaag aaagattgtt aagtgttca attgtggcaa agaagggcac 1200
 acagccagaa attgcagggc ccctaggaaa aagggtgtt gggaaatgtgg aaaggaagga 1260
 caccataatgt aagattgtac tgagagacag gctaattttt tagggaaagat ctggccttcc 1320
 tacaaggaa ggccaggaa ttttcttcag agcagaccag agccaacacg cccaccagaa 1380
 gagagcttca ggtctgggtt agagacaaca actccccctc agaaggcagga gccgatagac 1440
 aaggaactgt atcccttaac ttccctcaga tcactctttg gcaacgaccc ctcgtcacaa 1500
 taaagatagg ggggcaacta aaggaagctc tattagatac aggagcagat gatacagtt 1560
 tagaagaaat gagtttgcctt ggaagatggaa aacccaaaaat gatagggggaa attggagtt 1620
 ttatcaaagt aagacagtat gatcagatac tattagaaat ctgtggacat aaagctatag 1680
 gtacagttatt agtaggacct acacctgtca acataattgg aagaaatctg ttgactcaga 1740
 ttggttgcac tttaaattttt cccatttagcc ctattgagac ttttgccttca aaattaaagc 1800
 caggaatggaa tggcccaaaa gttaaacaaat ggccattgtac agaagaaaaaa ataaaagcat 1860
 tagtagaaat ttgtacagag atggaaaagg aagggaaaat ttcaaaaaattt gggcctgaaa 1920
 atccatacaa tactccagta ttggccataa agaaaaaaaga cagtaactaaa tggagaaaaat 1980
 tagtagattt cagagaactt aataagagaa ctcaagactt ctgggaaagt caatttagaa 2040
 taccacatcc cgcgggtta aaaaagaaaaa aatcagtaac agtactggat gtgggtgatg 2100
 catattttc agttccctta gatcagact tcaggaaata tttttttttt accataacta 2160
 gtataaaacaa tgagacacca gggatttagat atcagtaaca tttttttttt cagggatgga 2220
 aaggatcacc agcaatattc caaagtagca tgacaaaaat ctttaggcct ttttagaaaac 2280
 aaaatccaga catagttattc tatcaataca tggatgattt gtatgttaga tcttacttag 2340
 aaataggggca gcatagaaca aaaatagagg agctgagaca acatctgtt aggtggggac 2400
 ttaccacacc agacaaaaaa catcagaaag aaccccttccatt cttttttttt ggttatgaac 2460
 tccatcttca taaatggaca gtacagccca tagtgcgtcc agaaaaaaagac agctggactg 2520
 tcaatgacat acagaagttt gtggggaaat tgaattttttt aagttagattt taccctggaa 2580
 ttaaaatggaa gcaattatgt aaactcccttta gggaaacccaa agcactaaca gaagtaatac 2640
 cactaacacca agaagcagag cttagactgg cggaaaaacac agagatttca aaagaaccag 2700
 tacatggagt gtattatgtac ctatcaacaa acttaatagc agaaaaatacag aagcaggggc 2760
 aaggccaatg gacatataa atttatcaag agccattttaa aatctgtttt acaggaaaaat 2820
 atgcaagaat ggggggttcc cacactaattt atgtttttttt attaacagag gcagtgcataa 2880
 aaataaccac agaaagcata gtaatatggg gaaagactcc taaattttttt ctggccatatac 2940
 aaaagggaaac atggaaaaca tggtggacac agtatttttttca agccacctgg attcctttagt 3000
 gggagtttggtaa taaaatccctt ctttttttttta aattatggta ccagtttagag aaagaaccca 3060
 tagtaggagc agaaaacccatc tatgttagatg gggcagctaa cagggagact aaatttagaa 3120
 aagcaggata tggtttttttttta agagggaaagac aaaaagggtt cacccttactt gacacaacaa 3180
 atcagaagac tggtttttttttta gcaattttttttagtgcgtcc ggtttttttttagtgcgtcc 3240
 acatagtaac agactcacaa tatgcattttttagtgcgtcc ggtttttttttagtgcgtcc 3300
 aatcagatgtt agtcaatcaaa ataatagagg agttaataaa aaaaagggtt gttttttttttagtgcgtcc 3360
 catgggttacc agcacacaaaaa ggaattttttttagtgcgtcc ggtttttttttagtgcgtcc 3420
 ctggatccatc gaaagttttttttagtgcgtcc ggtttttttttagtgcgtcc ggtttttttttagtgcgtcc 3480
 aatatccatc gttttttttttagtgcgtcc ggtttttttttagtgcgtcc ggtttttttttagtgcgtcc 3540
 aagaaatagt agccagttttttagtgcgtcc ggtttttttttagtgcgtcc ggtttttttttagtgcgtcc 3600
 tagactttttttagtgcgtcc ggtttttttttagtgcgtcc ggtttttttttagtgcgtcc ggtttttttttagtgcgtcc 3660
 tggtagcgt tttttttttttagtgcgtcc ggtttttttttagtgcgtcc ggtttttttttagtgcgtcc ggtttttttttagtgcgtcc 3720
 ggcaggaaac agcatatttttagtgcgtcc ggtttttttttagtgcgtcc ggtttttttttagtgcgtcc ggtttttttttagtgcgtcc 3780
 atacagacaa tggcagcaat tttttttttttagtgcgtcc ggtttttttttagtgcgtcc ggtttttttttagtgcgtcc 3840
 gaatcaagca ggaattttttttagtgcgtcc ggtttttttttagtgcgtcc ggtttttttttagtgcgtcc 3900
 tgaataaaaga attaaagaaa attataggac aggttaagaga tttttttttttagtgcgtcc ggtttttttttagtgcgtcc 3960
 cagcagttttttttagtgcgtcc ggtttttttttagtgcgtcc ggtttttttttagtgcgtcc ggtttttttttagtgcgtcc 4020
 acatgtttttttagtgcgtcc ggtttttttttagtgcgtcc ggtttttttttagtgcgtcc ggtttttttttagtgcgtcc 4080
 aaaaacaaat tacaaaaattt cttttttttttagtgcgtcc ggtttttttttagtgcgtcc ggtttttttttagtgcgtcc 4140
 tttttttttttagtgcgtcc ggtttttttttagtgcgtcc ggtttttttttagtgcgtcc ggtttttttttagtgcgtcc 4200
 atagtgcacat aaaatgtttttagtgcgtcc ggtttttttttagtgcgtcc ggtttttttttagtgcgtcc ggtttttttttagtgcgtcc 4260
 agatggcagg tttttttttttagtgcgtcc ggtttttttttagtgcgtcc ggtttttttttagtgcgtcc ggtttttttttagtgcgtcc 4307

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

<400> 27

atggggagacc ctttgacatg gagcaaggcg ctcagaagaat tagagaagg tagccgtacaa 60
gggtctcaga aattaactac tggtaactgt aattgggcgc taagtctagt agacttattt 120
catgatacca actttgtaaa agaaaaggac tggcagctga gggatgtcat tccattgctg 180
gaagatgtaa ctcagacgct gtcaggacaa gaaagagaaa ccttggaaag aacatggtg 240
gcaatttctg ctgtaaagat gggcctccag attaataatg tagtagatgg aaaggcatca 300
ttccagctcc taagagcga atatgaaaag aagactgcta ataaaaagca gtctgagccc 360
tctgaagaat atccaatcat gatagatgg gctggaaaca gaaattttag acctctaaca 420
ccttagaggat atactacttg ggtgaatacc atacagacaa atggcttattt 480
agtcaaaaact tatttggat attatcgta gactgtactt ctgaagaat aaatgaagct 540
ttggatgtgg tacctggcca ggcaggacaa aagcagatatt tactgtgc aatagaagcc 600
atagcagatg attggataa tagacatcca ttaccgaatg ctccactgtt 660
caagggccta ttccatgac agcaaggttt attagagggt taggagtacc tagaaaaaga 720
cagatgggac ctgctttga tcagtttagg cagacatata gacaatggat aatagaagcc 780
atgtcagaag gcatcaaagt gatgattgga aaacctaag ctc当地atataat 840
gctaaaggAAC cttaaccaga attttagac agactattat cccaaataaa aagtgaggga 900
catccacaag agatttcaaa attctttagt gatacactga ctattcagaa cgcaatgtat 960
gaatgtagaa atgctatgag acatttaga ctagaggata cattagaaga gaaaatgtat 1020
gcttgcagag acatttggaa tacaaaacaa aagatgtatg tatttggcaaa agcacttcag 1080
actggcttg cggcccccatt taaaggtgga gccttggaaag gaggccact aaaggcagca 1140
caaacatgtt ataactgtgg gaagccagga catttatcta gtcaatgttag agcacctaaa 1200
gtctgttttta aatgtaaaca gcctggacat ttctcaaaagc aatgcagaag tttccaaaaa 1260
aacgggaagc aaggggctca agggggccc cagaaacaaa ct当地ccat acaacagaag 1320
agttagcaca acaaattctgt tgc当地aaagacttctcaga ct当地aaatct 1380
ctgagcggaa taaaaaagga atacaatgtc aaggagaagg atcaagtaga ggtatcoaac 1440
ctggacagt ttggggatg acatataatc tagagaaaag ct当地actaca atagttttaa 1500
ttaatgatc tcccttaat gtactgttag acacaggagc agatacttca gtgttgaact 1560
ctgcacatta taataggta aaatataagag ggagaaaaata tcaagggacg ggaataatag 1620
gagtgggagg aaatgtggaa acattttctt cccctgtgac tataaagaaa aagggttagac 1680
acattaagac aagaatgcta gtggcagata ttccagtgac tattttggaa cgagatattc 1740
ttcaggactt aggtgaaaaa ttggtttgg cacagcttc caaggaaata aaattttagaa 1800
aaatagagtt aaaagagggc acaatggggc caaaaattcc tcaatggcca ctcaactaagg 1860
agaaactaga agggccaaa gagatgtcc aaagactatt gtc当地gggaa 1920
aagctagtga caataatcct tataattcac ccatatttgc agtctggca 1980
aatggaggtt attacaagat ctgagagaat taaacaaaac ggaacggaaa 2040
tatccagagg attgcctcac cgggaggat taattaaatg taaacacatg actgtattag 2100
atattggaga tgc当地atttc actataaccct tagatccaga gtttagacca tatacagctt 2160
tcactattcc ctccatttaat catcaagaad cagataaaag atatgtgtgg aaatgttac 2220
cacaaggatt cgtgttgagc ccatatataat atcagaaaac attacaggaa ttttacac 2280
cttttaggaa aagataatcc tggatcataat tggatgatg ttgttcatgg 2340
gaagtaatgg ttctaaaaaa caacacaaaag agttaatcat agaattaagg gcatgttac 2400
tggaaaaggg ttgtggacaca ccagatggaa attacaaga agtgc当地ctt 2460
taggttatca actttgtcc gaaaatttggaa aagtacaaaat aatgc当地tta atgagctcag 2520
agaatcaac ccttaatgat gtgc当地aaaat taatggggaa tataacatgg ttagagttga 2580
ggatcccagg gt当地acagta aaacacattt cagctactac taaggatgt aatggtagt 2640
atcaaaaaagt aatttggacg gaagaggcac aaaaagagg agaagaaaat aatggtagt 2700
ttaaaaatgc tcaagggtta caatattata atccagaaga agaaatgtta tggatgttgc 2760
aaattacaaa aattatgag gcaactttagt ttataaaaaca atcacaagga atcctatggg 2820
caggtaaaaa gattatgaag gctaataagg gatggtcaac agtacaaaat ttaatgttat 2880
tggatgtgg tggatgtgg gaaagtttta cttagatggg aaaatgtcca acgtttaagg 2940
taccattac caaagagcaa gtaatgtggg aaatgc当地aaatggatg 3000
tcccagaaaat agtatataca catcaagtag ttcatgtatgaa aatttggtag 3060
aagaacactac atcaggaata acaatataca ctgatggggg aaaacaaaat ggagaaggaa 3120
tagcagctta tggatgtgg aatggggaaa ctaaacagaa aaggatgttgc cctgtcaact 3180
atcaagttgc tggatgtgg gcaatataca tggc当地atgggaa gataaacaag 3240
taaatataatg aactgtatgtt tattttgtt gggatggaaaat tacaagggaa ttaggtttag 3300
aaggaccaca aagtccctgg tggatgtggg cacaaggaa tatatgttca aatggca 3360
attttgc当地tgg ggtacctgtt cacaaggaa tatatgttca aatggca 3420
aaaaataaa agaagaaaatc atgctagcat accaaggcac acaatataaa gagatgtttag 3480
atgaagatgc aggtttgac ttatgttgc cttatgtatgacat catgatatactt gtagatgtt 3540
aaaaatcat acccacaatgttgc当地tgggaaatc aagttccccc taataqctt qgatqqgtca 3600

ctggaaatc	atcaatggca	aaacagggtt	tattaattaa	tggaggaata	attgtatgaag	3660
gatatacagg	agaaaatacaa	gtgatatgta	ctaatattgg	aaaaagtaat	attaaaattaa	3720
tagagggaca	aaaatttgca	caattaatta	tactacagca	tcactcaaat	tccagacagc	3780
cttggatga	aaataaaaata	tctcagagag	gggataaaagg	atttgaagt	acaggagttat	3840
tctggatga	aaatattcag	gaagcacaag	atgaacatga	gaattggcat	acatcaccaa	3900
agatattggc	aagaaaattat	aagataccat	tgactgtagc	aaaacagata	actcaagaat	3960
gtcctcattg	cactaagcaa	ggatcaggac	ctgcagggtg	tgtcatgaga	tctcctaattc	4020
attggcaggc	agattgcaca	catttggaca	ataagataat	attgactttt	gtagagtcaa	4080
attcaggata	catacatgct	acattattgt	aaaaagaaaa	tgcattatgt	acttcattgg	4140
ctattttaga	atgggcaaga	ttgttttcac	caaagtccctt	acacacagat	aacggcacta	4200
attttgtggc	agaaccagtt	gtaaattttgt	tgaagttcct	aaagatagca	cataaccacag	4260
gaataccata	tcatccagaa	agtcaaggta	ttgttagaaag	ggcaaatagg	accttggaaag	4320
agaagattca	aagtcataga	gacaacactc	aaacactgga	ggcagcttta	caacttgctc	4380
tcattacttg	taacaaaggg	agggaaagta	ttggaggacca	gacaccatgg	gaagtattta	4440
tcactaatca	agcacaagta	atacatgaga	aacttttact	acagcaagca	caatccctcca	4500
aaaaattttg	tttttacaaa	atccctggtg	aacatgattt	gaaggggacct	actagggtgc	4560
tgtggaaaggg	tgatggtgca	gtagtagtta	atgtatgaagg	aaagggaaata	attgctgtac	4620
cattaaccag	gactaagttt	ctaataaaac	caaatttga			4658

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

<220>
<223> pONY3.1
<400> 28

```
atgggagacc ctttgacatg gagcaaggcg ctcaagaagt tagagaaggt gacggtacaa 60
gggtctcaga aattaactac tggtaactgt aattgggcgc taagtctagt agacttattt 120
catgatacca actttgtaaa agaaaaggac tggcagctga gggatgtcat tccattgctg 180
gaagatgtaa ctcagacgct gtcaggacaa gaaagagagg cctttgaaag aacatggtgg 240
gcaatttctg ctgtaaaagat gggcctccag attaataatg tagtagatgg aaaggccatca 300
ttccagctcc taagagcgaa atatgaaaag aagactgcta ataaaaagca gtctgagccc 360
tctqaqaat atccaatcat qataq 385
```

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

<220>
<223> pONY3 2opti

<400> 29

atgggcgatc ccctcacctg gtccaaagcc ctgaaaaaac tggaaaaagt caccgttcag 60
ggtagccaaa agcttaccac aggcaattgc aactgggcatt tgccttggt ggatctttc 120
caccgacacta attcgtaa ggagaaagat tggcaactca gagacgtgat cccccctttg 180
gaggacgtga cccaaacatt gtctgggcag gagcgcgaag ctttcgagcg cacctggttg 240
gccatcagcg cagtaaaaat ggggctgcaa atcaacaacg tggttgacgg taaagctagc 300
tttcaactgc tccgcgctaa gtacgagaaa aaaaccgcac acaagaaaca atccgaacct 360
aqcqaqqaqt acccaatcat qataq 385

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

<400> 30
atggatacqa qa 12

5 <210> 31
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Virus de la Inmunodeficiencia Humana
10 <400> 31
 gatgaggatt ag 12
 <210> 32
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
15 <220>
 <223> gagpol-SYNgp
 <400> 32
 atgggcgcc gc 12
20 <210> 33
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
25 <220>
 <223> gagpol-SYNgp
 <400> 33
30 gatgaggatt ag 12
 <210> 34
 <211> 12
35 <212> ADN
 <213> Virus de la Inmunodeficiencia Humana
 <400> 34
40 atgagagtga ag 12
 <210> 35
 <211> 12
45 <212> ADN
 <213> Virus de la Inmunodeficiencia Humana
 <400> 35
 gcttgctat aa 12
50 <210> 36
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
55 <220>
 <223> synGP160mn
 <400> 36
60 atgagggtga ag 12
 <210> 37
 <211> 12
65 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> synGP160mn

5 <400> 37
gcgcgtgcgt 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:
 - 5 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;
- 10 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.
- 15 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:
 - 20 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;
- 25 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.
- 30 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.
- 35 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.
- 40 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

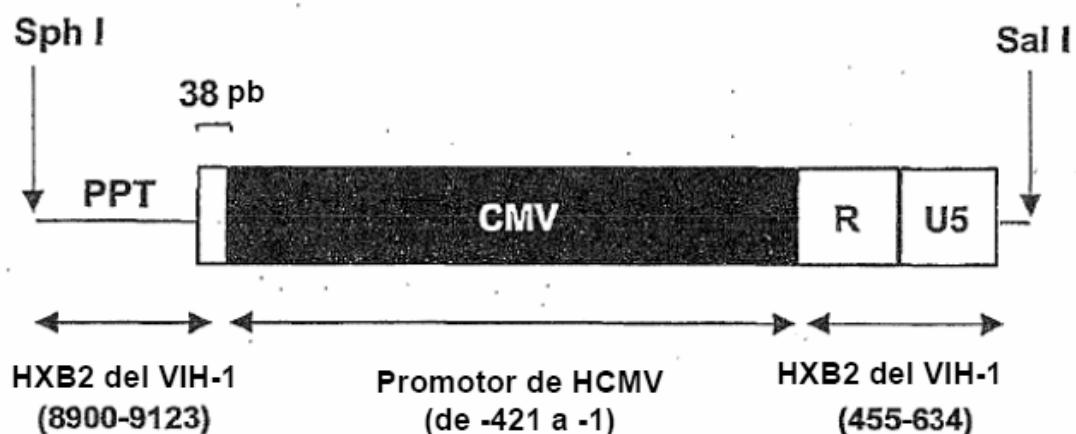
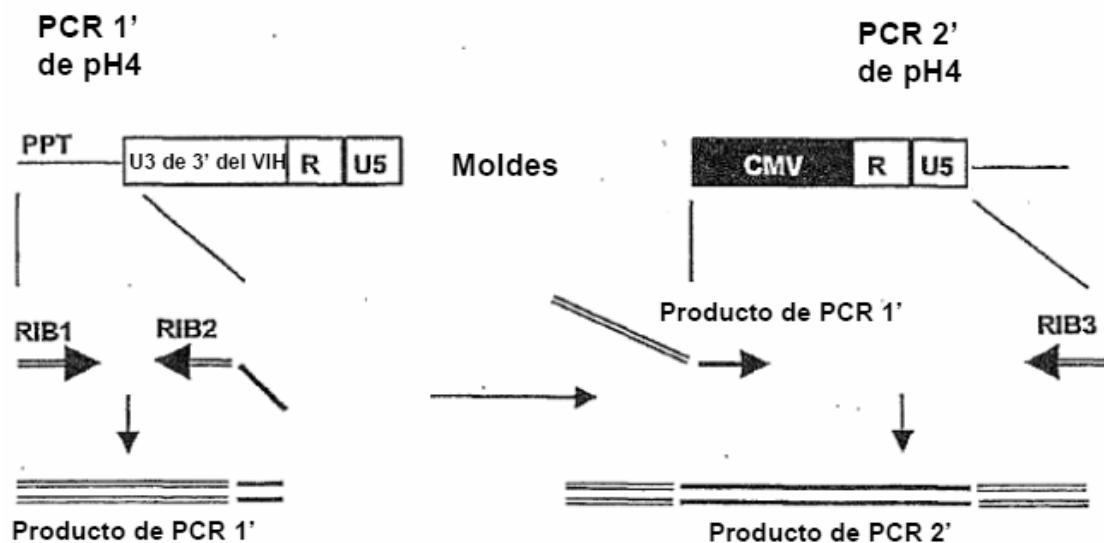
A**B**

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

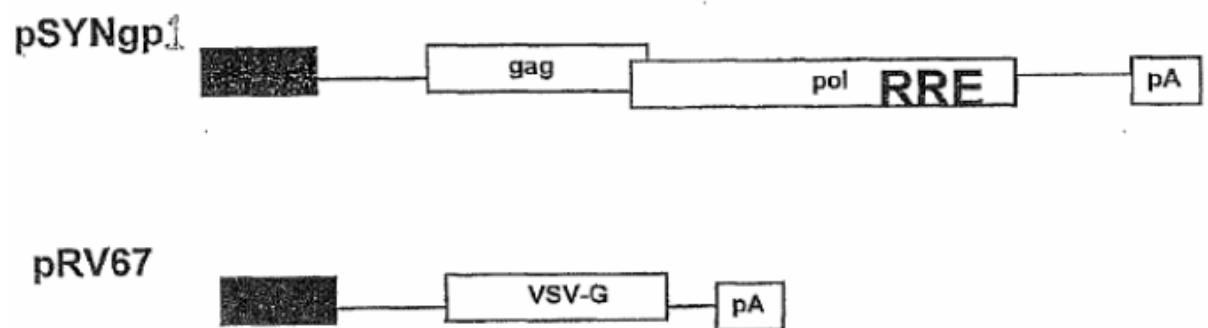
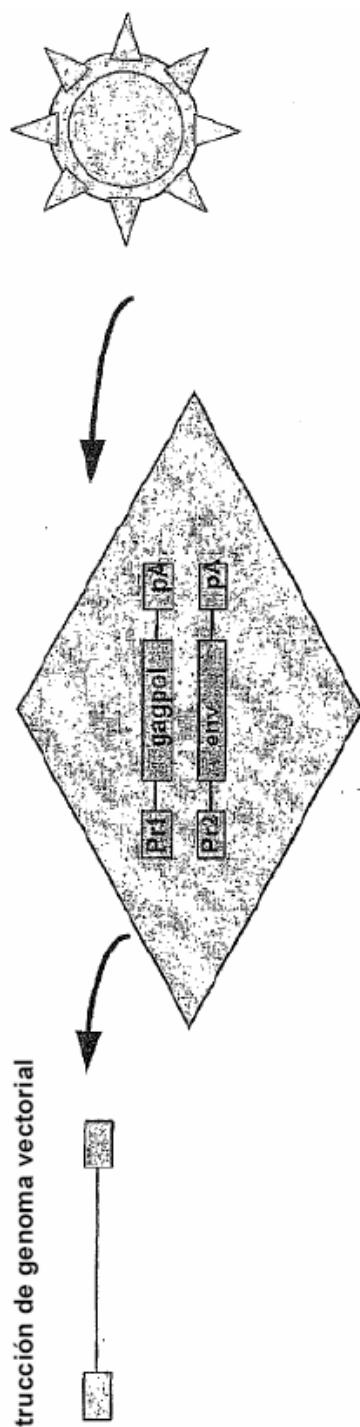


FIGURA 7

El sistema de vectores de Hit

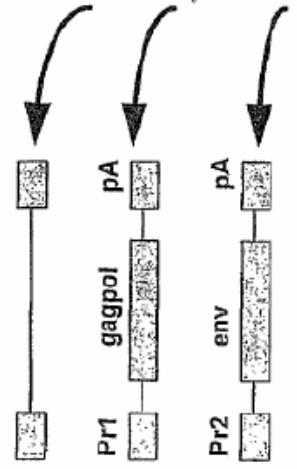
Líneas celulares de empaquetamiento auxiliares

Construcción de genoma vectorial



Cotransfección de tres plásmidos (HIT)

Construcción de genoma vectorial



p.ej.: 293T, COS

Figura 8

2401 TGGACCAACCGGACAGAAGGCCACCAAGGAGCTCCCTCTTGATG 2450
 2401 TTAACACACTAGACAAAACATGAAAGAACCTCCATTCCTTGATG 2450
 2451 GGTGACAGGTTTCACCCGAAATGGGACCCGCTATGTCGTGCC 2500
 2451 GGTGATGAACTCCATCTGATAAATGGACAGTACGGCTATGTCGTGCC 2500
 2501 AGAGAAAGAAGCTGGTCACTGCAACCTAAGGAAGCTGGGGAAAGT 2550
 2501 AGAAAAGATAGCTGGTCACTGCAACCTAAGGAAGCTGGGGAAAGT 2550
 2551 TGAACGGCGCACTGCACTGCAATTACCCAGGATTAGGTAGGGATC 2600
 2551 TGAATGGGAACTGGTCACTGCAATTACCCAGGATTAGGTAGGGATC 2600
 2601 AACCTCCTCGGGGACCAAGGCCACTCACAGGTGATCCCCCTAACCGA 2650
 2601 AACCTCCTCGGGGACCAAGGCCACTCACAGGTGATCCCCCTAACCGA 2650
 2601 AAACCTCTTGGGAAAGCAAGGAACTCAACAGAACTTACAGAACTAACAGA 2650
 2651 GGAGGGCGAGCTCGAAGTGGCGAGAAAACGGAGAGATCTAACGGCCG 2700
 2651 AGGAGCGAGCTTGGCGAGAAAACGGAGAGATCTAACGGCCG 2700
 2701 TGCACCGCTGTTACTATGACCCCTCCAAGGGCTGTATGCCGATCCAG 2750
 2701 TACATGGAGTGTATATGACCCCTCAAAAGACTTAATAGCGAAATAACAG 2750
 2751 AAGGAGGGCTAGGCCAGTGGACCTATGCAATTACCGGGTCCCTCA 2800
 2751 AAGGAGGGCTAGGCCAGTGGACCTATGCAATTACCGGGTCCCTCA 2800
 2801 GAACTGGAAGACCCGGAGTAGCCGGGTTGCGGGTCCCTCA 2850
 2801 AAATCTGAAACAGGAAATAATGCAAGTGGGGTGGCCACATTAATG 2850
 2851 ACGTCAGGAGCTGACCCGGAGCCCTGAGAAAGATCACACCGAAAGCAGC 2900
 2851 ATGTAACATACAGGGAGCTGCAAAATAACACAGAAAGCAGC 2900
 2901 GGTGATCTGGGAAAGACTCTAAAGTCAGGCGGTTGAGAATGCAAGGAAAC 2950
 2901 GAAATATGGGAAGAGACTCTAAATTTAAACTGCCCCATACAGGAAAC 2950
 3001 GGAGTTCCTCAACCCCTCCCTGGTAAAGCTGGTACAGCTGGGAG 3050
 3001 GGAGTTCCTTAATACCCCTCCCTTGGTAAATTAGCTTACAGCTGGGAG 3050
 3051 AAGGGGCCATAGTGGCGAACTCTAACCTGCTTACGGGCGCTTAA 3100
 3051 AAGGAACCTATGGGAAACCTCTTACGGGCGCTTAA 3100
 3101 CAGGGAGACTAAGTGGCGGAAACCTCTAACCTGCTTACGGGCGAC 3150
 3101 CAGGGAGACTAATGGGAAACCTCTTACGGGCGCTTAA 3150
 3151 AGAGGGTTCTACCCCTACTGACACCCACCCGAGACTGAGCTGAG 3200
 3151 AAAAATGTTCTACCCCTACTGACACCCACCCGAGACTGAGCTGAG 3200
 3201 GCGATTTACCTGGCTGGTCACTGAGCTGGGCTCTGGAGCTGAGTTCAGA 3250
 3201 GCGATTTACCTGGCTGGTCACTGAGCTGGGCTCTGGAGCTGAGTTCAGA 3250
 3251 AGACTCTCTGGTACCTGGCTGGTCACTGAGCTGGGCTCTGGAGCTGAG 3300
 3251 AGACTCTCTGGTACCTGGCTGGTCACTGAGCTGGGCTCTGGAGCTGAG 3300
 3301 AGCTTATCTAGCTTGGTCTGGTCACTGAGCTGGGCTCTGGAGCTGAG 3350
 3301 AAUCAGAGTTAGCTTGGTCACTGAGCTGGGCTCTGGAGCTGAG 3350
 3351 GTCTATCTGGCTGGTCTGGTCACTGAGCTGGGCTCTGGAGCTGAG 3400
 3351 GTCTATCTGGCTGGTCTGGTCACTGAGCTGGGCTCTGGAGCTGAG 3400
 3401 GTGCGCAAGCTGGCTGGTCTGGTCACTGAGCTGGGCTCTGGAGCTGAG 3450
 3401 AGTAGTAAATTTAGCTGGTCTGGTCACTGAGCTGGGCTCTGGAGCTGAG 3450
 3451 GCGATGGCTGGACTCTGGCTGGACTCTGGCTGGACTCTGGAGCTGAG 3500
 3451 GAATAGATAAGGCCCTAGTGAATGCACTTCTGGAGCTGAG 3500
 3501 GCGATGGCTGGACTCTGGCTGGACTCTGGCTGGACTCTGGAGCTGAG 3550
 3501 GCGATGGCTGGACTCTGGCTGGACTCTGGCTGGACTCTGGAGCTGAG 3550
 3551 GCGCAGCTGTTGCAAGGTTCAAGGTTCAAGGTTCAAGGTTCTGGAGG 3600
 3551 AGCCAGCTGTTGCAAGGTTCAAGGTTCAAGGTTCTGGAGG 3600

3601 TGGACTGTAGCCCGGCACTTCGGCACTCGGACTCTGGGGCC 3650
 3601 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 3601 TAGACTGTAGTCAGGGAAATATGGCACTAGATGTGACATTTAGAGA 3650
 3651 AAGGTATATCCTCTGTAGCCGTCCATGCGGGCA 3700
 3651 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 3651 AAGTGTATCCTCTGTAGCACTGCGGGCA 3700
 3701 GGTCAATCCCGGAAACAGGGAGGGAGCAACCTCACTCTCTCGAAGC 3750
 3701 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 3701 AGTTATTCGCAAGAAACAGGGAGGGAGCAACCTCACTCTCTCGAAGC 3750
 3751 TGGCAAGCCGGTGGCGCACTGAAAGGACCATCATACTGCAATGGCAGCAT 3800
 3751 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 3801 TTCACTAGCTGCTTAAGCTTAAGCCGGCTCTGGGGCGGAGATCGCA 3850
 3801 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 3801 TTCACTAGCTGCTTAAGGTACGGTAAAGCTTAAAGCTAATAGCTAAGTCGA 3850
 3851 GGAGTTGGGATCCCTCACTATCCCTGAGTCAGGGCTCTGCGAGTCGA 3900
 3851 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 3901 TGAATAAGGAGGTAAAGAAGATACTCGGAGCTATCCCTGAGCTGAG 3950
 3901 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 3901 TGAATAAGAATTAAGAATTAAGAATTAAGAATTAAGAATTAAGAATTAAG 3950
 3951 CATCTCAAGACCGGCTCCAAATGGCGGTATTCATCCCAATTTCAGCG 4000
 3951 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 3951 CATCTTAAGACAGGAGTACAAATGGCGCTATTCATCCCAATTTCAGCG 4000
 4001 GAGGGGGGATTCGGGGTACAGTCGGGGGGGATCTGGGACATCA 4050
 4001 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 4001 AAAAGGGGGATTCGGGGTACAGTCGGGGTACAGTCGGGGATAGACATA 4050
 4051 TCGCACCGCATCCAGACTAGGGACCTCAAGGGATATCCAGCTT 4100
 4051 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 4051 TAGCAACGACATCAACTAAGAATTAACAAATTAACAAATTAACAAAT 4100
 4101 CAGAAATTCCGGGTCCTACAGGACCTCAAGGGATATCCCTCTGGGAAAGG 4150
 4101 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 4151 CCCAGCGAGCTCCCTCTGGGGTCAAGGGGGGAGCTGAGTGTATCCAGGATA 4200
 4151 ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
 4151 ACCGAAAGCCTCTGGAAAGGTGAAAGGGGAGCTGAGTGTATACAGATA 4300

WT	ATGGGAGACCCCTTGACATGGAGCAAGGCGCTCAAGAAGTTAGAGAAGGTGACGGTACAA	60
CO	ATGGGCGATCCCCTCACCTGGTCAAAGCCCTGAAGAAAAGTGGAAAAAGTCACCGTTAG	60
WT	GGGTCTCAGAAAATTAACTACTGGTAAGTGTAAATTGGCGCTAAGTCTAGTAGACTTATTT	120
CO	GGTAGCCAAAAGCTTACACAGGCAATTGCAACTGGCATTGTCCTGGATCTTTC	120
WT	CATGATACCAACTTTGTAAAAGAAAAAGGACTGGCAGCTGAGGGATGTCAATTGCTG	180
CO	CACGACACTAATTGCGTTAAGGAGAAAGATTGGCAACTCAGAGACGTGATCCCCCTCTG	180
WT	GAAGATGTAACTCAGACGCTGTCAGGACAAGAAAAGAGAGGGCTTGAAAGAACATGGTGG	240
CO	GAGGACGTGACCCAAACATGTCGGCAGGAGCGGAAGCTTCGAGCGCACCTGGTGG	240
WT	GCAATTCTGCTGTAAGATGGGCCTCCAGATTAATAATGTAGTAGATGGAAAGGCATCA	300
CO	GCCATCAGCGCAGTCAAAATGGGCTGCAAATCACACACGTGGTGTGACGGTAAAGCTAGC	300
WT	TTCCAGCTCTTAAGAGCGAAATATGAAAAGAACACTGCTAATAAAAAGCAGTCTGAGCCC	360
CO	TTTCAACTGCTCCCGCTAAGTACGAGAAGAAAACGCCAACAGAAACATCCGAACCT	360
WT	TCTGAAGAATATCCAATCATGATAGATGGGCTGGAAACAGAAAATTAGACCTCTAACAA	420
CO	AGCGAGGAGTACCCATTATGATCGACGGCGCCGGCAATAGGAACCTCCGCCACTGACT	420
WT	CCTAGAGGATATACTACTTGGGTAATACCAACAGACAAATGGCTATTAAATGAAGCT	480
CO	CCCAGGGCTATACCACTTGGCTAACACCATCCAGACAAACGGACTTTGAACGAAGCC	480
WT	AGTCAAAACCTTATTGGGATATTATCAGTAGACTGTACTCTGAAAGAAAATGAATGCATT	540
CO	TCCCAGAACCTGTTGGCATCCCTGTCGTGGACTGCACCTCCGAAAGAAATGAATGCTTT	540
WT	TTGGATGTGGTACCTGGCCAGGCAGGACAAAACAGATATTACTTGATGCAATTGATAAG	600
CO	CTCGACGTGGTGGCCAGGACAGGCTGGACAGAACAGATCCTGCTCGATGCCATTGACAAG	600
WT	ATAGCAGATGATTGGGATAATAGACATCCATTACCGAATGCTCCACTGGTGGCACCAACCA	660
CO	ATCGCCGACGACTGGGATAATCGCACCCCTGCCAACGCCCTCTGGTGGCTCCCCCA	660
WT	CAAGGGCCTATTCCCATGACAGCAAGGTTATTAGAGGTTAGGAGTACCTAGAGAAAAGA	720
CO	CAGGGGCCTATCCCTATGACCGCTAGGTTCAATTAGGGACTGGGGTGCCCCGCGAACGC	720
WT	CAGATGGAGCCTGCTTTGATCAGTTAGGCAGACATATAGACAATGGATAATAGAACGCC	780
CO	CAGATGGAGCCAGCATTTGACCAATTAGGCAGACCTACAGACAGTGGATCATCGAACGCC	780
WT	ATGTCAGAAGGCATCAAAGTCATGATTGGAAAACCTAAAGCTAAAAATTAGGCAAGGA	840
CO	ATGAGCCGAGGGATTAAAGTCATGATCGAAAGCCCAAGGCACAGAACATCAGGCAGGG	840
WT	GCTAAGGAACCTTACCCAGAATTGCTAGACAGACTATTATCCAAATAAAAAGTGAGGGA	900
CO	GCCAAGGAACCATACCCCTGAGTTGTCGACAGGCTCTGTCAGATTAAATCCGAAGGC	900
WT	CATCCACAAAGAGATTTCAAAATTCTTGACTGATAACTGACTATTCAAGAACGCAAATGAG	960
CO	CACCCCTCAGGAGATCTCCAAGTTGACAGACACACTGACTATCCAAAATGCAAATGAA	960

WT	GAATGTAGAAATGCTATGAGACATTAAAGACCAGAGGATACATTAGAAGAGAAAAATGTAT	1020
CO	GAATGTAGAAACGGCATGAGGCACCTCAGACCTGAAGATAACCTGGAGGAGAAAATGTAC	1020
WT	GCTTGCAGAGACATTGGAACTACAAAACAAAAGATGATGTTATTGGCRAAGCACTTCAG	1080
CO	GCATGTCGCGACATTGGCACTACCAAGCAAAGATGATGTCGCTGCCAAGGCTCTGCAA	1080
WT	ACTGGTCTTGCGGGCCCCATTAAAGGTGGAGCCTTGAAAGGAGGGCCACTAAAGGCAGCA	1140
CO	ACCGGCCTGGCTGGTCCATTCAAAGGAGGAGCACTGAAGGGAGGTCCATTGAAAGCTGCA	1140
WT	CAAACATGTTATAACTGTGGGAAGCCAGGACATTATCTAGTCATGTAGAGCACCTAAA	1200
CO	CAAACATGTTATAATTGTGGGAAGCCAGGACATTATCTAGTCATGTAGAGCACCTAAA	1200
WT	GTCTGTTTAAATGTAACAGCCTGGACATTCTCAAAGCAATGCAGAAAGTGTTCAAA	1260
CO	GTCTGTTTAAATGTAACAGCCTGGACATTCTCAAAGCAATGCAGAAAGTGTTCAAA	1260
WT	AACGGGAAGCAAGGGGCTCAAGGGAGGCCCCAGAAAACAAACTTTCCCATAAACAGAAG	1320
CO	AACGGGAAGCAAGGGGCTCAAGGGAGGCCCCAGAAAACAAACTTTCCCATAAACAGAAG	1320
WT	AGTCAGCACAAACAAATCTGTTGTACAGAGACTCCTCAGACTCAAAATCTGTACCCAGAT	1380
CO	AGTCAGCACAAACAAATCTGTTGTACAGAGACTCCTCAGACTCAAAATCTGTACCCAGAT	1380
WT	CTGAGCGAAATAAAAAGGAATACATGTCAGGAGAAGGATCAAGTAGAGGATCTCAAC	1440
CO	CTGAGCGAAATAAAAAGGAATACATGTCAGGAGAAGGATCAAGTAGAGGATCTCAAC	1440
WT	CTGGACAGTTGTGGGAGTAACATATAATCTAGAGAAAAGGCCTACTACAATAGTATTAA	1500
CO	CTGGACAGTTGTGGGAGTAACATACAATCTCGAGAACAGGGCCACTACCACATCGTCTGA	1500
WT	TTAATGATACTCCCTTAAATGTAAGTTAGACACAGGAGCAGATACTTCAGTGTGACTA	1560
CO	TCAATGACACCCCTCTTAATGTGCTGGACACCGGAGCCGACACCAGCGTCTCACTA	1560
WT	CTGCACTTATAATAGGTTAAATATAGAGGGAGAAAATATCAAGGGACGGGAATAATAG	1620
CO	CTGCACTTATAACAGACTGAAATACAGAGGAAGGAATACCAAGGGCACAGGCATCATCG	1620
WT	GAGTGGGAGGAATGTGGAAACATTTCIACGCCTGTGACTATAAGAAAAGGGTAGAC	1680
CO	GCCTTGGAGGCAACGTCGAAACCTTTCACTCCTGTCACCATCCTGGCAGAGACATTC	1680
WT	ACATTAAGACAAGAAATGCTAGTGGCAGATATTCCAGTGAATTTGGGACGGAGATATTC	1740
CO	ACATTAACACAGAAATGCTGGCGCCACATCCCGTCACCATCCTGGCAGAGACATTC	1740
WT	TTCAGGACTTAGGTGCAAAATTGGTTTGGCACAGCTCTCCAGGAAATAAAATTAGAA	1800
CO	TCCAGGACCTGGCGCTAAACTCGTGTGGCACAACTGTCTAAGGAATCAAGTTCCGCA	1800
WT	AAATAGAGTTAAAGAGGGCACPATGGGCCAAAAATTCTCAATGGCCACTCACTAAGG	1860
CO	AGATCGAGCTGAAAGAGGGCACAATGGTCCAAAAATCCCCAGTGGCCCTGACCAAAG	1860
WT	AGAAACTAGAAGGGCCTAAGAGATAGTCCAAGAGACTATTGTCAGAGGGAAAATTCAG	1920
CO	AGAAGCTTGAGGGCGCTAAGGAATCTGTCAGCGCCTGCTTCTGAGGGCAAGATTAGCG	1920
WT	AAGCTAGTGCACATAATCCTTATAATTCCCATATTGTAAATAAAAAGAGGTCTGGCA	1980
CO	AGGCCAGCGACAATAACCTTACACAGCCCCATCTTGTGATTAAGAAAAGGAGCGGCA	1980

WT	AATGGAGGTATTACAAGAGATCTGAGAGAAATTAAACAAAACAGTACAAGTAGGAACGGAAA	2040
CO	AATGGAGACTCCTGCAGGACCTGAGGGAACTCAACAAGACCGTCCAGGTGGAACTGAGA	2040
WT	TATCCAGAGGGATTGCCCTCACCCGGGAGGGATTAAATTAAATGTAACACATGACTGTATTAG	2100
CO	TCTCTCGCGGACTGCCCTCACCCCGGCGGCCTGATTAAATGCAAGCACATGACAGTCCTTG	2100
WT	ATATTGGAGATGCATATTTCACTATACCCCTTAGATCCAGAGTTAGACCATAACAGCTT	2160
CO	ACATTGGAGACGCTTATTTACCATCCCCCTCGATCCTGAATTTCGCCCTATACTGCTT	2160
WT	TCACTATTCCCTCCATTAATCATCAAGAACAGATAAAAGATATGTGTGAAATGTTAC	2220
CO	TTACCATCCCCAGCATCAATCACCAGGAGCCGATAACGCTATGTGTGAAATGTTAC	2220
WT	CACAAGGATTCTGTTGAGCCCATAATAATATCAGAAAACATTACAGGAAATTTACAAC	2280
CO	CCCAGGGATTGTGCTAGCCCCTACATTACAGAACACTTCAAGAGATCCTCCAAAC	2280
WT	CTTTTAGGGAAAGATATCCTGAAGTACAATTGTATCAATATATGGATGATTGTTCATGG	2340
CO	CTTTCCCGCAAAGATAACCCAGAGGTTCAACTCTACCAATAATATGGACGACCTGTTCATGG	2340
WT	GAAGTAATGGTCTAAAAAACAACACAAAGAGTTAATCATAGAATTAGGGCGATCTTAC	2400
CO	GGTCCAACGGGTCTAAGAACGACAGCACAGGAACCTCATCGAACGTGAGGGCAATCTCC	2400
WT	TGGAAAAGGGTTTGAGACACCAAGATGATAAAATTACAAGAAGTGCCACCTTATAGCTGGC	2460
CO	TGGAGAAAAGGCTTCGAGACACCCGACGACAAGCTGCAAGAAGTTCCTCCATATAGCTGGC	2460
WT	TAGGTTATCAACTTGTCTGAAAATTGGAAAGTACAAAAATGCAATTAGACATGGTAA	2520
CO	TGGGCTACAGCTTGTCCCTGAAAAGTCCAGAAGATGCAAGTGGATATGGTCA	2520
WT	AGAATCCAACCCCTTAATGATGTGCAAAATTAAATGGGAATATAACATGGATGAGCTCAG	2580
CO	AGAACCCAAACACTGAACGACGTCCAGAACGCTCATGGCAATTACCTGGATGAGCTCCG	2580
WT	GGATCCCAGGGTTGACAGTAAAACACATTGCAGCTACTACTAAGGGATGTTAGAGTTGA	2640
CO	GAATCCCTGGGCTTACCGTTAAGCACATTGCCGCAACTACAAAGGATGCCGGAGTTGA	2640
WT	ATCAAAAAGTAATTGGACGGAAGAGGCACAAAAAGAGTTAGAAGAAAATAATGAGAAGA	2700
CO	ACCAGAACGTCATTGGACAGAGGAAGCTCAGAAGGAACCTGGAGGAGAATAATGAAAAGA	2700
WT	TTAAAAAATGCTCAAGGGTTACAATATTATAATCCAGAAGAAGAAAATGTTATGTGAGGGTG	2760
CO	TTAAGAATGCTCAAGGGCTCAATACTACAATCCGAAGAACGAAATGTTGTGCGAGGGTCG	2760
WT	AAATTACAAAAAATTATGAGGCACCTTATGTTATAACAAATCACAAGGAATCCTATGGG	2820
CO	AAATCACTAAGAACTACGAAGCCACCTATGTCATCAAACAGTCCCAAGGCATCTGTGGG	2820
WT	CAGGTAAAAAGATTATGAAGGCTAATAAGGGATGGTCAACAGTAAAAAATTAAATGTTAT	2880
CO	CCGGAAAGAAAATCATGAAGGCCACAAAGGCTGGTCCACCGTTAAAAATCTGATGCTCC	2880
WT	TGTTGCAACATGTGGCAACAGAAAGTATTACTAGACTAGGAAATGTCCAACGTTAAGG	2940
CO	TGCTCCAGCACGTGCCACCGAGTCTATCACCCGCGTGGCAAGTGGCCCCACCTTCAAAG	2940
WT	TACCATTTACCAAGAGCAAGTAATGTGGAAATGCAAAAAGGATGGTATTATTCTTGGC	3000
CO	TTCCCTTCACTAAGGAGCAGGTGATGTGGGAGATGCAAAAAGGCTGGTACTACTCTTGGC	3000

WT	TCCCAGAAATAGTATAACACATCAAGTAGTTCATGATGATTGGAGAATGAAATTGGTAG	3060
CO	TTCCCGAGATCGTCTACACCCACCAAGTGGTGCACGACGACTGGAGAATGAAGCTTGTG	3060
WT	AAGAACCTACATCAGGAATAACAATATACTGATGGGGAAAACAAAATGGAGAAGGAA	3120
CO	AGGAGCCCCTAGCGAATTACAATCTACCGACGGCGAAAGCAAAACGGAGAGGGAA	3120
WT	TAGCAGCTTATGTGACCAGTAATGGGAGAACTAAACAGAAAAGGTAGGGACCTGTCACTC	3180
CO	TCGCTGCATACGTACATCTAACGGCUGCACCAAGCAAAAGAGGCTGGCCCTGTCACTC	3180
WT	ATCAAGTTGCTGAAAGAATGGCAATACAAATGGCATTAGAGGATACCAAGAGATAACAAG	3240
CO	ACCAGGTGGCTGAGAGGATGGCTATCCAGATGCCCTTGAGGACACTAGAGACAAGCAGG	3240
WT	TAAATATAGTAACGTAGTTATTATTGTGGAAAAATATTACAGAAGGATTAGGTTAG	3300
CO	TGAACATTGTGACTGACAGCTACTACTGCTGGAAAAACATCACAGAGGCCCTGGCTGG	3300
WT	AAGGACCACAAAGCTTGGTGGCCTATAATACAAAATATCAGAGAAAAAGAGATAGTTT	3360
CO	AGGGACCCAGTCTCCCTGGTGGCCTATCATCCAGAATATCCCGCAAAGGAAATTGTCT	3360
WT	ATTTTGCTTGGGTACCTGGTCACAAAGGGATAATGGTAATCAATTGGCAGATGAAGCCG	3420
CO	ATTTCGCTTGGGTGCTGGACACAAAGGAATTACGGCAACCAACTCGCGATGAAGCCG	3420
WT	CAAAAATAAAAGAAGAAATCATGCTAGCATAACCAAGGCACACAAATTAAAGAGAAAAAGAG	3480
CO	CCAAAATTAAAGAGGAAATCATGCTTGCCTACACAGGGCACACAGATTAAGGAGAAAGAGAG	3480
WT	ATGAAGATGCAGGGTTGACTTATGTGTTCTTATGACATCATGATAACCTGTATCTGACA	3540
CO	ACGAGGACGCTGGCTTGACCTGTGTGCCATACGACATCATGATTCCGTTAGCGACA	3540
WT	CAAAAATCATACCCACAGATGTAACCTCAAGTCCCTCTAATAGCTTGGATGGGTCA	3600
CO	CAAAGATCATCCAAACGATGTCAAGATCCAGGTGCCACCCAATTCAATTGGTTGGGTGA	3600
WT	CTGGGAAATCATCAATGGCAAAACAGGGGTATTAAATTGGAGGAATAATTGATGAAG	3660
CO	CCGGAAAGTCCAGCATGGCTAACGCAGGGCTTCTGATTAACGGGGGAATCAATTGATGAAG	3660
WT	GATATACACCGACAAATACAACTGATATGTACTTAATATTGGAAAAACTAATAATTAA	3720
CO	GATACACCCGGCGAAATCCAGGTGATCTGCACAAATATCGGCAAAGCAATAAGCTTA	3720
WT	TAGAGGGACAAAAATTGACAATTAAATTATACAGCATCACTCAAATTCCAGACAGC	3780
CO	TCGAAGGGCAGAAGTTCGCTCAACTCATCATCCTCCAGCACACAGCAATTCAAGACAAC	3780
WT	CTTGGGATGAAAATAAAATCTCAGAGACGGGATAAAAGGATTGGAAGTACAGGAGTAT	3840
CO	CTTGGGACCAAAACAAGATTAGCCAGAGACGTGACAAAGGCTTCGGCACACAGGTGTCT	3840
WT	TCTGGGTAGAAAATTCAGGAAGCACAAGATGAACATGAGAATTGGCATACATCACC	3900
CO	TCTGGGTGGAGAACATCCAGGAAGCACAGGACGACGAGAATTGGCACACCTCCCTA	3900
WT	AGATATTGGCAAGAAATTATAAGATACCAITGACTGTAGCIAAACAGATAACTCAAGAAT	3960
CO	AGATTTGGCCCGCAATTACAAGATCCCCTGACTGTGGCTAACAGAGATCACACAGGAAT	3960
WT	GTCCCTCATGCACTAACGCAAGGATCAGGACCTGCAGGTTGTGTCATGAGATCTCTAATC	4020
CO	GCCCCCACTGCACCAACAAAGGTTCTGGCCCGCCGGCTCGTGTAGGATCCCCAATC	4020

WT	ATTGGCAGGCAGATTGCACACATTGGACAATAAGATAATATTGACTTTGTAGAGTCAA	4080
CO	ACTGGCAGGCAGATTGCACACATTGGACAATAAGATAATATTGACTTTGTAGAGTCAA	4080
WT	ATTCAGGATACATACATGCTACATTATTGTCAAAAGAAAATGCATTATGACTTCATTGG	4140
CO	ATTCGGCTACATCCACGCAACACTCCCTCTCCAAGGAAAATGCATTGTGACCTCCCTCG	4140
WT	CTATTTAGAATGGGCAAGATTGTTTCACCAAAGTCCTTACACACAGATAACGGCACTA	4200
CO	CAATTCTGGAATGGGCCAGGCTGTCTCTCCAATTCCTGCACACCGACAACGGCACCA	4200
WT	ATTTTGTGGCAGAACCAAGTTGTAATTGTTGAAGTTCTAAAGATAAGCACATACCAACAG	4260
CO	ACTTTGTGGCTGAACCTGTGGTGAATCTGCTGAAGTTCTGAAATCGCCCACACCACTG	4260
WT	GAATACCATATCATCCAGAAAGTCAGGGTATTGTAGAAAGGGCAAATAGGACCTTGAAG	4320
CO	GCATTCCTATCACCCCTGAAAGCCAGGGCATTGTCGAGAGGGCAACAGAACCTCTGAAAG	4320
WT	AGAAGATTCAAAGTCATAGAGACAAACACTCAAACACTGGAGGCAGCTTACAACTTGCTC	4380
CO	AAAAGATCCAATCTCACAGAGACAATACACAGACATTGGAGGCCACTTCAGCTCGCC	4380
WT	TCATTACTTGTAAACAAGGGAGGGAAAGTATGGGAGGACAGACACCATGGAAAGTATTAA	4440
CO	TTATCACCTGCAACAAAGGAAGAGAAAGCATGGCGGCCAGACCCCTGGAGGTCTTCA	4440
WT	TCACTAATCAAGCACAAGTAATACATGAGAAAATTTACTACAGCAAGCACAATCCTCCA	4500
CO	TCACTAACCCAGGCCAGGTCACTCATGAAAAGCTGCTCTGAGCAGGCCAGTCCTCCA	4500
WT	AAAAATTGTTTACAAAATCCCTGGTGAACATGATTGAAAGGGACCTACTAGGGTGC	4560
CO	AAAAGTTCTGTTTATAAGATCCCCGGTGAGCAGACTGAAAGGTCTACAAGAGTTT	4560
WT	TGTGGAAGGGTGATGGTGCAGTAGTTAATGATGAAGGAAAGGAATAATTGCTGTAC	4620
CO	TGTGGAAGGAGACGGCGCAGTTGTTGAACGATGAGGGCAAGGGATCATCGCTGTGC	4620
WT	CATTAACCAGGACTAAGTTACTAATAAAACCAAATTGA	4658
CO	CCCTGACACGCACCAAGCTCTCATCAAGCCAACTGA	4658

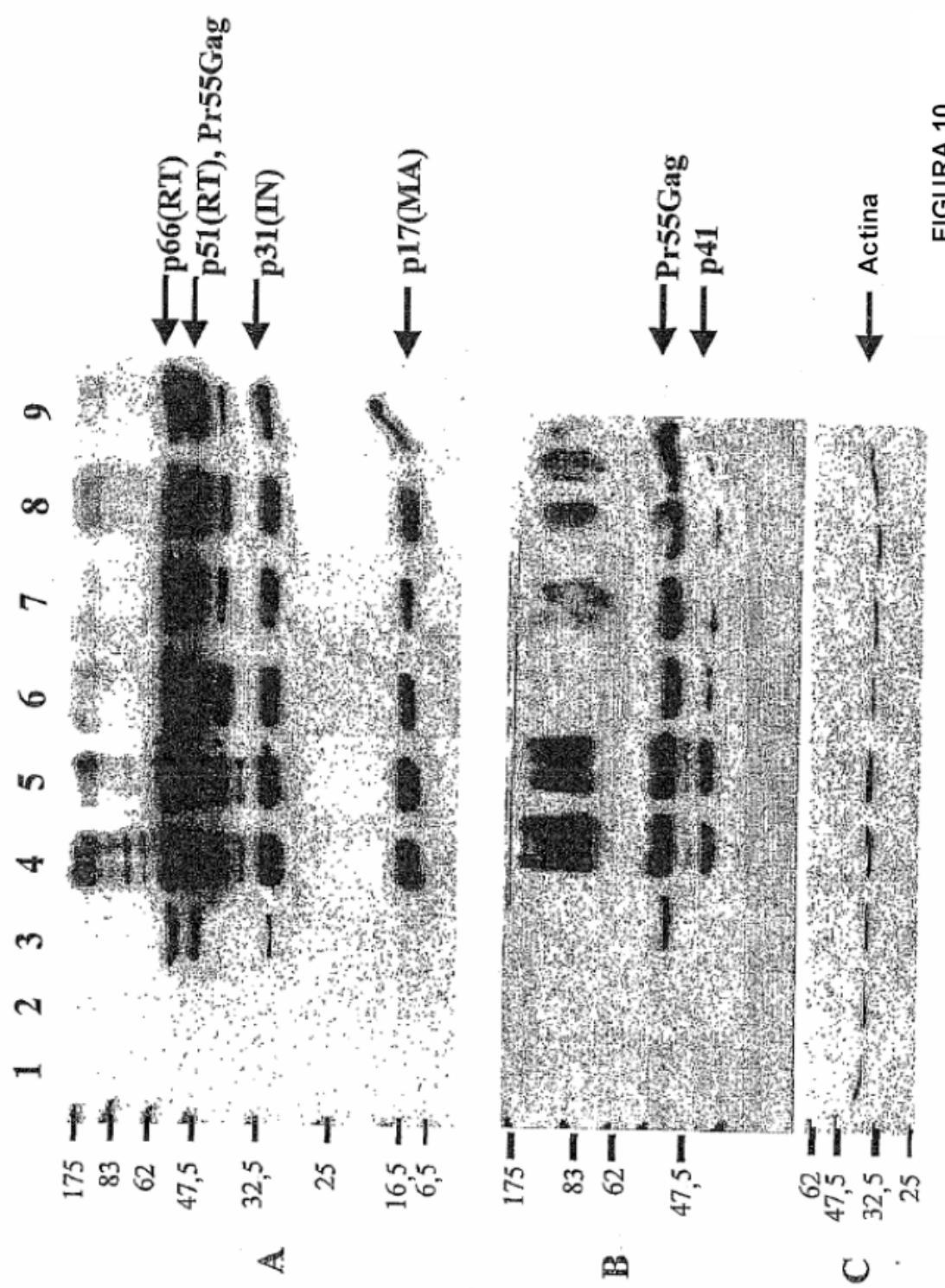


FIGURA 10

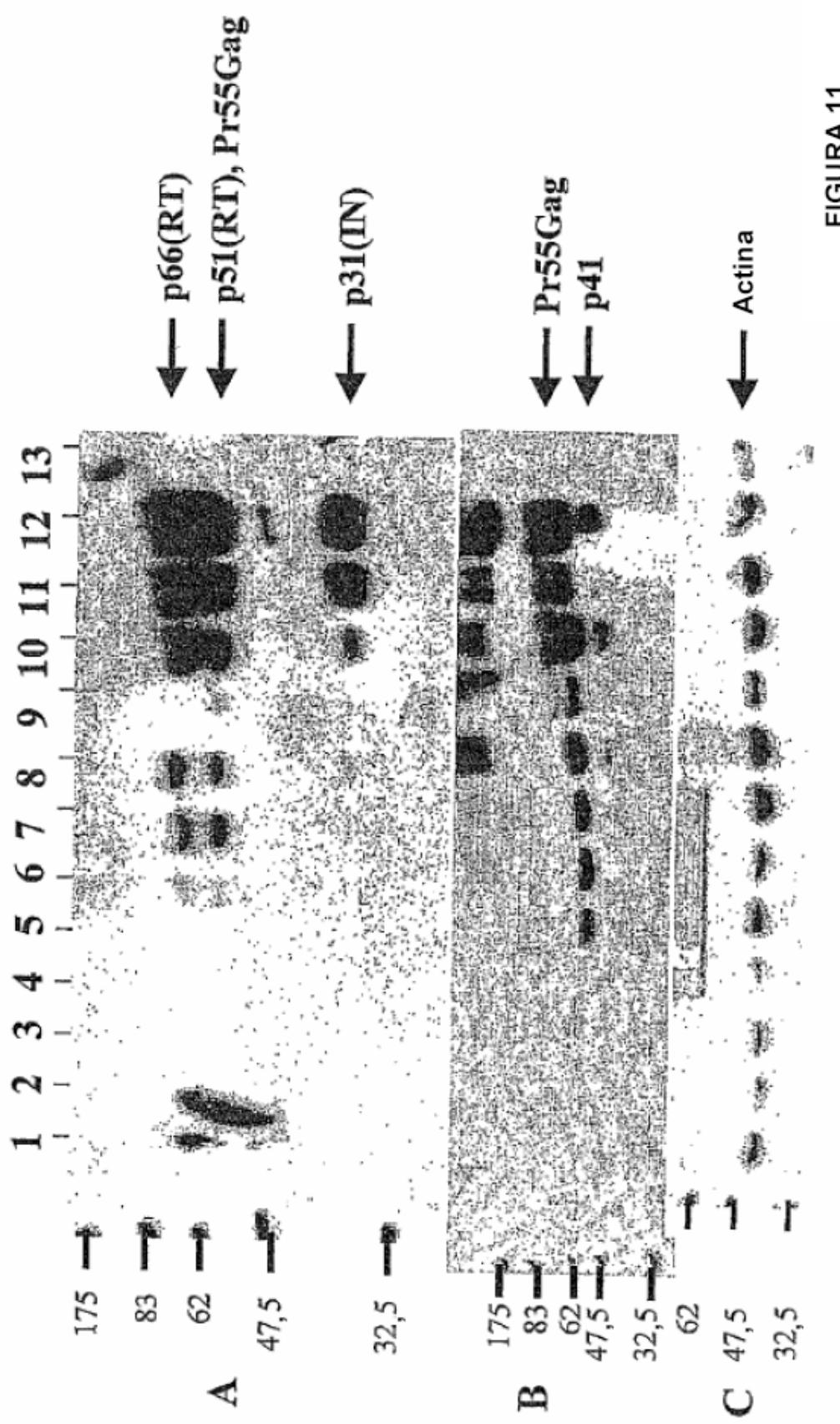


FIGURA 11

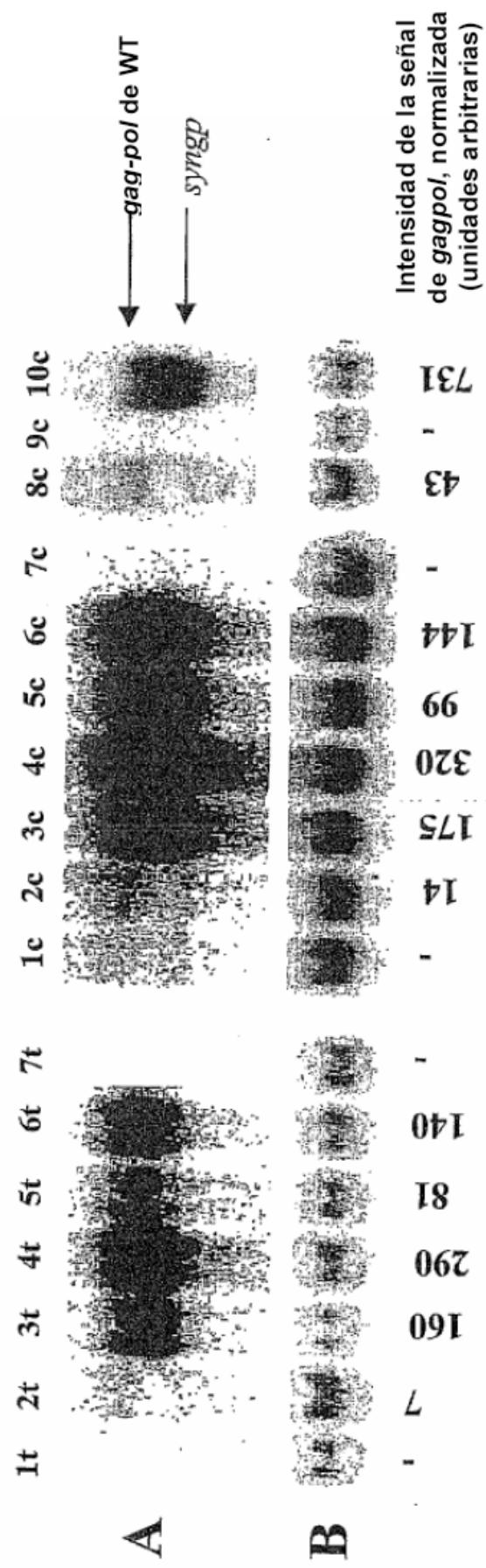


FIGURA 12

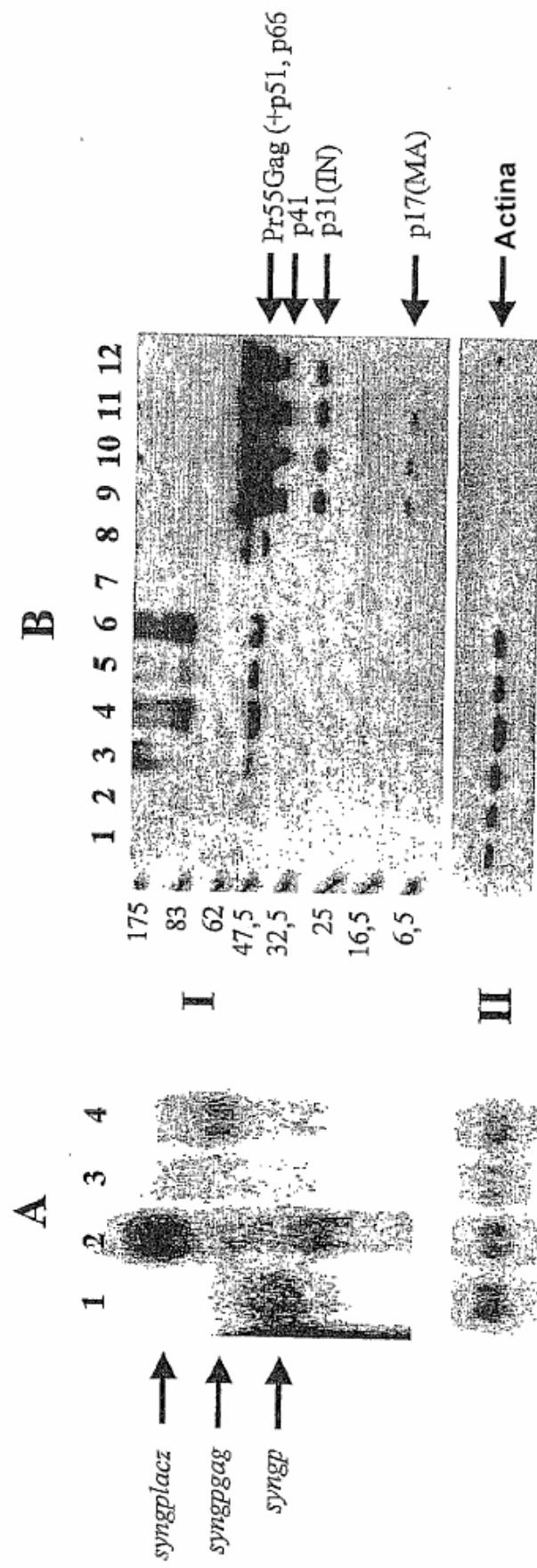


FIGURA 13

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

FIGURA 14

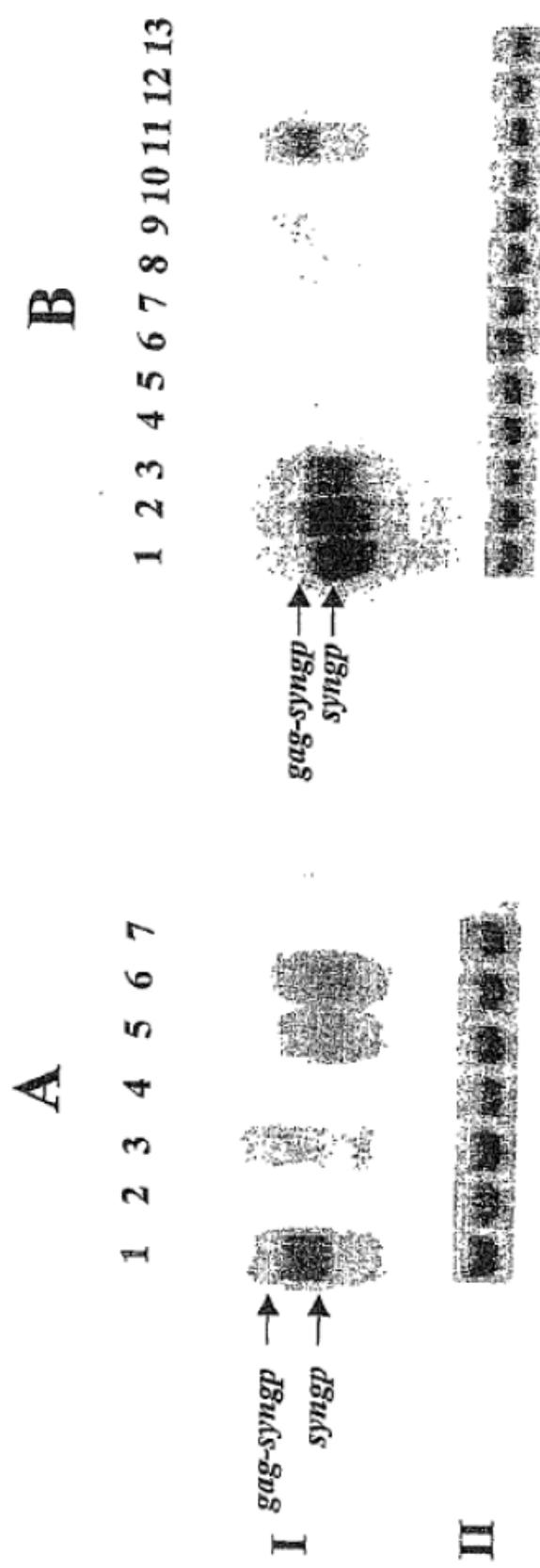


FIGURA 15

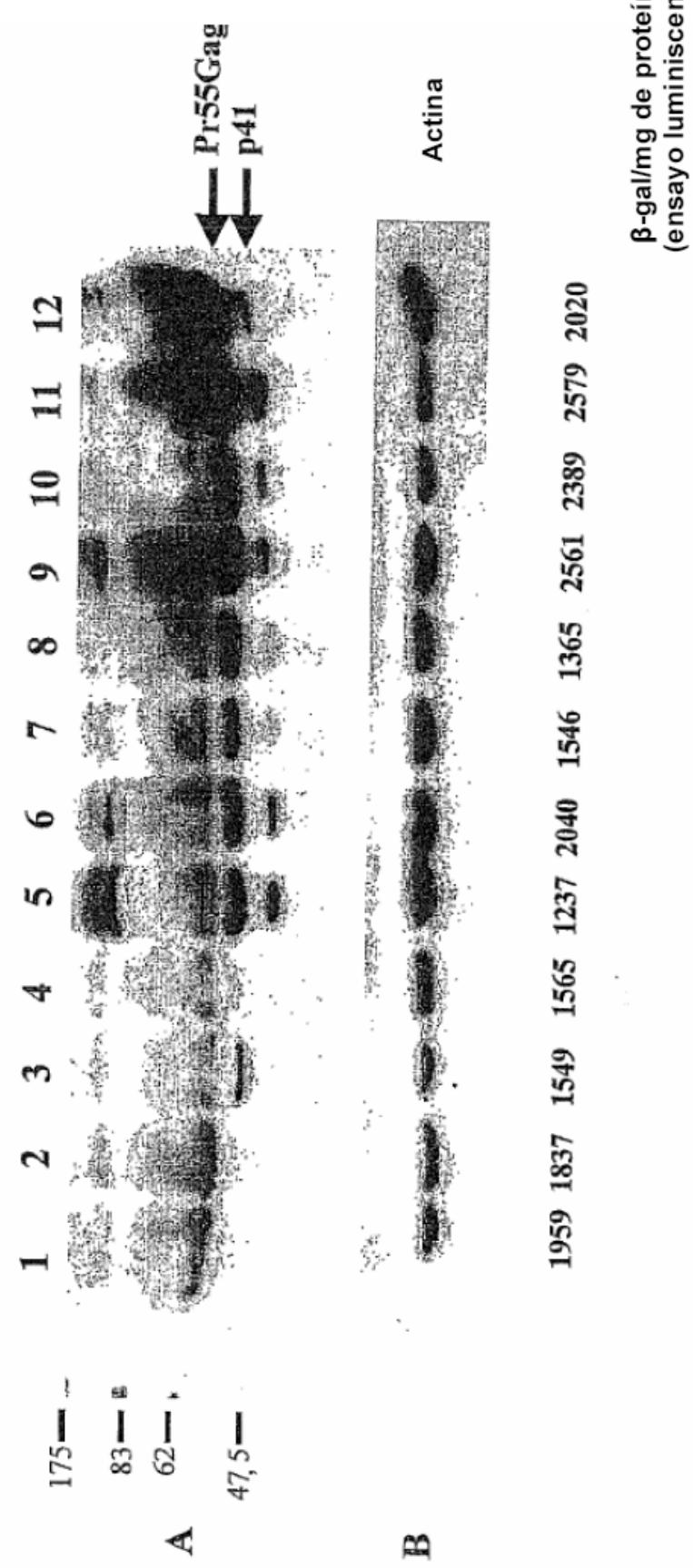


FIGURA 16

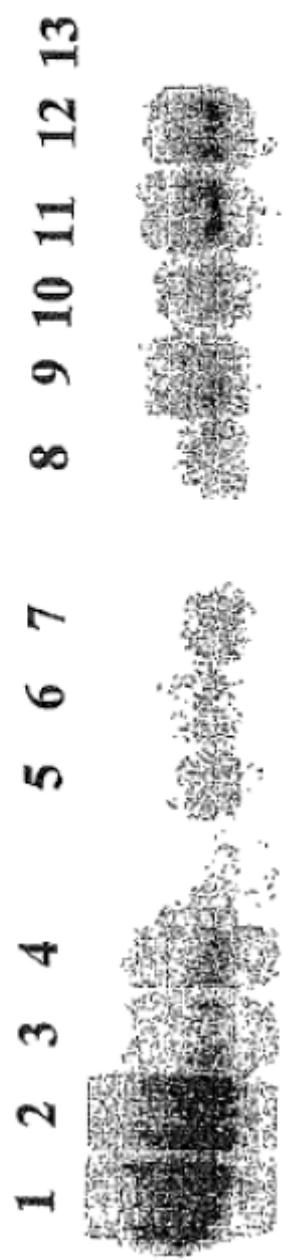
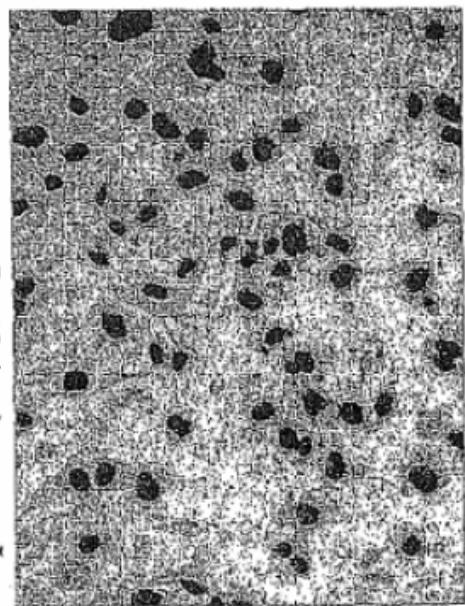
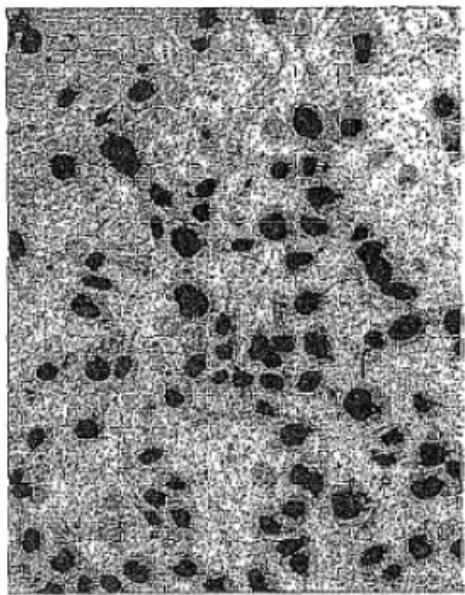


FIGURA 17

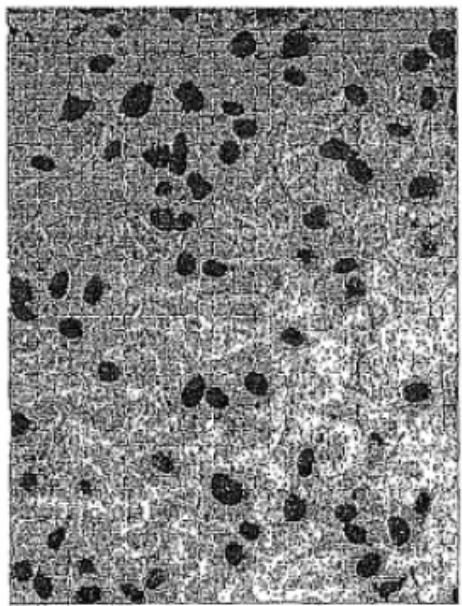
A. pH6nZ (15 µg)+ pSYNNGP (5 µg)



B. pH6nZ (15 µg)+ pSYNNGP (0,5 µg)



C. pH6nZ (15 µg)+ pGPP-RRE3 (5 µg)



D. pH6nZ (15 µg)+ pSYNNGP (0,5 µg)

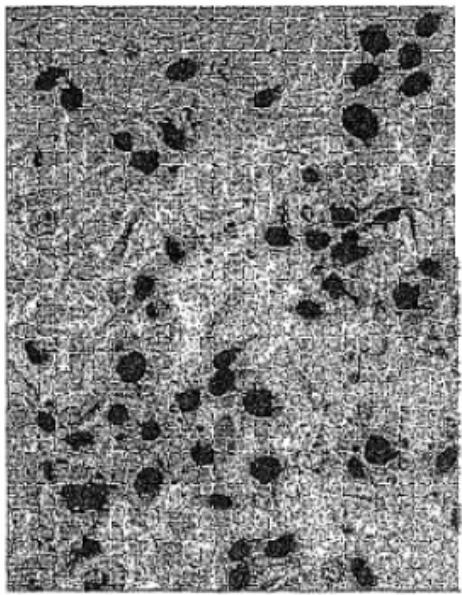


FIGURA 18

FIGURA 19

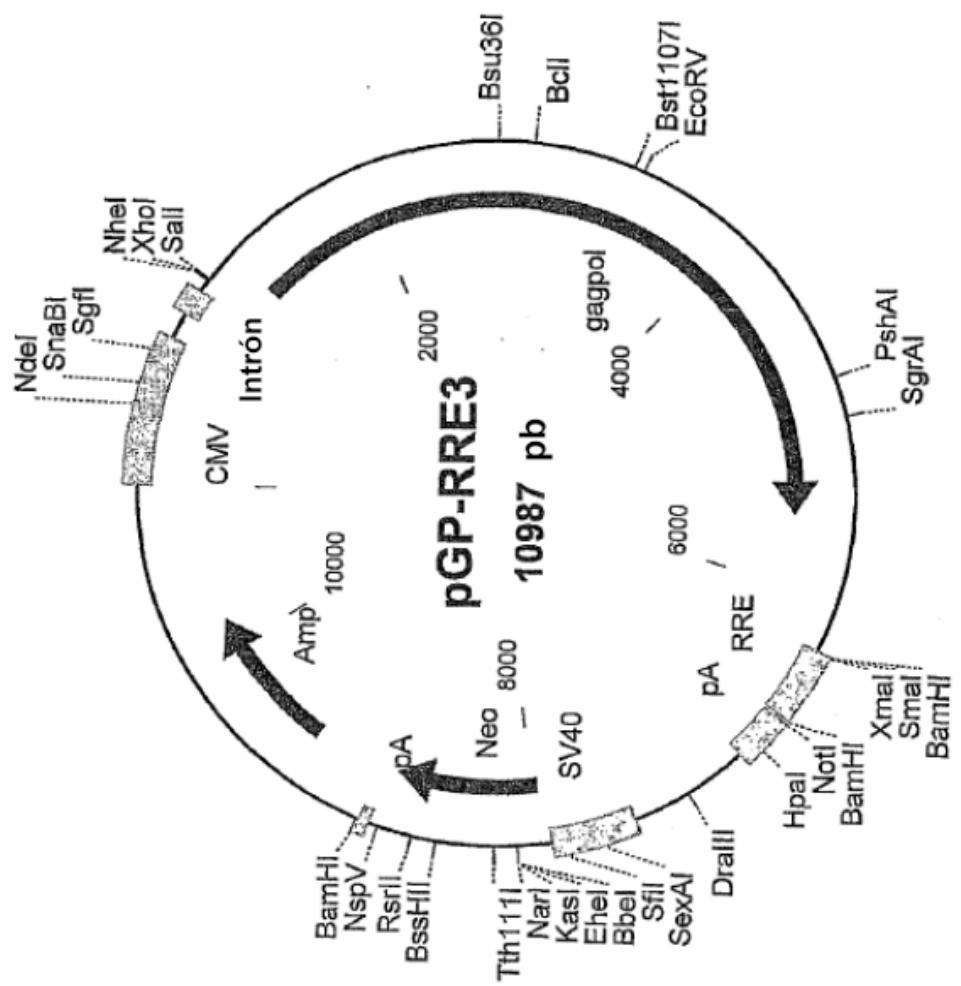


FIGURA 20

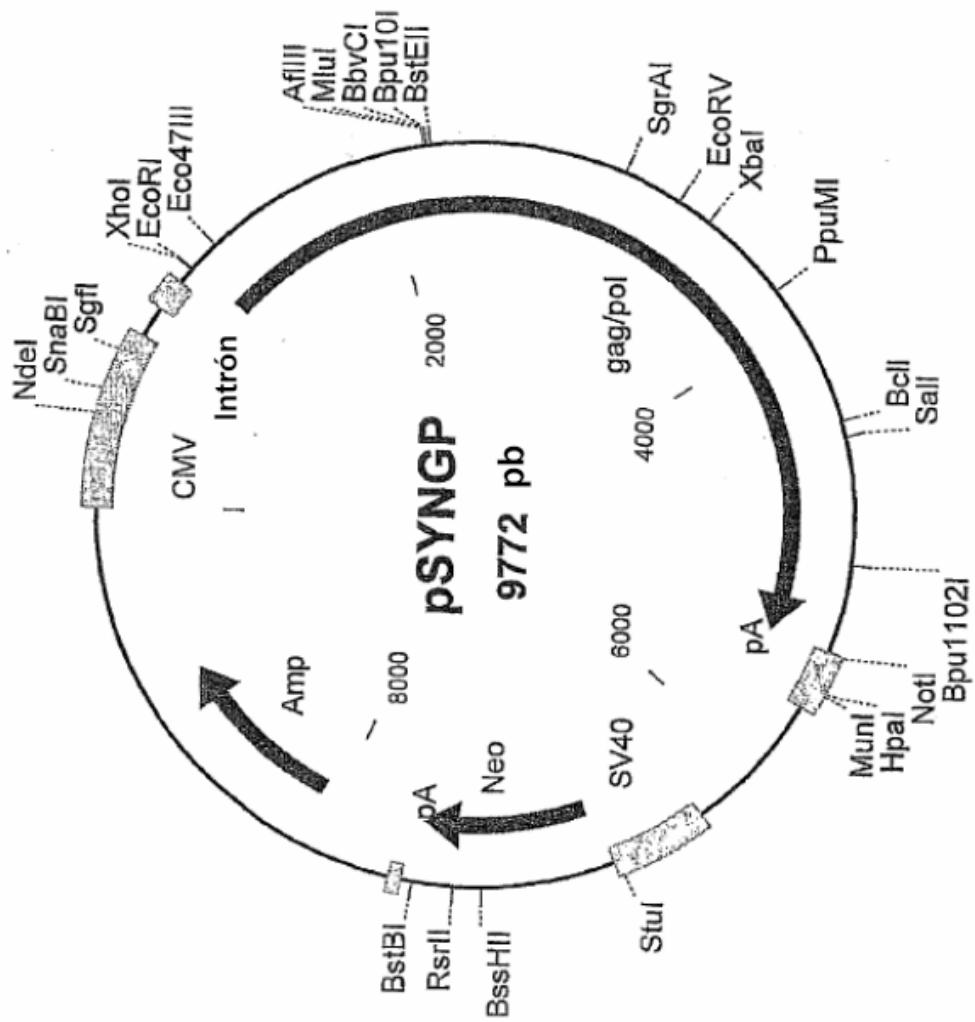


FIGURA 21

Cantidad de pH6nZ (μg)	Proporción de plásmido de expresión de gagpol con respecto a pH6nZ (μg/μg)	Titulo, pGP-RRE3	Titulo, pSYNGP	Titulo, pSYNGP-RRE	Titulo, pSYNGP-ERR
5	1:1	6x10 ⁵	5x10 ⁵	4x10 ⁵	3x10 ⁵
12,5	1:2,5	8x10 ⁵	6,5x10 ⁵		
10	1:10	3x10 ⁵	4x10 ⁵		
5	1:20	3,5x10 ⁵	2,5x10 ⁵		
12,5	1:50	3,5x10 ⁴	3x10 ⁵	3x10 ⁵	3x10 ⁵
18	1:180	2,5x10 ⁴	3x10 ⁵		

FIGURA 22

Vector de expresión	Genoma del vector de <i>gag-pol</i>	Expresión de Rev	Título (U/l/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 PCM V-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 PCM V-Rev	5,6±0,3 x 10 ⁴
pSYN GP	pH6nZ	Sí / de pH6Z	7,8±0,2 x 10 ⁵
pSYN GP	pH6.1nZ	No	5,4±0,3 x 10 ⁴
pSYN GP	pH6.1nZ	Sí / de PCM V-Rev	5,2±0,4 x 10 ⁴
pSYN GP	pH6.2nZ	No	5,0±0,2 x 10 ⁴
pSYN GP	pH6.2nZ	Sí / de PCM V-Rev	5,5±0,3 x 10 ⁴

FIGURA 23

Genoma del vector	Longitud de <i>gag</i> (nt)	Mutación SD	pSYNGP	pGPP-RRE3	pGPP-RRE + Rev *
pH6nZ	625	No	6,7±0,7 x 10 ⁵	No realizado	No realizado
pH6.1nZ	625	No	3,2±0,1 x 10 ⁴	No realizado	No realizado
pH6.2nZ	527	No	2,7±0,3 x 10 ⁴	No realizado	No realizado
pHS1nZ	40	No	2,1±0,4 x 10 ⁴	2,1±0,9 x 10 ³	1,4±0,3 x 10 ⁴
pHS2nZ	260	No	1,5±0,3 x 10 ⁴	4,2±0,6 x 10 ³	3,0±0,5 x 10 ⁴
pHS3nZ	360	No	1,3±0,3 x 10 ⁵	6,5±0,7 x 10 ³	1,7±0,4 x 10 ⁵
pHS4nZ	625	No	1,0±0,9 x 10 ⁴	1,2±0,7 x 10 ³	1,0±0,3 x 10 ⁴
pHS5nZ	40	Si	2,0±0,5 x 10 ⁴	6,0±0,8 x 10 ²	2,3±0,5 x 10 ⁴
pHS6nZ	260	Si	1,0±0,2 x 10 ⁴	8,1±0,6 x 10 ²	1,0±0,4 x 10 ⁴
pHS7nZ	360	Si	1,9± x 10 ⁴	2,4±0,9 x 10 ³	4,2±0,8 x 10 ⁴
pHS8nZ	625		8,0±1,0 x 10 ³	1,0±0,5 x 10 ³	4,0±0,9 x 10 ³

FIGURA 24

Genoma del vector	pSYNGP	PSYNGP + Rev *
pH6nZ	6,5 x 10 ⁵	6,9 x 10 ⁵
pH6.1nZ	1,5 x 10 ⁴	1,7 x 10 ⁴
pH6.1nZR	2,3 x 10 ³	1,6 x 10 ⁵
pHS1,nZ	8,5 x 10 ³	8,4 x 10 ³
pHS1nZR	8,1 x 10 ³	8,8 x 10 ⁴
pHS3nZ	1,2 x 10 ⁵	1,4 x 10 ⁵
pHS3nZR	2,5 x 10 ³	4,8 x 10 ⁵
pHS7nZ	7,3 x 10 ³	7,0 x 10 ³
pHS7nZR	3,4 x 10 ³	5,8 x 10 ³

FIGURA 25

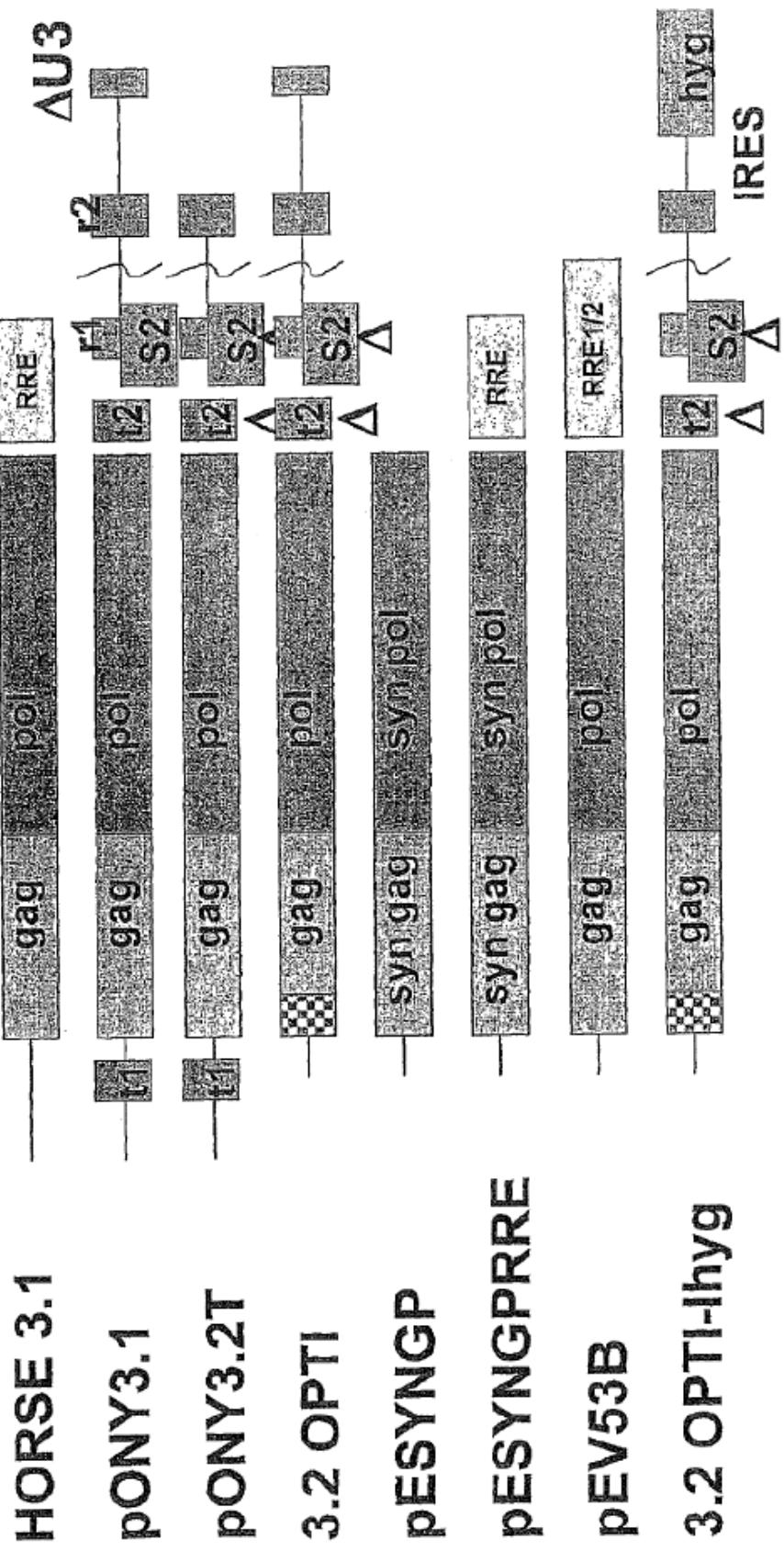


FIGURA 26 Transferencia Western de extractos de 293T

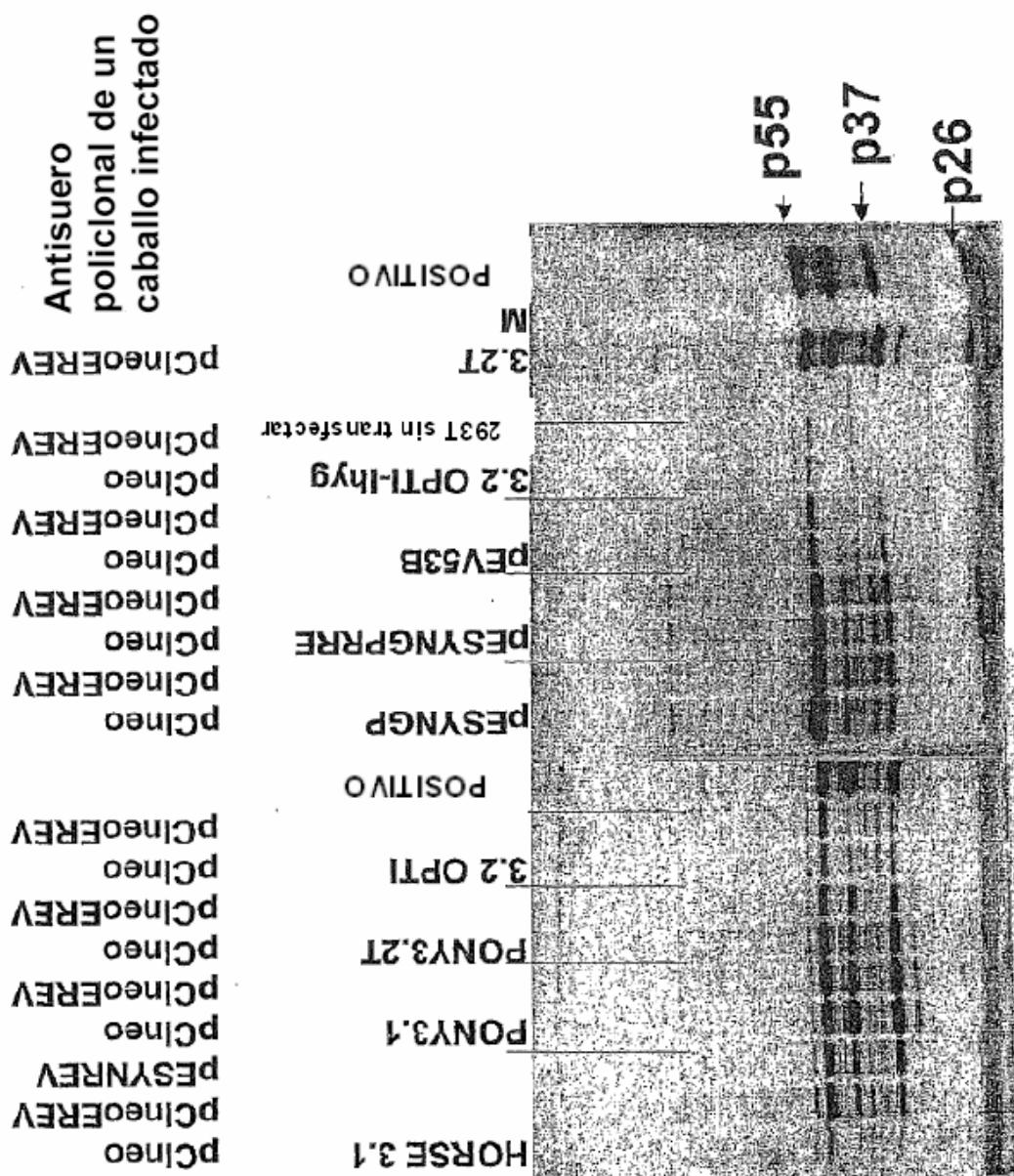


FIGURA 27

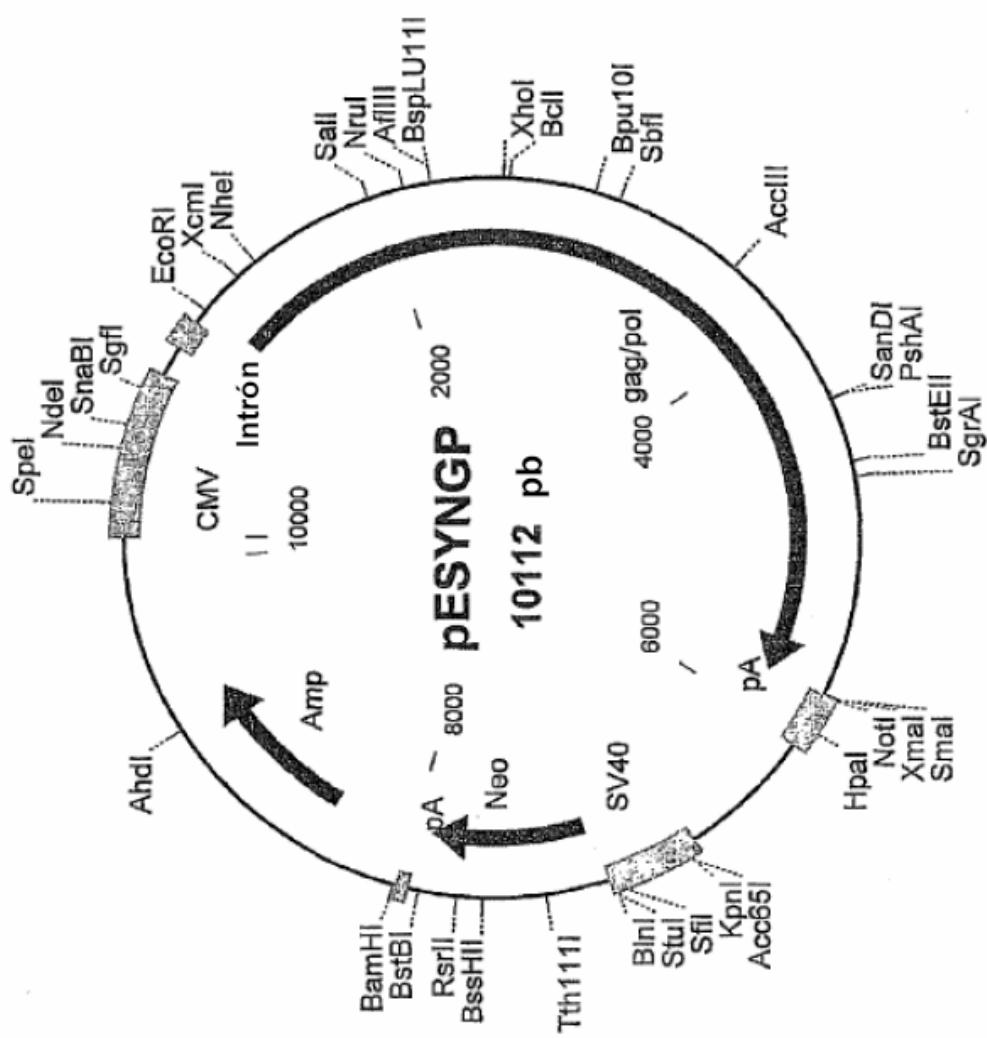


FIGURA 28

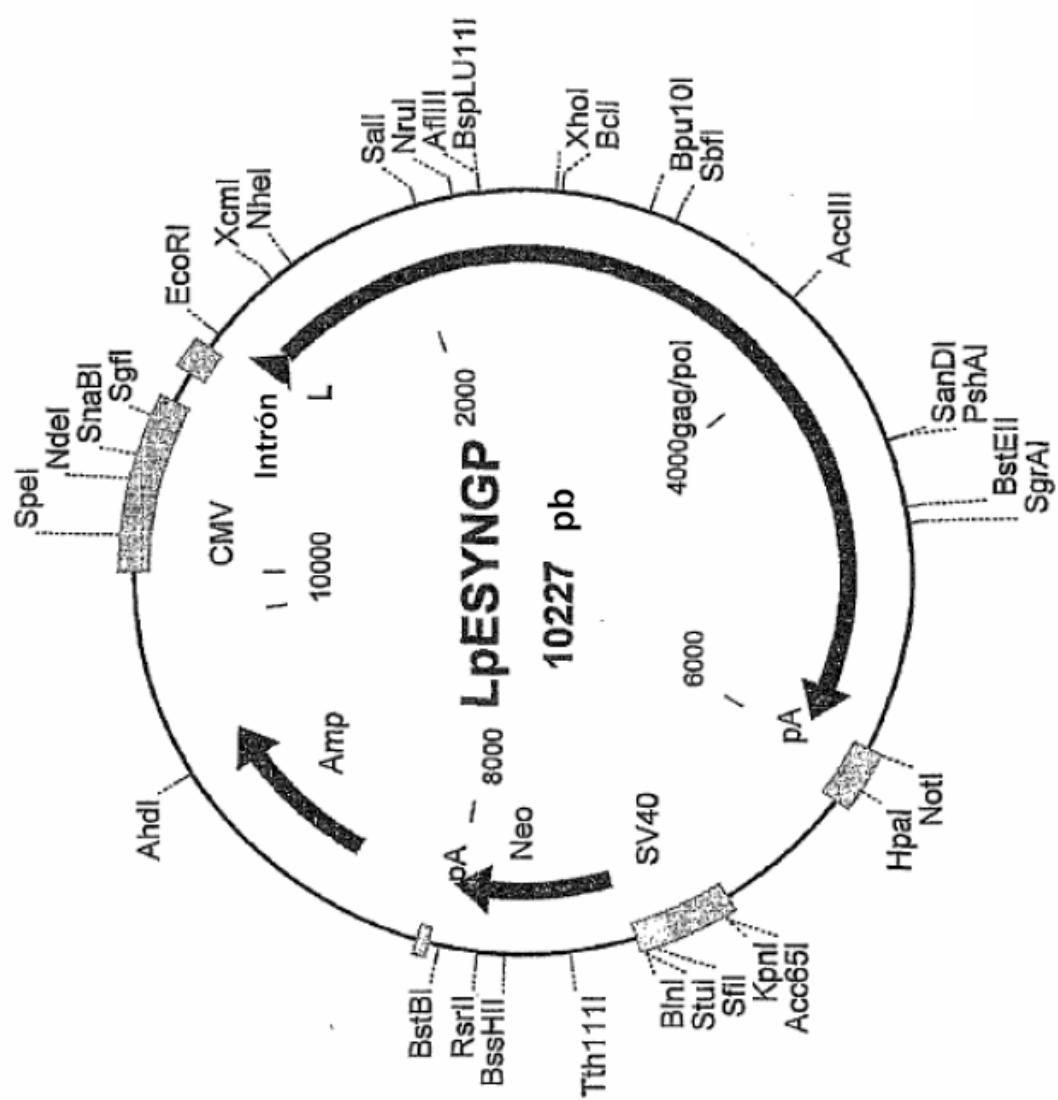


FIGURA 29

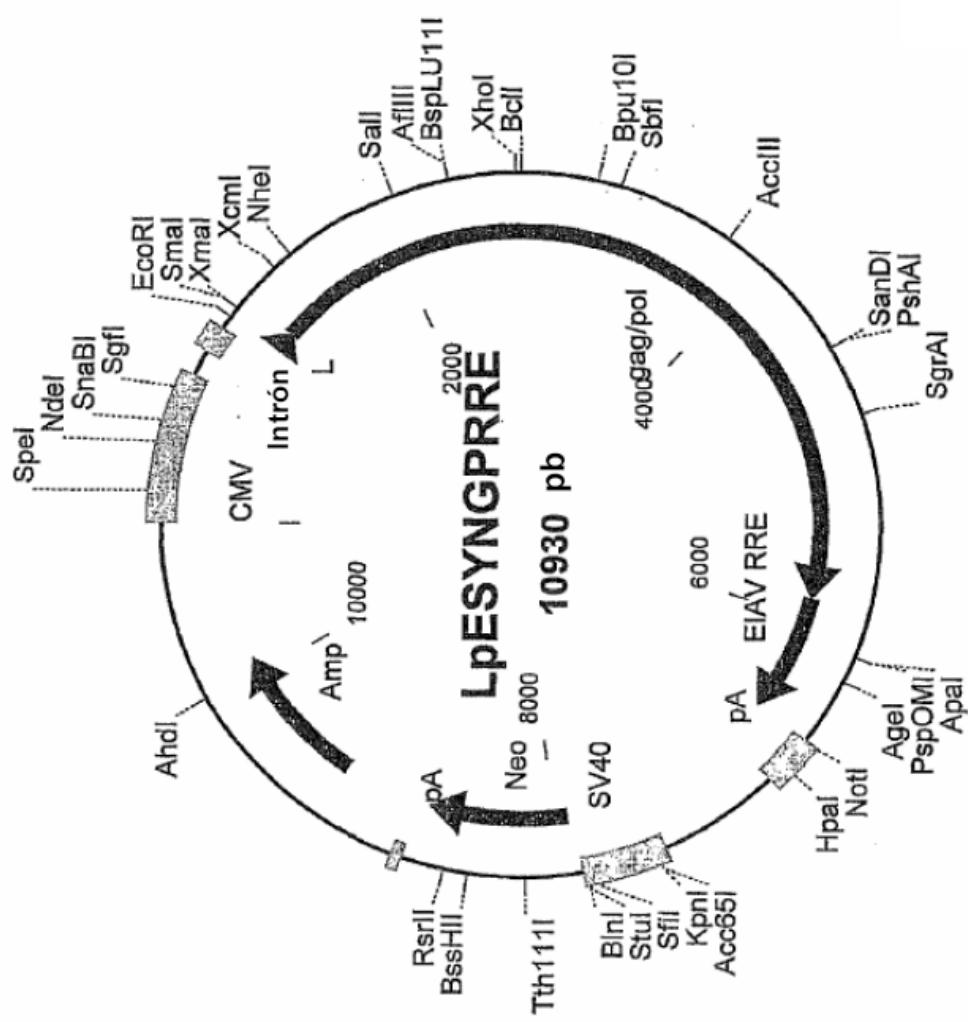


FIGURA 30

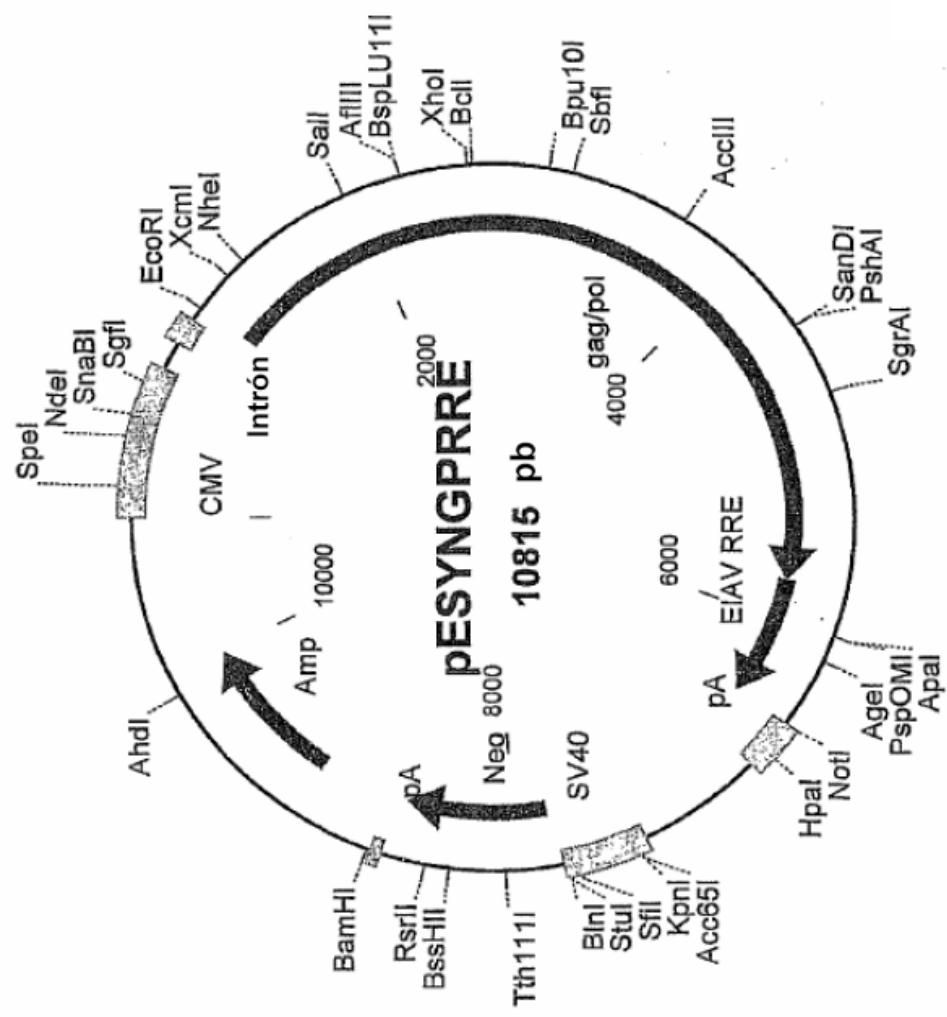


FIGURA 31

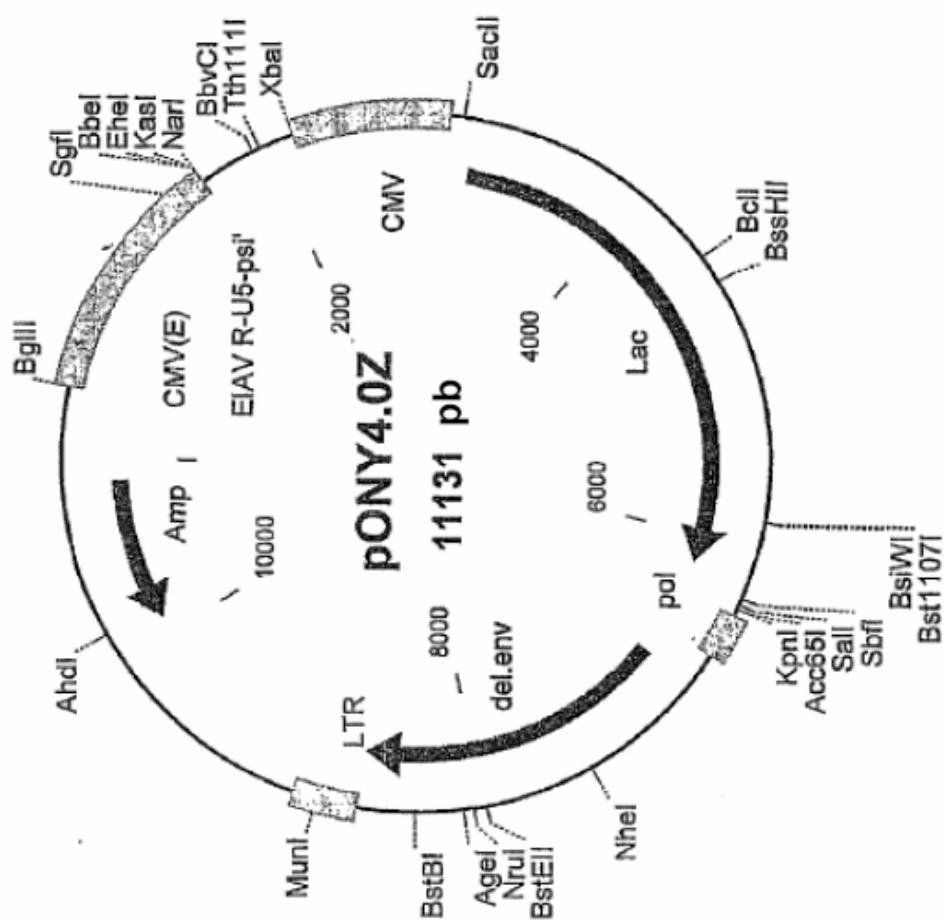
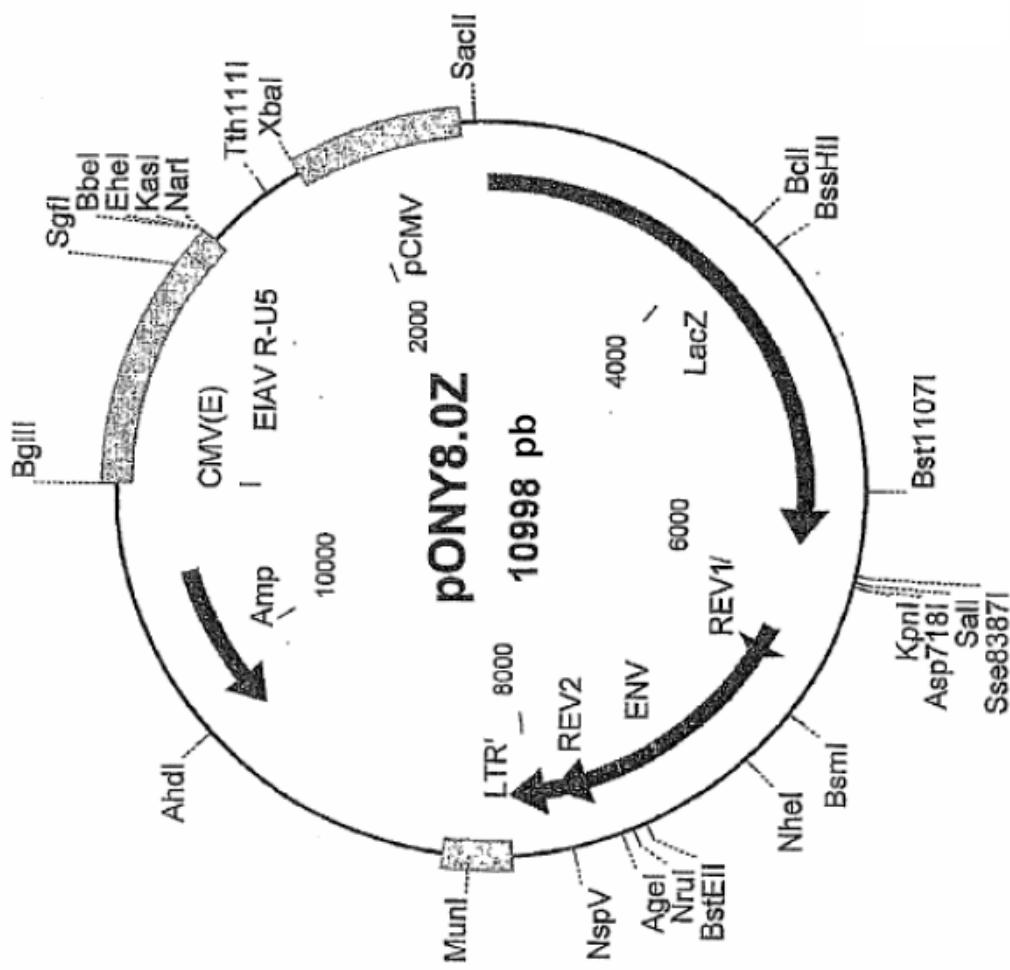


FIGURA 32



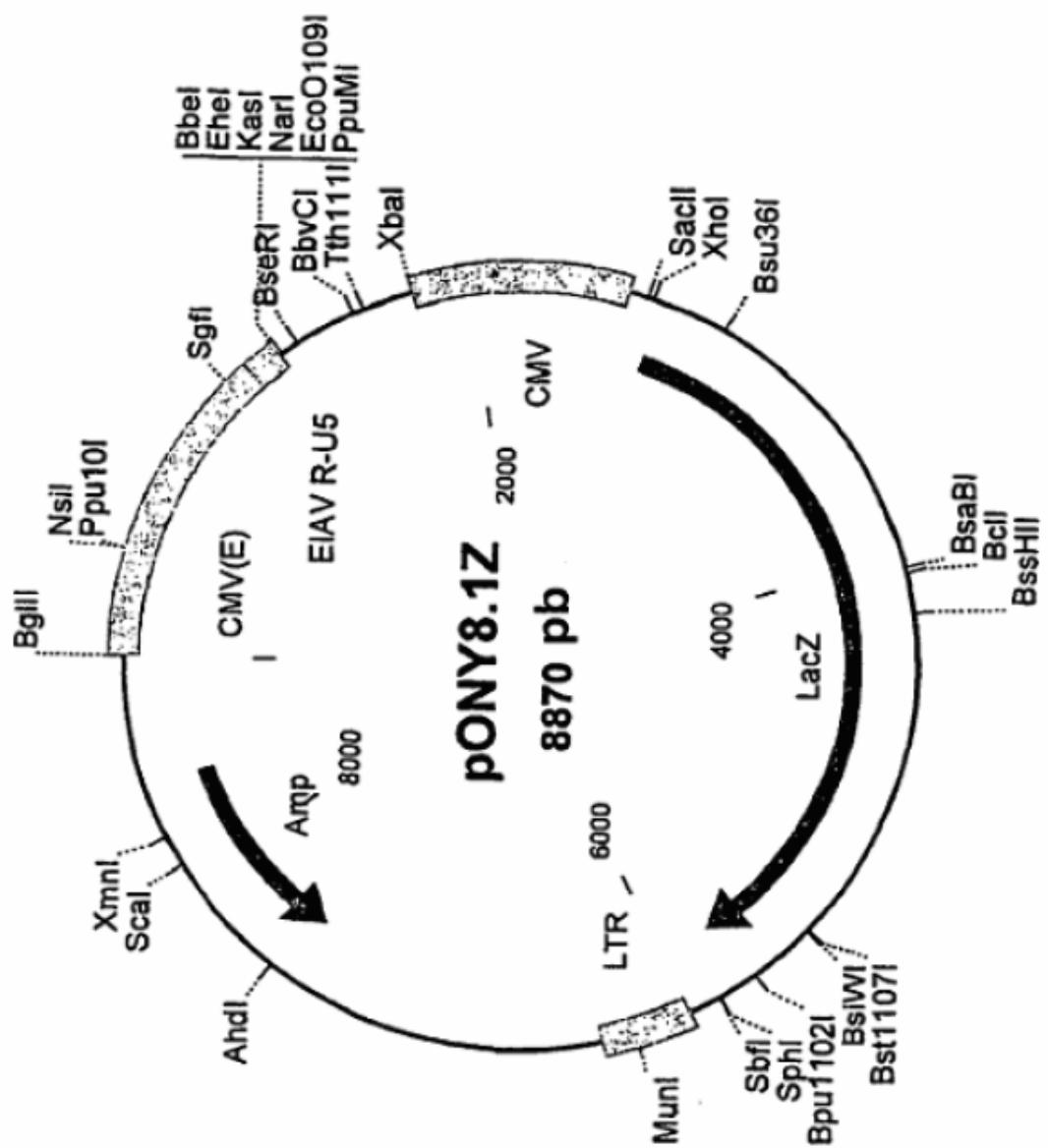


FIGURA 33

FIGURA 34

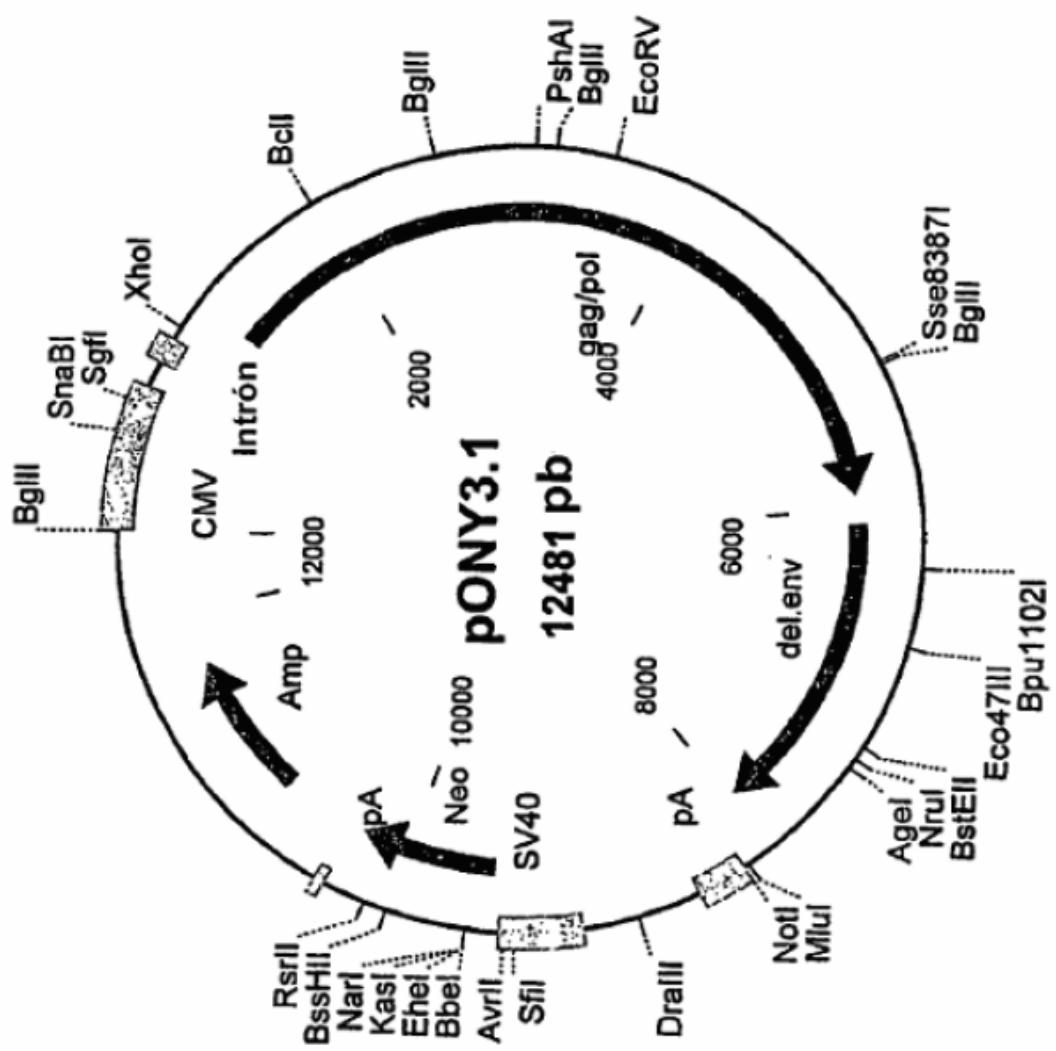


FIGURA 35

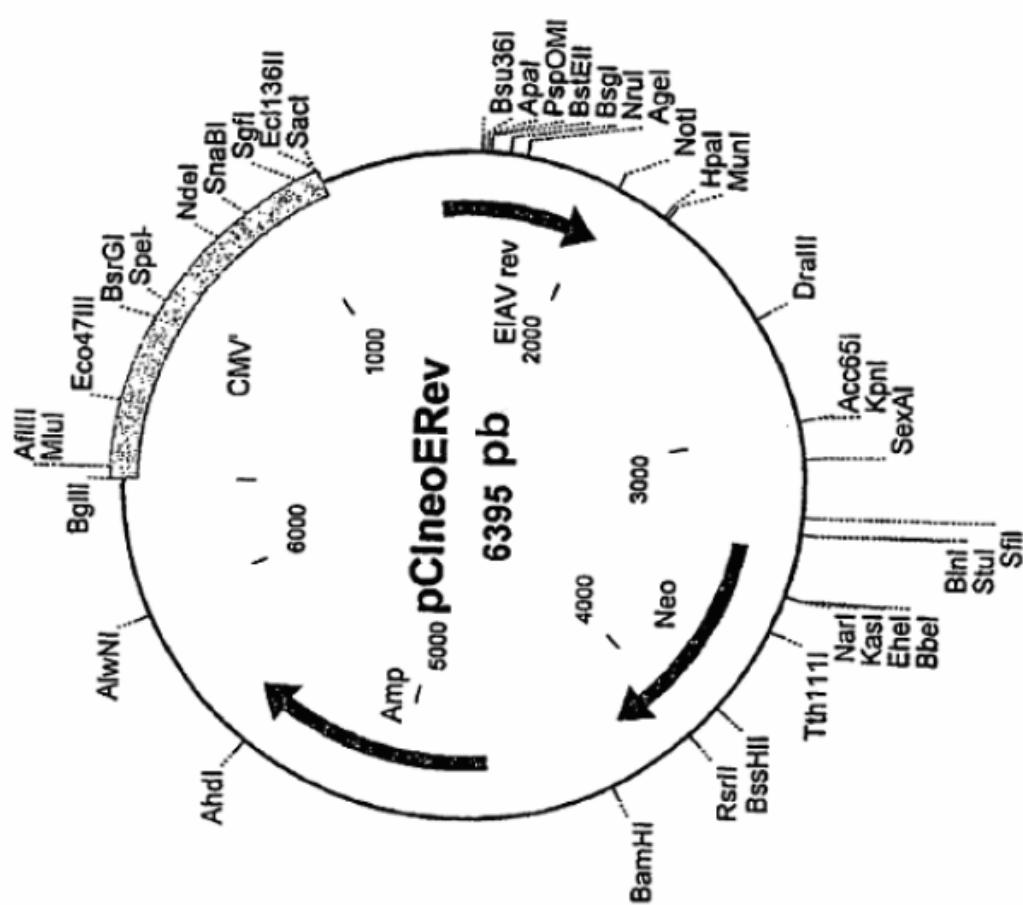
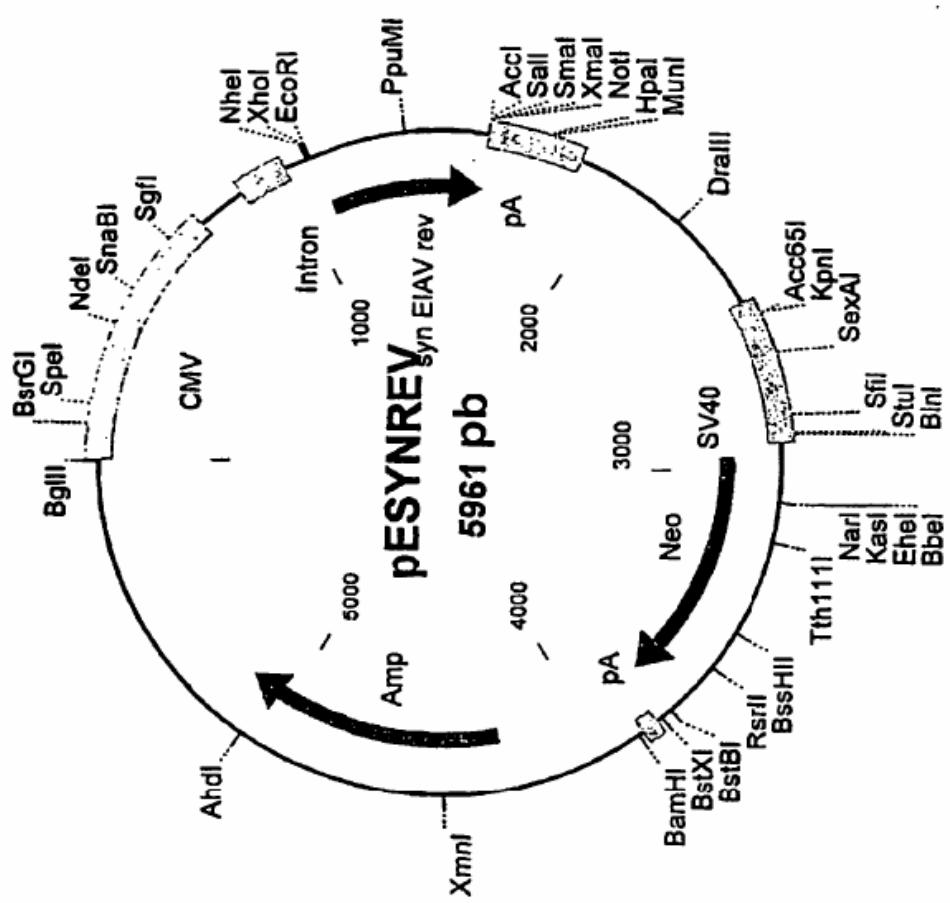


FIGURA 36



	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	pClneo	8,80E+04	1,26E+05	1,07E+05
pHORSE3.1	pONY4.0Z	pClneoREV	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	pClneo	4,00E+04	3,40E+04	2,93E+04
pESYNGP	pONY8.0Z	pClneoREV	6,40E+04	8,20E+04	6,47E+04
pHORSE3.1	pONY8.0Z	pClneo	2,00E+03	2,00E+03	2,00E+03
pHORSE3.1	pONY8.0Z	pClneoREV	1,80E+05	2,48E+05	2,14E+05

FIGURA 38

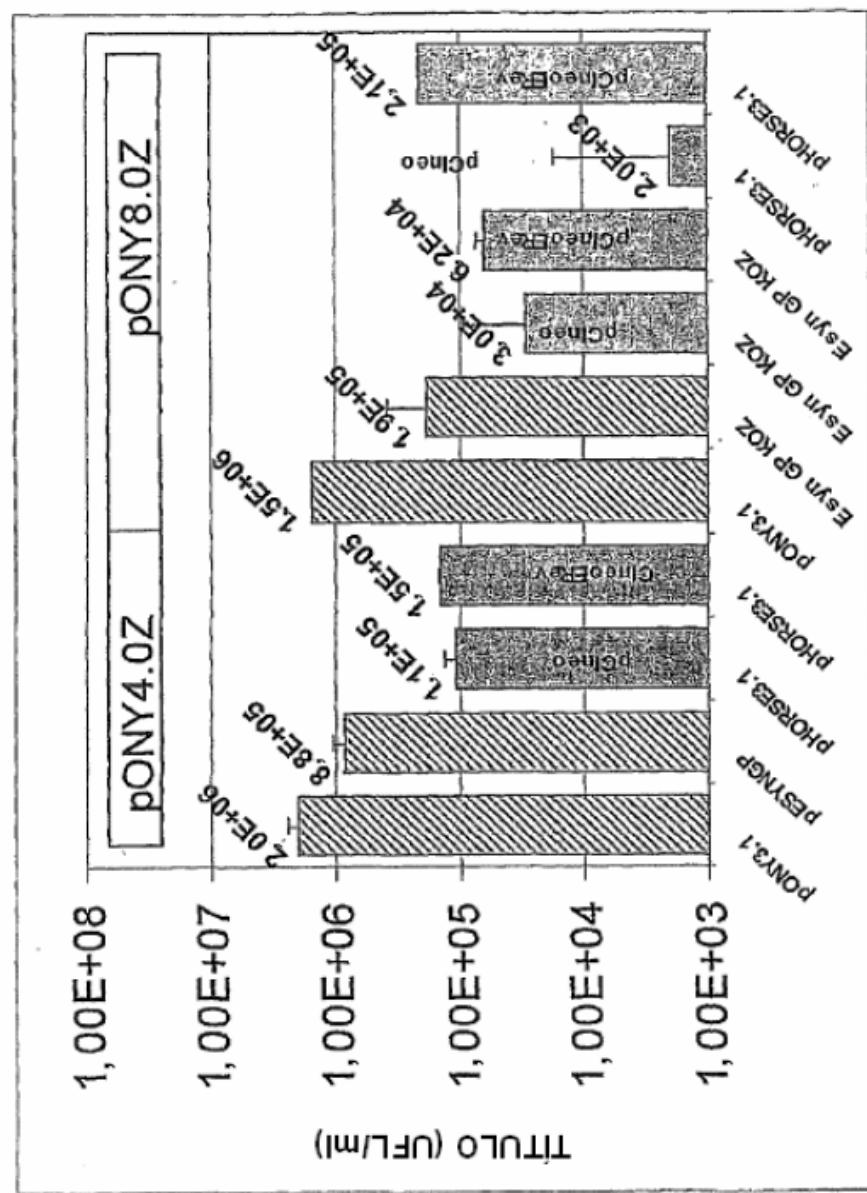


FIGURA 39

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

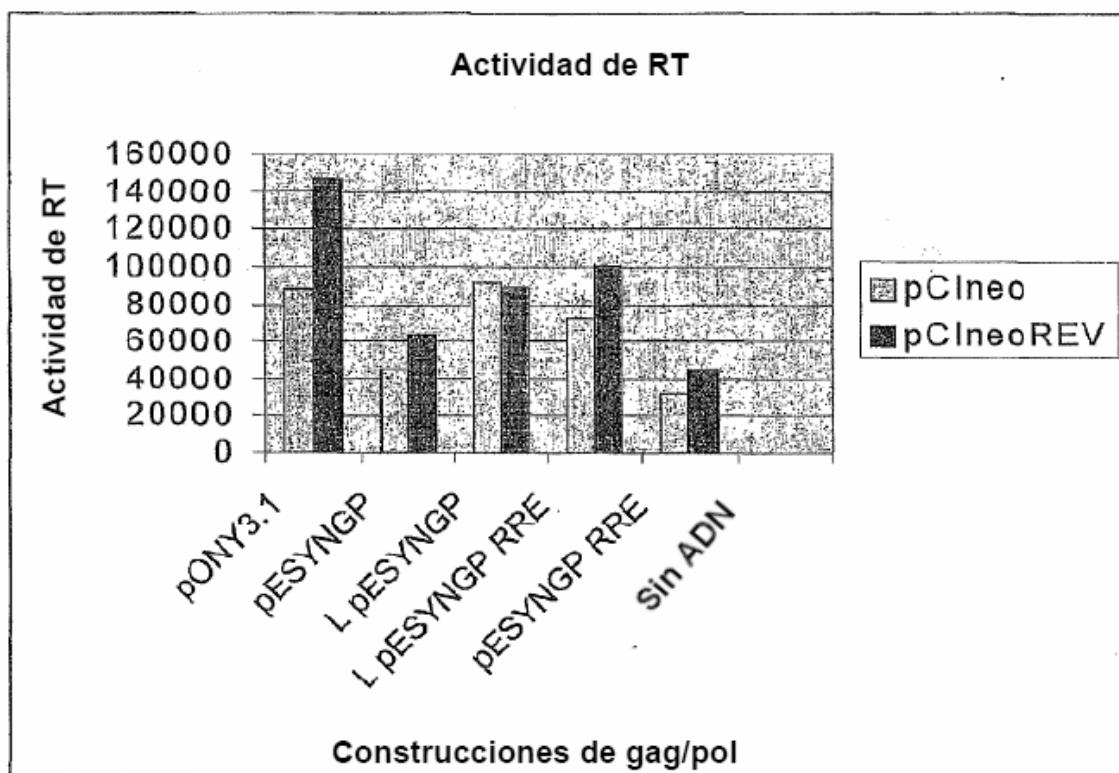


FIGURA 41

VECTOR	GAG/POL	OTRO	Título/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)

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

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

 catgataccaaactttgtaaaaggaaaggactggcagctgaggatgtcattccattgtcg
 ..c..c..t..t..c..t..g..g..a..t..a..a..c..a..c..g..c..cc..ct..

 gaagatgttaactcagacgctgtcaggacaagaaggaggccctttgaaagaacatggtgg
 ..g..c..g..c..a..at..t..g..g..g..gc..c..a..t..c..gc..c..c.....

 gcaattttctgttaaagatggcctccaggatataatgttagatgaaaggcatca
 ..c..cagc..a..c..a.....g..g..a..c..c..c..c..g..t..a..tagc

 ttccagctctaaggcgaaattatgaaaaggactgtctaataaaaaggcagtcgtggcc
 ..t..a..g..cc..c..t..g..c..g..a..a..c..c..c..c..g..a..a..c..a..t

 tctgaaagaatataatccaaatcatgatag
 agc..g..g..g..c.....

FIGURA 44

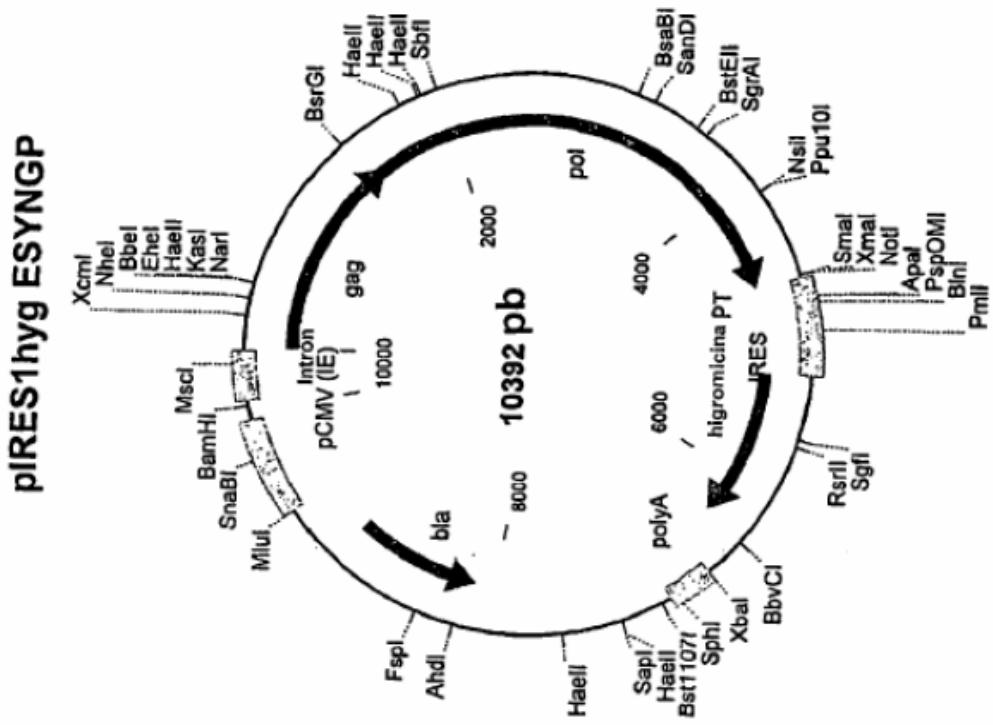


FIGURA 45

Línea celular	Valor de Ct	Ct línea celular - Ct ₁ 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 (μ g)/placa de 10 cm de diámetro	Título en células D17 (unidades formadoras de LacZ/ml)					
	1 ^a cosecha			2 ^a cosecha		
numero de transfacción	PESYNGP	PONY8.3G	PONY8.0Z	PESYNREV	PRV67	PCineo
1	16 μ g	16	8	1,4 $\times 10^5$	1,6 $\times 10^5$	
2	16	16	8	1,4 $\times 10^5$	1,6 $\times 10^6$	
3	16	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	2,4 $\times 10^5$	2,8 $\times 10^5$	
6		32	8	4,5 $\times 10^5$	1,1 $\times 10^6$	

FIGURA 47

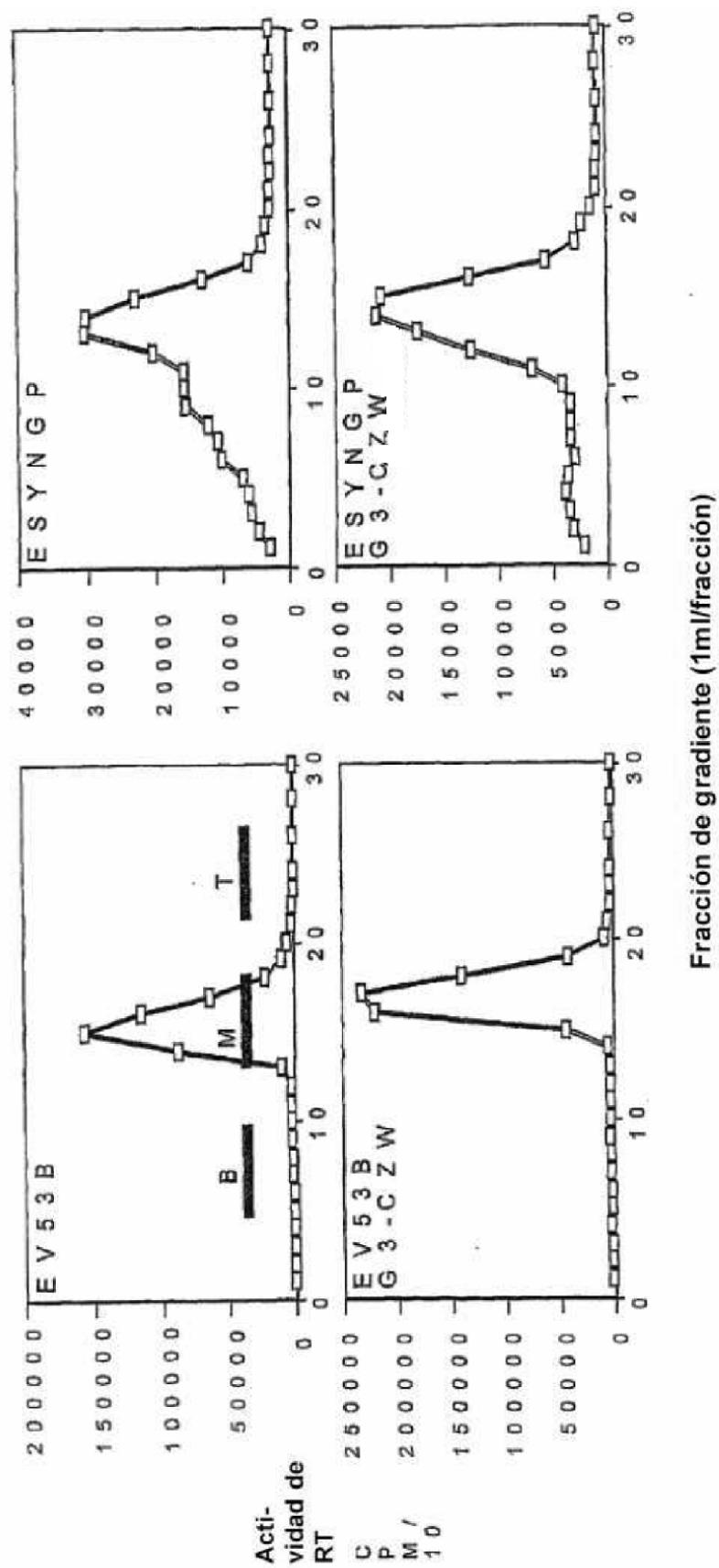
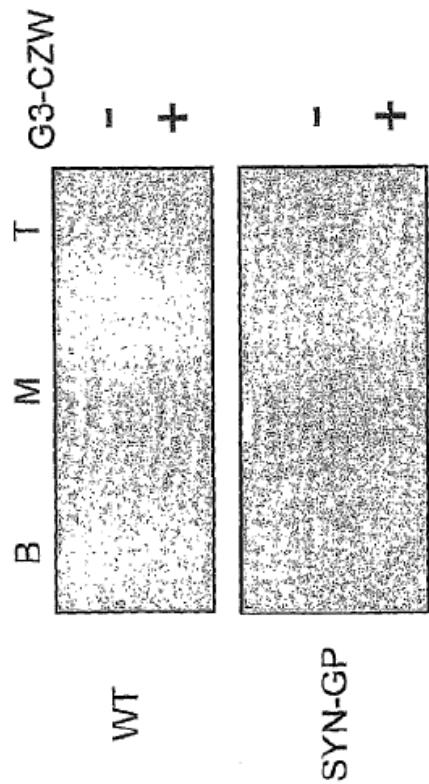


FIGURA 48

SONDA DE GAG-POL



SONDA DE LACZ

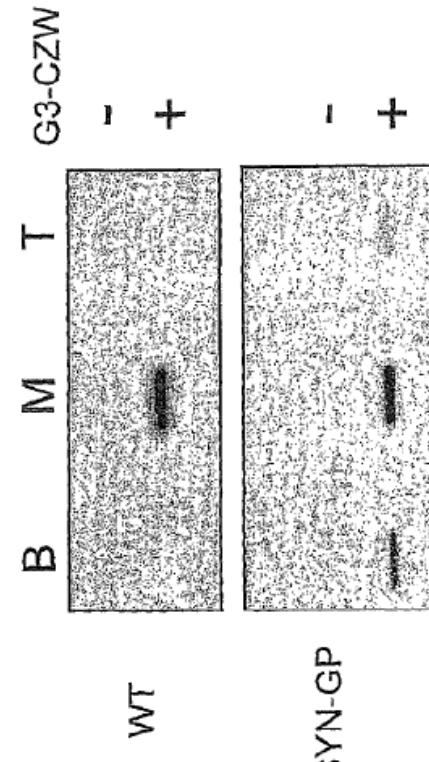


FIGURA 49

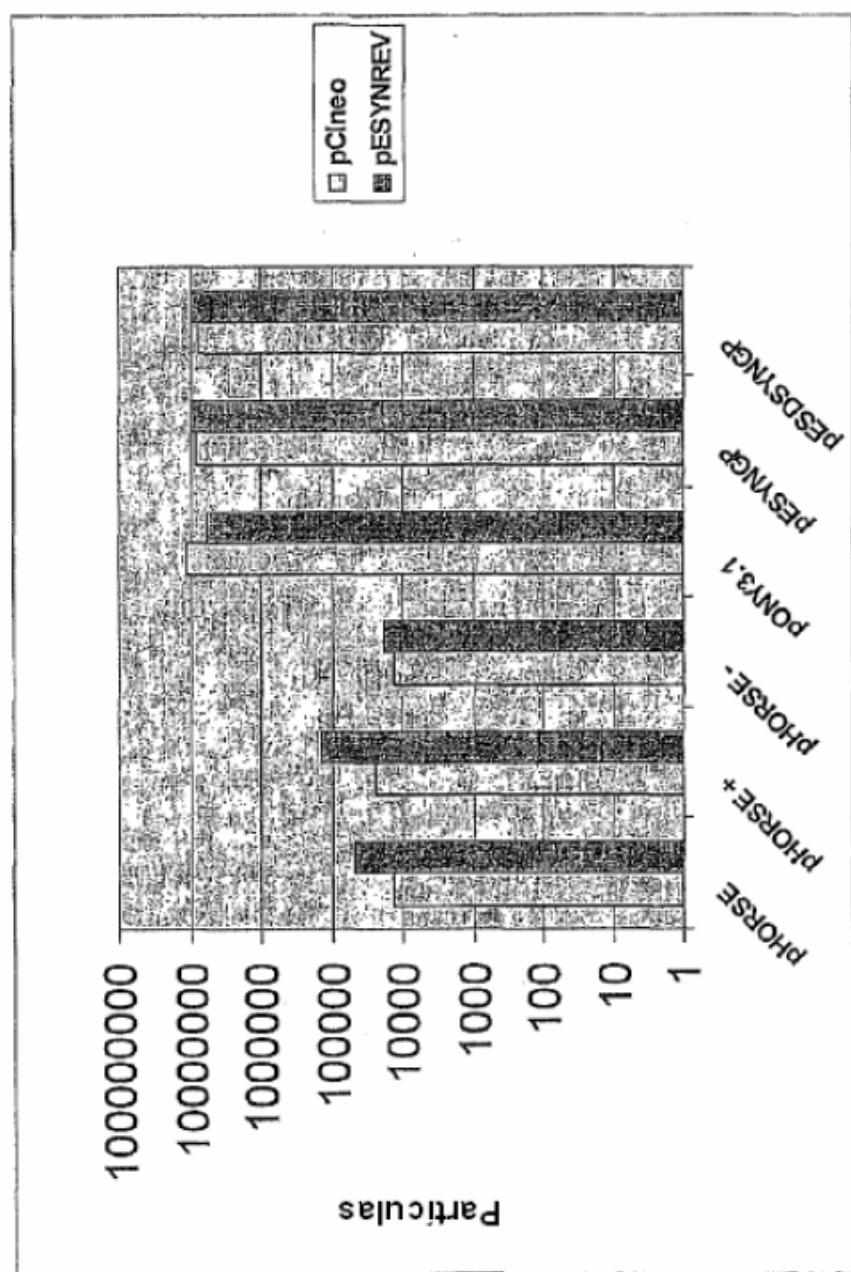


FIGURA 50

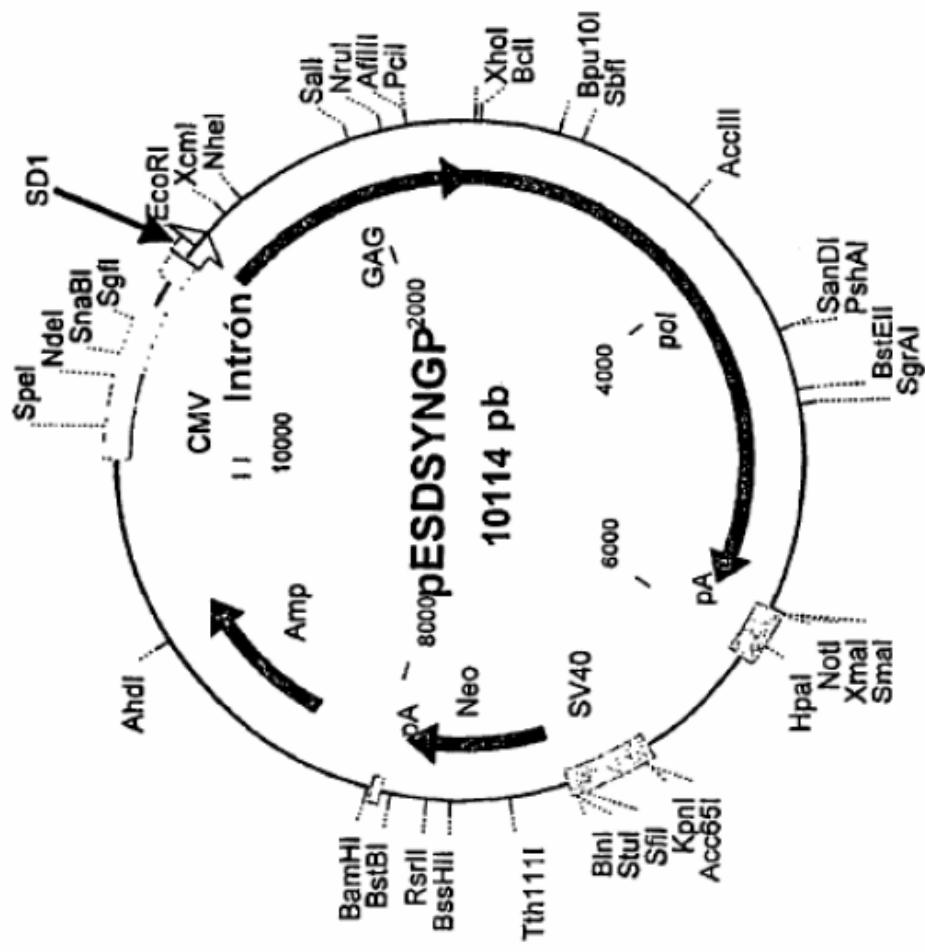


FIGURA 51

