



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 328 685**

51 Int. Cl.:

C07K 14/16 (2006.01)

A61K 39/21 (2006.01)

C12N 15/48 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03778306 .5**

96 Fecha de presentación : **03.11.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1558635**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.08.2005**

54 Título: **Vacuna.**

30 Prioridad: **05.11.2002 GB 0225786**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.11.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.11.2009

73 Titular/es: **GLAXO GROUP LIMITED**
Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue
Greenford, Middlesex UB6 0NN, GB

72 Inventor/es: **Ertl, Peter, Franz**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

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

DESCRIPCIÓN

Vacuna.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a construcciones de ácidos nucleicos, a vectores que comprenden dichas construcciones, a procedimientos de preparación de los vectores y las construcciones y a su uso en la profilaxis o terapia, en particular a vacunas terapéuticas. La invención se refiere además a células huésped que comprenden las construcciones y vectores y a proteínas de fusión codificadas por las construcciones así como a las propias proteínas de fusión. La invención se refiere además a formulaciones farmacéuticas que comprenden las construcciones y vectores y al uso de las construcciones y vectores en medicina. La invención se refiere en particular a vacunas de ADN que son útiles en la profilaxis y el tratamiento de infecciones por el VIH, más en particular cuando se administran mediante suministro mediado por partículas.

15 Antecedentes de la invención

El VIH-1 es la causa principal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) que se considera como uno de los principales problemas de salud mundiales. Aunque se ha llevado a cabo una extensa investigación a lo largo de todo el mundo para producir una vacuna, dichos esfuerzos hasta ahora no han tenido éxito.

La glicoproteína de la envuelta del VIH gp120 es la proteína vírica que se usa para la unión a la célula huésped. Esta unión es mediada por la unión a dos moléculas de superficie de células T auxiliares y macrófagos, conocidas como CD4 y uno de los dos receptores de quimioquinas CCR-4 o CXCR-5. La proteína gp120 se expresa primero como una molécula precursora más grande (gp160), que después se escinde a la molécula gp41, que se inserta en la membrana vírica.

La proteína gp120 es el objetivo principal de anticuerpos neutralizantes, pero desgraciadamente las regiones más inmunógenas de las proteínas (bucle V3) también son las partes más variables de la proteína. Por lo tanto, se cree que el uso de gp120 (o su precursor gp160) como un antígeno vacuna para provocar anticuerpos neutralizantes, tiene un uso limitado para una vacuna protectora amplia. La proteína gp120 también contiene epítomos que son reconocidos por linfocitos T citotóxicos (CTL). Estas células efectoras pueden eliminar células infectadas por virus, y por lo tanto constituyen un segundo mecanismo inmunitario antivírico principal. En contraste con las regiones objetivo de anticuerpos neutralizantes, parece que algunos epítomos de CTL están relativamente conservados entre las diferentes cepas del VIH. Por esta razón, se puede considerar que gp120 y gp160 son componentes antigénicos útiles en vacunas cuyo objetivo es provocar respuestas inmunitarias mediadas por células (en particular CTL).

Se han descrito proteínas del VIH-1 que no son de la envuelta, e incluyen, por ejemplo, proteínas estructurales internas tales como los productos de los genes gag y pol y otras proteínas no estructurales tales como Rev, Nef, Vif y Tat (Green y col., *New England J. Med.*, 324, 5, 308 y sigs (1991) y Bryantetal. (Ed. Pizzo), *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 11, 5, 390 y sigs (1992).

Las proteínas Tat y Nef del VIH son proteínas tempranas, es decir, se expresan pronto en la infección y en ausencia de proteína estructural.

Se sabe que la proteína Nef causa la eliminación de CD4, el receptor del VIH, de la superficie celular, pero se debate sobre la importancia biológica de esta función. Además, Nef interacciona con la ruta de señales de las células T e induce un estado activo, que a su vez puede promover la expresión de genes más eficaz. Algunos aislados de VIH tienen mutaciones en esta región, que hacen que no codifiquen la proteína funcional y tienen gravemente comprometida su replicación y patogénesis *in vivo*.

El gen Tat da lugar a una serie de transcritos religados de modo distinto en diferentes momentos durante la infección. El primer exón codifica una proteína de 86 aminoácidos que domina pronto en la infección. El segundo exón codifica 14 aminoácidos adicionales, y esta forma parcialmente religada de Tat se encuentra tarde en la infección. Ambas formas son transactivadores completamente funcionales, pero la forma más larga también contiene un patrón RGD importante para la unión a las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_5\beta_1$. Tat se une a una estructura de bucle de tamaño corto, conocida como elemento de respuesta de transactivación (TAR), que está situado en el extremo 5' de los ARN de VIH, y favorece la transcripción a partir del LTR de VIH al menos 1000 veces. Tat tiene una función en la promoción de la fase de elongación de la infección por el VIH y estimula la producción de transcritos víricos de longitud completa. Tat puede afectar a la expresión de una serie de genes celulares y puede activar la expresión de una serie de genes celulares incluyendo TNF, IL-2 e IL-6, y regula la expresión de p53 y Bcl-2. Tat se produce en exceso y es secretado de las células infectadas. Este Tat extracelular puede entrar en otras células y puede sensibilizar a las células para la infección por el VIH o acelerar la velocidad de replicación del VIH en las células recién infectadas.

En la presentación de un congreso (C. David Pauza, Immunization with Tat toxoid attenuates SHIV89.6PD infection in rhesus macaques, 12th Cent Gardes meeting, Marnes-La-Coquette, 26.10.1999), se describieron experimentos en los que se inmunizaban macacos rhesus con taxoide Tat solo o combinado con una combinación de vacuna de

glicoproteína de envuelta gp160 (1 dosis de vacuna recombinante y 1 dosis de proteína recombinante). Los resultados observados mostraron que la presencia de la glicoproteína de envuelta no proporcionaba ventajas frente a los experimentos realizados con Tat solo.

5 El gen Gag se traduce a partir del ARN de longitud completa para dar una poliproteína precursora que es esencialmente escindida en 3-5 proteínas de cápside; la proteína de la matriz, proteína de cápside y proteína de unión al ácido nucleico y proteasa (1. Fundamental Virology, Fields BN, Knipe DM and Howley M 1996 2. *Fields Virology* vol 2 1996).

10 El gen gag da lugar a la proteína precursora Gag de 55 kilodalton (kD), llamada también p55, que se expresa a partir del ARN, vírico no religado. Durante la traducción, el extremo N de p55 se miristoila, provocando su asociación con el aspecto citoplasmático de las membranas celulares. La poliproteína Gag asociada a la membrana recluta 2 copias del ARN genómico vírico junto con otras proteínas víricas y celulares que provocan la emergencia de la partícula vírica de la superficie de una células infectadas. Después de emerger, p55 es escindida por la proteasa codificada víricamente
15 (un producto del gen pol) durante el procedimiento de maduración vírica en 4 proteínas más pequeñas, denominadas MA (matriz [p17]), CA (cápside [p24]), NC (nucleocápside [p9]) y p6. (4).

Además de las 3 proteínas Gag principales, todos los precursores de Gag contienen varias regiones distintas, que se escinden y permanecen en el virión como péptidos de diferentes tamaños. Estas proteínas tienen diferentes funciones, p. ej., la proteína p2 tiene una función propuesta en la regulación de la actividad de la proteasa y contribuye al momento
20 correcto de procesamiento proteolítico.

El polipéptido MA deriva del extremo N-terminal miristoilado de p55. La mayoría de las moléculas MA permanecen unidas a la superficie interior de la bicapa lipídica del virión, estabilizando la partícula. Un subconjunto de MA es reclutado dentro de las capas más profundas del virión donde se convierten en parte del complejo que acompaña al ADN vírico al núcleo. Estas moléculas MA facilitan el transporte nuclear del genoma vírico porque una señal cariofílica en MA es reconocida por la maquinaria de importación nuclear celular. Este fenómeno permite que el VIH infecte las células que no se dividen, una propiedad que no es habitual en los retrovirus.

30 La proteína p24 (CA) forma el núcleo cónico de las partículas víricas. Se ha demostrado que la ciclofilina A interacciona con la región p24 de p55 conduciendo a su incorporación en las partículas de VIH. La interacción entre Gag y la ciclofilina A es esencial, porque la alteración de esta interacción por la ciclosporina A inhibe la replicación vírica.

35 La región NC de Gag es responsable del reconocimiento específico de la llamada señal de empaquetamiento del VIH. La señal de empaquetamiento consiste en 4 estructuras de bucle-tallo situadas cerca del extremo 5' del ARN vírico, y es suficiente para mediar la incorporación de un ARN heterólogo en los viriones del VIH-1. NC se une a la señal de empaquetamiento a través de las interacciones mediadas por 2 patrones de dedos de cinc. NC también facilita la transcripción inversa.

40 La región del polipéptido p6 también media la interacción entre Gag p55 y la proteína auxiliar Vpr, conduciendo a la incorporación de Vpr en los viriones que se están formando. La región p6 también contiene un llamado dominio tardío que es necesario para la liberación eficaz de los viriones que emergen de una célula infectada.

45 El gen Pol codifica 2 proteínas que contienen las dos actividades que el virus necesita en una infección temprana, la RT y la proteína integrasa necesarias para la integración del ADN vírico en el ADN celular. El producto principal de Pol es escindido por la proteasa del virión para dar el péptido RT amino terminal que contiene las actividades necesarias para la síntesis de ADN (ARN y ADN polimerasa dirigida por ADN, ribonucleasa H) y la proteína integrasa carboxi terminal. La RT del VIH es un heterodímero de RT de longitud completa (p66) y un producto de escisión (p51) que
50 carece del dominio de integrasa Rnasa carboxi terminal.

La RT es una de las proteínas más conservadas codificada por el genoma retrovírico. Las 2 actividades principales de RT son la ADN Pol y ribonucleasa H. La actividad de ADN Pol de RT usa el ARN y el ADN como moldes que se pueden intercambiar, y como todas las ADN polimerasas conocidas, no es capaz de iniciar de nuevo la síntesis de
55 ADN, si no que requiere una molécula preexistente que sirva como cebador (ARN).

La actividad de Rnasa inherente en todas las proteínas RT tiene una función esencial pronto en la replicación de la eliminación del ARN genómico cuando avanza la síntesis de ADN. Degrada selectivamente el ARN de todas las moléculas híbridas de ARN-ADN. Estructuralmente, la polimerasa y la ribo H ocupan dominios separados que no se superponen con Pol y cubren dos tercios de amino de Pol.

60 La subunidad catalítica p66 está plegada en 5 subdominios distintos. El amino terminal 23 de estos, tiene la parte con actividad de RT. El carboxi terminal de estos, es el dominio de Rnasa H.

65 Después de infectar la célula huésped, el genoma ARN retrovírico se copia en ADN bc lineal por la transcriptasa inversa que está presente en la partícula infecciosa. La integrasa (revisada en Skalka AM'99 *Adv. in Virus Res.*, 52, 271-273) reconoce los extremos del ADN vírico, los corta y acompaña al ADN vírico a un sitio del cromosoma huésped para catalizar la integración. Muchos sitios del ADN huésped pueden ser objetivos para la integración.

Aunque la integrasa es suficiente para catalizar la integración *in vitro*, no es la única proteína asociada con el ADN vírico *in vivo*, el complejo de ADN vírico, proteína grande, aislado de las células infectadas ha se ha designado el complejo de preintegración. Esto facilita la adquisición de los genes de la célula huésped por los genomas víricos de la progenie.

La integrasa está compuesta de 3 dominios distintos, el dominio N terminal, el núcleo catalítico y el dominio C terminal. El dominio del núcleo catalítico contiene todos los requisitos para la química de la transferencia de polinucleótidos.

Las vacunas de ADN normalmente consisten en un vector plasmídico bacteriano en el que se inserta un promotor fuerte, el gen de interés que codifica un péptido antigénico y una secuencia de poliadenilación/terminación transcripcional. El gen de interés puede codificar una proteína entera o simplemente una secuencia antigénica relacionada con el patógeno, tumor u otro agente frente al que se pretende proteger. El plásmido se puede hacer crecer en bacterias, tales como por ejemplo *E. coli* y después aislar y preparar en un medio adecuado, dependiendo de la vía de administración pretendida, antes de administrarlo al huésped. Después de la administración, el plásmido es absorbido por las células del huésped, o se suministra directamente en las células huésped, donde se produce el péptido codificado. El vector plasmídico preferiblemente estará hecho sin un origen de replicación funcional en células eucariotas, con el fin de prevenir la replicación del plásmido en el huésped mamífero y la integración en el ADN cromosómico del animal implicado.

Hay una serie de ventajas de la vacunación con ADN con respecto a las técnicas de vacunación tradicionales. Primero, se ha previsto que debido a que las proteínas que son codificadas por la secuencia de ADN son sintetizadas en el huésped, la estructura o conformación de la proteína será similar a la proteína nativa asociada con el estado patológico. También es probable que la vacunación con ADN ofrezca protección contra diferentes cepas de un virus, generando una respuesta de linfocitos T citotóxicos que reconocen epítomos de proteínas conservadas. La tecnología también ofrece la posibilidad de combinar diversos inmunógenos en una sola preparación para facilitar la inmunización simultánea con respecto a una serie de estados patológicos.

Se proporciona información de antecedentes útil en relación con la vacunación con ADN en Donnelly y col., "DNA vaccines" *Ann. Rev Immunol.* 1997 15: 617-648.

Doe y col. (1994) *Eur. J. immunol.*, 24: 2369-2376, investigaron como afectaban las variaciones en la glicosilación a la respuesta de CTL CD8+ a gp120, y encontraron que gp120 producida en células CHO de mamífero tenían una menor capacidad de sensibilizar las respuestas de CTL cuando se comparaba con proteínas de envuelta derivadas de células de insecto o levadura, salvo que se eliminaran los oligosacáridos unidos por N antes de la inmunización.

Ahora se ha descubierto que se pueden obtener beneficios usando un polinucleótido que codifica una proteína de la envuelta del VIH no glicosilada en una vacuna para el VIH. Sorprendentemente, un vector de ADN que expresa gp120 sin una señal de secreción y que por lo tanto no es glicosilado o secretado de la célula, es un estimulador de las respuestas de CTL más eficaz que un vector de ADN que expresa gp120 con su señal de secreción nativa. Puesto que la señal de secreción es responsable de dirigir gp120 al sitio intracelular en el que se produce la glicosilación, el gp120 que carece de su señal de secreción nativa no es glicosilado. Además, con la presencia de una proteína del VIH no estructural tal como tat en una proteína de fusión con gp120 no glicosilado, las respuestas de CTL aumentan. En contraste, Tat en una proteína de fusión con gp120 normal previene la secreción pero no da como resultado una mayor respuesta inmunitaria. El gp120 no glicosilado también se puede expresar de forma satisfactoria en una proteína de fusión con otros antígenos del VIH, tanto estructurales como no estructurales.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona, por lo tanto, construcciones nuevas para usar en vacunas de ácidos nucleicos o polipéptidos para la profilaxis y el tratamiento de infecciones por el VIH y SIDA.

En un aspecto, la invención proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la proteína de la envuelta del VIH gp120, en el que gp120 no es glicosilada cuando se expresa en una célula objetivo de mamífero, y en el que gp120 carece de una señal de secreción funcional, unida a una secuencia que codifica RT de VIH, Gag de VIH y Nef de VIH, operativamente unida a un promotor heterólogo que codifica una proteína de fusión que contiene gp120, RT, Gag y Nef.

En las siguientes realizaciones preferidas, la proteína de fusión se selecciona de:

gp120-RT-Nef-Gag, y

RT-Nef Gag-gp120.

Opcionalmente, la secuencia Nef para usar en la invención se trunca para eliminar la secuencia que codifica la región N terminal, es decir, eliminar 30-85, preferiblemente 60-85, preferiblemente los 65 aminoácidos N-terminales (este último truncado se denomina en el presente documento trNef).

Ventajosamente, Nef se puede modificar para eliminar uno de los sitios de miristilación. Por ejemplo, el sitio de miristilación Gly 2 se puede eliminar por delección o sustitución.

Alternativamente o adicionalmente, Nef se puede modificar para alterar el patrón de dileucina de Leu 174 y Leu 175 por delección o sustitución de una o ambas leucinas. La importancia del patrón de dileucina en la reducción de CD4 se describe, por ejemplo, en Bresnahan P.A. y col. (1998) *Current Biology*, 8 (22): 1235-8.

El polinucleótido RT para usar en la invención codifica preferiblemente una mutación para inactivar esencialmente cualquier actividad de transcripción inversa. Un mutante inactivo preferido implica la sustitución de K lisina por W triptófano 229. Véase el documento WO 03/025003.

Preferiblemente, Gag para usar en la invención no codifica el polipéptido Gag P6. Las secuencias Gag preferidas para usar en la invención comprenden P 17 y/o 24.

Preferiblemente, una o más secuencias del VIH incluidas en el polinucleótido de acuerdo con la invención que codifican gp120, Nef, Gag o RT tienen codones optimizados para células de mamíferos, lo más preferiblemente de modo que se parezcan a un gen altamente expresado en su uso de codones.

La fusión puede contener secuencias del VIH adicionales.

Las secuencias de polinucleótidos preferiblemente se optimizan en cuanto a los codones para células de mamíferos, en línea con aspectos preferidos de la invención.

Las proteínas de envuelta del VIH tales como gp120 expresadas en una célula de mamífero normalmente serán glicosiladas. El polinucleótido de acuerdo con la invención comprende una secuencia que codifica gp120 que está adaptada para prevenir la glicosilación en una célula objetivo de mamífero, en particular una célula objetivo humana. La glicosilación se puede reducir o prevenir en una serie de formas diferentes, por ejemplo por eliminación o mutación de los sitios de glicosilación, o por eliminación de la señal de secreción nativa. En la construcción de polinucleótido de acuerdo con la invención, gyp120 carece de una señal de secreción funcional. La señal de secreción puede variar de longitud entre aislados de VIH, por ejemplo, tiene 30 aminoácidos de longitud en el aislado W61D descrito en el presente documento, puede ser más corta o más larga que esta para aislados diferentes. En general, la señal de secreción está claramente definida y se eliminará en su totalidad, aunque este no es necesariamente el caso. Se eliminará una cantidad de señal suficiente para prevenir la función de llevar la proteína de la envuelta a la maquinaria celular responsable de la glicosilación. Esto se puede ensayar fácilmente.

La invención se refiere preferiblemente al VIH-1. Se prefiere que las construcciones descritas en el presente documento deriven de un VIH de subtipo B o subtipo C, en particular subtipo B.

Preferiblemente, el promotor es el promotor del gen HCMV IE, más en particular, en el que está incluida la región 5' no traducida del gen HCMV IE que comprende el exón 1, como se describe en el documento WO 02/36792.

En otro aspecto, la invención proporciona un vector que comprende las secuencias de polinucleótidos descritas en el presente documento. La secuencia de polinucleótido preferiblemente es ADN y preferiblemente está contenida en un vector que es un plásmido de ADN bicatenario. Alternativamente, en lo sucesivo se describen vectores y se incluyen en particular vectores adenovíricos tales como los vectores adenovíricos derivados de chimpancé Pan 9 o Pan 5, 6 y 7, en los que preferiblemente estos son de replicación defectuosa, de modo que no pueden replicarse en las células objetivo.

En una realización, la invención proporciona una proteína de fusión que comprende la proteína de la envuelta del VIH gp120, RT de VIH, Gag de VIH y Nef de VIH, en la que gp120 no se glicosila cuando se expresa en una célula objetivo de mamífero y en el que gp120 carece de una señal de secreción funcional.

En otra realización, la invención proporciona una proteína de fusión como se define en el presente documento, expresada a partir de un polinucleótido que tiene los codones optimizados para células de mamífero.

En un aspecto adicional, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden las secuencias de nucleótidos y vectores y proteínas de fusión descritas en el presente documento, junto con un excipiente, diluyente, vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable. En una realización preferida, los polinucleótidos, preferiblemente en forma de un vector de ADN y preferiblemente que comprenden al menos una secuencia de VIH de codones optimizados, están presente en una composición que comprende una pluralidad de partículas, preferiblemente perlas tales como perlas de oro, sobre las que se pone el ADN como recubrimiento.

El suministro de polinucleótidos de acuerdo con la invención se lleva a cabo preferiblemente por suministro mediado por partículas, en particular mediante un procedimiento de bombardeo.

Está previsto que los vectores de acuerdo con la invención se puedan usar con agentes inmunoestimuladores, preferiblemente pero no necesariamente administrados al mismo tiempo que los vectores, y preferiblemente formulados juntos en las composiciones de acuerdo con la invención.

Los agentes inmunoestimuladores para usar en la invención incluyen, pero esta lista no es de ningún modo exhaustiva y no excluye otros agentes: imidazoquinolinas sintéticas tales como imiquimod [S-26308, R-837], (Harrison, y col. "Reduction of recurrent HSV disease using imiquimod alone or combined with a glycoprotein vaccine", *Vaccine* 19: 1820-1826, 35 (2001)); y resiquimod [S-28463, R-848] (Vasilakos, y col. "Adjuvant activities of immune response modifier R-848: Comparison with CpG ODN", *Cellular immunology* 204: 64-74 (2000).), bases de Schiff de carbonilos y aminas que se expresan constitutivamente en las superficies de células presentadoras de antígeno y células T, tales como tucareosol (Rhodes, J. y col. "Therapeutic potentiation of the immune system by costimulatory Schiff-base-forming drugs", *Nature* 377: 71-75 (1995)), citoquina, quimioquina y moléculas coestimuladoras como proteína o péptido o ADN, esto incluiría citoquinas proinflamatorias tales como GM-CSF, IL-1 alfa, IL-1 beta, TGF-alfa y TGF-beta, inductores de Th1 tales como interferón gamma, IL-2, IL-12, IL-15 e IL-18, inductores de Th2 tales como IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 y otras quimioquinas y genes coestimuladores tales como MCP-1, MIP-1 alfa, MIP-1 beta, RANTES, TCA-3, CD80, CD86 y CD40L, otros ligandos directores inmunoestimuladores, tales como CTLA-4 y L-selectina, proteínas estimuladoras de la apoptosis tales como Fas, (49), adyuvantes basados en lípidos sintéticos tales como Vaxfectin, (Reyes y col., "Vaxfectin enhances antigen specific antibody titres and maintains Th1 type immune responses to plasmid DNA immunization", *Vaccine* 19: 3778-3786) escualeno, alfa-tocoferol, polisorbato 80, DOPC y colesterol, endotoxina, [LPS], Beutler, B., "Endotoxin, 'Toll-like receptor 4, and the afferent limb of innate immunity", *Current Opinion in Microbiology* 3: 23-30 (2000)); CpG oligo- y di-nucleótidos, Sato, Y. y col., "Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization", *Science* 273 (5273): 352-354(1996). Hemmi, H. y col., "A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA", *Nature* 408: 740-745, (2000), y otros ligandos potenciales que desencadenan los receptores Toll para producir las citoquinas adecuadas inductoras de Th1, tales como lipoproteínas micobacterianas sintéticas, proteína micobacteriana p19, péptidoglucano, ácido teicoico y lípido A.

Un agente inmunoestimulador preferido para usar con la invención es GM-CSF. Este se puede usar en forma de un polinucleótido que expresa GM-CSF que se coadministra con la vacuna de ADN de la invención. Puede estar presente un ADN plasmídico que codifica GM-CSF en una composición farmacéutica que comprende el(los) polinucleótido(s) de acuerdo con la invención.

Algunos adyuvantes preferidos para provocar una respuesta predominantemente de tipo Th1 incluyen, por ejemplo, un derivado de lípido A tal como monofosforil-lípido A, o preferiblemente 3-des-O-acilado-monofosforil-lípido A. Los adyuvantes MPL[®] están disponibles en Corixa Corporation (Seattle, WA; véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 4.436.727; 4.877.611; 4.866.034 y 4.912.094). Los oligonucleótidos que contienen CpG (en los que el dinucleótido CpG no está metilado) también inducen una respuesta predominantemente Th1. Dichos oligonucleótidos son conocidos y se describen, por ejemplo, en los documentos WO 96/02555, WO 99/33488 y patentes de EE.UU. n.º 6.008.200 y 5.856.462. Las secuencias de ADN inmunoestimuladoras también se describen, por ejemplo, en Sato y col., *Science* 273:352, 1996. Otro adyuvante preferido comprende una saponina tal como Quil A, o derivados del mismo, que incluye QS21 y QS7 (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA); escina; digitonina; o saponinas de *Gypsophila* o *Chenopodium*.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona una célula huésped que comprende una secuencia de polinucleótido de acuerdo con la invención, o un vector de expresión de acuerdo con la invención. La célula huésped puede ser, por ejemplo, bacteriana, p. ej., *E. coli*, de mamífero, p. ej. humana, o puede ser una célula de insecto. Las células de mamífero que comprenden un vector de acuerdo con la presente invención pueden ser células cultivadas transfectadas *in vitro* o pueden ser células transfectadas *in vivo* por administración del vector al mamífero.

La optimización de codones significa que la secuencia de ADN se optimiza para que se parezca al uso de codones de genes en células de mamífero. En particular, el uso de codones en la secuencia se optimiza para que parezca el de genes humanos altamente expresados.

El código del ADN tiene 4 letras (A, T, C y G) y las usa para escribir "codones" de 3 letras que representan los aminoácidos de las proteínas codificadas, en los genes de un organismo. La secuencia lineal de los codones a lo largo de la molécula de ADN se traduce en la secuencia lineal de aminoácidos en la o las proteínas codificadas por esos genes. El código está muy degenerado, con 61 codones que codifican 20 aminoácidos naturales y 3 codones que representan señales de "parada". Por lo tanto, la mayoría de los aminoácidos son codificados por más de un codón, de hecho varios son codificados por 4 o más codones diferentes.

Cuando hay más de un codón disponible para codificar un aminoácido dado, se ha observado que los patrones de uso de los codones de los organismos son altamente no aleatorios. Diferentes especies presentan una tendencia diferente en la selección de codones, y además, el uso de los codones puede ser notablemente diferente en una sola especie entre genes que se expresan con niveles altos y bajos. Esta tendencia es diferente en virus, plantas, bacterias y células de mamíferos, y algunas especies presentan una tendencia más fuerte a alejarse de una selección de codones aleatoria que otras. Por ejemplo, los seres humanos y otros mamíferos tienen una tendencia menos fuerte que algunas bacterias y virus. Por estas razones, hay una probabilidad significativa de que un gen de mamífero expresado en *E. coli* o un gen extraño o recombinante expresado en células de mamífero, tengan una distribución de codones inadecuada para la expresión eficaz. Se cree que la presencia en una secuencia de ADN heteróloga de grupos de codones o una abundancia de codones que es raro observar en el huésped en el que se produce la expresión, es indicativa de niveles bajos de expresión heteróloga en ese huésped.

En una realización de la presente invención, se proporciona una secuencia del polinucleótido gp120 que codifica una secuencia de aminoácidos de gp120 no glicosilada, en el que el patrón de uso de codones de la secuencia de polinucleótidos se parece al de los genes de mamífero altamente expresados. Preferiblemente, la secuencia de polinucleótidos es una secuencia de ADN. Convenientemente el patrón de uso de codones de la secuencia de polinucleótidos es típico de genes humanos altamente expresados.

En los polinucleótidos de la presente invención, el patrón de uso de codones está alterado respecto al típico de los virus de inmunodeficiencia humana para representar mejor la tendencia de codones del organismo objetivo, por ejemplo, un mamífero, en especial un ser humano. El “coeficiente de uso de codones” es una medida de cuanto se parece el patrón de codones de una secuencia de polinucleótido dada al de una especie objetivo. Las frecuencias de los codones se pueden obtener de fuentes de la bibliografía para los genes altamente expresados de muchas especies, (véase, por ejemplo, Nakamura y col., *Nucleic Acids Research* 1996, 24:214-215). Las frecuencias de los codones para cada uno de los 61 codones (expresada como el número de veces que aparece por 1000 codones de la clase de genes seleccionada) se normaliza para cada uno de los 20 aminoácidos naturales, de modo que el valor del codón más frecuentemente usado para cada aminoácido se ajusta a 1 y las frecuencias para los codones menos comunes va a estar entre 0 y 1. Así, a cada uno de los 61 codones se le asigna un valor de 1 o inferior para los genes altamente expresados de la especie objetivo. Con el fin de calcular un coeficiente de uso de codones para un polinucleótido específico, con respecto a los genes altamente expresados de esa especie, se anota el valor obtenido para cada codón del polinucleótido específico y se toma la media geométrica de todos estos valores (dividiendo la suma de los logaritmos naturales de esos valores entre el número total de codones y tomando el antilogaritmo). El coeficiente tendrá un valor entre 0 y 1, y cuanto mayor sea el coeficiente, más codones en el polinucleótidos son codones usados con frecuencia. Si una secuencia de polinucleótido tiene un coeficiente de uso de codón de 1, todos los codones son los codones “más frecuentes” para los genes altamente expresados de las especies objetivo.

De acuerdo con la presente invención, el patrón de uso de codones del polinucleótido preferiblemente excluirá los codones raros. Los codones raros se pueden definir como codones que representan <20% o más preferiblemente que representan <10% de los codones usados para un aminoácido particular en genes altamente expresados del organismo objetivo. Alternativamente, los codones raros se pueden definir como codones con un valor de uso de codón sinónimo relativo (RSCU) de <0,3 o más preferiblemente <0,2 en genes altamente expresados del organismo objetivo. Un valor de RSCU es el número de codones observados dividido entre el número esperado si todos los codones para ese aminoácidos se usaran con la misma frecuencia. Una definición adecuada de un codón raro sería evidente para un experto en la materia.

Un polinucleótido de la presente invención, en general tendrá un coeficiente de uso de codones para los genes humanos altamente expresados mayor que 0,3, preferiblemente mayor que 0,4, más preferiblemente mayor que 0,5. Preferiblemente, el coeficiente de uso de condones también será menor que 1,0, y preferiblemente menor que 0,9 y más preferiblemente menor que 0,8. Por lo tanto, es más preferido un coeficiente de uso de condones entre 0,5 y 0,9, o entre 0,5 y 0,8. Las tablas de uso de codones para seres humanos se pueden encontrar también en Genbank.

En comparación, un gen de beta-actina altamente expresado tiene un coeficiente de uso de condones de 0,747.

A continuación se expone la tabla de uso de codones para un *homo sapiens*.

ES 2 328 685 T3

Uso de codones para genes humanos (altamente expresados)

	1/24/91 (human	high.cod)			
	Aminoácido	Codón	Número	/1000	Fracción
5	Gly	GGG	905,00	18,76	0,24
10	Gly	GGA	525,00	10,88	0,14
	Gly	GGT	441,00	9,14	0,12
	Gly	GGC	1867,00	38,70	0,50
15	Glu	GAG	2420,00	50,16	0,75
	Glu	GAA	792,00	16,42	0,25
	Asp	GAT	592,00	12,27	0,25
20	Asp	GAC	1821,00	37,75	0,75
	Val	GTG	1866,00	38,68	0,64
	Val	GTA	134,00	2,78	0,05
25	Val	GTT	198,00	4,10	0,07
	Val	GTC	728,00	15,09	0,25
	Ala	GCG	652,00	13,51	0,17
30	Ala	GCA	488,00	10,12	0,13
	Ala	GCT	654,00	13,56	0,17
	Ala	GCC	2057,00	42,64	0,53
35	Arg	AGG	512,00	10,61	0,18
	Arg	AGA	298,00	6,18	0,10
	Ser	AGT	354,00	7,34	0,10
40	Ser	AGC	1171,00	24,27	0,34
	Lys	AAG	2117,00	43,88	0,82
	Lys	AAA	471,00	9,76	0,18
45	Asn	AAT	314,00	6,51	0,22
	Asn	AAC	1120,00	23,22	0,78
	Met	ATG	1077,00	22,32	1,00
50	Ile	ATA	88,00	1,82	0,05
	Ile	ATT	315,00	6,53	0,18
	Ile	ATC	1369,00	28,38	0,77
55	Thr	ACG	405,00	8,40	0,15
	Thr	ACÁ	373,00	7,73	0,14
	Thr	ACT	358,00	7,42	0,14
60	Thr	ACC	1502,00	31,13	0,57
	Trp	TGG	652,00	13,51	1,00
	End	TGA	109,00	2,26	0,55
65	Cys	TGT	325,00	6,74	0,32
	Cys	TGC	706,00	14,63	0,68

ES 2 328 685 T3

	Aminoácido	Codón	Número	/1000	Fracción
5	End	TAG	42,00	0,87	0,21
	End	TAA	46,00	0,95	0,23
	Tyr	TAT	360,00	7,46	0,26
10	Tyr	TAC	1042,00	21,60	0,74
	Leu	TTG	313,00	6,49	0,06
	Leu	TTA	76,00	1,58	0,02
15	Phe	TTT	336,00	6,96	0,20
	Phe	TTC	1377,00	28,54	0,80
	Ser	TCG	325,00	6,74	0,09
20	Ser	TCA	165,00	3,42	0,05
	Ser	TCT	450,00	9,33	0,13
	Ser	TCC	958,00	19,86	0,28
25	Arg	CGG	611,00	12,67	0,21
	Arg	CGA	183,00	3,79	0,06
	Arg	CGT	210,00	4,35	0,07
30	Arg	CGC	1086,00	22,51	0,37
	Gln	CAG	2020,00	41,87	0,88
35	Gln	CAA	283,00	5,87	0,12
	His	CAT	234,00	4,85	0,21
	His	CAC	870,00	18,03	0,79
40	Leu	CTG	2884,00	59,78	0,58
	Leu	CTA	166,00	3,44	0,03
	Leu	CTT	238,00	4,93	0,05
45	Leu	CTC	1276,00	26,45	0,26
	Pro	CCG	482,00	9,99	0,17
	Pro	CCA	456,00	9,45	0,16
50	Pro	CCT	568,00	11,77	0,19
	Pro	CCC	1410,00	29,23	0,48

55 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un vector de expresión que comprende y es capaz de dirigir la expresión de una secuencia de polinucleótido de acuerdo con el primer aspecto de la invención, en particular, en el que el patrón de uso de codones de la secuencia de polinucleótido de gyp120 es típico de genes de mamífero altamente expresados, preferiblemente genes humanos altamente expresados. El vector pueden ser adecuado para dirigir la expresión de ADN heterólogo en células bacterianas, de insecto o mamífero, en particular en células humanas. En una realización, el vector de expresión es p7313 (véase la figura 1).

65 La administración de la composición farmacéutica de la invención puede ser en forma de una o más de una dosis individual, por ejemplo, como dosis repetidas del mismo plásmido de ADN, o en un régimen de vacunación de "sensibilización-refuerzo", en particular un régimen de vacunación terapéutico. Un régimen de sensibilización-refuerzo heterólogo usa la administración de diferentes formas de vacunas en la sensibilización y el refuerzo, cada una de las cuales puede incluir 2 o más administraciones. Preferiblemente, pero no necesariamente la composición de sensibilización y refuerzo comprende los mismos antígenos o diferentes formas de los mismos antígenos. La composición de

sensibilización y la composición de refuerzo tendrán en cualquier caso al menos un antígeno en común, aunque no es necesariamente una forma idéntica del antígeno, puede ser una forma diferente del mismo antígeno. Un ejemplo de formas diferentes del mismo antígeno es el caso de un polinucleótido que codifica una gp120 que carece de una secuencia señal funcional y no es glicosilada en células de mamíferos, y un polipéptido que es gp120 con su secuencia señal y que es glicosilada. Una versión de longitud completa y una troncada de la misma proteína, o una forma mutada y no mutada de la misma proteína, también se pueden considerar formas diferentes del mismo antígeno para el propósito de un formato de sensibilización-refuerzo de acuerdo con la invención.

En un ejemplo de un régimen de sensibilización-refuerzo, la vacunación de “sensibilización” puede ser por el suministro de ADN mediado por partículas de una composición de sensibilización que comprende un polinucleótido de acuerdo con la presente invención, preferiblemente incorporado en un vector plasmídico, mientras que la administración de “refuerzo” puede ser de una composición de refuerzo que comprende un vector vírico recombinante que comprende la misma secuencia de polinucleótido o un polinucleótido que codifica al menos uno de los mismos antígenos codificados por la composición de sensibilización. Alternativamente, el refuerzo se puede llevar a cabo con al menos uno de los mismos antígenos en forma de la proteína en adyuvante. A la inversa, la sensibilización puede ser con una composición de sensibilización que comprende el vector vírico o con una formulación de proteína, normalmente una proteína formulada en adyuvante, y el refuerzo una vacuna de ADN de la presente invención.

Un formato de sensibilización-refuerzo para usar con los polinucleótidos de acuerdo con la presente invención se selecciona de:

Sensibilización con proteína/refuerzo con vector vivo

Sensibilización con vector vivo/refuerzo con proteína

Sensibilización con proteína/refuerzo con plásmido de ADN

Sensibilización con plásmido de ADN/refuerzo con proteína

Sensibilización con vector vivo/refuerzo con plásmido de ADN

Sensibilización con plásmido de ADN/refuerzo con vector vivo.

Los vectores vivos preferidos incluyen vectores de virus vivos, en particular vectores de adenovirus como se describe en el presente documento.

Preferiblemente, las composiciones de sensibilización y refuerzo comprenden, además del o de los antígenos, un adyuvante adecuado, que pueden ser diferentes de acuerdo con la composición particular.

Tanto la composición de sensibilización como la composición de refuerzo se pueden suministrar en más de una dosis. Además, a las dosis iniciales de sensibilización y refuerzo le pueden seguir dosis adicionales que pueden alternarse, para dar como resultado, por ejemplo, una sensibilización con plásmido de ADN/refuerzo con proteína/dosis adicional de plásmido de ADN/dosis adicional de proteína.

La invención proporciona además un procedimiento para producir un polinucleótido como se describe en el presente documento, que comprende unión de una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína gp120 de la envuelta del VIH, en el que la gp120 no es glicosilada cuando se expresa en una célula objetivo de mamífero, y en el que gp120 carece de una señal de secreción funcional, y una secuencia que codifica Nef de VIH, RT de VIH y Gag de VIH.

Como se ha discutido antes, la presente invención incluye vectores de expresión que comprenden las secuencias de nucleótidos de la invención. Dichos vectores de expresión se construyen de forma rutinaria en la técnica de la biología molecular, y pueden implicar, por ejemplo, el uso de ADN plasmídico e iniciadores, promotores, potenciadores adecuados y otros elementos, tales como por ejemplo señales de poliadenilación que pueden ser necesarias, y que están colocadas en la orientación correcta, con el fin de permitir la expresión de la proteína. Otros vectores adecuados y como construirlos, será evidente para el experto en la materia. Para ejemplos adicionales en relación con esto, se remite a Sambrook y col. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2ª edición. CSH Laboratory Press. (1989).

Preferiblemente, un polinucleótido de la invención, o para usar en la invención en un vector, está operativamente unido a una secuencia de control, que es capaz de que la célula huésped proporcione la expresión de la secuencia codificante, es decir, el vector es un vector de expresión. La expresión “operativamente unido” se refiere a una juxtaposición en la que los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar de la manera pretendida. Una secuencia reguladora, tal como un promotor, “operativamente unida” a una secuencia codificante, está colocada de forma que la expresión de la secuencia codificante se logra en condiciones compatibles con la secuencia reguladora.

Una secuencia de ácido nucleico de la presente invención, se puede administrar mediante vectores de suministro especializados útiles en terapia génica. Los procedimientos de terapia génica los discuten, por ejemplo, Verme y col., *Nature* 1997, 389:239-242. Se pueden usar tanto sistemas víricos como no víricos. Los vectores pueden ser,

por ejemplo, plásmidos, cromosomas artificiales (p. ej., BAC, PAC, YAC), vectores víricos o fagos provistos de un origen de replicación, opcionalmente un promotor para la expresión del polinucleótido, y opcionalmente un regulador del promotor. Los vectores pueden contener uno o más genes marcadores seleccionables, por ejemplo, un gen de resistencia a la ampicilina o la kanamicina, en el caso de un plásmido bacteriano o un gen de resistencia para un vector fúngico. Los vectores se pueden usar *in vitro*, por ejemplo para la producción de ADN o ARN, o se pueden usar para transfectar o transformar una célula huésped, por ejemplo, una célula huésped de mamífero, p. ej., para producir la proteína codificada por el vector. Los vectores también pueden adaptarse para usar *in vivo*, por ejemplo, en un procedimiento de vacunación con ADN o de terapia génica.

Los ejemplos de vectores víricos adecuados incluyen sistemas basados en retrovirus, lentivirus, adenovirus, virus adenoasociado, herpesvirus, tales como herpesvirus simplex, alfa-virus, virus de la viruela tal como virus de la viruela del canario y virus vaccinia. Las técnicas de transferencia de genes que usan estos virus son conocidas para los expertos en la materia. Se pueden usar por ejemplo vectores retrovíricos para integrar establemente el polinucleótido de la invención en el genoma del huésped, aunque no se prefiere dicha recombinación. Los vectores de adenovirus de replicación defectuosa, en cambio, permanecen episomales y por lo tanto permiten la expresión transitoria. Los vectores capaces de dirigir la expresión en células de insectos (por ejemplo vectores baculovirus), en células humanas, levaduras o bacterias, se pueden usar con el fin de producir cantidades de la proteína del VIH codificada por el polipéptido de la presente invención, por ejemplo, para usar como vacunas subunidad o en inmunoensayos.

En una realización preferida, el adenovirus usado como vector vivo es un adenovirus de simio de replicación defectuosa. Normalmente, estos virus contienen una delección E1 y se pueden hacer crecer en líneas celulares que son transformadas con un gen E1. Los adenovirus de simio preferidos son virus aislados de chimpancés. En particular se prefieren C68 (también conocido como Pan 9) (véase la patente de EE.UU. n° 6083716) y Pan 5, 6 y Pan 7 (documento WO 03/046124) para usar en la presente invención. Por lo tanto, estos vectores se pueden manipular para insertar un gen heterólogo de la invención, de modo que el producto génico pueda ser expresado. El uso, formulación y fabricación de dichos vectores adenovíricos recombinantes se expone con detalle en el documento WO 03/046124.

Se pueden seleccionar promotores y otras señales de regulación de la expresión para que sean compatibles con la célula huésped para la que está diseñada la expresión. Por ejemplo, los promotores de mamíferos incluyen el promotor de metanotioneína que puede inducirse en respuesta a metales pesados tales como cadmio, y el promotor de β -actina. También se pueden usar promotores víricos tales como el promotor del antígeno T grande de SV40, promotor temprano inmediato (IE) del citomegalovirus humano (CMV), promotor LTR del virus de sarcoma de Rous, promotor de adenovirus, o un promotor de HPV, en particular la región secuencia arriba de HPV (URR). Todos estos promotores están bien descritos y están fácilmente disponibles en la técnica.

Un elemento promotor preferido es el promotor temprano inmediato de CMV desprovisto del intrón A, pero que incluye el exón 1. Por consiguiente, se proporciona un vector que comprende un polinucleótido de la invención bajo el control del promotor temprano HCMV IE. Se describe un promotor HCMV IE en el documento WO 02/36792.

Los sistemas no basados en virus incluyen la administración directa de ácidos nucleicos, tecnología de encapsulación de microsferas, poli(lactida-co-glicólido) y sistemas basados en liposomas.

Los polinucleótidos de acuerdo con la invención son útiles en la producción para la expresión de las proteínas codificadas, cuya expresión puede tener lugar *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*. Por lo tanto, los nucleótidos pueden estar implicados en la síntesis de proteínas recombinantes, por ejemplo para aumentar rendimientos, o realmente pueden ser útiles como agentes terapéuticos por sí mismos, usados en técnicas de vacunación con ADN. Cuando los polinucleótidos de la presente invención se usan en la producción de proteínas codificadas *in vitro* o *ex vivo*, las células, por ejemplo en cultivo celular, se modificarán para incluir el polinucleótidos que se va a expresar. Dichas células incluyen, líneas de células de mamífero transitorias o preferiblemente estables. Los ejemplos particulares de células que se pueden modificar por inserción de vectores que codifican un polipéptido de acuerdo con la invención, incluyen células de mamífero HEK293T, CHO, HeLa, 293 y COS. Preferiblemente, la línea celular seleccionada será una que es estable. La expresión se puede lograr en oocitos transformados. Un polipéptido puede expresarse a partir de un polinucleótido de la presente invención en células de un animal no humano transgénico, preferiblemente un ratón. Un animal no humano transgénico que expresa un polipéptido a partir de un polinucleótido de la invención, está incluido dentro del alcance de la invención.

Preferiblemente, los vectores de expresión para usar en vacunas de ADN, composiciones de vacunas y productos inmunoterapéuticos, serán vectores plasmídicos o vectores víricos vivos.

Las vacunas de ADN se pueden administrar en forma de “ADN desnudo”, por ejemplo en una formulación líquida administrada usando una jeringuilla o chorro de alta presión, o ADN formulado con liposomas o un potenciador de la transfección irritante, o por suministro de ADN mediado por partículas (PMDD o suministro inmunoterapéutico mediado por partículas PMID) como se describe con más detalle en el presente documento. Todos estos sistemas de suministro son bien conocidos en la técnica. El vector se puede introducir en un mamífero, por ejemplo, mediante un sistema de suministro de vector vírico.

La composición de la presente invención se puede suministrar por una serie de vías, tales como la vía intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o mucosa.

La invención proporciona además un dispositivo de suministro intradérmico que comprende una composición farmacéutica descrita en el presente documento.

En una realización preferida, la composición se administra por vía intradérmica. En particular, la composición se suministra mediante una pistola génica, en particular usando técnicas de administración por bombardeo de partículas, que implican recubrir perlas (p. ej., perlas de oro) con el vector, las cuales después se administran con alta presión en la epidermis. Esto lo describen, por ejemplo, Haynes y col., *J. Biotechnology* 44: 37-42 (1996).

Se conocen numerosos procedimientos para llevar a cabo un procedimiento de bombardeo de partículas, véase por ejemplo el documento WO 91/07487. En un ejemplo ilustrativo, la aceleración de partículas dirigida por gas se puede lograr con dispositivos como los fabricados por Powderject Pharmaceuticals PLC (Oxford, Reino Unido) y Powderject Vaccines Inc. (Madison, WI), algunos ejemplos de los cuales se describen en las patentes de EE.UU. n° 5.846.796; 6.010.478; 5.865.796; 5.584.807; y patente EP n° 0500799. Este procedimiento ofrece un procedimiento de suministro sin aguja en el que una formulación en polvo seco de partículas microscópicas, tal como polinucleótido, es acelerada a gran velocidad dentro de un chorro de helio gaseosos generado mediante un dispositivo manual, que propulsa las partículas a los tejidos objetivo de interés, normalmente la piel. Las partículas preferiblemente son perlas de oro de un diámetro de 0,4-4,0 μm , más preferiblemente 0,6-2,0 μm , y están recubiertas con el conjugado de ADN y después encerradas en un cartucho o caja para poner en el dispositivo de suministro.

En una realización relacionada, otros dispositivos y procedimientos que pueden ser útiles para la inyección sin aguja dirigida por gas, de las composiciones de la presente invención, incluyen los proporcionados por Bioject, Inc. (Portland, OR), algunos de cuyos ejemplos se describen en las patentes de EE.UU. n° 4.790.824; 5.064.413; 5.312.335; 5.383.851; 5.399.163; 5.520.639 y 5.993.412.

Los vectores que comprenden las secuencias de nucleótidos que codifican péptidos antigénicos se administran en una cantidad que sea profiláctica o terapéuticamente eficaz. La cantidad a administrar en general está en el intervalo de 1 picogramo a 1 miligramo, preferiblemente 1 picogramo a 10 microgramos por suministro mediado por partículas, y de 100 nanogramos a 10 miligramos para otras vías de nucleótidos por dosis. La cantidad exacta puede variar considerablemente, dependiendo del peso del paciente que se va a inmunizar y la vía de administración.

El componente inmunogénico que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido antigénico, se puede administrar una sola vez o se puede administrar de forma repetida, por ejemplo, entre 1 y 7 veces, preferiblemente entre 1 y 4 veces, en intervalos de aproximadamente 1 día a aproximadamente 18 meses. También se pueden dar administraciones adicionales según sea necesario, para mantener las respuestas inmunitarias a lo largo de la vida del paciente. Sin embargo, este régimen de tratamiento variará significativamente dependiendo del tamaño del paciente implicado, la cantidad de secuencia de nucleótido administrada, la vía de administración y otros factores que serán evidentes para un médico experto. El paciente puede recibir uno o más fármacos retrovirales para el VIH distintos como parte de su régimen de tratamiento general. Además, el ácido nucleico inmunogénico se puede administrar con un adyuvante.

El componente adyuvante especificado en el presente documento se puede administrar también por una variedad de vías de administración diferentes, tales como por ejemplo, por vía oral, nasal, pulmonar, intramuscular, subcutánea, intradérmica o tópica. Preferiblemente, el componente adyuvante se administra por vía intradérmica o tópica, lo más preferiblemente por una vía tópica. Esta administración puede tener lugar entre aproximadamente 14 días antes y aproximadamente 14 días después de la administración de la secuencia de nucleótidos, preferiblemente entre aproximadamente 1 día antes y aproximadamente 3 días después de la administración de la secuencia de nucleótidos.

En una realización, el componente adyuvante se administra sustancialmente de forma simultánea con la administración de la secuencia de nucleótidos. Por “sustancialmente de forma simultánea” se entiende que la administración del componente adyuvante preferiblemente es al mismo tiempo que la administración de la secuencia de nucleótidos, o si no lo es, al menos es en pocas horas respecto a la administración de la secuencia de nucleótidos. En el protocolo de tratamiento más preferido, el componente adyuvante se administrará sustancialmente de forma simultánea con la administración de la secuencia de nucleótidos. Obviamente, este protocolo se puede variar según sea necesario, de acuerdo con el tipo de variables referidas antes. Se prefiere que el adyuvante sea un derivado de 1H-imidazo[4,5c]quinolina-4-amina tal como imiquimod. Normalmente, imiquimod se presentará como una formulación en crema típica y se administrará de acuerdo con el protocolo anterior.

Otra vez, dependiendo de dichas variables, la dosis de administración del derivado también variará, pero puede estar, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 0,1 mg por kg a aproximadamente 100 mg por kg, donde “por kg” se refiere al peso corporal del mamífero implicado. Esta administración del derivado de 1H-imidazo[4,5c]quinolina-4-amina preferiblemente se repetirá con cada administración posterior o de refuerzo de la secuencia de nucleótidos. Lo más preferiblemente, la dosis de administración será entre aproximadamente 1 mg por kg y aproximadamente 50 mg por kg. En el caso de un esquema de “sensibilización-refuerzo” descrito en el presente documento, el imiquimod u otro derivado de 1H-imidazo[4,5c]quinolina-4-amina, se puede administrar con la sensibilización o con el refuerzo o tanto con la sensibilización como con el refuerzo.

Aunque el componente adyuvante puede comprender solo derivados de 1H-imidazo[4,5c]quinolina-4-amina para administrar en el estado químico puro, se prefiere que la administración sea en forma de una formulación farmacéutica.

Es decir, el componente adyuvante comprenderá preferiblemente la 1H-imidazo[4,5c]quinolina-4-amina combinada con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos. El o los vehículos deben ser “aceptables” en el sentido de ser compatibles con otros ingredientes dentro de la formulación, y no ser perjudiciales para su receptor. La naturaleza de las formulaciones naturalmente variará según la vía de administración pretendida, y se pueden preparar por procedimientos bien conocidos en la técnica farmacéutica. Todos los procedimientos incluyen la etapa de asociar un derivado de 1H-imidazo[4,5c]quinolina-4-amina con un vehículo o vehículos adecuados. En general, las formulaciones se preparan mediante la asociación uniforme e íntima del derivado con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, y después, si es necesario, conformando el producto en la formulación deseada. Las formulaciones de la presente invención adecuadas para la administración oral se pueden presentar en forma de unidades discretas tales como cápsulas, sellos o comprimidos, que contienen cada uno una cantidad predeterminada del principio activo; en forma de un polvo o gránulos; en forma de una solución o suspensión en un líquido acuoso o un líquido no acuoso; o en forma de una emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión de agua en aceite. El principio activo también se puede presentar en forma de bolo, electuario o pasta.

Un comprimido se puede hacer por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes auxiliares. Los comprimidos hechos pro compresión, se pueden preparar comprimiendo en una máquina adecuada el principio activo en una forma fluida tal como un polvo o gránulos, opcionalmente mezclados con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, lubricante, tensioactivo o agente de dispersión. Los comprimidos moldeados se pueden hacer moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte.

Los comprimidos pueden recubrirse o marcarse opcionalmente y se pueden formular para proporcionar liberación lenta o controlada del principio activo.

Las formulaciones para administrar por inyección, por ejemplo, por las vías de administración intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea, incluyen disoluciones para inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen la formulación isotónica con la sangre del receptor a la que va dirigida; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones se pueden presentar en envases de una sola dosis o de múltiples dosis, por ejemplo, ampollas y viales sellados, y se pueden almacenar en condiciones liofilizadas que solo requieren la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Las disoluciones y suspensiones para inyección extemporánea se pueden preparar a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles del tipo descrito previamente. Las formulaciones adecuadas para la administración pulmonar a través de la cavidad bucal o nasal, se presentan como partículas que contienen el principio activo, que tienen convenientemente un diámetro en el intervalo de 0,5 a 7 micrómetros, que se suministran en el árbol bronquial del receptor. Las posibilidades para dichas formulaciones, es que estén en forma de polvos finalmente divididos que pueden presentarse de forma conveniente en una cápsula perforable, de forma adecuada, por ejemplo, de gelatina, para usar en un dispositivo de inhalación, o alternativamente, en forma de una formulación autopropelente que comprende el principio activo, un propulsor líquido adecuado y opcionalmente otros ingredientes tales como tensioactivos y/o un diluyente sólido. Las formulaciones autopropelentes se pueden usar cuando el principio activo se dispensa en forma de gotas de una solución o suspensión. Dichas formulaciones autopropelentes son análogas a las conocidas en la técnica y se pueden preparar por procedimientos establecidos. Se proporcionan de forma adecuada con una válvula de funcionamiento manual o automático que tiene las características de pulverización deseadas; ventajosamente la válvula es de tipo dosificadora que suministra un volumen fijo, por ejemplo, de 50 a 100 μ l, tras cada operación de la misma.

Una posibilidad adicional, el componente adyuvante puede estar en forma de una disolución para usar en un atomizador o nebulizador, por el cual se usa una corriente de aire acelerada o agitación ultrasónica para producir una niebla de gotas finas para inhalar.

Las formulaciones adecuadas para la administración intranasal, en general incluyen presentaciones similares a las descritas antes para la administración pulmonar, aunque se prefiere que dichas formulaciones tengan un diámetro de partículas en el intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 200 micrómetros, para permitir la retención dentro de la cavidad nasal. Esto se puede lograr mediante el uso adecuado de un polvo de un tamaño de partículas adecuado, o la elección de una válvula adecuada. Otras formulaciones adecuadas incluyen polvos gruesos que tienen un diámetro de partículas en el intervalo de aproximadamente 20 a aproximadamente 500 micrómetros, para la administración por inhalación rápida a través del conducto nasal desde un envase mantenido cerca de la nariz, y gotas nasales que comprenden aproximadamente de 0,2 a 5% en p/p del principio activo en disoluciones acuosas o aceitosas. En una realización de la invención, el vector que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido antigénico se puede administrar dentro de la misma formulación que el derivado de 1H-imidazo[4,5c]quinolina-4-amina. Por lo tanto, en esta realización, el componente inmunogénico y el adyuvante están en la misma formulación.

En una realización, el componente adyuvante se prepara de una forma adecuada para la administración biolística, y se administra por esta vía sustancialmente de forma simultánea con la administración de la secuencia de nucleótidos. Para preparar las formulaciones adecuadas para usar de esta forma, puede ser necesario liofilizar el derivado de 1H-imidazo[4,5c]quinolina-4-amina y adherirlo, por ejemplo, a partículas tales como perlas de oro que son adecuadas para la administración biolística.

En una realización alternativa, el componente adyuvante se puede administrar en forma de un polvo seco, por propulsión con gas a alta presión.

Incluso aunque no se formulen juntos, puede ser adecuado que el componente adyuvante se administre en el mismo o aproximadamente en el mismo sitio que la secuencia de nucleótidos.

Se pueden encontrar otros detalles de preparaciones farmacéuticas en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania (1985).

Las técnicas adecuadas para introducir el polinucleótido o vector desnudo en un paciente, también incluyen la aplicación tópica con un vehículo adecuado. El ácido nucleico se puede administrar por vía tópica en la piel o en superficies mucosas, por ejemplo por vía intranasal, oral, intravaginal, o intrarrectal. El polinucleótido o vector desnudo puede estar presente junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como disolución salina tamponada con fosfato (PBS). La absorción de ADN se puede facilitar además por el uso de agentes que la facilitan tales como bupivacaína, por separado o incluidos en la formulación de ADN. Otros procedimientos de administración del ácido nucleico directamente a un receptor incluyen ultrasonidos, estimulación eléctrica, electroporación y microsiembra que se describe en el documento US 5.697.901.

La absorción de construcciones de ácido nucleico se puede potenciar por varias técnicas de transfección conocidas, por ejemplo, las que incluyen el uso de agentes de transfección. Los ejemplos de estos agentes incluyen agentes catiónicos, por ejemplo fosfato de calcio y DEAE-dextrano y lipoinfectantes, por ejemplo Lipofectam y Transfectam. La dosificación del ácido nucleico que se va a administrar se puede alterar.

También se puede administrar una secuencia de ácido nucleico de la presente invención mediante vectores de suministro especializados útiles en la terapia génica. Se discuten procedimientos de terapia génica por ejemplo por Verme y col., *Nature* 1997, 389: 239-242. Se pueden usar tanto sistemas víricos como no víricos como se han descrito antes. Los sistemas de suministro víricos y no vírico se pueden combinar cuando se quieren proporcionar inyecciones de refuerzo después de una vacunación inicial, por ejemplo, una vacunación inicial de "sensibilización" con ADN usando un vector no vírico tal como un plásmido, seguido de una o más vacunaciones de "refuerzo" usando un sistema basado en vector vírico o no vírico. Igualmente, la invención contempla sistemas de sensibilización y refuerzo con el polinucleótido de la invención, seguido del refuerzo con la proteína en adyuvante o viceversa.

Una secuencia de ácido nucleico de la presente invención también se puede administrar mediante células transformadas. Dichas células incluyen células recogidas de un sujeto. El polinucleótido o vector desnudo de la presente invención se puede introducir en dichas células *in vitro*, y después se pueden devolver las células transformadas al sujeto. El polinucleótido de la invención puede integrarse en el ácido nucleico ya presente en una célula mediante sucesos de recombinación homóloga. Una célula transformada, si se desea, se puede hacer crecer *in vitro* y se pueden usar en la presente invención una o más de las células resultantes. Las células se pueden proporcionar en un sitio adecuado en un paciente mediante técnicas quirúrgicas o microquirúrgicas (p. ej., injerto, microinyección, etc.).

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden incluir compuestos adyuvantes como se ha detallado antes, u otras sustancias que pueden servir para aumentar la respuesta inmunitaria inducida por la proteína que es codificada por el ADN. Esta puede ser codificada por el ADN de forma separada o como una fusión con el antígeno, o puede incluirse como elementos no ADN de la formulación. Los ejemplos de sustancias de tipo adyuvante que se pueden incluir en las formulaciones de la presente invención incluyen ubiquitina, proteína de membrana asociada a lisosomas (LAMP), antígeno de núcleo de virus de la hepatitis B, ligando FLT-3 (una citoquina importante en la generación de células presentadoras de antígeno profesionales, en particular células dendríticas) y otras citoquinas tales como IFN- γ y GM-CSF. Otros adyuvantes preferidos incluyen imiquimod y resiquimod y tucarasol, siendo particularmente preferido imiquimod.

En una realización particular de la invención, se proporciona el uso de una molécula de ácido nucleico como se ha descrito en el presente documento para el tratamiento o profilaxis de la infección por el VIH, administrado con imiquimod. El imiquimod se administra preferiblemente por vía tópica, mientras que la molécula de ácido nucleico se administra preferiblemente mediante el suministro mediado por partículas.

La presente invención se describirá ahora con referencia a los siguientes ejemplos, referencias respecto a Tat que se proporciona a modo de comparación y no forma parte de la invención reivindicada.

Ejemplos

Ejemplo 1

Construcción de plásmido

1.1 Construcción del plásmido que contiene gp120

La glicoproteína gp120 recombinante descrita en los siguientes ejemplos es una forma sintética de la proteína de la envuelta gp120 del VIH-1 aislado W61D.

Codón optimizado (pgp120c)

La secuencia génica se basó en la secuencia de gp120 del aislado del VIH-1 W61D. Esta tiene un coeficiente de uso de codones (CUC) de 0,297. La optimización se realizó usando SynGene 2d, dando como resultado un CUC de 0,749 (Ertl, PF., Thomsen, LL. Technical issues in construction of nucleic acid vaccines. (2003) *Methods* 31 (3); 199-206. SynGene usa un procedimiento matemático para la optimización de codones basado en las frecuencias de uso relativas. Brevemente, se asignan intervalos de valores a los codones de acuerdo con sus frecuencias, de modo que los codones más frecuentes tienen intervalos más amplios y se ponen en orden ascendente de frecuencia. Los intervalos de valores se expresan como $\geq 0,000$, $\geq 0,0??$, $\geq 0,??? etc.$ Se genera un número aleatorio entre 0 y 0,99999. Después, este se usa para seleccionar un codón que será el codón asignado dentro de cuyo intervalo está el número aleatorio. Para excluir codones raros, se añade el valor 0,1 al número aleatorio, de modo que está en el intervalo de 0,1-1,09999.

La secuencia de gp120 se dividió en 40 oligonucleótidos que se superponen, se montó por PCR y se recuperó usando los cebadores de los extremos. El gen se clonó en el vector p7313-ie (mostrado en la figura 1) como un fragmento NotI-BamHI y se secuenció. Los fragmentos de restricción de los 3 clones iniciales se combinaron para generar un solo clon correcto. La secuencia de aminoácidos y la secuencia de ADN de codones optimizados se dan en la figura 2.

1.2 Generación de plásmidos que contienen Nef/Tat

Nef/Tat (pNTm y ptrNTm)

El gen para la proteína de fusión Nef/Tat se proporcionó en el plásmido pRIT15244 (Figura 3). El plásmido pRIT15244 es idéntico a pRIT 14913 descrito a continuación excepto que se ha suprimido la cola de His.

General

Se seleccionó el gen Nef del aislado de Bru/Lai (*Cell* 40: 9-17, 1985) para las construcciones, puesto que este gen está entre los que están más estrechamente relacionados con Nef de consenso.

El material de partida para el gen Nef de Bru/Lai era un fragmento de ADN de 1170 pb clonado en el vector de expresión de mamífero pcDNA3 (pcDNA3/Nef).

El gen Tat se origina a partir del clon molecular BH10. Este gen se recibió como un clon de ADNc de HTLV III denominado pCV y está descrito en *Science*, 229, p69-73, 1985. Este gen *tat* lleva las mutaciones en la región del sitio activo (Lys41 → Ala) y en el patrón RGD (Arg78 → Lys y Asp80 → Glu) (*Virology* 235: 48-64, 1997).

El gen *tat* mutante se recibió como un fragmento de ADNc subclonado entre los sitios EcoRI y HindIII dentro del plásmido de expresión de CMV (pCMVLys41/KGE).

Construcción del vector pRIT14597 (que codifica la proteína Nef-His)

El gen *nef* se amplificó por PCR a partir del plásmido pcDNA3/Nef con los cebadores 01 y 02.

NcoI

CEBADOR 01: 5' ATCGTCCATG.GGT.GGC.AAG.TGG.T 3' [SEQ ID NO: 1]

SpeI

CEBADOR 02: 5' CGGCTACTAGTGCAGTTCTTGAA 3' [SEQ ID NO:2]

Se usó el vector de integración PHIL-D2 (INVITROGEN). Este vector se modificó de forma que la expresión de la proteína heteróloga empieza inmediatamente después del codón ATG nativo del gen AOX1 y producirá proteína recombinante con una cola de 1 resto glicina y 6 histidinas. Este vector PHIL-D2-MOD se construyó por clonación de un conector oligonucleótido entre los sitios adyacentes *AsuII* y *EcoRI* del vector PHIL-D2. Además de esta cola de His, este conector lleva los sitios de restricción *NcoI*, *SpeI* y *XbaI* entre los cuales se insertaron *nef*, *tat* y la fusión *nef-tat*.

El fragmento *nef* de la PCR obtenido y el vector de integración PHIL-D2-MOD se trataron ambos con enzimas de restricción *NcoI* y *SpeI*, se purificaron en gel de agarosa y se ligaron para crear el plásmido de integración pRIT14597.

ES 2 328 685 T3

Construcción del vector pRIT14913 (que codifica la fusión Nef-Tat His-mutante)

Para construir pRIT14913, el gen mutante *tat* se amplificó por PCR a partir del plásmido pCMVLys41/KGE con los cebadores 03 y 04.

SpeI

CEBADOR 03: 5' ATCGTACTAGT.GAG.CCA.GTA.GAT.C 3' [SEQ ID NO: 3]

SpeI

CEBADOR 04: 5' CGGCTACTAGTTTTCCTTCGGGCCT 3' [SEQ ID NO: 4]

El fragmento de PCR obtenido y el plásmido de pRIT14597 (que expresa la proteína Nef-His) se hicieron digerir ambos por la enzima de restricción SpeI, se purificaron en gel de agarosa y se ligaron para crear el plásmido de integración pRIT149143.

1.3 Generación de vectores PMID para gp120 y Nef/Tat

gp120: gp120 de codones optimizados se proporcionó como se ha descrito antes.

Nef/Tat (pNTm y ptrNTm):

El gen para la proteína de fusión Nef/Tat se proporcionó en el plásmido pRIT15244 como se ha descrito antes. El Tat en este plásmido contiene 3 mutaciones para inactivar la función de transactivación. La fusión contiene Nef de longitud completa que tiene una función inmunomoduladora (Collins y Baltimore (1999)) que se puede abolir por truncado N-terminal. Por lo tanto, se generaron construcciones tanto para Nef de longitud completa/Tat(pNTm) mutante como para Nef truncado/Tat(ptrNTm) mutante, en las que se quitaron los 65 primeros aminoácidos de Nef. Estas secuencias se amplificaron por PCR a partir de pRIT15244 usando los cebadores:

5'Nef GAATTCGCGGCCGCCATGGGTGGCAAGTGGTCAAAAAG

5'trNef GAATTCGCGGCCGCCATGGGTGGGTTTTCCAGTCACACC

3'Tat GAATTCGGATCCTTATTCCTTCGGGCCTGTCGGG

[SEQ ID NOS: 5,6,7]

Los genes se clonaron en el vector p7313-ie como fragmentos NotI-BamHI y se secuenciaron. PNTm y ptrNTm y las secuencias de Nef/Tat y Nef truncado/Tat se muestran en las figuras 4 y 5.

Vectores de expresión dobles: (pRIX1 y pRIX2)

Los casetes de expresión de Nef/Tat y trNef/Tat se escindieron como fragmentos de restricción ClaI-XmnI, se ligaron en los sitios ClaI y Sse8387 I romo del vector que contenía gp120 de codones optimizados (pgp120c) para proporcionar plásmidos únicos para la expresión de ambas proteínas (pRIX1 y pRIX2 respectivamente).

Composición del plásmido p7313-ie (Figura 1)

El plásmido se construyó sustituyendo el gen de la beta-lactamasa que contiene el fragmento Eam1105I-PstI de pUC19 (disponible en Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd., Amersham Place, Little Chalfont, Bucks, HP7 9NA) por un fragmento EcoRI de pUC4K (Amersham-Pharmacia) que contiene el gen de resistencia a la kanamicina, seguido de la formación de extremos romos de ambos fragmentos usando la ADN polimerasa T4. El promotor/potenciador IE1 del citomegalovirus humano, intrón A, se obtuvo del plásmido JW4303 obtenido de Dr Harriet Robinson, University of Massachusetts, y se insertó en el sitio SalI de pUC19 como un fragmento XhoI-SalI, incorporando la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. La delección del fragmento 5'SalI-BanI a partir del promotor generó el promotor mínimo usado en el vector (documento WO00/23592-Powderject Vaccines Inc.). El antígeno de superficie del VHB 3'UTR se obtuvo del virus de la hepatitis B, serotipo adw, en el vector pAM6 (Moriarty *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 2606-10, 1981). pAM6 (vector basado en pBR322) se obtuvo del American Type Culture Collection, número de catálogo en ATCC 45020. El 3'UTR se insertó 5' respecto a la señal de poliadenilación como un fragmento BamHI de 1,4 kb, se hizo el extremo romo para la inserción para eliminar los sitios BamHI. En una

ES 2 328 685 T3

serie de etapas (incluyendo la digestión con *Bgl* II, tratamiento con la polimerasa Klenow, digestión con *Bsf* XI, digestión con *Nco* I, tratamiento con nucleasa de judía mungo para eliminar el saliente y posterior digestión con *Bst* XI), se hicieron modificaciones en la región entre la región potenciadora 3' no traducida del gen S del VHB y la señal bGHpA para eliminar todos los marcos de lectura abiertos de más de 5 codones entre el promotor del gen X y la señal bGHpA. Esto dio como resultado la delección de la secuencia que codifica la parte traducible de la proteína X (9 aminoácidos) y el codón de inicio del gen X. La señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina se sustituyó por la señal de poliadenilación de la globina beta de ratón. Las secuencias 5' no codificantes y codificantes del antígeno S se escindieron y se sustituyeron por un conector oligonucleótido para proporcionar múltiples sitios de clonación como se muestra para producir el plásmido p7313-PL.

```
Hind-- -NotI--      EcoRV-      -NdeI-      -BamHI
AGCTTGCGGCCGCTAGCGATATCGGTACCATATGTCGACGGATCC....
....ACGCCGGCGATCGCTATAGCCATGGTCTACAGCTGCCTAGGCCGG
      -NheI-      -KpnI-      -SalI-      ΔNotI
[SEQ ID NO: 8]
```

Este policonector se extendió más por inserción de un conector oligonucleótido adicional entre los sitios KpnI y SalI:

```
AspI-      -MunI-      NaeI-      NdeI--      BglII-
GTACCGGTCAATTGGCGCCGGCGCGCCATATGACGTCAGATCTG----
----GCCAGTTAACC GCGCCGCGCGGTATACTGCAGTCTAGACAGCT
--AgeI-      -NarI--      AatII-      SalI
[SEQ ID NO: 9]
```

La secuencia cer ColeI se obtuvo de un subclón a partir del plásmido pDAH212 de David Hodgeson (Warwick University) y se amplificó por PCR usando cebadores para poner sitios de restricción EcoRI en los extremos de la secuencia. La secuencia cer después se insertó en el sitio EcoRI de p7313-PL para producir el plásmido p7313-PLc. La secuencia de cer amplificado se verificó frente a la entrada M11411 de Genbank.

La secuencia 3'UTR del VHB entre el promotor y la señal de poliadenilación se quitó por amplificación por PCR de la señal de poliadenilación, usando los cebadores:

```
homosentido: CCATGGATCCGATCTTTTCCCTCTGCC [SEQ ID NO: 10]
antisentido: GTTAGGGTGAAAAGCTTCCGAGTGAGAGACAC [SEQ ID NO: 11]
```

El producto resultante se cortó con BamHI y XmnI y se usó para sustituir el correspondiente fragmento que contenía tanto la señal de poliadenilación como 3'UTR. Se eliminó la secuencia del intrón A del plásmido por amplificación por PCR del promotor/potenciador de CMV usando los cebadores:

```
homosentido: GCTAGCCTGCAGGCTGACCGCCCAACGAC [SEQ ID NO: 12]
antisentido: GTTCTCCATCGCGGCCGCACTCTTGGCACGGGG [SEQ ID NO: 13]
```

El producto resultante se cortó con Sse8387I y NotI, y se volvió a insertar en los sitios Sse8387I y NotI del vector parental.

Ejemplo 2

Modificación de los vectores de expresión pg120 y Nef/Tat(mut)

Las construcciones gp120 se modificaron para reducir la secreción de la proteína.

ES 2 328 685 T3

Generación de construcciones

gp120 sin un señal de secreción (dsgp120, pRix 12-véase la figura 2 y 6)

5 El gen gp120 se amplificó por PCR a partir de pgp120c usando los siguientes cebadores:

5' 120ds: 5'GAATTCGCGGCCGCCATGGCCGAGCAGCTGTGGGTCACC [SEQ ID NO 14]

10

L01:

5'GAATTCGGATCCTCATCTCTGCACGACGCGGCGCTTGGCCCCGGGT
15 GGGGGCCACG [SEQ ID NO: 15]

Los fragmentos se amplificaron usando la ADN polimerasa PWO (Roche) y el ciclo:

20

95°C (30s) 95°C(30s) 50°C(30s) 72°C(90s) 72°C(120s) 4°C(hold)

\ _____ repetición x20 _____ /

25

Los productos se cortaron con NotI y BamHI y se clonaron en p7313-ie para dar pRix12 (Figura 6).

Resultados

30 En las células 293T el vector pRIX12, que carece de señal de secreción, produce una buena cantidad de una proteína no glicosilada de 60 kDa que no es secretada.

Ejemplo 3

35 *Construcción de vectores para la expresión de gp120 y Nef/Tat(mut) a partir de un solo plásmido*

Construcción del vector

40 Las construcciones de gp120 Nef/Tat(m) se generaron por PCR uniendo los ORF de gp120 y Nef/Tat(m) o trNef/Tat(m).

Se amplificaron 5' y 3' Gp120, 5' y 3' Nef/Tat(m) y 5'trNef/Tat a partir de pRix1. 3'trNef/Tat(m) se amplificó a partir de pNTm. Se usaron los siguientes cebadores:

45

3'120 (antisentido a) GCCAAGCGCCGCGTCGTGCAGAGA [SEQ ID NO: 16] 5'120/NT
GCCAAGCGCCGCGTCGTGCAGAGAATGGGTGGCAAGTGGTCAAAAAGT [SEQ ID NO 17]
3'NT(antisentido a) GGGGAGCCGACAGGCCCGAAGGAA [SEQ ID NO 18]

50

5'NT/120: GGGGAGCCGACAGGCCCGAAGGAAATGAAGGTCAAGGAGACCAGAAAG [SEQ ID NO: 19]
5'120/trN: GCCAAGCGCCGCGTCGTGCAGAGAATGGTGGTGTTCAGTCAC [SEQ ID NO: 20]
5'trNef GAATTCGCGGCCGCCATGGTGGTGTTCAGTCACACC [SEQ ID NO: 21]
L01:

55

GAATTCGGATCCTCATCTCTGCACGACGCGGCGCTTGGCCCCGGGTG
GGGGCCACG [SEQ ID NO: 22]

60

L02

65

ACCACCTTGTACTTGTACAGCTCGCTCCGCCAGTTATCCCTCATGTC
GCCGCCGCCGGGC [SEQ ID NO: 23]

ES 2 328 685 T3

Los fragmentos se amplificaron usando la ADN polimerasa PWO (Roche) y el ciclo:

95°C (60s) 95°C(30s) 55°C(30s) 72°C(120s) 72°C(120s) 4°C(hold)

\ _____ repetición x20 _____ /

Se usó el cebador L1 como el cebador 3' para 3' gp120. Sin embargo, había problemas usando este cebador cuando se unía Nef/Tat o trNef/T al extremo 5' de gp120, de modo que se usó en su lugar el cebador L2.

Los fragmentos gp120-N/Tm y gp120-trN/Tm unidos se cortaron con NotI y BamHI y se clonaron en p7313-ie cortado de la misma forma. Debido al uso del cebador L2 en lugar de L1, los fragmentos N/Tm-gp120 y trN/Tm-gp120 carecían de un sitio BamHI, por lo que estos se cortaron con NotI y AccI, y se clonaron en ppg120c cortado la misma forma. Todos los insertos se verificaron completamente por secuenciación. Los plásmidos se designaron pRix6 (gp120c NefTat^m), pRix11 (gp120c trNefTat^m), pRix7 (NefTat^m gp120c) y pRix8 (trNefTat^mgp120) (Figuras 23-26).

Ejemplo 4

Construcción de vectores para investigar los efectos de glicosilación y secreción, inclusión de Tat e inclusión de Gag (p17/24) y Nef y RT en gp120 y fusiones de gp120

Los vectores se construyeron como se muestra en las figuras 33 y 34 (esquemático).

pRix 28 y pRix29 (Figuras 7 y 8)

pRix28 y 29 que contienen ds gp120c NefTat^m y ds gp120ctrNefTat se generaron por transferencia de los fragmentos AccI-BamHI de pRix6 (2315bp) y pRix11 (2123bp) a pRix12 (ds gp120c) cortado de forma similar.

pRix30 y pRix31 (Figura 27 y Figura 9)

Para generar los vectores de fusión glicosilados y no glicosilados de gp120c Nef sin Tat, el fragmento NotI-KpnI se transfirió de pRix11 (1580bp) o pRix29 (1496bp) a pRix15 cortado de forma similar, un vector que contiene Tat/trNef.

(pRix15)-Tat(mut)trNef

Los genes para Tat y trNef se amplificaron por PCR a partir de pNTm usando los siguientes cebadores:

5'Tat: 5'GAATTCGCGGCCGCCATGGAGCCAGTAGATCCTAGAC [SEQ ID NO: 24]

3'Tat: 5'TTCCTTCGGCCTGTCTGGC [SEQ ID NO: 25]

5'trTN: GCCGACAGGCCCGAAGGAAATGGTGGGTTTCCAGTCACAC [SEQ ID NO: 26]

3'Nef: GAATTCGGATCCTTAGCAGTTCTTGAAGTACTCCGG [SEQ ID NO: 27]

Los genes individuales se purificaron en gel y después se unieron por PCR para dar TmtrN usando los cebadores de los extremos. Después la fusión se hizo digerir con NotI y BamHI y se clonó en p7313-ie.

pRix32 (Figura 28)

Para generar la fusión que contiene p 17/24, se amplificó gp 120 por PCR a partir de ppg 120c usando los cebadores U1 y 3' 120, se amplificó p17/24-Nef a partir de p73i-GN2 usando los cebadores 5' 120G y 3' Nef, y los dos se unieron usando U1 y 3' Nef. p73i-GN2 contenía una secuencia de codones optimizados sintética de p17/p24 basada en la secuencia de HXB2 (GenBank entrada K03455) y se diseñó usando SynGene y se montó a partir de oligonucleótidos que se superponían como se ha descrito antes para gp120 de codones optimizados, fusionado con HXB2 Nef, que se había obtenido del plásmido pHXBDPr (B. Maschera, E. Furfine y E.D. Blair 1995, *J. Virol.* 69 5431-5436) por PCR. Puesto que el gen nef de HXB2 en este plásmido contiene un codón de terminación prematuro, se usaron dos PCR que se superponían para reparar el codón (TGA [parada] a TGG [Trp]). La posición del codón reparado está subrayada en la secuencia. Se insertó el gen p17/p24/Nef en los sitios NotI y BamHI del plásmido p7313ie. La secuencia codificante y el mapa se dan en la figura 10. A* marca la unión p24/trNef.

ES 2 328 685 T3

Cebadores:

U1:

GAATTCGCGGCCGCAATGAAGGTCAAGGAGACCAGAAAGAACTACCAGC
ATCTGTG [SEQ ID NO: 28]

3'120: TCTCTGCACGACGCGCGCTTGGC [SEQ ID NO: 29] 5'120G: GCCAAGCGCCGCGTCGTGGAGAGAAT-
GGGTGCCCCGAGCTTCGGTAC [SEQ ID NO: 30]
3'Nef: GAATTCGGATCCTTAGCAGTTCTTGAAGTACTCCGG [SEQ ID NO: 31]

Ciclo inicial:

94°C(30s) 20x[94°C (30s) 50°C (30s) 68°C (180s)] 68°C (120s) 4°C (0s)

Usando la polimerasa pfx con 1x potenciador:

Unión:

94°C(30s) 20x[94°C (30s) 50°C (30s) 72°C (180s)] 72°C (120s) 4°C (0s)

Usando la polimerasa Vent en las condiciones iniciales + MgCl₂ 2 mM.

El producto se cortó con NotI y BamHI y se clonó en p7313-ie.

Al secuenciar la construcción se encontró que había un error en el péptido señal, que se corrigió por transferencia del fragmento BstEII-KpnI de 2560 pb que contenía del final de gp120 al inicio de Nef, a pRix30.

pRix33 (Figura 11), pRix34 (Figura 29) y pRix35 (Figura 12)

El fragmento BstEII-KpnI de 2560 pb que contenía del final de gp120 al inicio de Nef se transfirió a pRix31, pRix11 y pRix29 para hacer los vectores pRix 33 (Figura 11), 34 y 35 (Figura 12), respectivamente.

pRix39 (gp120 de codones optimizados menos señal de secreción-p17/24 gag-Nef-Tat-Figura 13) y pRix40-47
(Las construcciones pRix 40-47 contienen gp120 no glicosilado, gag-p 17/24, Nef y fusiones Tat(m) con mutaciones en el sitio de miristoilación y/o patrón de dileucina de Nef).

Se amplificó por PCR un fragmento que contenía gag p17/24 a partir del vector pRix35, usando los cebadores:

5'120G: GCCAAGCGCCGCGTCGTGGAGAGAATGGGTGCCCCGAGCTTCGGTAC [SEQ ID NO: 32]
y
p24AS: CAACACTCTGGCTTTGTGTCC [SEQ ID NO: 33]

Nef de longitud completa se amplificó por PCR a partir de pNTm usando los cebadores:

5'p24-N: GGACACAAAGCCAGAGTGTGATGGGCAAGTGGTCAAAAAGTAG [SEQ ID NO: 34]
y
3'Nef: GAATTCGGATCCTTAGCAGTTCTTGAAGTACTCCGG [SEQ ID NO: 35]

Los 2 fragmentos se unieron entre sí por PCR usando los cebadores de los extremos (5'120G y 3'Nef). El producto se cortó con SalI y KpnI, y el fragmento de 423 pb que contenía parte de p24 y Nef se usó para sustituir el correspondiente fragmento en pRix35 para hacer pRix39 (Figura 13).

ES 2 328 685 T3

pRix40 (Figura 14) se construyó de forma similar, excepto que el cebador 5'p24-N se sustituyó por el cebador:

5'p24-Ndm:

GGACACAAAGCCAGAGTGTGATGGGCAAGTGGTCAAAAAGTAG [SEQ ID NO: 36]

G H K A R V L | M G K W S K S

Este cebador elimina una G para destruir el sitio de miristoilación al inicio de Nef.

pRix41-44, 46 y 47 (Figuras 15 a 20)

Las mutaciones en el patrón de dileucina de Nef (L174L175) se hicieron por PCR:

Para insertar las mutaciones, la parte de Nef 5' al patrón LL se amplificó por PCR usando el cebador de 5'Nef y como NefLL 5'Nef

5'Nef GAATTCGCGGCCGCCATGGGTGGCAAGTGGTCAAAAAG [SEQ ID NO: 37]

como NefLL (antisentido a)

GCCAATAAAGGAGAGAACACCAGC [SEQ ID NO: 38]

A N K G E N T S

Las mutaciones a L174, L175 o tanto 174 como 175, se generaron usando los cebadores directos:

sNefL1 (L174A)

GCCAATAAAGGAGAGAACACCAGCGCCTTACACCCTGTGAGCCTGCATG

A N K G E N T S | A L H P V S L H

[SEQ ID NO: 39]

sNefL2 (L175A)

GCCAATAAAGGAGAGAACACCAGCTTGGCACACCCTGTGAGCCTGCATG

A N K G E N T S | L a H P V S L H

[SEQ ID NO: 40]

sNefLL (LL174/5AA)

GCCAATAAAGGAGAGAACACCAGCGCCGCACACCCTGTGAGCCTGCATG

A N K G E N T S | A A H P V S L H

[SEQ ID NO: 41]

y el cebador 3'NT:

3'NT (antisentido a): GGGGAGCCGACAGGCCCGAAGGAA [SEQ ID NO: 42]

ES 2 328 685 T3

para amplificar la parte 3' de Nef. El producto de 5' y cada uno de los productos de 3' se unieron por PCR usando los cebadores 5'Nef y 3'NT. Estos se cortaron con KpnI y SpeI y se insertaron en pRix39 cortado de forma similar, para generar pRix41 (L174A), pRix42 (L175A), y pRix43 (LL174/175A) en ausencia de mutación del sitio de miristoilación, o en pRix40 para generar pRix44 (mLL174/175AA) pRix46 (mL174A) y pRix47 (mL175A) con la mutación del sitio de miristoilación.

pRix58 (Figura 21)

El fragmento de gp120 sin la secuencia señal se amplificó por PCR a partir de pgp120 usando los cebadores:

5' ds120 : GAATTCGCGGCCGCCATGGCCGAGCAGCTGTGGGTCACC [SEQ ID NO: 43]

3'120: (antisentido a): GCCAAGCGCCGCGTCGTGCAGAGA [SEQ ID NO: 44]

el extremo 5' de RT (de codones optimizados y que contenía la mutación inactivante W229K) se amplificó por PCR a partir de pt-rng (Figura 32-véase también el documento WO 03/025003) usando el cebador 5' para insertar una secuencia homóloga a 3'120, y un cebador dentro de RT

120RTf: GCCAAGCGCCGCGTCGTGCAGAGAATGGCCCCATCAGTCCCATC [SEQ ID NO: 45]

RT3SR1: CGTCACGATGTTACCTCCAGGCC [SEQ ID NO: 46]

Los dos productos se unieron por PCR usando los cebadores de los extremos, y se cortaron con NotI y NheI. El fragmento se purificó en gel y se usó para sustituir el fragmento NotI-NheI a partir de pT-rng.

pRix59 (Figura 22): el fragmento 3'Gag se amplificó por PCR a partir de pT-rng usando un cebador 5' al sitio MunI en p24 y un cebador 3' que codifica el inicio de ds120, que cubre la posición del sitio BstEII cerca del extremo 5':

GagMunf

GTGGCCCCGAGAGCTGCATCCG [SEQ ID NO: 47]

GAG120R (Antisentido a:)

Gag-----ds120

GGACACAAAGCCAGAGTGTTGATGGCCGAGCAGCTGTGGGTCACCGTC

[SEQ ID NO: 48]

El producto se cortó con MunI y BstEII, y se insertó en el fragmento de 7113 pb de pRix54 cortado con MunI-BstEII.

pRix48 y 49 (Figuras 30 y 31)

Los plásmidos pRix 48 y 49 son equivalentes a pRix39 y 41 excepto que contienen gp120 glicosilado. Para generar pRix48 y pRix49, los fragmentos NotI-SalI de pRix39 y pRix41 se sustituyeron por el fragmento equivalente de pRix32.

Resultados

Los datos de expresión se muestran en las figuras 33 y 35.

Se transfectaron monocapas de células 293T en placas de 24 pocillos con 1 μ g de cada ADN indicado usando Lipofectamina 2000 siguiendo el protocolo suministrado por el fabricante. Después de 24 horas, las células se desprendieron y se separaron del medio de cultivo por centrifugación. Se examinaron muestras equivalentes a 1×10^4 células o 12 μ l de medio por PAGE y transferencia Western.

La construcción gp 120c dio una proteína secretada muy glicosilada. La adición de fusiones Nef/Tat C-terminales (pRix 6 y pRix11) dio como resultado la reducción de los niveles de proteína intracelular y pérdida de secreción. La eliminación de la señal de secreción de gp120c (pRix12) dio una forma no secretada, no glicosilada de la proteína.

Como se esperaba, las construcciones de fusión sin señal de secreción pRix28, 29, 31, 33 y 35, hacían proteínas intracelulares no glicosiladas en cantidades similares, aunque la expresión de pRix35 se redujo algo. Sorprendentemente, cuando la señal de secreción estaba presente en las construcciones pRix30, 32 y 34, sólo pRix34 no fue secretado. Parece que la presencia de Tat en la fusión inhibe la secreción de la proteína. La construcción pRix32.1 inicial tenía una mutación puntual que daba como resultado una expresión pobre. Esto se corrigió en pRix32.7, que mostró una expresión muy mejorada.

Para pRix40-47 la transferencia Western de la figura 35 muestra la expresión de las fusiones dsGp120/Gag/Nef/Tat con mutaciones en Nef en células 293T 24 horas después de transfección con los plásmidos indicados. Los extractos celulares totales equivalentes a $\sim 1 \times 10^4$ células se cargaron en el gel. La transferencia se hibridó con un antisuero anti-nef.

Para pRix48-49 la transferencia Western de la figura 35 muestra la expresión de las fusiones gp120/Gag/Nef/Tat con gp120 glicosilado en células 293T 24 horas después de la transfección con los plásmidos mostrados. Los extractos celulares totales equivalentes a $\sim 1 \times 10^4$ células se cargaron en el gel. La transferencia se hibridó con un antisuero anti-nef.

Igualmente, los datos de expresión (anti-Nef) para las proteínas de fusión cuadrivalentes que contienen RT, Nef, Gag y dsGp120, comparados con la expresión de fusión solo de RT, Nef, Gag, se muestran en la figura 35.

Referencias

Andre S. Seed B. Eberle J. Schraut W. Bultmann A. Haas J. (1998) "Increased immune response elicited by DNA vaccination with a synthetic gp120 sequence with optimized codon usage". *Journal of Virology*. 72(2): 1497-503.

Vinner L. Nielsen HV. Bryder K. Corbet S. Nielsen C. Fomsgaard A. (1999) "Gene gun DNA vaccination with Rev-independent synthetic HIV-1 gp160 envelope gene using mammalian codons". *Vaccine*. 17(17):2166-75.

Collins KL. Baltimore D. (1999) "HIV's evasion of the cellular immune response". *Immunological Reviews*. 168: 65-74.

Ejemplo 5

Preparación de "suspensión de oro" recubierta de plásmido para cartuchos de ADN de "pistola de genes"

Se suspendió ADN plasmídico (aproximadamente $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$), p. ej. $100 \mu\text{g}$, y partículas de oro de $2 \mu\text{m}$, p. ej. 50 mg , (PowderJect), en espermidina $0,05 \text{ M}$, p. ej. $100 \mu\text{l}$, (Sigma). El ADN se hizo precipitar sobre las partículas de oro por adición de CaCl_2 1 M , p. ej. $100 \mu\text{l}$ (American Pharmaceutical Partners, Inc., EE.UU.). El complejo de ADN/oro se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente, se lavó 3 veces en etanol absoluto, p. ej., $3 \times 1 \text{ ml}$, (previamente secado con tamices moleculares de 3A (BDH)). Las muestras se volvieron a suspender en etanol absoluto que contenía polivinilpirrolidona $0,05 \text{ mg/ml}$ (PVP, Sigma), y se dividieron en 3 partes alícuotas en tubos de microfuga de $1,5 \text{ ml}$ (Eppendorf). Las partes alícuotas se usaron para el análisis de (a) "suspensión de oro", (b) eluato-plásmido eluido de (a) y (c) para preparar cartuchos de Tefzel recubierto de oro/plásmido para la "pistola de genes" (véase el siguiente ejemplo 3). Para preparar las muestras para (a) y (b), los tubos que contienen el ADN plasmídico/"suspensión de oro" en etanol/PVP se centrifugaron durante 2 minutos a velocidad máxima en un dispositivo de microfuga Eppendorf 5418, se separó el líquido sobrenadante y la "suspensión de oro" se secó durante 10 minutos a temperatura ambiente. La muestra (a) se volvió a suspender a $0,5\text{-}1,0 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ de ADN plasmídico en TE pH 8,0, suponiendo un recubrimiento de aproximadamente 50%. Para la elución, la muestra de (b) se volvió a suspender a $0,5\text{-}1,0 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ de ADN plasmídico en TE pH 8,0, y se incubó a 37°C durante 30 minutos, agitando vigorosamente, y después se centrifugó durante 2 minutos a velocidad máxima en un dispositivo de microfuga Eppendorf 5418 y el líquido sobrenadante, eluato, se separó y se almacenó a -20°C . La concentración de ADN exacta eluida se determinó por cuantificación espectrofotométrica usando un Genequant II (Pharmacia Biotech).

Ejemplo 6

Preparación de los cartuchos para inmunización con ADN

La preparación de los cartuchos para el dispositivo de transferencia de genes AcceII se hizo como se ha descrito antes (Eisenbraun y col. *DNA and Cell Biology*, 1993 Vol 12 No 9 pp 791-797; Pertner y col.). Brevemente, el ADN plasmídico se aplicó como recubrimiento sobre partículas de oro de $2 \mu\text{m}$ (DeGussa Corp., South Plainfield, N.J., EE.UU.) y se cargaron en tubos Tefzel, que posteriormente se cortaron en longitudes de $1,27 \text{ cm}$ para servir como cartuchos y se almacenaron desecados a 4°C hasta su uso. En una vacunación típica, cada cartucho contenía $0,5 \text{ mg}$ de oro recubierto, con un total de $0,5 \mu\text{g}$ de ADN/cartucho.

Ejemplo 7

Inmunizaciones por PMID que incluyen el uso de la fusión triple gp120-Nef-Tat que carece de la señal de secreción de gp120

Protocolo: Para las inmunizaciones por PMID se prepararon cartuchos (ADN) preparados usando los procedimientos estándar como se han descrito en los ejemplos 5 y 6. Se usó una tasa de carga de ADN de 2, que dará aproximadamente 0,5 µg de ADN/cartucho y cada inmunización consistía en 2 disparos. Se administró a ratones Balb/c una inmunización primera de ADN (usando PMID). Se administró refuerzo a los ratones 28 días después con ADN (usando PMID). Los ratones se sacrificaron 7 días después y se recogió el suero y los bazo. Se recogieron los esplenocitos separando las células del bazo y se lisaron los eritrocitos. Los esplenocitos se lavaron y contaron. Se usaron placas ELISpot especializadas (recubiertas con anticuerpo de captura de interferón gamma y bloqueadas). Los esplenocitos se transfirieron a estas placas y se incubaron durante la noche a 37°C/CO₂ al 5% en presencia de un péptido gp120, péptido RT o péptido Gag. Los esplenocitos se lisaron y la placa se reveló usando procedimientos estándar para demostrar el número de células secretoras de interferón gamma presentes. El suero se analizó por ensayo ELISA para detectar los anticuerpos específicos. Los resultados se dan en las figuras 36-38.

Conclusión

De forma inesperada, la respuesta inmunitaria celular de ratones inmunizados con ds-gp120 (gp120 que carecían de la señal de secreción) que expresaban las construcciones, era aproximadamente el doble que la de los ratones inmunizados con las construcciones gp120 (véase la figura 36 y 37). Esto estaba de acuerdo con la observación de que en los estudios de transfección *in vitro*, la expresión de ds-gp120 permanecía en gran medida asociada a la célula, mientras que gp 120 se había excretado.

La inclusión de Tat (Tat mutado) en las construcciones ds-gp120 aumentaron la respuesta inmunitaria celular al doble que la de las construcciones ds-gp120 sin Tat (figuras 36 y 37). Tat por sí mismo no afectaba a la respuesta inmunitaria de gp120, pero actuaba de forma sinérgica con ds-gp120 para optimizar la respuesta celular.

La inclusión de otros antígenos de VIH en las construcciones produjo una respuesta celular equilibrada a todos los antígenos diferentes incluidos y por lo tanto ampliaban la respuesta inmunitaria comprado con los vectores de gp120 solos (figura 38).

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica la proteína de la envuelta del VIH gp120, en el que gp120 no es glicosilada cuando se expresa en una célula objetivo de mamífero, y en el que gp120 carece de una señal de secreción funcional, unida a una secuencia que codifica RT de VIH, Gag de VIH y Nef de VIH, operativamente unida a un promotor heterólogo, para codificar una proteína de fusión que contiene gp120, RT, Gag y Nef.
2. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la fusión se selecciona de gp120-RT-Nef-Gag y RT-Nef-Gag- gp120.
3. El polinucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que Gag comprende p17 y/o 24.
4. El polinucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que una o más de las secuencias que codifican gp120, Nef, Gag o RT tiene o tienen codones optimizados para parecerse al uso de codones en un gen humano altamente expresado.
5. El polinucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el promotor es el promotor del gen HCMV IE.
6. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la región 5' no traducida entre el promotor y el polinucleótido codificante comprende el exón 1 del gen HCMV IE.
7. Un vector que comprende un polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
8. El vector de acuerdo con la reivindicación 7, que es un plásmido de ADN bicatenario.
9. El vector de acuerdo con la reivindicación 7, que es un vector de adenovirus de replicación defectuosa.
10. El vector de acuerdo con la reivindicación 9, que deriva de Pan 9, 5, 6 ó 7.
11. Una proteína de fusión que comprende la proteína de la envuelta del VIH gp120, RT de VIH, Gag de VIH y Nef de VIH, en la que gp120 no es glicosilada cuando se expresa en una célula objetivo de mamífero y en la que gp120 carece de una señal de secreción funcional.
12. Una proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 11, en la que la fusión se selecciona de gp120-RT-Nef-Gag y RT-Nef-Gag-gp120.
13. Una composición farmacéutica que comprende una secuencia de nucleótidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, un vector de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, o una proteína de fusión de la reivindicación 11 u 12, y un excipiente, diluyente, vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable.
14. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 13, en la que el vehículo es una pluralidad de partículas tales como perlas de oro.
15. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 13 ó 14, para suministrar en un formato de sensibilización-refuerzo.
16. Un dispositivo de suministro intradérmico que comprende una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15.
17. Un polinucleótido o un vector o proteína de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para usar en medicina.
18. Uso de un polinucleótido o un vector o proteína de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la fabricación de un medicamento para la profilaxis y el tratamiento de la infección por el VIH y SIDA.
19. Un procedimiento para producir un polinucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende unir una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de la proteína de la envuelta del VIH gp120, en la que gp120 no es glicosilada cuando se expresa en una célula objetivo de mamífero, y en la que gp120 carece de una señal de secreción funcional, y una secuencia que codifica RT de VIH, Gag de VIH y Nef de VIH, a una secuencia promotora heteróloga.

Fig.1.

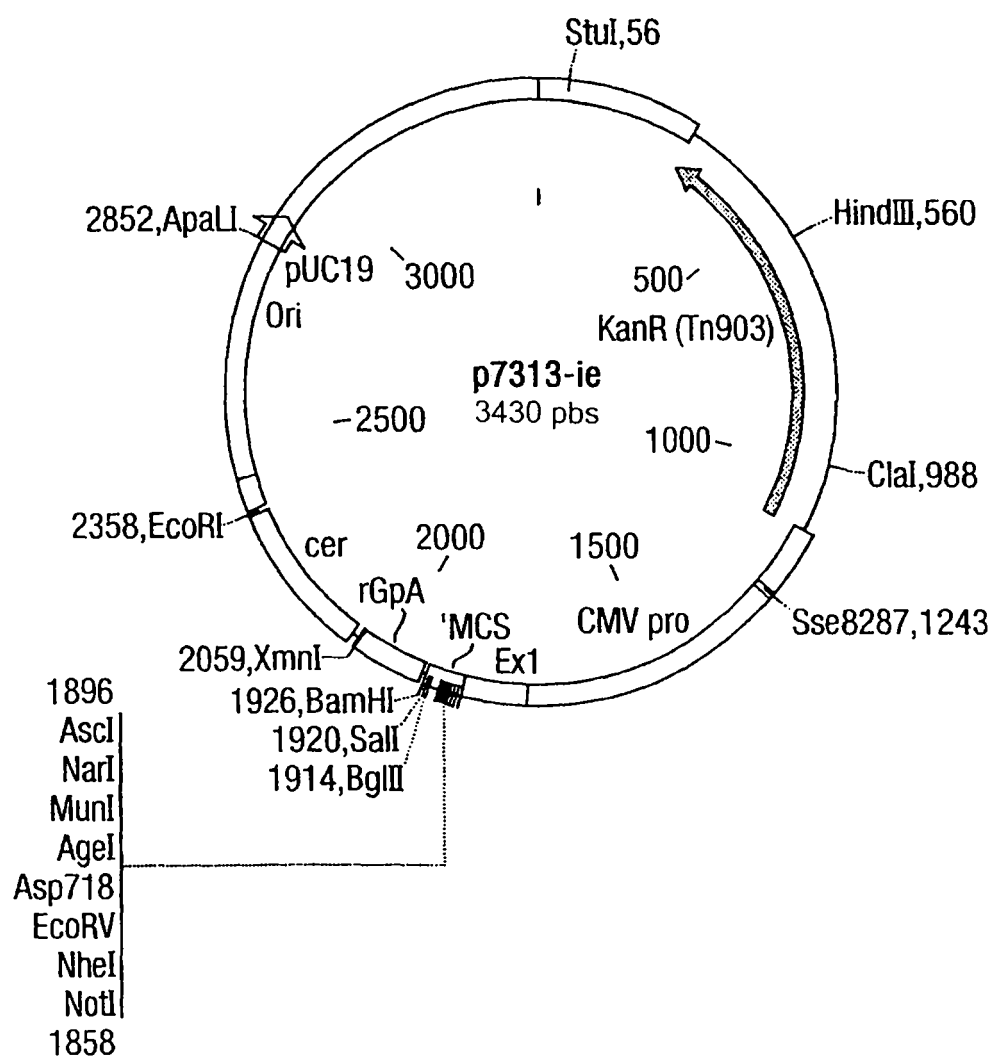
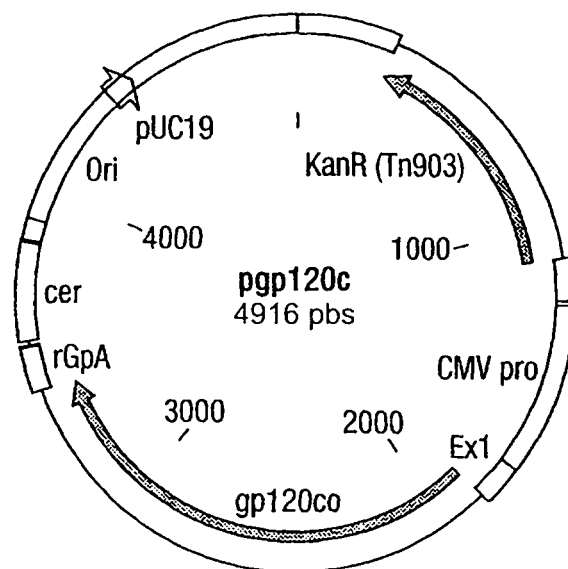


Fig.2.

Mapa de pgp 120c:



A continuación está la secuencia de aminoácidos de gp120 de W61D. La secuencia señal está subrayada y en negrilla, hasta el sitio de escisión previsto entre los aminoácidos 29 y 30. Esta es la secuencia eliminada en dsGP120 (pRix12 etc).

MKVKE TRKNYQHLWRWG TMLLGM LMC SAAEQLWVTVYYGVPVWKEATTTLFCASDAKAYDTEVHNWATH
 ACVPTDPNPQEVVLGNVTEYFNMWKNNMVDQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLDCDDVNTNSTTTT
 SNGWTGEIRKGEIKNCSFNITTSIRDKVQKEYALFYNLDVVPIDDDNATTKNKTTRNFRLIHCNSSVMTQA
 CPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCNKTFDGGKGLCTNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGSLAEDEVVIRSD
 NFMNDNTKTIIIVQLNESVAINCTRPNNNTRKGIHIGPGRFYAARKIIGDIRQAHCNLSRAQWNNTLKQIVI
 KLREHFGNKTIFNQSSGGDPEIVRHSFNCGGEFFYCDTTQLFNSTWNGTEGNNTGNSTITLPCRICKQII
 NMWQEVGKAMYAPPIGGQIRCSSNITGLLLTRDGGTEGNGTENETEIFRPGGGDMRDNRSELYKYKVVKV
 EPLGVAPTRAKRRVVQR [SEQ ID NO: 49]

La secuencia de ADN de codones optimizados para el gen gp120 de W61D es:

ATGAAGGTCAAGGAGACCAGAAAGAACTACCAGCATCTGTGGCGCTGGGGCACCATGCTCCTGGGAATGCT
 GATGATCTGCTCCGCCGCGAGCAGCTGTGGGTACCGTCTACTACGGCGTGCCTGTGTGGAAGGAGGCCA
 CGACCACCTCTTCTGCGCGAGCGACGCCAAGGCCTACGACACGGAAGTGCATAACGTGTGGGCGACGCAT
 GCTTGCCTGCTTACGGACCCCAACCCCCAGGAGGTGGTGTGTTGGAACGTGACCGAGTACTTCAACATGTG
 GAAGAATAACATGGTGGATCAGATGCACGAGGACATCATCTCTGTGGGACCACTCCCTGAAGCCCTGCG
 TGAAGCTGACGCCTCTTGCCTGACACTGGACTGTGACGACGTCAACACCACCAACAGCACTACCACCACC
 AGCAACGGCTGGACCGGAGAGATTCCGAAGGGCGAGATCAAGAACTGCTCCTTCAATATCAGCACTCGAT
 CAGAGACAAGGTGCAGAAGGAATACGCGCTGTTTATAATCTCGATGTGGTCCCCATCGACGACGACAATG
 CCACCACCAAGAACAAGACGACGCGTAATTTCAGACTCATTCACTGCAACAGCAGCGTCATGACGCGAGGCC
 TGCCCCAAGGTGTCTTTCGAACCAATCCCGATCCATTACTGTGCCCCGCGGATTCCGATCCTCAAGTG
 TAACAACAAGACCTTCGACGGGAAGGCCTGTGCACCAACGTGACGCGGTGCAGTGACCCATGGCATCC

Fig.2 (Cont).

GCCCCGTCGTGAGCACCCAGCTGCTGCTGAACGGGTCCCTGGCTGAGGAGGAGGTGGTGATCCGGTCCGAC
 AACTTCATGGACAACACCAAGACAATCATCGTCCAGCTGAACGAGTCTGTGGCGATTAAGTGTACCCGGCC
 TAACAACAACACCCGTAAGGGCATCCACATCGGGCCTGGACGGGCCTTCTATGCCGCCGCAAGATCATCG
 GCGACATCCGGCAGGCCCCATTGCAACCTCTCCCGCGCCAGTGGAATAACACCCTGAAGCAGATCGTGATC
 AAGCTGAGAGAGCACTTTGGAACAAGACCATCAAGTTCAATCAGAGTTC'TGGCGGAGACCCGAGATCGT
 GCGGCACTCCTTCAACTGCGGGGGCGAGTTCTTCTACTGCGATACGACACAGCTCTTCAACTCCACCTGGA
 ACGGCACCGAGGGCAACAACACAGAGGGAACTCCACTATCACCTCCCTTGCCGCATCAAGCAGATCATC
 AACATGTGGCAGGAGGTGGGAAAGGCCATGTATGCCCCCCCCATCGGGGGCCAGATCCGCTGCTCCTCCAA
 CATCACCGGCCTGCTGCTCACCAGAGACGGGGGCACCGAGGGCAACGGCACGGAGAACGAGACGGAGATCT
 TCAGGCCCCGGCGGGCGACATGAGGGATAACTGGCGGAGCGAGCTGTACAAGTACAAGGTGGTGAAGGTG
 GAGCCGCTCGGCGTGGCCCCCACCCGGGCCAAGCGCCGCTCGTGCAGAGATGA [SEQ ID NO: 50]

Fig.3.

Mapa de pRix15244:

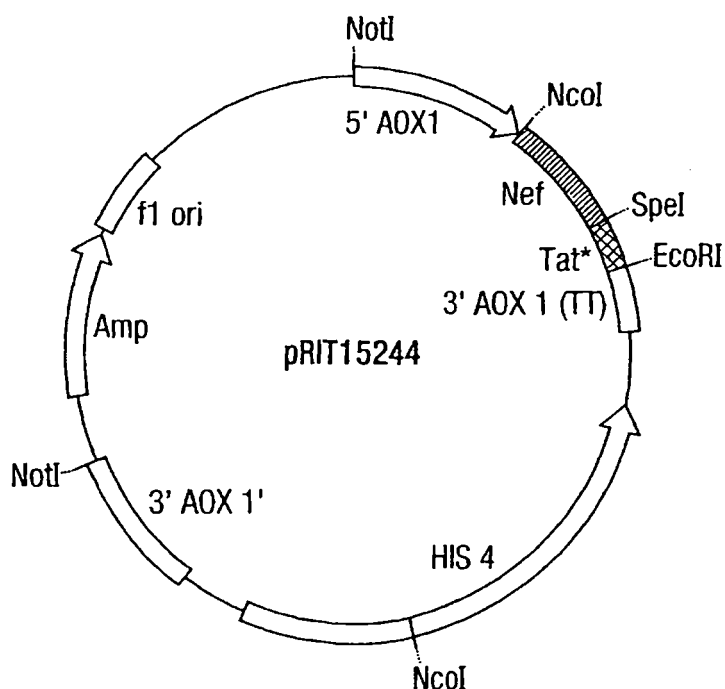
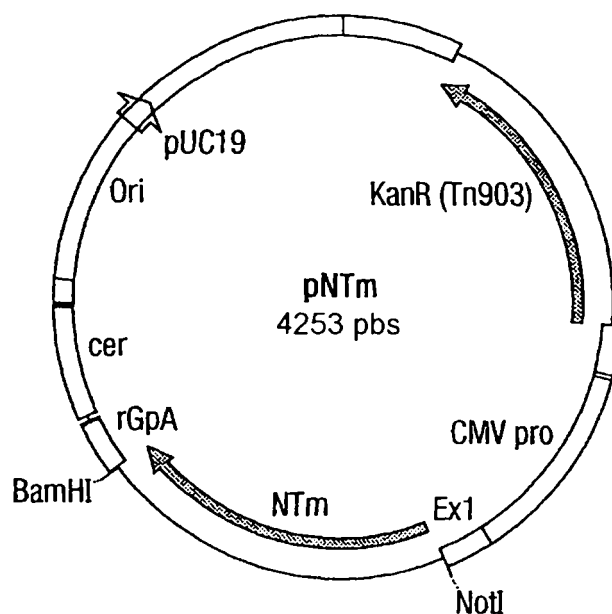


Fig.4.

Plásmido pNTm:



Secuencia del inserto:

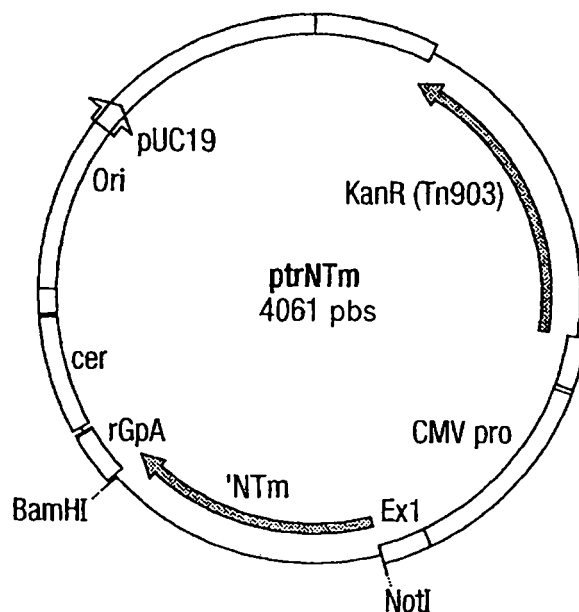
ATGGGTGGCAAGTGGTCAAAAAGTAGTGTGGTTGGATGGCCTACTGTAAAGGGAAGAATGAGACGAGCTGA
 GCCAGCAGCAGATGGGGTGGGAGCAGCATCTCGAGACCTGGAAAAACATGGAGCAATCACAAGTAGCAATA
 CAGCAGCTACCAATGCTGCTTGTGCTGGCTAGAAGCACAAGAGGAGGAGGAGGTGGGTTTCCAGTCACA
 CCTCAGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTAAAAAGAAAAGGG
 GGGACTGGAAGGGCTAATTCACCTCCCAACGAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGGATCTACCACACACAAG
 GCTACTTCCCTGATTGGCAGAACTACACACCAGGGCCAGGGGTCAGATATCCACTGACCTTTGGATGGTGC
 TACAAGCTAGTAGCCAGTTGAGCCAGATAAGGTAGAGAGAGCAAGTGTAGAGTGGAGGTTTGACAGCCGCTAG
 CCCTGTGAGCCTGCATGCAATGGATGACCCTGAGAGAGAAAGTGTAGAGTGGAGGTTTGACAGCCGCTAG
 CATTTCATCACGTGGCCCGAGAGCTGCATCCGGAGTACTTCAAGAACTGCACTAGTGAGCCAGTAGATCCT
 AGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAGTCAGCCTAAAGTCTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTG
 TTGCTTTTCATTGCAAGTTTGTTCATAACAGCTGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGGAGAC
 AGCGACGAAGACCTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAACCCACCTCCCAATCC
 AAAGGGGAGCCGACAGGCCCGAAGGAATAA [SEQ ID NO: 51]

Secuencia de aminoácidos del antígeno:

MGGKWSKSSVVGWPTVRERMRAEPAADGVGAASRDLEKHGAITSSNTAATNAACAWLEAQEE
 EEVGFPVTPQVPLRPMYKAAVDLSHFLKEKGGLEGLIHSQRRQDILDWLYHTQGYFPDWQNYT
 PGPVRYPLTFGWYKLVPEPDKVEEANKGENTSLLHPVSLHGMDDPEREVLEWRFSRLAFH
 HVARELHPEYFKNCTSEPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFITAAALGISYGRK
 KRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSKGEPTGPKE [SEQ ID NO: 52]

Fig.5.

Plásmido ptrNTm:



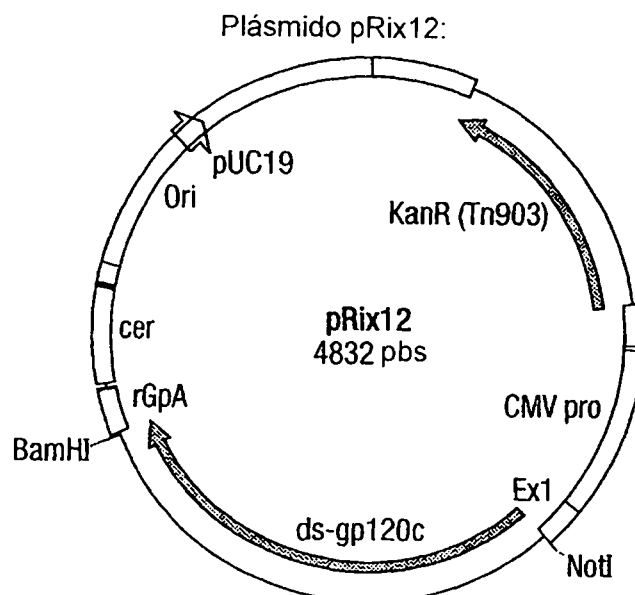
Secuencia del inserto:

ATGGTGGGTTTTCAGTCACACCTCAGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAG
 CCACCTTTTAAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCACCTCCCAACGAAGACAAGATATCCTTGATC
 TGTGGATCTACCACACACAAGGCTACTTCCCTGATTGGCAGAACTACACACCAGGGCCAGGGGTCAGATAT
 CCACTGACCTTTGGATGGTGCTACAAGCTAGTACCAGTTGAGCCAGATAAGGTAGAAGAGGCCAATAAAGG
 AGAGAACACCAGCTTGTACACCTGTGAGCCTGCATGGAATGGATGACCTGAGAGAGAAGTGTAGAGT
 GGAGGTTTGACAGCCGCCTAGCATTTTCATCACGTGGCCCCGAGAGCTGCATCCGGAGTACTTCAAGAACTGC
 ACTAGTGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAGTCAGCCTAAAAGTGCCTTGATC
 CAATTGCTATTGTAAAAAGTGTGCTTTTCATTGCCAAGTTTGTTCATAACAGCTGCCTTAGGCATCTCCT
 ATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCA
 AAGCAACCCACCTCCCAATCCAAAGGGGAGCCGACAGGCCCGAAGGAATAA [SEQ ID NO: 53]

Secuencia de aminoácidos del antígeno:

MVGFPVTPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGLEGLIHSQRRQDILDWYHTQGYFPDWQNYTPGPGVRY
 PLTFGWICYKLVPVEPKVEEANKGENTSLHHPVSLHGMDDPEREVLEWRFD SRLAFHHVARELHPEYFKNC
 TSEPVDPRLPEPWKHPGSQPKTACTNICYCKKCCFHCQVCFITAALGISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVSL
 KQPTSQSKGEPTGPKE [SEQ ID NO: 54]

Fig.6.



Secuencia del inserto:

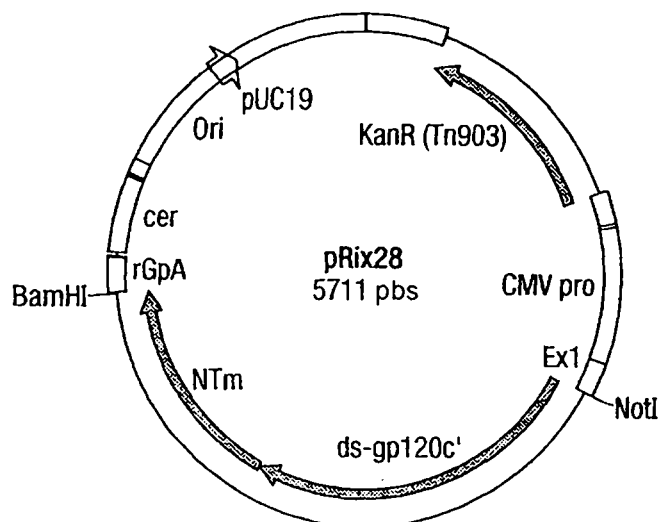
ATGGCCGAGCAGCTGTGGGTACCGTCTACTACGGCGTGCCTGTGTGGAAGGAGGCCACGACCACCTCTT
 CTGCGCGAGCGACGCCAAGGCTACGACACGGAAGTGCATAACGTGTGGCGGACGCATGCTTGCGTGCCTA
 CGGACCCCAACCCCAAGGAGGTGGTGTGGGAAACGTGACCGAGTACTTCAACATGTGGAAGAATAACATG
 GTGGATCAGATGCACGAGGACATCATCTCTGTGTGGGACCAGTCCCTGAAGCCCTGCGTGAAGCTGACGCC
 TCTCTGCGTGACACTGGACTGTGACGACGTCAACACCACCAACAGCACTACCACCACCAGCAACGGCTGGA
 CCGGAGAGATTGGAAGGGCGAGATCAAGAAGTCTCTTCAATATCAGCACTCGATCAGAGACAAGGTG
 CAGAAGGAATACCGCTGTCTTTAATCTCGATGTGGTCCCATCGACGACGACAATGCCACCACCAAGAA
 CAAGACGACGCGTAATTTCACTGCAACAGCAGCGTCATGACCGAGGCTGCCCAAGGTGT
 CCTTCGAACCAATCCCGATCCATTACTGTGCCCTGCCGGATTCCGCGATCCTCAAGTGTAAACAACAGACC
 TTCGACGGGAAGGGCTGTGCACCAACGTCAGCAGCGTGAGTGCACCATGGCATCCGCCCCGTCGTGAG
 CACCCAGCTGCTGCTGAACGGGTCCCTGGCTGAGGAGGAGTGGTGATCCGCTCGGACAACCTTCATGGACA
 ACACCAAGACAATCATCGTCCAGCTGAACGAGTCTGTGGCGATTAACTGTACCCGGCCCTAACCAACACACC
 CGTAAGGGCATCCACATCGGGCTGGACGGGCTTCTATGCCGCGCCGCAAGATCATCGGCGACATCCGGCA
 GGCCATTGCAACCTCTCCCGCGCCAGTGGGAATAACACCTGAAGCAGATCGTGATCAAGCTGAGAGAGC
 ACTTTGGAACAAGACCATCAAGTTCAATCAGAGTCTTGGCGGAGACCCGAGATCGTGCGGCACTCCTTC
 AACTGCGGGGGCGAGTTCTTCTACTGCGATACGACACAGCTCTTCAACTCCACCTGGAACGGCACCGAGGG
 CAACAACACAGAGGGAAGTCCACTATCACCTCCCTTGCCGATCAAGCAGATCATCAACATGTGGCAGG
 AGGTGGGAAGGCCATGTATGCCCCCCCCATCGGGGCGGATCCGCTGCTCCTCCAACATCACCGGCTG
 CTGCTCACCAGACACGGGGCACCGAGGGCAACGGCACGGAGAACGAGACGGAGATCTTCAGGCCCGGCGG
 CGGCGACATGAGGGATAACTGGCGGAGCGAGCTGTACAAGTACAAGGTGGTGAAGGTGGAGCCGCTCGGCG
 TGGCCCCCACCGGGCAAGCGCCGCTCGTGCAGAGATGA [SEQ ID NO: 55]

Secuencia de aminoácidos del antígeno:

MAEQLWVTVYYGVFPVWKEATTLFCASDAKAYDTEVHNWATHACVPTDPNPQEVVLGNVTEYFNMWKNNM
 VDQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLDCDDVNTNSTTTTNSNGWTGEIRKEIKNCSFNITTSIRDKV
 QKEYALFYNLDVVPIDDDNATTKNKTTRNFRLLHCNSSVMTQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCNKNT
 FDGKGLCTNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLLNGSLAEEVVIRSDNFMONTKTIIVQLNESVAINCTRPNNNT
 RKGIIHIGPGRAFYAARKIIGDIRQAHCNLSRAQWNNLTQIVIKLREHFGNKTIFNQSSGGDPEIVRHSF
 NCGGEFFYCDTTLFNSTWNGTEGNTEGNSTITLPCRICKIINMWQEVGKAMYAPPIGGQIRCSNITGL
 LLTRDGGTEGNTENETEIFRPGGDMRDNRSELYKYKVVKVEPLGVAPTRAKRRVVQR [SEQ ID
 NO: 56]

Fig.7.

Plásmido pRix28:



Secuencia del inserto:

ATGCCGAGCAGCTGTGGGTACCGTCTACTACGGCGTGCTGTGTGGAAGGAGGCCACGACCACCTCTT
 CTGCGCGAGCGACGCCAAGGCTTACGACACGGAAGTGCATAACGTGTGGCGACGCATGCTTGCCTGCCCTA
 CGGACCCCAACCCCGAGGCTGGTGTCTGGAAACGTGACCGAGTACTTCAACATGTGGAAGAATAACATG
 GTGGATCAGATGCACGAGGACATCATCTCTCTGTGGGACAGTCCCTGAAGCCCTGCGTGAAGCTGACGCC
 TCTCTGCGTGACACTGGACTGTGACGACGTCAACACCACCAACAGCACTACCACCACCAGCAACGGCTGGA
 CCGGAGAGATTCCGAAGGGCGAGATCAAGAATGCTCTTCAATATCAGGACCTCGATCAGAGACAAGGTG
 CAGAAGGAATACGCGCTGTTTTATAATCTCGATGTGGTCCCATCGACGACGACAATGCCACCACCAAGAA
 CAAGACGACGCGTAATTTCACTTCACTGCAACAGCAGCGTCAAGCAGGCGCTGCCCAAGGTGT
 CCTTCGAACCAATCCCGATCCATTACTGTGCCCTGCGGATTTCGGATCTCTAAGTGTAAACAACAAGACC
 TTCGACGGGAAGGGCTGTGCACCAACGTGACGACGGTGCAGTGACCCATGGCATCCGCCCGCTCGTGAG
 CACCCAGCTGCTGCTGAACGGGTCCCTGGCTGAGGAGGAGGTGGTGTATCCGGTCCGACAACCTCATGGACA
 ACACCAAGACAATCATCGTCCAGCTGAACGAGTCTGTGGCGATTAACTGTACCCGCCCTAACAACAACACC
 CGTAAGGGCATCCACATCGGGCTGGACGGGCTTCTATGCCGCCCGCAAGATCATCGGCGACATCCGGCA
 GGCCCATTTGCAACCTCTCCGCGCCAGTGGATAACACCCTGAAGCAGATCGTGATCAAGCTGAGAGAGC
 ACTTTGGAACAAGACCATCAAGTTCAATCAGAGTTCTGGCGGAGACCCGAGATCGTGGCGCACTCCTTC
 AACTGCGGGGGCGAGTTCTTCTACTGCGATACGACACAGCTCTTCAACTCCACCTGGAACGGCACCAGGG
 CAACAACACAGAGGGGAACTCCACTATCACCTCCCTTGGCGCATCAAGCAGATCATCAACATGTGGCAGG
 AGGTGGGAAAGGCCATGTATGCCCGCCCATCGGGGGCCAGATCCGCTGCTCCTCCAACATCACCGGCTG
 CTGCTCACGAGAGACGGGGCACCGAGGGCAACGGCACGGAGAACGAGACGGAGATCTTACGGCCCGGCGG
 CGGCGACATGAGGGATAACTGGCGGAGCGAGCTGTACAAGTACAAGGTGGTGAAGGTGGAGCCGCTCGGCG
 TGGCCCCACCCGGGCCAAGCGCCGCGTCTGTGACAGAAATGGGTGGCAAGTGGTCAAAAAGTAGTGTGGTT
 GGATGGCTTACTGTAAGGGAAAGAATGAGACGAGCTGAGCCAGCAGCAGATGGGGTGGGAGCAGCATCTCG
 AGACCTGGAAAAACATGGAGCAATCACAAGTAGCAATACAGCAGCTACCAATGCTGCTTGTGCTGGCTAG
 AAGCACAAGAGGAGGAGGAGGTGGGTTTTCCAGTCACACCTCAGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAG
 GCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGAGTGGAGGGCTAATTCATCCCAACGAAG
 ACAAGATATCCTTGATCTGTGGATCTACCACACACAAGGCTACTTCCCTGATTGGCAGAACTACACACCAG
 GGCCAGGGGTGAGATATCCACTGACCTTTGGATGGTGTACAAGCTAGTACCAGTTGAGCCAGATAAGGTA
 GAAGAGGCCAATAAAGGAGAGAACACCAGCTTGTACACCTGTGAGCCTGCATGGAATGGATGACCTGA
 GAGAGAAGTGTAGAGTGGAGGTTTGACAGCCGCTTAGCATTTTCATCAGTGGCCCGAGAGCTGCATCCCG
 AGTACTTCAAGAATGCACTAGTGAGCCAGTAGATCTTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAGTCAG

Fig.7 (Cont).

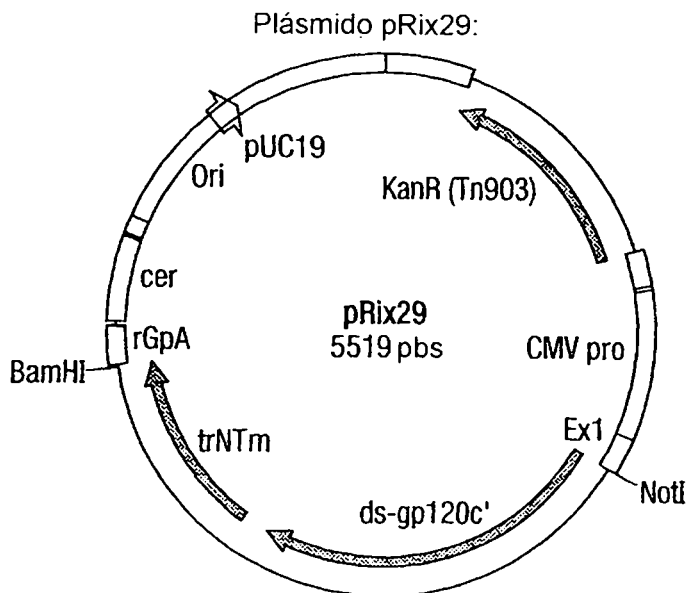
CCTAAAACTGCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTGCTTTCATTGCCAAGTTGTTTCATAACAGC
TGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGGCAGTCAGACTC
ATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAACCCACCTCCCAATCCAAAGGGGAGCCGACAGGCCCGAAGGAATAA

[SEQ ID NO: 57]

Secuencia de aminoácidos del antígeno:

MAEQLWVTVYYGVPVWKEATTLFCASDAKAYDTEVHNWATHACVPTDPNPQEVVLGNVTEYFNMWKNNM
VDQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLDCDDVNTTNSTTTTNGWTGEIRKGEIKNCSEFNITTSIRDKV
QKEYALFYNLDVVPIDDDNATTKNKTTRNFRLIHCNSSVMTQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCNKNT
FDGKGLCTNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLLNGSLAEEEVVIRSDNFMNTKTIIIVQLNESVAINCTRPNNT
RKGIIHIGPGRAFYAARKIIGDIRQAHCNLSRAQWNNTLKQIVIKLREHFGNKTIFNQSSGGDPEIVRHSF
NCGGEFFYCDTTQLFNSTWNGTEGNNTTEGNSTITLPCRIKQIINMWQEVGKAMYAPPIGGQIRCSSNITGL
LLTRDGGTEGNGTENETEIFRPGGDMRDNRSELYKYKVVKVEPLGVAPTRAKRRVVQRMGGKWSKSSVV
GWPTVRERMRAEPAADGVGAASRDLEKHGAITSSNTAATNAACAWLEAQEEEEVGFPVTPQVPLRPMTYK
AAVDLSHFLKEKGGLEGLIHSQRRQDILDWLYHTQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWCYKLPVEPKV
EEANKGENTSLHPVSLHGMDPEREVLEWRFD SRLAFHHVARELHPEYFKNCTSEPVDPRLPEWKHPGSQ
PKTACTNICYCKCCFHCQVCFITAALGISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSKGEPTGPKE
[SEQ ID NO: 58]

Fig.8.



Secuencia del inserto:

```

ATGGCCGAGCAGCTGTGGGTACCGTCTACTACGGCGTGCCGTGTGTGAAGGAGGCCACGACCACCCCTCTT
CTGCGCGAGCGACGCCAAGGCCCTACGACACGGAAGTGCATAACGTGTGGGCGACGCATGCTTGCGTGCCTA
CGGACCCCAACCCCGAGGAGGTGGTGCTGGGAAACGTGACCGAGTACTTCAACATGTGGAAGAATAACATG
GTGGATCAGATGCACGAGGACATCATCTCTCTGTGGGACCAGTCCCTGAAGCCCTGCGTGAAGCTGACGCC
TCTCTGCGTGACACTGGACTGTGACGACGCTCAACACCACCAACAGCACTACCACCACCAGCAACGGCTGGA
CCGGAGAGATTTCGAAGGGCGAGATCAAGAACTGCTCCTTCAATATCACGACCTCGATCAGAGACAAGGTG
CAGAAGGAATACGCGCTGTTTATAATCTCGATGTGGTCCCATCGACGACGACAATGCCACCACCAAGAA
CAAGACCACGCGTAATTTTCAGACTCATTCACTGCAACAGCAGCGTCATGACGCAGGCCTGCCCAAGGTGT
CCTTCGAACCAATCCCGATCCATTACTGTGCCCTGCCGATTCCGCGATCCTCAAGTGTAACAACAAGACC
TTCGACGGGAAGGGCCTGTGCACCAACGTGACGACGGTGCAGTGCACCCATGGCATCCGCCCGCTCGTGAG
CACCAGCTGCTGCTGAACGGGTCCCTGGCTGAGGAGGAGGTGGTGATCCGGTCCGACAACCTTCATGGACA
ACACCAAGACAATCATCGTCCAGCTGAACGAGTCTGTGGCGATTAACTGTACCCGGCCTAACAACAACACC
CGTAAGGGCATCCACATCGGGCCTGGACGGGCCCTTCTATGCCGCCCGCAAGATCATCGGCGACATCCGGCA
GGCCCATTGCAACCTCTCCCGCGCCAGTGGAAATAACACCCTGAAGCAGATCGTGATCAAGCTGAGAGAGC
ACTTTGGAAACAAGACCATCAAGTTCAATCAGAGTTCTGGCGGAGACCCCGAGATCGTGCGGCACCTCCTTC
AACTGCGGGGCGAGTTCTTCTACTGCGATACGACACAGCTCTTCAACTCCACCTGGAACGGCACCAGGGG
CAACAACACAGAGGGAACTCCACTATCACCTCCCTTGCCGATCAAGCAGATCATCAACATGTGGCAGG
AGGTGGGAAAGGCCATGTATGCCCCCCCATCGGGGGCCAGATCCGCTGCTCCTCCAACATCACCGGCCCTG
CTGCTCACCAGAGACGGGGCACCGAGGGCAACGGCACGGAGAACGAGACGGAGATCTTCAGGCCCGGGCGG
CGGCGACATGAGGGATAACTGGCGGAGCGAGCTGTACAAGTACAAGGTGGTGAAGGTGGAGCCGCTCGGCG
TGGCCCCCACCCGGGCCAAGCGCCGCTCGTGACAGAGAATGGTGGGTTTCCAGTCACACCTCAGGTACCT
TTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGG
GCTAATTCACTCCCAACGAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGGATCTACACACACAAGGCTACTTCCTTG
ATTGGCAGAACTACACACCAGGGCCAGGGGTGAGATATCCACTGACCTTTGGATGGTGCTACAAGCTAGTA
CCAGTTGAGCCAGATAAGGTAGAAGAGGCCAATAAAGGAGAGAACACCAGCTTGTACACCCTGTGAGCCT
GCATGGAATGGATGACCTGAGAGAGAAGTGTAGAGTGGAGTTTGACAGCCGCTAGCATTTCATCAGG
TGGCCCGAGAGCTGCATCCGGAGTACTTCAAGAACTGCACTAGTGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCC
TGGAAGCATCCAGGAAGTCAGCCTAAAAC TGCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTGCTTTTCATTG
CCAAGTTGTTTCATAACAGCTGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAC
CTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTTATCAAAGCAACCCACCTCCCAATCCAAAGGGGAGCCG
ACAGGCCCGAAGGAATAA [SEQ ID NO: 59]

```

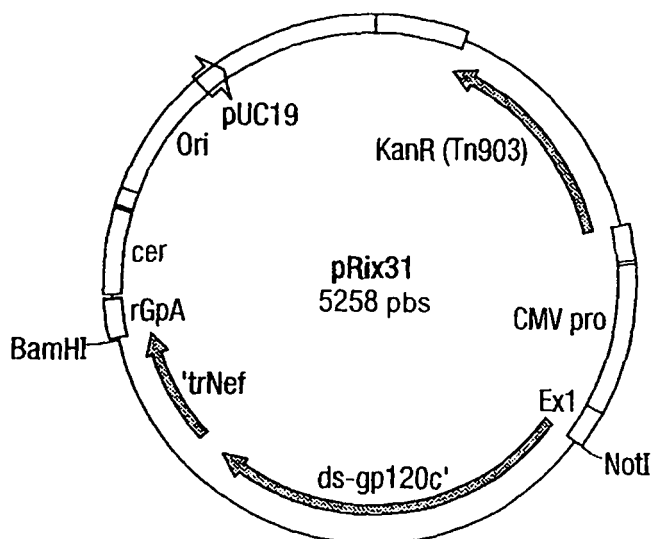
Fig.8 (Cont).

Secuencia de aminoácidos del antígeno:

MAEQLWVTVYYGVPVWKEATTTLCASDAKAYDTEVHNVWATHACVPTDPNPQEVVLGNVTEYFNMWKNNM
VDQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLDCDDVNTTNSTTTTSNGWTGEIRKGEIKNCSFNI TTSIRDKV
QKEYALFYNLDVVPIDDDNATTKNKTTRNFRLIHCNSSVMTQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCNNKT
FDGKGLCTNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGSLAEDEVVIRSDNFMDNTKTIIVQLNESVAINCTRPNNNT
RKGIIHIGPGRAFYAARKIIGDIRQAHCNLSRAQWNNTLKQIVIKLREHFGNKTIFNQSSGGDPEIVRHSE
NCGGEFFYCDTTQLFNSTWNGTEGNNTGNSTITLPCRIKQIINMWQEVGKAMYAPPIGGQIRCSSNITGL
LLTRDGGTEGNGTENETEIFRPGGGDMRDNRSELYKYKVVKVEPLGVAPTRAKRRVVQRMVGFVPVTPQVP
LRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGLEGLIHSQRRQDILDWIIYHTQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWCYKLV
PVEPDKVEEANKGENTSLLHPVSLHGMDDPEREVLEWRFD SRLAFHHVARELHPEYFKNCTSEPVDPRLP
WKHPGSQPKTACTNCYCKCCFHCQVCFITAAALGISYGRKKRRQRRRPQGSQTHQVSLSKQPTSQSKGEP
TGPKE [SEQ ID NO: 60]

Fig.9.

Plásmido pRix31:



Secuencia del inserto:

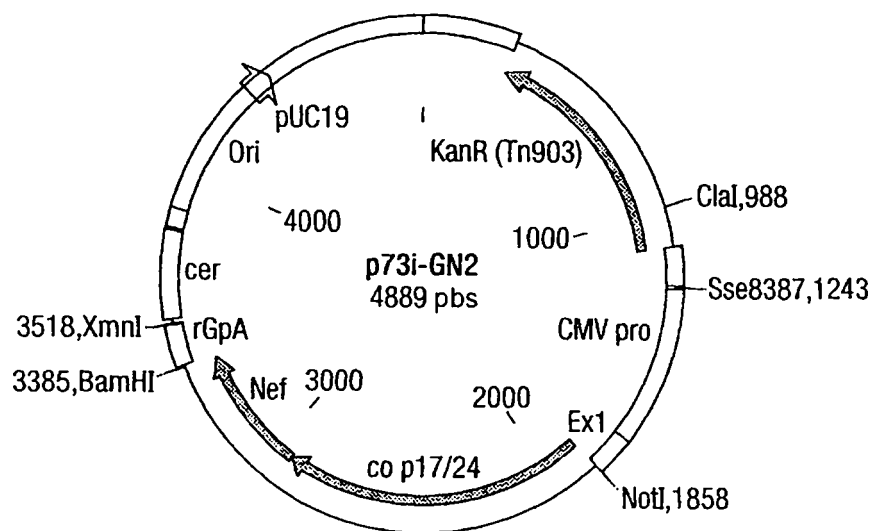
ATGGCCGAGCAGCTGTGGGTACCGTCTACTACGGCGTGCCTGTGTGGAAGGAGGCCACGACCACCTCTT
 CTGCGCGAGCGACGCCAAGGCTACGACACGGAAGTGCATAACGTGTGGGCGACGCATGCTTGGGTGCTTA
 CGGACCCCAACCCCAAGGAGGTGGTGTCTGGGAAACGTGACCGAGTACTTCAACATGTGGAAGAATAACATG
 GTGGATCAGATGCACGAGGACATCATCTCTGTGTGGGACCAGTCCCTGAAGCCCTGCGTGAAGCTGACGCC
 TCTCTGCGTGACACTGGACTGTGACGACGTCAACACCACCAACAGCACTACCACCACCAGCAACGGCTGGA
 CCGGAGAGATTCCGAAGGGCGAGATCAAGAAGTCTCTTCAATATCAGCACTCGATCAGAGACAAGGTG
 CAGAAGGAATACGCGCTGTTTTATAATCTCGATGTGGTCCCCATCGACGACGACAATGCCACCACCAAGAA
 CAAGACGACGCGTAATTTCACTTCATTCACTGCAACAGCAGCGTCATGACGACGGCTGCCCCAAGGTGT
 CCTTCGAACCAATCCCGATCCATTACTGTGCCCCGTGCCGGATTCCGGATCCTCAAGTGTAACAACAAGACC
 TTCGACGGGAAGGGCTGTGCACCAACGTGACGACCGTGCAGTGCACCCATGGCATCCGCCCGCTCGTGAG
 CACCCAGCTGCTGTGAACGGGTCCCTGGCTGAGGAGGAGGTGGTGATCCGGTCCGACAACCTTCATGGACA
 ACACCAAGACAATCATCGTCCAGCTGAACGAGTCTGTGGCGATTAACTGTACCCGGCCTAACAACAACACC
 CGTAAGGGCATCCACATCGGGCTTGCACGGGCTTCTATGCCGCCCGCAAGATCATCGGCGACATCCGGCA
 GGCCCATTTGAACCTCTCCCGCGCCAGTGGAAATAACACCTTGAAGCAGATCGTGATCAAGCTGAGAGAGC
 ACTTTGGAAACAAGACCATCAAGTTCAATCAGAGTTCTGGCGGAGACCCGAGATCGTGGCGGCACTCCTTC
 AACTCGGGGGCGAGTTCTTCTACTGCGATACGACACAGCTCTTCAACTCCACCTGGAACGGCACCGAGGG
 CAACAACACAGAGGGAACTCCACTATCACOCTCCCTTGCCGATCAAGCAGATCATCAACATGTGGCAGG
 AGGTGGGAAAGGCCATGTATGCCCCCCCCATCGGGGGCCAGATCCGCTGCTCTCCAACATCACCGGCTTG
 CTGCTCACCAGAGACGGGGGACCGAGGGCAACGGCACGGAGAACGAGACGGAGATCTTCAGGCCCGGGCGG
 CGCGCATGAGGGATAACTGGCGGAGCGAGCTGTACAAGTACAAGGTGGTGAAGGTGGAGCCGCTCGGGC
 TGGCCCCACCCGGGSCAAGCGCCGCTCGTGCAGACAATGGTGGGTTTTCCAGTCACACCTCAGGTACCT
 TTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGG
 GCTAATTAATCTCCCAACGAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGGATCTACCACACACAAGGCTACTTCCCTG
 ATTGGCAGAACTACACACCAGGGCCAGGGGTGAGATATCCACTGACCTTTGGATGGTGTACAGCTAGTA
 CCAGTTGAGCCAGATAAGGTAGAAGAGGCCAATAAAGGAGAGAACACAGCTTGTACACCTGTGAGCCT
 GCATGGAATGGATGACCTGTAGAGAGAAGTGTAGAGTGGAGGTTGACAGCGCCTAGCATTTTCATCAGG
 TGGCCCCGAGAGCTGCATCCGGAGTACTTCAAGAAGTCTAA [SEQ ID NO: 61]

Secuencia de aminoácidos del antígeno:

Fig.9 (Cont).

MAEQLWVTVYYGVPVWKEATTLFCASDAKAYDTEVHNWATHACVPTDPNPQEVVLGNVTEYFNMWKNNM
VDQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLDCDDVNTNSTTTTSNGWTGEIRKGEIKNCSFNITTSIRDKV
QKEYALFYNLDVVPIDDDNATTKNKTTNRFLIHCNSSVMTQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCNNKT
FDGKGLCTNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGSLAEEEVVIRSDNFMDNTKTIIVQLNESVAINCTRPNNNT
RKGIHIGPGRAFYAARKIIGDIRQAHCNLSRAQWNNTLKQIVIKLREHFGNKTIFNQSSGGDPEIVRHSF
NCGGEFFYCDTTQLFNSTWNGTEGNNTEGNSTITLPCRIKQIINMWQEVGKAMYAPPIGGQIRCSSNITGL
LLTRDGGTEGNGTENETEIFRPGGGDMRDNRSELYKYKVVKVEPLGVAPTRAKRRVVQRMVGFVTPQVP
LRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGLEGLIHSQRRQDILDLWIYHTQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWCYKLV
PVEPDKVEEANKGENTSLLHPVSLHGMDDPEREVLEWRFD SRLAFHHVARELHPEYFKNC
[SEQ ID NO: 62]

Fig.10.

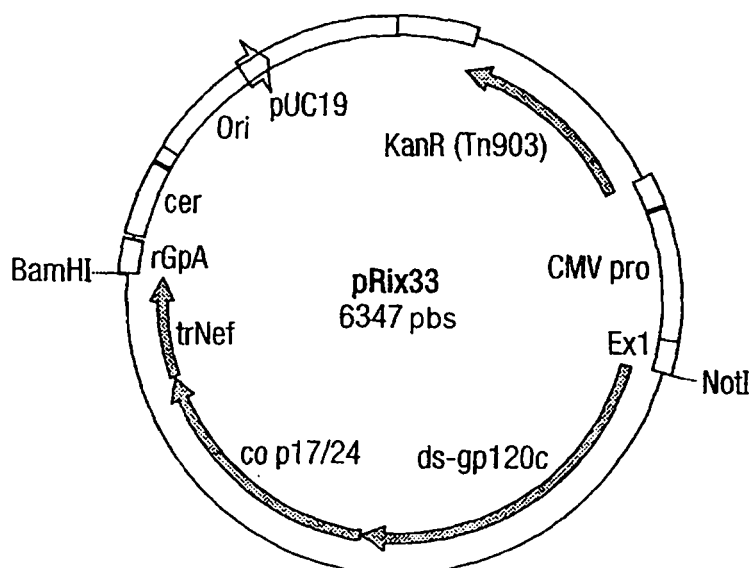


Secuencia del inserto:

TGGGTGCCCCGAGCTTCGGTACTGTCTGGTGGAGAGCTGGACAGATGGGAGAAAATTAGGCTGCGCCCGGA
 GGCAAAAAGAAATACAAGCTCAAGCATATCGTGTGGGCTCGAGGGAGCTTGAACGGTTTGCCGTGAACCC
 AGGCCTGCTGGAAACATCTGAGGGATGTCGCCAGATCCTGGGGCAATTGCAGCCATCCCTCCAGACCGGGA
 GTGAAGAGCTGAGGTCCTTGATAACACAGTGGCTACCTCTACTGCGTACACCAGAGGATCGAGATTAAG
 GATACCAAGGAGGCCTTGGACAAAATTGAGGAGGAGCAAAACAAGAGCAAGAAGAAGGCCAGCAGGCAGC
 TGCTGACACTGGGCATAGCAACCAGGTATCACAGAACTATCCTATTGTCCAAAACATTGAGGGCCAGATGG
 TTCATCAGGCCATCAGCCCCCGGACGCTCAATGCCTGGGTGAAGGTTGTGGAAGAGAAGGCCCTTTCTCCT
 GAGGTTATCCCCATGTTCTCCGCTTTGAGTGAGGGGGCCACTCCTCAGGACCTCAATACAATGCTTAATAC
 CGTGGGCGGCCATCAGGCCGCCATGCAAATGTTGAAGGAGACTATCAACGAGGAGGCAGCCGAGTGGGACA
 GAGTGATCCCGTCCACGCTGGCCCAATCGCGCCCGGACAGATGCGGGAGCCTCGCGGCTCTGACATTGCC
 GGCACCACCTCTACACTGCAAGAGCAAATCGGATGGATGACCAACAATCCTCCCATCCAGTTGGAGAAAT
 CTATAAACGGTGGATCATTCTCGGTCTCAATAAAATTGTTAGAATGTACTCTCCGACATCCATCCTTGACA
 TTAGACAGGGACCCAAAGAGCCTTTTAGGGATTACGTCGACCGGTTTTATAAGACCCTGCGAGCAGAGCAG
 GCCTCTCAGGAGGTCAAAAAGTGGATGACGGAGACTCCTGGTACAGAACGCTAACCCCGACTGCAAAAC
 AATCTTGAAGGCACTAGGCCCGGCTGCCACCCTGGAAGAGATGATGACCGCCTGTGAGGGAGTAGGCGGAC
 CCGGACACAAAGCCAGAGTGTG*ATGGTGGGTTTTCCAGTCACACCTCAGGTACCTTTAAGACCAATGAC
 TTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATCACTCCC
 AAAGAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGGATCTACCACACACAAGGCTACTTCCCTGATGGCAGAACTAC
 ACACAGGGCCAGGGGTGAGATATCCACTGACCTTTGGATGGTGCTACAAGCTAGTACCAGTTGAGCCAGA
 TAAGGTAGAAGAGGCCAATAAAGGAGAGAACACCAGCTTGTTACACCCTGTGAGCCTGCATGGGATGGATG
 ACCCGGAGAGAGAAGTGTAGAGTGGAGGTTTGACAGCCGCTAGCATTTTCATCACGTGGCCCGAGAGCTG
 CATCCGGAGTACTTCAAGAACTGCTGA [SEQ ID NO: 63]

Fig.11.

Plásmido pRix33:



Secuencia del inserto:

ATGGCCGAGCAGCTGTGGGTACCCGCTACTACGGCGTGCCCTGTGTGGAAGGAGGCCACGACCACCTCTT
 CTGCGCGAGCGACGCCAAGGCTACGACACGGAAGTGCCATAACGTGTGGCGACGCATGCTTGCGTGCCTA
 CGGACCCCAACCCCAAGGAGGTGGTGCTGGGAAACGTGACCGAGTACTTCAACATGTGAAGAATAACATG
 GTGGATCAGATGCACGAGGACATCATCTCTCTGTGGGACCAGTCCCTGAAGCCCTGCGTGAAGCTGACGCC
 TCTCTGCGTGACACTGGACTGTGACGACGTCAACACCACCAACAGCACTACCACCACCAGCAACGGCTGGA
 CCGGAGAGATTGGAAGGGCGAGATCAAGAACTGCTCCTTCAATATCAGGACCTCGATCAGAGACAAGGTG
 CAGAAGGAATACGCGCTGTTTATAATCTCGATGTGTTCCCATCGACGACGACAATGCCACCACCAAGAA
 CAAGACGACGCGTAATTTACAGACTCATTCACTGCAACAGCAGCGTCATGACGCAAGGCTGCCCAAGGTGT
 CCTTGAACCAATCCCGATCCATTACTGTGCCCTTGCCGGATTGCGGATCCTCAAGTGTAACAACAAGACC
 TTGACGGGAAGGGCTGTGCACCAACGTGACACGGTGCAAGTGACCCATGGCATCCGCCCGCTCGTGAG
 CACCCAGCTGCTGCTGAACGGGTCCCTGGCTGAGGAGAGGTGGTGATCCGGTCGGACAACCTTCATGGACA
 ACACCAAGACAATCATCGTCCAGCTGAACGAGTCTGTGGCGATTAACTGTACCCGGCTTAACAACAACACC
 CGTAAGGGCATCCACATCGGCGCTGGACGGGCTTCTATGCCGCGCCGCAAGATCATCGGCGACATCCGGCA
 GGCCCATTGCAACCTCTCCCGCGCCAGTGGAATAACACCTGAAGCAGATCGTGATCAAGCTGAGAGAGC
 ACTTTGGAACAAGACCATCAAGTTCAATCAGAGTTCTGCCGAGACCCGAGATCGTGCCGCACTCCTTC
 AACTGCGGGGGCGAGTTCTTCTACTGCGATACGACACAGCTCTTCAACTCCACCTGGAACGGCACCGAGGG
 CAACAACACAGAGGGAACTCCACTATCACCTCCCTTGCCGCATCAAGCAGATCAACAACATGTGGCAGG
 AGGTGGGAAAGGCCATGTATGCCCCCCCCATCGGGGGCCAGATCCGCTGCTCCTCCAACATCACCGGCTG
 CTGCTCACCAGAGACGGGGGACCGAGGGCAACGGCAGGAGAACGAGACGGAGATCTTCAGGCCCGGCGG
 CGCGACATGAGGGATAACTGGCGGAGCGAGCTGTACAAGTACAAGGTGGTGAAGGTGGAGCCGCTCGGCG
 TGGCCCCCACCCGGGCAAGCGCCGCTGCTGCAGAGAATGGGTGCCGAGCTTCGGTACTGTCTGGTGGA
 GAGCTGGACAGATGGGAGAAAATTAGGCTGCGCCCGGAGGCAAAAAGAAATACAAGCTCAAGCATATCGT
 GTGGGCTCGAGGGAGCTTGAACGGTTTGGCGTGAACCCAGGCTGCTGGAAACATCTGAGGGATGTGCGC
 AGATCCTGGGGCAATTGCAGCCATCCCTCCAGACCGGAGTGAAGAGCTGAGGTCTTGTATAACACAGTG
 GCTACCCTCTACTGCGTACACAGAGGATCGAGATTAAGGATACCAAGGAGGCCCTTGACAAAATTGAGGA
 GGAGCAAAACAAGAGCAAGAAGAAGGCCAGCAGGCACTGCTGACACTGGGCATAGCAACCAGGTATCAC
 AGAACTATCCTATTGTCCAAACATTAGGGCCAGATCGTTTCATCAGGCCATCAGCCCCGGAGCTCAAT
 GCCTGGGTGAAGTTGTGCAAGAGAAGGCTTTTCTCCTGAGGTATCCCATGTTCTCCGCTTTGAGTGA
 GGGGGCACTCCTCAGGACCTCAATACAATGCTTAATACCGTGGGCGGCCATCAGGCCGCCATGCAAAATGT
 TGAAGGAGACTATCAACGAGGAGGCAGCCGAGTGGGACAGAGTGCATCCCGTCCACGCTGGCCCAATCGCG
 CCCGGACAGATGCGGGAGCCTCGCGGCTCTGACATTGCCGGCACCACTCTACACTGCAAGAGCAAAATCGG

Fig.11 (Cont).

ATGGATGACCAACAATCCTCCCATCCCAGTTGGAGAAATCTATAAACGGTGGATCATTCTCGGTCTCAATA
AAATTGTTAGAAATGTACTCTCCGACATCCATCCTTGACATTAGACAGGGACCCAAAGAGCCTTTTAGGGAT
TACGTCGACCGGTTTTATAAGACCCTGCGAGCAGAGCAGGCCTCTCAGGAGGTCAAAAAGTGGATGACGGA
GACACTCCTGGTACAGAACGCTAACCCCGACTGCAAAACAATCTTGAAGGCAGTAGGCCCGGCTGCCACCC
TGGAAGAGATGATGACCGCTGTCAGGGAGTAGGCCGACCCGGACACAAAGCCAGAGTGTGATGGTGGGT
TTTCCAGTCACACCTCAGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTT
AAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCACTCCAACGAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGGATCT
ACCACACACAAGGCTACTTCCCTGATTGGCAGAACTACACACCAGGGCCAGGGGTGAGATATCCACTGACC
TTTGGATGGTGTACAAGCTAGTACCAGTTGAGCCAGATAAGGTAGAAGAGGCCAATAAAGGAGAGAACAC
CAGCTTGTACACCTGTGAGCCTGCATGGAATGGATGACCCTGAGAGAGAAGTGTAGAGTGGAGGTTTG
ACAGCCGCTAGCATTTTCATCAGTGGCCCGAGAGCTGCATCCGGAGTACTTCAAGAACTGCTAA
[SEQ ID NO: 64]

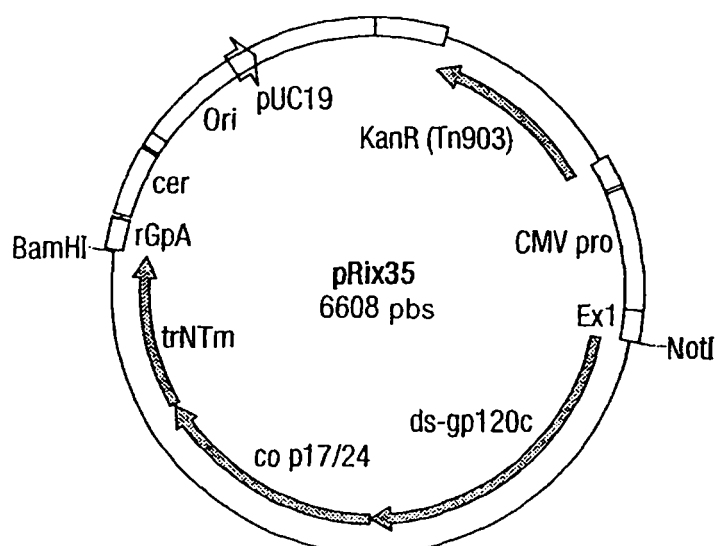
Secuencia de aminoácidos del antígeno:

MAEQLWVTVYYGVPVWKEATTTLFCASDAKAYDTEVHNWVATHACVPTDPNPQEVVLGNVTEYFNMWKNNM
VDQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLDCDDVNTNSTTTTSNGWTGEIRKGEIKNCSFNITTSIRDKV
QKEYALFYNLDVVPIDDDNATTKNKTRNFRLIHCNSSVMTQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCNKNT
FDGKGLCTNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLLNGSLAEEVVIRSDNFMDNTKTIIVQLNESVAINCTRPNNT
RKGIIHGPGRAFYAARKIIGDIRQAHCNLSRAQWNNTLKQIVIKLREHFGNKTIFKNQSSGGDPEIVRHSF
NCGGEFFYCDTTQLENSTWNGTEGNNTEGNSTITLPCRIKQIINMWQEVGKAMYAPPIGGQIRCSSNITGL
LLTRDGGTEGNGTENETEIFRPGGDMRDNRSELYKYKVVEPLGVAPTRAKRRVVQRMGARASVLSGG
ELDRWEKIRLRPGGKKKYKLKHIVWASRELERFAVNPGLLETSEGCRQILGQLQPSLQTGSEELRSLYNTV
ATLYCVHQRIEIKDTKEALDKIEEQNKSKKKAQQAADTGHSNOVSNYPIVQNIQGMVHQAI SPRTL N
AWVKVVEEKAFSPEVIMFSALSEGATPQDLNMLNTVGGHQAAMQMLKETINEEAEWDRVHPVHAGPIA
PGQMPREPRGSDIAGTTSTLQEQIGWMTNNPPIPVGEIYKRWIILGLNKIVRMYSPTSILDIRQGPKEPFRD
YVDRFYKTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQNPANPDCKTILKALGPAATLEEMMTACQGVGGPGHKARVLMVG
FPVTPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGLEGLIHSQRRQDILDWIIYHTQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLT
FGWCYKLVPEPDKVEEANKGENTSLLHPVSLHGMDPEREVLEWRFD SRLAFHHVARELHPEYFKNC

[SEQ ID NO: 65]

Fig.12.

Plásmido pRix35:



Secuencia del inserto:

ATGGCCGAGCAGCTGTGGGTCACCGTCTACTACGGCGTGCCTGTGTGGAAGGAGGCCACGACCACCCTCTT
 CTGCGCGAGCGACGCCAAGCCCTACGACACGGAAGTGCATAACGTGTGGGCGACGCATGCTTGCCTGCCTA
 CGGACCCCAACCCCAAGGAGGTGGTCTGGGAAACGTGACCGAGTACTTCAACATGTGGAAGAATAACATG
 GTGGATCAGATGCACGAGGACATCATCTCTCTGTGGGACCACTCCCTGAAGCCCTGCGTGAAGCTGACGCC
 TCTCTGCGTGACACTGGACTGTGACGACGTCAACACCACCAACAGCACTACCACCACCAGCAACGGCTGGA
 CCGGAGAGATTTCGGAAGGGCGAGATCAAGAAGTCTCTCTTCAATATCACGACCTCGATCAGAGACAAGGTG
 CAGAAGGAATACGCGCTGTTTTATAATCTCGATGTGTCTCCCATCGACGACGACAATGCCACCACCAGAA
 CAAGACGACGCGTAATTTCACTTCATTCTGCAACAGCAGCGTCATGACGCGAGCCCTGCCCAAGGTGT
 CCTTCGAACCAATCCGATCCATTACTGTGCCCTGCCGATTCCGGATCCTCAAGTGAACAACAAGACC
 TTCGACGGGAAGGGCTGTGCACCAACGTGACGACGTCAGTGCACCCATGGCATCCGCCCGCTCGTGAG
 CACCCAGCTGCTGCTGAACGGGTCCCTGGCTGAGGAGGAGGTGGTGATCCGGTCCGACAACTTCATGGACA
 ACACCAAGACAATCATCGTCCAGCTGAACGAGTCTGTGGCGATTAACTGTACCCGGCCTAACAACAACACC
 CGTAAGGGCATCCACATCGGGCTGGACGGGCTTCTATGCCGCCCGCAAGATCATCGCGGACATCCGGCA
 GGCCCATTTGAACCTCTCCCGCGCCAGTGGGAATAACACCCTGAAGCAGATCGTGATCAAGCTGAGAGAGC
 ACTTTGGAACAAGACCATCAAGTTCAATCAGAGTTCTGGCGGAGACCCCGAGATCGTGCGGCACTCCTTC
 AACTCGGGGGGCGAGTTCTTCTACTGCGATACGACACAGCTCTTCAACTCCACCTGGAACGGCACCAGGG
 CAACAACACAGAGGGAACTCCACTATCACCTCCCTTGCCGCATCAAGCAGATCATCAACATGTGGCAGG
 AGGTGGGAAAGGCCATGTATGCCCCCCCCATCGGGGGCCAGATCCGCTGCTCCTCCAACATCACGGGCTG
 CTGCTCACCAGAGACGGGGCACCGAGGGCAACGGCAGGAGAACGAGACGGGATCTTCAGGCCCGCGCG
 CGCGGACATGAGGGATAACTGGCGGAGCGAGCTGTACAAGTACAAGGTGGTGAAGGTGAGCCGCTCGCG
 TGGCCCCACCCGGGCCAAGCGCCGCGTCTGTCAGAGAATGGGTGCCCGAGCTTCGGTACTGTCTGGTGA
 GAGCTGGACAGATGGGAGAAAATTAGGCTGCGCCCGGAGGCAAAAAGAAATACAAGCTCAAGCATATCGT
 GTGGGCTCGAGGGAGCTTGAACGGTTGCGCTGAACCCAGGCTGCTGGAACATCTGAGGGATGTGCGC
 AGATCCTGGGGCAATTGCAGCCATCCCTCCAGACCGGAGTGAAGAGCTGAGGTCCCTTGATAACACAGTG
 GCTACCTCTACTGCGTACACAGAGGATCGAGATTAAGGATACCAAGGAGGCCTTGGACAAAATTGAGGA
 GGAGCAAAACAAGAGCAAGAAGAAGGCCAGCAGGAGCTGCTGACACTGGGCATAGCAACCAGGTATCAC
 AGAATATCTTATGTCCAAAACATTCAGGCCAGATGGTTTCATCAGGCCATCAGCCCCGGACGCTCAAT
 GCTGGGTGAAGTTGTCTGAAGAGAAGGCTTTTCTCTGAGGTATCCCCATGTTCTCGCTTTGAGTGA
 GGGGGCCACTCCTCAGGACCTCAATACAATGCTTAATACCGTGGGCGGCCATCAGGCCGCCATGCAATGT
 TGAAGGAGACTATCAACGAGGAGGACCGGAGTGGACAGAGTGCATCCCGTCCACGCTGGCCCAATCGCG
 CCGGACAGATGCGGAGCCTCGCGCTCTGACATTGCCGGCACCCTCTACACTGCAAGAGCAATCGG

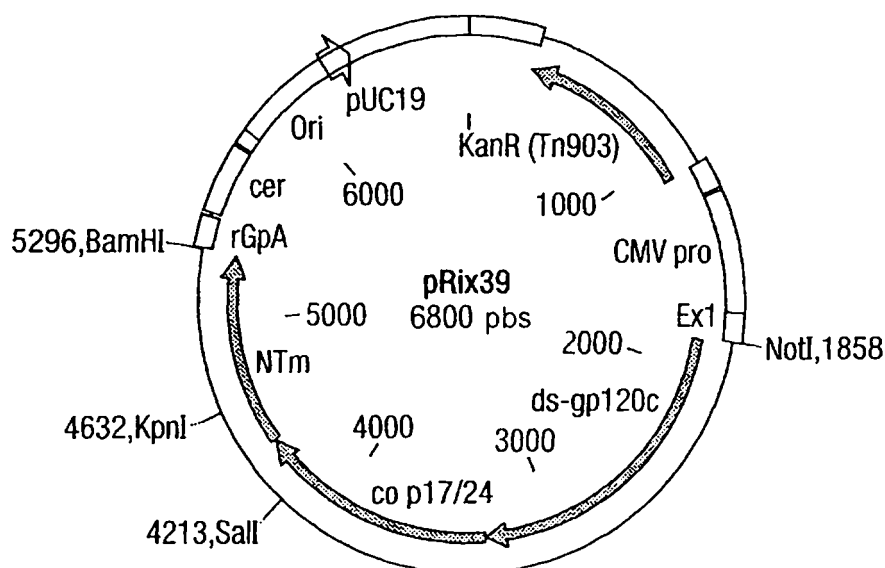
Fig.12 (Cont).

ATGGATGACCAACAATCCTCCCATCCAGTTGGAGAAATCTATAAACGGTGGATCATTCTCGGTCTCAATA
AAATTGTTAGAATGTACTCTCCGACATCCATCCTTGACATTAGACAGGGACCCAAAGAGCCTTTTAGGGAT
TACGTCGACCGGTTTTATAAGACCCTGCGAGCAGAGCAGGCCTCTCAGGAGGTCAAAACTGGATGACGGA
GACACTCCTGGTACAGAACGCTAACCCCGACTGC AAAACAATCTTGAAGGCACTAGGCCCGGCTGCCACCC
TGGAAGAGATGATGACCGCCTGTCAGGGAGTAGCGCGACCCGGACACAAAGCCAGAGTGTGATGGTGGGT
TTTCCAGTCACACCTCAGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTT
AAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCACCTCCAACGAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGATCT
ACCACACACAAGGCTACTTCCCTGATTGGCAGAACTACACACCAGGGCCAGGGGTCAGATATCCACTGACC
TTTGGATGGTCTACAAGCTAGTACCAGTTGAGCCAGATAAGGTAGAAGAGGCCAATAAGGAGAGAACAC
CAGCTTGTACACCCCTGTGAGCCTGCATGGAATGGATGACCTGAGAGAGAAGTGTAGAGTGGAGGTTTG
ACAGCCGCTTAGCATTTTCATCAGTGGCCCGAGAGCTGCATCCGGAGTACTTCAAGAACTGCACTAGTGAG
CCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAGTCAGCCTAAAAGTGCCTTGTACCAATTGCTA
TTGTAAAAGTGTGCTTTTCATTGCCAAGTTTGTTCATAACAGCTGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGA
AGAAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAACCC
ACCTCCCAATCCAAAGGGGAGCCGACAGGCCCGAAGGAATAA [SEQ ID NO: 66]

Secuencia de aminoácidos del antígeno:

MAEQLWVTVYYGVPVWKEATTTLFCASDAKAYDTEVHNVWATHACVPTDPNPQEVVLGNVTEYFNMWKNM
 VDOMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLDCDDVNTNSTTTTNSNGWTGEIRKGEIKNCSFNITTSIRDV
 QKEYALFYNLDVVPIDDDNATTKNKTTRNFRLIHCNSSVMTQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCNKT
 FDGKGLCTNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLLNGSLAEDEVVIRSDNFMONTKTIIVQLNESVAINCTRPNNNT
 RKGIHIGPGRFYAARKIIGDIRQAHCNLSRAQWNNTLKQIVIKLREHFGNKTIFKNQSSGGDPEIVRHSF
 NCGGEFFYCDTTQLFNSTWNGTEGNTEGNSTITLPCRIKQIINMWQEVGKAMYAPPIGGQIRCSSNITGL
 LLTRDGGTEGNGTENETEIFRPGGDMRDNRSELYKYKVVKVEPLGVAPTRAKRRVVQRMGARASVLSGG
 ELDRWEKIRLRPGGKKYKLKHIVWASRELERFAVNPGLLETSEGCRQILGQLQPSLQTGSEELRSLYNTV
 ATLYCVHQRIEIKDTKEALDKIEEEQNKSKKKAQAAADTGHNSQVSNQYPIVQNIQGMVHQAI SPRTL N
 AWVKVVEEKAFSPEVIMFSALSEGATPQDLNMTLNTVGGHQAAMQMLKETINEEAAEWDRVHPVHAGPIA
 PGQMREPRGSDIAGTTSTLQEQIGWMTNPPPIPVGEIYKRWII LGLNKIVRMYSPTSILDIRQGPKEPFRD
 YVDRFYKTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQANPNPCKTILKALGPAATLEEMMTACQVGPGPHKARVLMVG
 FPVTPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGLEGLIHSQRRQDILDWIYHTQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLT
 FGWCYKLPVPEPDKVEEANKGENTSLLHPVSLHGMDPEREVLEWRFD SRLAFHHVARELHPEYFKNCTSE
 PVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFITAALGISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQP
 TSQSKGEPTGPKE [SEQ ID NO: 67]

Fig.13.



Secuencia del inserto:

ATGGCCGAGCAGCTGTGGGTACCGTCTACTACGGCGTGCCTGTGTGGAAGGAGGCCACGACCACCCTCTT
 CTGCGCGAGCGACGCCAAGGCCTACGACACGGAAGTGCATAACGTGTGGGCGACGCATGCTTGCGTGCCTA
 CGGACCCCAACCCCAAGGAGGTGGTGTGCTGGGAAACGTGACCGAGTACTTCAACATGTGGAAGAATAACATG
 GTGGATCAGATGCACGAGGACATCATCTCTGTGGGACCAGTCCCTGAAGCCCTGCGTGAAGCTGACGCC
 TCTCTGCGTGACACTGGACTGTGACGACGTCAACACCACCAACAGCACTACCACCACCAGCAACGGCTGGA
 CCGGAGAGATTGCGAAGGGCGAGATCAAGAAGTCTCTTCAATATCAGACCTCGATCAGAGACAAGGTG
 CAGAAGGAATACGCGCTGTTTTATAATCTCGATGTGGTCCCATCGACGACGACAATGCCACCACCAAGAA
 CAAGACGACGCGTAATTTCACTCATTTCACTGCAACAGCAGCGTCATGACGCGAGCCCTGCCCAAGGTGT
 CCTTCGAACCAATCCCGATCCATTACTGTGCCCTGCCGGATTGCGGATCCTCAAGTGTAACAACAAGACC
 TTCGACGGGAAGGGCTGTGCACCAACGTGACGACGGTGCAGTGCACCCATGGCATCCGCCCCGTGCTGAG
 CACCCAGCTGCTGCTGAACGGGTCCCTGGCTGAGGAGGAGTGGTGATCCGGTCGGACAACCTTCATGGACA
 ACACCAAGACAATCATCGTCCAGCTGAACGAGTCTGTGGCGATTAACTGTACCCGGCCTAACAACAACACC
 CGTAAGGGCATCCACATCGGGCCTGGACGGGCCTTCTATGCCGCCCGCAAGATCATCGGCGACATCCGGCA
 GGCCCATTTGCAACCTCTCCCGCGCCAGTGGAAATAACACCTGAAGCAGATCGTGATCAAGCTGAGAGAGC
 ACTTTGGAAACAAGACCATCAAGTTCAATCAGAGTTCTGGCGGAGACCCGAGATCGTGCGGCCTCCTTC
 AACTGCGGGGCGAGTTCTTCTACTGCGATACGACACAGCTCTTCAACTCCACCTGGAACGGCACCGAGGG
 CAACAACACAGAGGGAACTCCACTATCACCTCCCTTGCCGCATCAAGCAGATCATCAACATGTGGCAGG
 AGGTGGGAAAGGCCATGTATGCCCCCCCCATCGGGGGCCAGATCCGCTGCTCCTCAACATCACCGGCCTG
 CTGCTCACAGAGACGGGGGCACCGAGGGCAACGGGCACGGAGAACGAGACGGAGATCTTCAGGCCCGGGCG
 CGGCGACATGAGGGATAACTGGCGGAGCGAGCTGTACAAGTACAAGGTGGTGAAGGTGGAGCCGCTCGGGC
 TGGCCCCCACCCGGGCCAAGCGCCGCGTCGTGCAGAGAATGGGTGCCCGAGCTTCGGTACTGTCTGGTGA
 GAGCTGGACAGATGGGAGAAAATTAGGCTGCGCCCGGGAGGCAAAAAGAAATACAAGCTCAAGCATATCGT
 GTGGGCTCGAGGGAGCTTGAACGGTTTCCCGTGAACCCAGGCCTGCTGGAACATCTGAGGGATGTGCCC
 AGATCCTGGGGCAATTGCAGCCATCCTCCAGACCGGGAGTGAAGAGCTGAGGTCTTGTATAACACAGTG
 GCTACCCCTCTACTGCGTACACCAGAGGATCGAGATTAAGGATACCAAGGAGGCCTTGGACAAAATTGAGGA
 GGAGCAAAACAAGAGCAAGAAGAAGGCCAGCAGGCAGCTGCTGACACTGGGCATAGCAACCAGGTATCAC
 AGAATATCCTATGTGTCAAAACATTGAGGGCCAGATGGTTTCATCAGGCCATCAGCCCCGGACGCTCAAT
 GCCTGGGTGAAGGTGTGCGAAGAGAAGGCCTTTTCTCCTGAGGTATCCCCATGTTCTCCGCTTTGAGTGA
 GGGGGCCACTCCTCAGGACCTCAATACAATGCTTAATACCGTGGCGGCCATCAGGCCGCCATGCAAAATGT
 TGAAGGAGACTATCAACGAGGAGGACCGGAGTGGGACAGAGTGCATCCCGTCCACGCTGGCCCAATCGCG
 CCCGACAGATGCGGGAGCCTCGCGGCTCTGACATTGCCGGCACCACTCTACACTGCAAGAGCAAAATCGG
 ATGGATGACCAACAATCCTCCCATCCAGTTGGAGAAATCTATAAACGGTGGATCATTTCTCGGTCTCAATA
 AAATTGTTAGAAATGTAATCTCCGACATCCATCCTTGACATTAGACAGGGACCCAAGAGCCTTTTAGGGAT

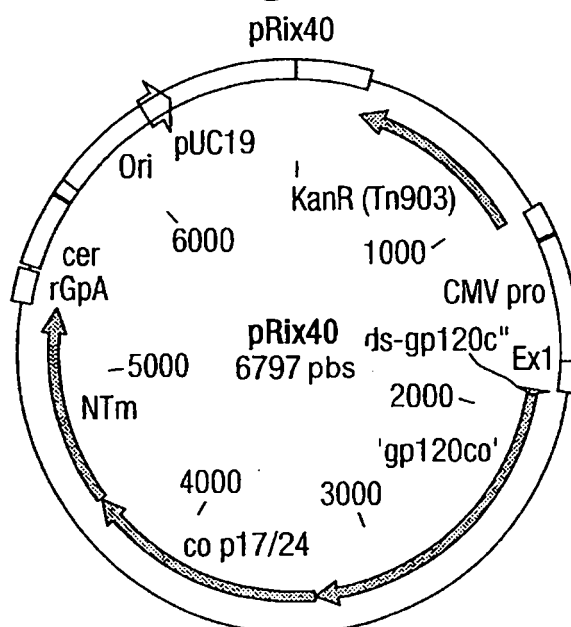
Fig.13 (Cont).

TACGTCGACCGGTTTTATAAGACCCTGCGAGCAGAGCAGGCCCTCTCAGGAGGTCAAAAACCTGGATGACGGA
 GACACTCCTGGTACAGAACGCTAACCCCGACTGCAAAACAATCTTGAAGGCACTAGGCCCGGCTGCCACCC
 TGGAAAGAGATGATGACCGCCTGTACGGGAGTAGGCGGACCCGGACACAAAGCCAGAGTGTGATGGGTGGC
 AAGTGGTCAAAAAGTAGTGTGGTGGATGGCTACTGTAAGGGAAAGAATGAGACGAGCTGAGCCAGCAGC
 AGATGGGGTGGGAGCAGCATCTCGAGACCTGGAAAAACATGGAGCAATCACAAGTAGCAATACAGCAGCTA
 CCAATGCTGCTTGTGCCTGGCTAGAAGCACAAGAGGAGGAGGAGGTGGGTTTTCCAGTCACACCTCAGGTA
 CCTTAAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGA
 AGGGCTAATTAACCTCCCAACGAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGGATCTACCACACACAAGGCTACTTCC
 CTGATGGCAGAACTACACACCAGGGCCAGGGGTGAGATATCCACTGACCTTTGGATGGTGTACAAGCTA
 GTACCAGTTGAGCCAGATAAGGTAGAAGAGGCCAATAAAGGAGAGAGAACACCAGCTTGTACACCTGTGAG
 CCTGCATGGAATGGATGACCCTGAGAGAGAAGTGTAGAGTGGAGGTTTGACAGCCCGCTAGCATTTCATC
 ACGTGGCCCCGAGAGCTGCATCCGAGTACTTCAAGAAGTGCAGTGTAGGAGCCAGTAGATCTAGACTAGAG
 CCCTGGAAGCATCCAGGAAGTCAGCCTAAAAGTGCCTGTACCAATTGCTATTGTAAAAGTGTGCTTTCA
 TTGCCAAGTTTGTTCATACAGCTGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAA
 GACCTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAACCCACCTCCCAATCAAAGGGGAG
 CCGACAGGCCCGAAGGAATAA [SEQ ID NO: 68]

Secuencia de aminoácidos del antígeno:

MAEQLVTVVYGVVPVWKEATTLFCASDAKAYDTEVHNWATHACVPTDPNPQEVVLGNVTEYFNMWKNNM
 VDQMHEDIISLWDQSLKPCVKLPLCVTLDCDDVNTTNSTTTTSGWTGEIRKGEIKNCSFNITTSIRDKV
 QKEYALFYNLVDVPIDDDNATTKNKTNRNRLIHCNSSVMTQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCNKNT
 FDGKGLCTNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGSLAEEVVIRSDNFMDNTKTIIVQLNESVAINCTRPNNT
 RKGIIHIGPGRAFYAARKIIGDIRQAHCNLSRAQWNNTLKQIVIKLREHFGNKTIFKNQSSGDPFIVRHSF
 NCGGEFFYCDTTQLFNSTWNGTEGNNTGNSTITLPCRIKQIINMWQEVGKAMYAPPIGGQIRCSSNITGL
 LLTRDGGTEGNNGTENETEIFRPGGGMDRDNWRSELYKYKVVKEPLGVAPTRAKRRVVQRMGARASVLSGG
 ELDRWEKIRLRPGGKKKYKLKHI VWASRELERFAVNPGLLETSEGCRQILGQLQPSLOTGSEELRSLYNTV
 ATLYCVHQRIEIKDTKEALDKIEEQNKSKKKAQQAADTGHSNQVSQNYPIVQNIQGMVHQAI SPTLN
 AWWKVVEEKAFSPFVPMFSALSEGATPQDLNMTLNTVGGHQAAQMMLKETINEEAAEWDRVHPVHAGPIA
 PGQMREPRGSDIAGTTSTLQEQIGWMTNPPPIVGEIYKRWII LGLNKIVRMYSPSILDIRQGPKEPFRD
 YVDRFYKTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQANANPDCKTILKALGPAATLEEMMTACQGVGGPGHKARVLMGG
 KWSKSSVVGWPTVRERMRAEPAADGVGAASRDLEKHGAITSSNTAATNAACAWLEAQEEEEVGFPVTPQV
 PLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGLEGLIHSQRRQDILDWIYHTQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWCYKL
 VPVEPDKVEEANKGENTSLLHPVSLHGMDDEPEREVLWRFD SRLAFHHVARELHPEYFKNCTSEPVDPRL
 PWKHGPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFITAAALGISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSKGE
 PTGPKE [SEQ ID NO: 69]

Fig.14.



Secuencia de ADN del inserto

ATGGCCGAGCAGCTGTGGGTCACCGTCTACTACGGCGTGCCTGTGTGGAAGGAGGCCACGACCACCCTCTT
 CTGCGCGAGCGACGCCAAGGCCTACGACACGGAAGTGCATAACGTGTGGCGACGCATGCTTGCCTGCCTA
 CGGACCCCAACCCCAAGGAGGTGGTGCTGGGAAACGTGACCGAGTACTTCAACATGTGGAAGAATAACATG
 GTGGATCAGATGCACGAGGACATCATCTCTGTGGGACCAGTCCCTGAAGCCCTGCGTGAAGCTGACGCC
 TCTCTGCGTGACACTGGACTGTGACGACGTCAACACCACCAACAGCACTACCACCACCAGCAACGGCTGGA
 CCGGAGAGATTTCGGAAGGGCGAGATCAAGAAGTCTCCTTCAATATCACGACCTCGATCAGAGACAAGGTG
 CAGAAGGAATACGCGCTGTTTTATAATCTCGATGTGGTCCCCATCGACGACGACAATGCCACCACCAAGAA
 CAAGACGACGCGTAATTTACAGACTCATTCACTGCAACAGCAGCGTCATGACGCAGGCCTGCCCAAGGTGT
 CCTTCGAACCAATCCCGATCCATTACTGTGCCCTGCCGGATTTCGCGATCCTCAAGTGTAAACAACAAGACC
 TTCGACGGGAAGGGCCTGTGCACCAACGTGACGACGGTGCAGTGCACCCATGGCATCCGCCCGTCTGTGAG
 CACCCAGCTGCTGCTGAACGGGTCCCTGGCTGAGGAGGAGGTGGTATCCGGTTCGGACAACCTCATGGACA
 ACACCAAGACAATCATCGTCCAGCTGAACGAGTCTGTGGCGATTAACTGTACCCGGCCTAACAAACAACACC
 CGTAAGGGCATCCACATCGGGCCTGGACGGGCCTTCTATGCCGCCCGCAAGATCATCGGCGACATCCGGCA
 GGCCCATTTGCAACCTCTCCCGCGCCAGTGGGAATAACACCCTGAAGCAGATCGTGATCAAGCTGAGAGAGC
 ACTTTGGAACAAGACCATCAAGTTCAATCAGAGTTCTGGCGGAGACCCGAGATCGTGCGGCACTCCTTC
 AACTGCGGGGGCGAGTTCTTCTACTGCGATACGACACAGCTCTTCAACTCCACCTGGAACGGCACCGAGGG
 CAACAACACAGAGGGGAACTCCACTATCACCTCCCTTGCCGCATCAAGCAGATCATCAACATGTGGCAGG
 AGGTGGGAAAGGCCATGTATGCCCCCCCCATCGGGGGCCAGATCCGCTGCTCCTCCAACATCACCGGCCTG
 CTGCTCACCAGAGACGGGGGCACCGAGGGCAACGGCACGGAGAACGAGACGGAGATCTTCAGGCCCCGGCG
 CGGCGACATGAGGGATAACTGGCGGAGCGAGCTGTACAAGTACAAGGTGGTGAAGGTGGAGCCGCTCGGCG
 TGGCCCCACCCGGGCCAAGCGCCGCTCGTGACAGAAATGGGTGCCGAGCTTCGGTACTGTCTGGTGGGA
 GAGCTGGACAGATGGGAGAAAATTAGGCTGCGCCCCGGGAGGCAAAAAGAAATACAAGCTCAAGCATATCGT
 GTGGGCCTCGAGGGAGCTTGAACGCTTTCGCGTGAACCCAGGCCTGTGGAAACATCTGAGGGATGTGCGC
 AGATCCTGGGGCAATTGACGCCATCCCTCCAGTACCGGGAGTGAAGAGCTGAGGTCTTGTATAACACAGTG
 GCTACCCTCTACTGCGTACACCAGAGGATCGAGATTAAGGATACCAAGGAGGCCTTGACAAAATTGAGGA
 GGAGCAAAACAAGAGCAAGAAGAGGCCAGCAGGCAGCTGCTGACACTGGGCATAGCAACCAGGTATCAC
 AGAACTATCCTATTGTCCAAAACATTCAGGGCCAGATGGTTTCATCAGGCCATCAGCCCCGGACGCTCAAT
 GCCTGGGTGAAGGTTGTGCAAGAGAAGGCCTTTTCTCCTGAGGTTATCCCATGTTCTCCGCTTTGAGTGA
 GGGGGCCACTCCTCAGGACCTCAATACAATGCTTAATACCGTGGGCGGCCATCAGGCCGCCATGCAAATGT
 TGAAGGAGACTATCAACGAGGAGGCAGCCGAGTGGGACAGAGTGCATCCCGTCCACGCTGGCCCAATCGCG

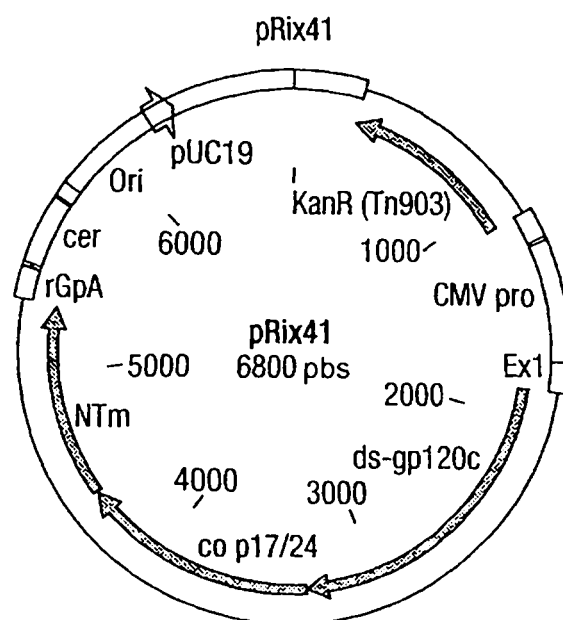
Fig.14 (Cont).

CCCGGACAGATGCGGGAGCCTCGCGGCTCTGACATTGCCGGCACCACCTCTACACTGCAAGAGCAAATCGG
 ATGGATGACCAACAATCCTCCCATCCCAGTTGGAGAAATCTATAACGGTGGATCATTCTCGGTCTCAATA
 AAATTGTTAGAATGTACTCTCCGACATCCATCCTTGACATTAGACAGGGACCCAAAGAGCCTTTTAGGGAT
 TACGTCGACCGGTTTATAAGACCTGCGAGCAGAGCAGGCCTCTCAGGAGGTCAAAAAGTGGATGACGGA
 GACACTCCTGGTACAGAACGCTAACCCCGACTGCAAAACAATCTGAAGGCACTAGGCCCGGTGCCACCC
 TGGAAGAGATGATGACCGCCTGTCAGGGAGTAGGCGGACCCGGACACAAAGCCAGAGTGTGATGGGCAAG
 TGGTCAAAAAGTAGTGTGGTTGGATGGCCTACTGTAAGGGAAAGAATGAGACGAGCTGAGCCAGCAGAGA
 TGGGGTGGGAGCAGCATCTCGAGACCTGGAACCAATGGAGCAATCACAAGTAGCAATACAGCAGCTACCA
 ATGCTGCTTGTGCTGGCTAGAAGCACAAGAGGAGGAGGAGGTGGGTTTCCAGTCACACCTCAGGTACCT
 TTAAGACCAATGACTTACAAGGCACTGTAGATCTTAGCCACTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGG
 GCTAATTCCTCCCAACGAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGGATCTACCACACACAAGGCTACTTCCCTG
 ATTGGCAGAACTACACACCAGGGCCAGGGGTGAGATATCCACTGACCTTTGGATGGTGTACAAAGCTAGTA
 CCAGTTGAGCCAGATAAGGTAGAAGAGGCCAATAAAGGAGAGAACACCAGCTTGTACACCTGTGAGCCT
 GCATGGAATGGATGACCCTGAGAGAGAAGTGTAGAGTGGAGGTTGACAGCCGCTTAGCATTTCATCAG
 TGGCCCGAGAGCTGCATCCGGAGTACTTCAAGAACTGCACTAGTGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCC
 TGGAAGCATCCAGGAAGTCAGCCTAAAAGTCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTGTCTTCATTG
 CCAAGTTTGTTCATAACAGCTGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAC
 CTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAACCCACCTCCCAATCCAAAGGGGAGCCG
 ACAGGCCCGAAGGAATAA [SEQ ID NO: 70]

Secuencia de aminoácidos del inserto:

MAEQLWVTVYYGVFVWKEATTLFCASDAKAYDTEVHNWVATHACVPTDPNPQEVVLGNVTEYFNMWKNM
 VDMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLDCDDVNTNSTTTTSGWTGEIRKGEIKNCSFNITTSIRDKV
 QKEYALFYNLDVVPIDDDNATTKNKTTRNFRLIHCNSSVMTQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCNKNT
 FDGKGLCTNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLLNGSLAEDEVVIRSDNFMONTKTIIVQLNESVAINCTRPNNT
 RKGIIHIGPGRFYAARKIIGDIRQAHCNLSRAQWNNTLKQIVIKLREHFGNKTIFKNQSSGGDPEIVRHSF
 NCGGEFFYCDTTQLFNSTWNGTEGNTEGNSTITLPCRIKQIINMWQEVGKAMYAPPIGGQIRCSSNITGL
 LLTRDGGTEGNGTENETEIFRPGGDMRDNRSELYKYKVVEPLGVAPTRAKRRVVQRMGARASVLSGG
 ELDRWEKIRLRPGGKKKYKLKHIVASRELERFAVNPGLLETSEGCROILGQLQPSLQTGSEELRSYNTV
 ATLYCVHQRIEIKDTKEALDKIEEQNKSKKKAQQAADTGHNSQVSNQYPIVQNIQGMVHQAI SPRTLN
 AWVKVVEEKAFSPFVIMFSALEGATPQDLNMLNTVGGHQAMQMLKETINEEAAEWDRVHPVHAGPIA
 PGQMPREPRGSDIAGTTSTLQEQIGWMTNPPPIPVGEIYKRWIILGLNKIVRMYSPSTILDIRQGPKEFRD
 YVDRFYKTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQANPDKTILKALGPAATLEEMMTACQGVGGPGHKARVLMGK
 WSKSSVVGWPTVRERMRAEPAADGVGAASRDLEKHGAITSSNTAATNAACAWLEAQEEEEVGFPVTPQVP
 LRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGLEGLIHSQRRQDILDWYHTQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWICYKLV
 PVEPDKVEEANKGENTSLLHPVSLHGMDDPEREVLEWRFD SRLAFHHVARELHPEYFKNCTSEPVDPRLP
 WKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFITAALGISYGRKRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSKGEP
 TGPKE [SEQ ID NO: 71]

Fig.15.



Secuencia de ADN del inserto

ATGGCCGAGCAGCTGTGGGTACCGTCTACTACGGCGTGCCTGTGTGGAAGGAGGCCACGACCACCCTCTT
 CTGCGCGAGCGACGCCAAGGCCTACGACACGGAAGTGCATAACGTGTGGGCGACGCATGCTTGCGTGCCTA
 CGGAÇCCCAACCCCAAGGAGGTGGTGTGGGAAACGTGACCGAGTACTTCAACATGTGGAAGAATAACATG
 GTGGATCAGATGCACGAGGACATCATCTCTGTGGGACCAGTCCCTGAAGCCCTGCGTGAAGCTGACGCC
 TCTCTGCGTGACACTGGACTGTGACGACGTCAACACCACCAACAGCACTACCACCACCAGCAACGGCTGGA
 CCGGAGAGATTGGAAGGGCGAGATCAAGAAGTCTCTTCAATATCACGACCTCGATCAGAGACAAGGTG
 CAGAAGGAATACGCGCTGTTTTATAATCTCGATGTGGTCCCCATCGACGACGACAATGCCACCACCAAGAA
 CAAGACGACGCGTAATTTAGACTCATTCAGTGCACACGAGCGTCATGACGAGGCTGCCCCAAGGTGT
 CCTTCGAACCAATCCCGATCCATTACTGTGCCCCCTGCCGATTGCGGATCCTCAAGTGTAACAACAAGACC
 TTCGACGGGAAGGGCCTGTGCACCAACGTCAGCACGGTGCAGTGCACCCATGGCATCCGCCCCGTCGTGAG
 CACCCAGCTGCTGCTGAACGGGTCCCTGGCTGAGGAGGAGGTGGTGATCCGGTCGGACAACCTCATGGACA
 ACACCAAGACAATCATCGTCCAGCTGAACGAGTCTGTGGCGATTAACTGTACCCGGCCTAACAACAACACC
 CGTAAGGGCATCCACATCGGGCCTGGACGGGCCTTCTATGCGCCCGCAAGATCATCGCGCATCCGGCA
 GGCCCATTGCAACCTCTCCCGCGCCAGTGAATAACACCCTGAAGCAGATCGTGATCAAGCTGAGAGAGC
 ACTTTGGAACAAGACCATCAAGTTCAATCAGAGTCTGGCGGAGACCCGAGATCGTGCGGCACTCCTTC
 AACTGCGGGGGCGAGTTCTTCTACTGCGATACGACACAGCTCTTCAACTCCACCTGGAACGGCACCAGGG
 CAACAACACAGAGGGAACTCCACTATCACCTCCCTTGGCCGATCAAGCAGATCATCAACATGTGGCAGG
 AGGTGGGAAAGGCCATGTATGCCCCCCCCATCGGGGGCCAGATCCGCTGCTCCTCCAACATACCGGCCTG
 CTGCTCACCAGAGACGGGGGACCGAGGGCAACGGCACGGAGAACGAGACGGAGATCTTCAGGCCCGGGCGG
 CGGCGACATGAGGGATAACTGGCGGAGCGAGCTGTACAAGTACAAGGTGGTGAAGGTGGAGCCGCTCGGCG
 TGGCCCCCACC CGGGCCAAGCGCCGCTCGTGCAGAGAATGGGTGCCCCGAGCTTCGGTACTGTCTGGTGA
 GAGCTGGACAGATGGGAGAAAATTAGGCTGCGCCCGGGAGGCAAAAAGAAATACAGCTCAAGCATATCGT
 GTGGGCCTCGAGGGAGCTTGAACGGTTTGCCGTGAACCCAGGCCTGCTGGAACATCTGAGGGATGTGCGC
 AGATCCTGGGGCAATTGCAGCCATCCCTCCAGACCGGGAGTGAAGAGCTGAGGTCCCTGTATAACACAGTG
 GCTACCTCTACTGCGTACACCAGAGGATCGAGATTAAGGATACCAAGGAGGCCTTGGAACAAATTGAGGA
 GGAGCAAAACAAGAGCAAGAAGGCCAGGAGGAGTGTGACACTGGGCATAGCAACCAGGTATCAC
 AGAATATCCTATTGTCCAAAACATTAGGGCCAGATGGTTTCATCAGGCCATCAGCCCCGGACGCTCAAT
 GCCTGGGTGAAGGTTGTGGAAGAGAAGGCCTTTTCTCTGAGGTTATCCCCATGTTCTCCGCTTTGAGTGA
 GGGGGCCACTCCTCAGGACCTCAATACAATGCTTAATACCGTGGGCGGCCATCAGGCCGCCATGCAATGT

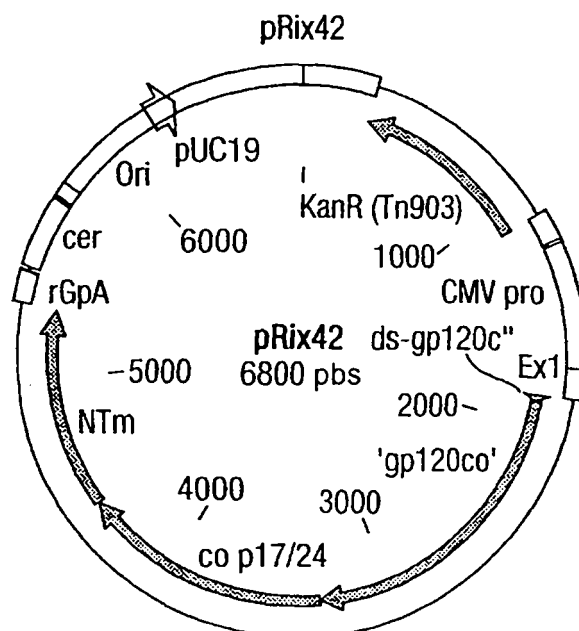
Fig.15 (Cont).

TGAAGGAGACTATCAACGAGGAGGCAGCCGAGTGGGACAGAGTGCATCCCGTCCACGCTGGCCCAATCGCG
 CCCGGACAGATGCGGGAGCCTCGCGGCTCTGACATTGCCGGCACCACCTCTACACTGCAAGAGCAAATCGG
 ATGGATGACCAACAATCCTCCCATCCAGTTGGAGAAATCTATAAACGGTGGATCATTCTCGGTCTCAATA
 AAATTGTTAGAAATGTACTCTCCGACATCCATCCTTGACATTAGACAGGGACCCAAAGAGCCTTTTAGGGAT
 TACGTCGACCGGTTTTATAAGACCCTGCGAGCAGAGCAGGCCTCTCAGGAGGTCAAAAACCTGGATGACGGA
 GACACTCCTGGTACAGAACGCTAACCCCGACTGCAAAAACAATCTTGAAGGCACTAGGCCCGGCTGCCACCC
 TGGAAAGAGATGATGACCGCCTGTCAGGGAGTAGGCGGACCCGGACACAAAGCCAGAGTGTGATGGGTGGC
 AAGTGGTCAAAAAGTAGTGTGGTTGGATGGCCTACTGTAAGGGAAAGAATGAGACGAGCTGAGCCAGCAGC
 AGATGGGGTGGGAGCAGCATCTCGAGACCTGGAAAAACATGGAGCAATCACAAGTAGCAATACAGCAGCTA
 CCAATGCTGCTTGTGCTGGCTAGAAGCACAAAGAGGAGGAGGTGGGTTTTCCAGTCACACCTCAGGTA
 CCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGA
 AGGGCTAATTAAGTCACTCCCAACGAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGGATCTACCACACACAAGGCTACTTCC
 CTGATTGGCAGAACTACACACCAGGGCCAGGGGTCAGATATCCACTGACCTTTGGATGGTGTACAAGCTA
 GTACCAGTTGAGCCAGATAAGGTAGAAGAGGCCAATAAAGGAGAGAACACCAGCGCCTTACACCCTGTGAG
 CCTGCATGGAATGGATGACCCTGAGAGAGAAGTGTAGAGTGGAGGTTTGACAGCCGCCTAGCATTTCATC
 ACGTGGCCCGGAGCTGCATCCGGAGTACTTCAAGAACTGCACTAGTGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAG
 CCCTGGAAGCATCCAGGAAGTCAGCCTAAAACCTGCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTGCTTTCA
 TTGCCAAGTTTGTTCATAACAGCTGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGAAGAA
 GACCTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAGCAACCCACCTCCCAATCCAAGGGGAG
 CCGACAGGCCCGAAGGAATAA [SEQ ID NO: 72]

Secuencia de aminoácidos del inserto:

MAEQLWVTVYYGVVPVWKEATTLFCASDAKAYDTEVHNWATHACVPTDPNPQEVVLGNVTEYFNMWKNNM
 VDOMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLDCDDVNTTNSTTTTSSNGWTGEIRKGEIKNCSFNITTSIRDKV
 QKEYALFYNLDVVPIDDDNATTKNKTTRNFRLIHCNSSVMTQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCNKT
 FDGKGLCTNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLLNGSLAEVEVVIRSDNFMNTKTIIVQLNESVAINCTRPNNNT
 RKGIIHIGPGRAFYAARKIIGDIRQAHCNLSRAQWNNLTQIVIKLREHFGNKTIFKNQSSGGDEIVRHSF
 NCGGEFFYCDTTQLFNSTWNGTEGNNTEGNSTITLPCRIKQIINMWQEVGKAMYAPPIGGQIRCSSNITGL
 LLTRDGGTEGNGTENETEIFRPGGDMRDNRSELYKYKVVKVEPLGVAPTRAKRRVVQRMGARASVLSGG
 ELDRWEKIRLRPGGKKKYKLKHIVWASRELERFAVNPGLLETSEGCRQILGQLQPSLQTSSEELRSLYNTV
 ATLYCVHQRIEIKDTEALDKIEEQNKSKKKAQQAADTGHSNQVSONYPIVQNIQGQMVHQIISPTLN
 AWVKVVEEKAFSPEVIPMFSALSEGATPQDLNLTMLNTVGGHQAAMQMLKETINEEAAEWDRVHPVHAGPIA
 PGQMPREPRGSDIAGTTSTLQEQIGWMTNNPPIPVGEIYKRWIILGLNKIVRMYSPTSILDIRQGPKEFRD
 YVDRFYKTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQANANPDCKTILKALGPAATLEEMMTACQGVGGPGHKARVLMGG
 KWSKSSVVGWPTVRERMRAEPAADGVGAASRDLEKHGAITSSNTAATNAACAWLEAQEEEEVGFPVTPQV
 PLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGLEGLIHSQRRQDILDWYHTQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWCYKL
 VPVEPDKVEEANKGENTSALHPVSLHGMDDPEREVLWRFSRLAFHHVARELHPEYFKNCTSEPVDPRLE
 PWKHFGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFITAALGISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSKGE
 PTGPKE [SEQ ID NO: 73]

Fig.16.



Secuencia de ADN del inserto

ATGGCCGAGCAGCTGTGGGTACCGTCTACTACGGCGTGCCTGTGTGGAAGGAGGCCACGACCACCCTCTT
 CTGCGCGAGCGACGCCAAGGCCTACGACACGGAAGTGCATAACGTGTGGCGGACGCATGCTTGGTGCCTA
 CGGACCCCAACCCCAAGGAGGTGGTGTCTGGGAAACGTGACCGAGTACTTCAACATGTGGAAGAATAACATG
 GTGGATCAGATGCACGAGGACATCATCTCTGTGGGACCAGTCCCTGAAGCCCTGCGTGAAGCTGACGCC
 TCTCTGCGTGACACTGGACTGTGACGACGTCAACACCACCAACAGCACTACCACCACCAGCAACGGCTGGA
 CCGGAGAGATTCCGAAGGGCGAGATCAAGAACTGCTCCTTCAATATCACGACCTCGATCAGAGACAAGGTG
 CAGAAGGAATACGCGCTGTTTTATAATCTCGATGTGGTCCCCATCGACGACGACAATGCCACCACCAAGAA
 CAAGACGACGCGTAATTTACAGACTCATTCTGCAACAGCAGCGTCATGACGAGGCCTGCCCAAGGTGT
 CCTTCGAACCAATCCCGATCCATTACTGTGCCCTGCCGATTCCGATCCTCAAGTGAACAACAAGACC
 TTCGACGGGAAGGGCTGTGCACCAACGTGACGACGGTGCAGTGCACCCATGGCATCCGCCCCGCTCGTGAG
 CACCCAGCTGCTGTGAACGGGTCCCTGGCTGAGGAGGAGGTGGTGATCCGGTCGGACAACCTCATGGACA
 ACACCAAGACAATCATCGTCCAGCTGAACGAGTCTGTGGCGATTAAGTGTACCCGGCCTAACAACAACACC
 CGTAAGGGCATCCACATCGGGCCTGGACGGGCCTTCTATGCCGCCGCAAGATCATCGGCGACATCCGGCA
 GGCCCATTGCAACCTCTCCCGCGCCAGTGAATAACACCCTGAAGCAGATCGTGATCAAGCTGAGAGAGC
 ACTTTGGAACAAGACCATCAAGTTCAATCAGAGTTCTGGCGGAGACCCCGAGATCGTGCGGCACTCCTTC
 AACTGCGGGGGCGAGTTCTTCTACTGCGATACGACACAGCTCTTCAACTCCACCTGGAACGGCACCGAGGG
 CAACAACACAGAGGGGAACTCCACTATCACCTCCCTTGCCGCATCAAGCAGATCATCAACATGTGGCAGG
 AGGTGGGAAAGGCCATGTATGCCCCCCCCATCGGGGGCCAGATCCGCTGCTCCTCCAACATCACGGCCCTG
 CTGCTCACCAGAGACGGGGGCACCGAGGGCAACGGCAGGAGAACGAGACGGAGATCTTCAGGCCCGGCGG
 CGGCGACATGAGGGATAACTGGCGGAGCGAGCTGTACAAGTACAAGGTGGTGAAGGTGGAGCCGCTCGGCG
 TGGCCCCACCCGGGCCAAGCGCGCGCTCGTGCAAGAGAATGGGTGCCGAGCTTCGGTACTGTCTGGTGGA
 GAGCTGGACAGATGGGAGAAAATTAGGCTGCGCCCGGAGGCAAAAAGAAAATACAAGCTCAAGCATATCGT
 GTGGGCCTCGAGGGAGCTTGAACGGTTTGCCGTGAACCCAGGCCTGCTGGAAACATCTGAGGGATGTCGCC
 AGATCCTGGGGCAATTGCAGCCATCCCTCCAGACCGGGAGTGAAGAGCTGAGGTCCTTGATAACACAGTG
 GCTACCCTCTACTGCGTACACCAGAGGATCGAGATTAAGGATACCAAGGAGGCCTTGGACAAAATTGAGGA
 GGAGCAAAACAAGAGCAAGAAGAAGGCCAGCAGGCAGCTGCTGACACTGGGCATAGCAACCAGGTATCAC
 AGAACTATCCTATTGTCCAAAACATTGAGGGCCAGATGGTTTCATCAGGCCATCAGCCCCGGACGCTCAAT
 GCCTGGGTGAAGGTTGTGCAAGAGAAGGCCTTTTCTCCTGAGGTTATCCCCATGTTCTCCGCTTTGAGTGA
 GGGGGCCACTCCTCAGGACCTCAATACAATGCTTAATACCGTGGGCGGCCATCAGGCCGCCATGCAAAATGT

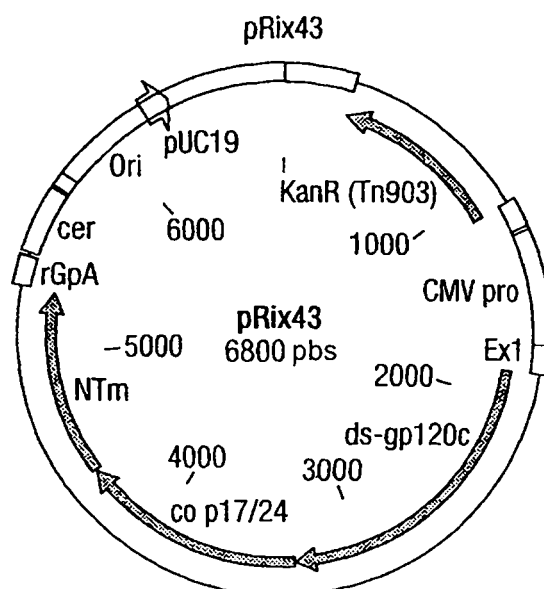
Fig.16 (Cont).

TGAAGGAGACTATCAACGAGGAGGCGAGTGGGACAGAGTGCATCCCGTCCACGCTGGCCCAATCGCG
 CCCGGACAGATGCGGGAGCCTCGCGGCTCTGACATTGCCGGCACCACCTCTACACTGCAAGAGCAAATCGG
 ATGGATGACCAACAATCCTCCCATCCAGTTGGAGAAATCTATAAACGGTGGATCATTCTCGGTCTCAATA
 AAATTGTTAGAATGTACTCTCCGACATCCATCCTTGACATTAGACAGGGACCCAAAGAGCCTTTTAGGGAT
 TACGTCGACCGGTTTTATAAGACCCTGCGAGCAGAGCAGGCCTCTCAGGAGGTCAAAAAGTGGATGACGGA
 GACACTCCTGGTACAGAACGCTAACCCGACTGCAAAAACAATCTTGAAGGCACTAGGCCCGGCTGCCACCC
 TGGAGAGATGATGACCGCCTGTGAGGAGTAGGCGGACCCGGACACAAAGCCAGAGTGTGATGGGTGGC
 AAGTGGTCAAAAAGTAGTGTGGTTGGATGGCCTACTGTAAGGGAAGAATGAGACGAGCTGAGCCAGCAGC
 AGATGGGGTGGGAGCAGCATCTCGAGACCTGGAAAAACATGGAGCAATCACAAGTAGCAATACAGCAGCTA
 CCAATGCTGCTTGTGCCTGGCTAGAAGCACAAGAGGAGGAGGAGGTGGGTTTTCCAGTCACACCTCAGGTA
 CCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAGAAAAGGGGGGACTGGA
 AGGGCTAATTCCTCCCAACGAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGGATCTACCACACACAAGGCTACTTCC
 CTGATTGGCAGAACTACACACCAGGGCCAGGGGTCAGATATCCACTGACCTTTGGATGGTGTACAAGCTA
 GTACCAGTTGAGCCAGATAAGGTAGAAGAGGCCAATAAAGGAGAGAACACCAGCTTGGCACACCTGTGAG
 CCTGCATGGAATGGATGACCTGAGAGAGAAGTGTAGAGTGGAGGTTGACAGCCGCCTAGCATTTCATC
 ACGTGGCCCCGAGAGCTGCATCCGGAGTACTTCAAGAACTGCACTAGTGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAG
 CCCTGGAAGCATCCAGGAAGTCAGCCTAAAAGTGTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTGCTTTCA
 TTGCCAAGTTTGTTCATAACAGCTGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAA
 GACCTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAACCCACCTCCCAATCCAAAGGGGAG
 CCGACAGGCCCGAAGGAATA [SEQ ID NO: 74]

Secuencia de aminoácidos del inserto:

MAEQLWVTVYYGVVWKEATTTLCASDAKAYDTEVHNWVATHACVPTDPNPQEVVLGNVTEYFNMWKNNM
 VDMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLDCDDVNTNSTTTTSSNGWTGEIRKGEIKNCSFNIITTSIRDKV
 QKEYALFYNLDVVPIDDDNATTKNKTTRNFRLIHCNSSVMTQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCNKNT
 FDGKGLCTNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLLNGSLAEDEVVIRSDNFMNDTKTIIVQLNESVAINCTRPNNNT
 RKGIHIGPGRAFYAARKIIGDIRQAHCNLSRAQWNNTLKQIVIKLREHFGNKTIFKNQSSGGDPEIVRHSF
 NCGGEFFYCDTTQLFNSTWNGTEGNNTEGNSTITLPCRIKQIINMWQEVGKAMYAPPIGGQIRCSSNITGL
 LLTRDGGTEGNGTENETEIFRPGGGMDRDNWRSELYKYKVVKEPLGVAPTRAKRRVVQRMGARASVLSGG
 ELDRWEKIRLRPGGKKKYKLKHIVWASRELERFAVNPGLLETSEGCRQILGQLQPSLQTGSEELRSLYNTV
 ATLYCVHQRIEIKDTKEALDKIEEQNKSKKKAQQAADTGHSNQVSQNYPIVQNIQGQMVHQAI SPRTLN
 AWVKVVEEKAFSPEVIPMFSALSEGATPQDLNLTMLNTVGGHQAAMQMLKETINEEAAEWDVHPVHAGPIA
 PGQMRPRGSDIAGTTSTLQEQIGWMTNNPPIPVGEIYKRWIIILGLNKIVRMYSPSILDIRQGPKEPFRD
 YVDRFYKTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQANANPDCKTILKALGPAATLEEMMTACQGVGGPGHKARVLMGG
 KWSKSSVVGWPTVRERMRAEPAADGVGAASRDLEKHGAITSSNTAATNAACAWLEAQEEEEVGFPVTPQV
 PLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGLEGLIHSQRRQDILDWIIYHTQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWCYKL
 VPVEPDKVEEANKGENTSLAHPVSLHGMDDPEREVLWRFDSRLAFHHVARELHPEYFKNCTSEPVDPRL
 PWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFITAALGISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSKGE
 PTGPKE [SEQ ID NO: 75]

Fig.17.



Secuencia de ADN del inserto

ATGGCCGAGCAGCTGTGGGTACCGTCTACTACGGCGTGCCTGTGTGGAAGGAGGCCACGACCACCTCTT
 CTGCGCGAGCGACGCCAAGGCCTACGACACGGAAGTGCATAACGTGTGGGCGACGCATGCTTGCGTGCCTA
 CGGACCCCAACCCCAAGGAGGTGGTGTGGGAAACGTGACCGAGTACTTCAACATGTGGAGAATAACATG
 GTGGATCAGATGCACGAGGACATCATCTCTGTGGGACCAGTCCCTGAAGCCCTGCGTGAAGCTGACGCC
 TCTCTGCGTGACACTGGACTGTGACGACGTCAACACCACCAACAGCACTACCACCACCAGCAACGGCTGGA
 CCGGAGAGATTTCGAAGGGCGAGATCAAGAACTGCTCCTTCAATATCACGACCTCGATCAGAGACAAGGTG
 CAGAAGGAATACGCGCTGTTTTATAATCTCGATGTGGTCCCCATCGACGACGACAATGCCACCACCAAGAA
 CAAGACGACGCGTAATTTAGACTCATTCACTGCAACAGCAGCGTCATGACGAGGCCCTGCCCAAGGTGT
 CCTTCGAACCAATCCCGATCCATTACTGTGCCCTGCCGATTGCGGATCCTCAAGTGTAAACAACAAGACC
 TTCGACGGGAAGGGCTGTGCACCAACGTGACGACGGTGCAGTGCACCCATGGCATCCGCCCGCTCGTGAG
 CACCCAGCTGCTGCTGAACGGGTCCCTGGCTGAGGAGGAGGTGGTATCCGGTCGGACAACCTCATGGACA
 ACACCAAGACAATCATCGTCCAGCTGAACGAGTCTGTGGCGATTAACTGTACCCGGCCTAACAAACAACACC
 CGTAAGGGCATCCACATCGGGCCTGGACGGGCCTTCTATGCCGCCCGCAAGATCATCGGCGACATCCGGCA
 GGCCCATTTGAACCTCTCCCGCGCCAGTGGAAATAACACCCCTGAAGCAGATCGTGATCAAGCTGAGAGAGC
 ACTTTGGAAACAAGACCATCAAGTTCAATCAGAGTTCTGGCGGAGACCCCGAGATCGTGCGCACTCCTTC
 AACTGCGGGGCGAGTTCTTCTACTGCGATACGACACAGCTCTTCAACTCCACCTGGAACGGCACCGAGGG
 CAACAACACAGAGGGAACTCCACTATCACCTCCCTTGCCGCATCAAGCAGATCATCAACATGTGGCAGG
 AGGTGGGAAAGGCCATGTATGCCCCCCCCATCGGGGGCCAGATCCGCTGCTCCTCAACATCACCGGCCTG
 CTGCTCACCAGAGACGGGGGACCGAGGGCAACGGCACGGAGAACGAGACGGAGATCTTCAGGCCCGGGCG
 CGGCGACATGAGGGATAACTGGCGGAGCGAGCTGTACAAGTACAAGGTGGTGAAGGTGGAGCCGCTCGGCG
 TGGCCCCACCCGGGCCAAGCGCCGCTCGTGACAGAAATGGGTGCCCCGAGCTTCGGTACTGTCTGGTGGA
 GAGCTGGACAGATGGGAGAAAATTAGGCTGCGCCCGGGAGGCAAAAAGAAATACAAGCTCAAGCATATCGT
 GTGGGCTCGAGGGAGCTTGAACGGTTTGCCGTGAACCCAGGCCTGCTGGAACATCTGAGGGATGTGCC
 AGATCTTGGGCAATTGCAGCCATCCCTCCAGACCGGGAGTGAAGAGCTGAGGTCTTGTATAACACAGTG
 GCTACCCTCTACTGCGTACACCAGAGGATCGAGATTAAGGATACCAAGGAGGCCTTGGACAAAATTGAGGA
 GGAGCAAAACAAGAGCAAGAAGAAGGCCACGAGGCAGCTGCTGACACTGGGCATAGCAACCAGGTATCAC
 AGAATATCTTATTGTCCAAAACATTACAGGGCCAGATGGTTTCATCAGGCCATCAGCCCCGGACGCTCAAT
 GCCTGGGTGAAGGTTGTGGAAGAGAAGGCCTTTTCTCTGAGGTTATCCCATGTTCTCCGCTTTGAGTGA
 GGGGGCCACTCCTCAGGACCTCAATACAATGCTTAATACCGTGGGCGGCCATCAGGCCGCCATGCAATGT

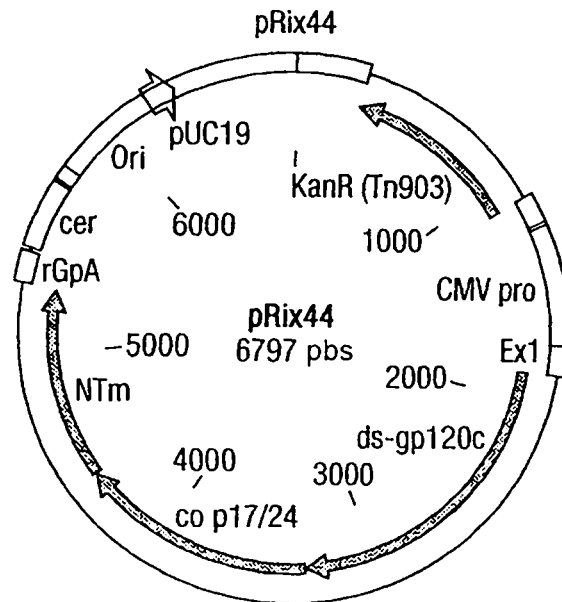
Fig.17 (Cont).

TGAAGGAGACTATCAACGAGGAGGCAGCCGAGTGGGACAGAGTGCATCCCGTCCACGCTGGCCCAATCGCG
 CCCGGACAGATGCGGGAGCCTCGCGGCTCTGACATTGCCGGCACCACCTCTACACTGCAAGAGCAAATCGG
 ATGGATGACCAACAATCCTCCCATCCCAGTTGGAGAAATCTATAAACGGTGGATCATTCTCGGTCTCAATA
 AAATTGTTAGAATGTACTCTCCGACATCCATCCTTGACATTAGACAGGGACCCAAAGAGCCTTTTAGGGAT
 TACGTCGACCGGTTTTATAAGACCCTGCGAGCAGAGCAGGCCTCTCAGGAGGTCAAAAAGTGGATGACGGA
 GACACTCCTGGTACAGAACGCTAACCCCGACTGCAAAACAATCTTGAAGGCACTAGGCCCGGCTGCCACCC
 TGGAAGAGATGATGACCGCCTGTCAGGGAGTAGGGCGACCCGGACACAAAGCCAGAGTGTGATGGGTGGC
 AAGTGGTCAAAAAGTAGTGTGGTTGGATGGCCTACTGTAAGGGAAGAATGAGACGAGCTGAGCCAGCAGC
 AGATGGGGTGGGAGCAGCATCTCGAGACCTGGAAAAACATGGAGCAATCACAAGTAGCAATACAGCAGCTA
 CCAATGCTGCTTGTGCCTGGCTAGAAGCACAAGAGGAGGAGGAGGTGGGTTTTCCAGTCACACCTCAGGTA
 CCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAGAAAAGGGGGGACTGGA
 AGGGCTAATTCACCTCCCAACGAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGGATCTACCACACACAAGGCTACTTCC
 CTGATTGGCAGAACTACACACCAAGGCCAGGGGTCAGATATCCACTGACCTTTGGATGGTGCTACAAGCTA
 GTACCAGTTGAGCCAGATAAGGTAGAAGAGGCCAATAAAGGAGAGAACACCAGCGCCGCACACCCTGTGAG
 CCTGCATGGAATGGATGACCTGAGAGAGAAGTGTAGAGTGGAGGTTTGACAGCCGCTAGCATTTTCATC
 ACGTGGCCCCGAGAGCTGCATCCGAGTACTTCAAGAACTGCACTAGTGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAG
 CCTTGAAGCATCCAGGAAGTCAGCCTAAAAGTCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTGCTTTCA
 TTGCCAAGTTTGTTCATAACAGCTGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAA
 GACCTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAGCAACCCACCTCCCAATCCAAAGGGGAG
 CCGACAGGCCCGAAGGAATAA [SEQ ID NO: 76]

Secuencia de aminoácidos del inserto:

MAEQLWVTVYYGVVPVWKEATTTLCASDAKAYDTEVHNWATHACVPTDPNPQEVVLGNVTEYFNMWKNNM
 VDQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLDCDDVNTNSTTTTNSNGWTGEIRKGEIKNCSFNITTSIRDKV
 QKEYALFYNLDDVPIDDDNATTKNKTRNFRLIHCNSSVMTQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCNKNT
 FDGKGLCTNVSTVQCETHGIRPVVSTQLLLNGLSLAEVIRSDNFMNTKTIIVQLNESVAINCTRPNNNT
 RKGIIHGPGAFYAARKIIGDIRQAHCNLSRAQWNNTLKQIVIKLREHFGNKTIFKNQSSGGDPEIVRHSF
 NCGGEFFYCDTTQLFNSTWNGTEGNTEGNSTITLPCRKQIINMWQEVGKAMYAPPIGGQIRCSSNITGL
 LLTRDGGTEGNTEGETEIRFRPGGDMRDNRSELYKYKVVKEPLGVAPTRAKRRVQRMGARASVLSGG
 ELDRWEKIRLRPGGKKYKLVASRELERFAVNPGLLETSEGCRQILGQLQPSLQTGSEELRSLYNTV
 ATLYCVHQRIEIKDTKEALDKIEEQNKSKKKAQQAADTGHNSQVSQNYPIVQNIQGMVHQAISPTLN
 AWVKVVEEKAFSPEVIMFSALSEGATPQDLNMLNTVGGHQAAMQMLKETINEEAAEWDRVHPVHAGPIA
 PGQMREPRGSDIAGTTSTLQEQIGWMTNNPPIPVGEIYKRWIILGLNKIVRMYSPSILDIRQGPKEPFRD
 YVDRFYKTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQANANPDCKTILKALGPAATLEEMMTACQGVGGPGHKARVLMGG
 KWSKSSVVGWPTVRERMRAEPAADGVGAASRDLEKHGAISSNTAATNAACAWLEAQEEEEVGFVTPQV
 PLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGLEGLIHSQRRQDILDWIYHTQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWCYKL
 VPVEPDKVEEANKGENTSAAHPVSLHGMDPPEREVLEWRFSRLAFHHVARELHPEYFKNCTSEPVDPRLE
 PWKHPSQPKTACTNICYCKKCFHCQVCFITAALGISYGRKKRRQRRRPQGSQTHQVSLSKQPTSQSKGE
 PTGPKE [SEQ ID NO: 77]

Fig.18.



Secuencia de ADN del inserto

ATGGCCGAGCAGCTGTGGGTACCGTCTACTACGGCGTGCCTGTGTGGAAGGAGGCCACGACCACCTCTT
 CTGCGCGAGCGACGCCAAGGCCTACGACACGGAAGTGCATAACGTGTGGGCGACGCATGCTTGCGTGCCTA
 CGGACCCCAACCCCAAGGAGGTGGTGGTGGGAAACGTGACCGAGTACTTCAACATGTGGAAGAATAACATG
 GTGGATCAGATGCACGAGGACATCATCTCTGTGGGACCAGTCCCTGAAGCCCTGCGTGAAGCTGACGCC
 TCTCTGCGTGACACTGGACTGTGACGACGTCAACACCACCAACAGCACTACCACCACCAGCAACGGCTGGA
 CCGGAGAGATTTCGAAGGGCGAGATCAAGAACTGCTCCTTCAATATCACGACCTCGATCAGAGACAAGGTG
 CAGAAGGAATACGCGCTGTTTTATAATCTCGATGTGGTCCCCATCGACGACGACAATGCCACCACCAAGAA
 CAAGACGACGCGTAATTTTCACTTCACTGCAACAGCAGCGTCATGACGACGCGCTGCCCAAGGTGT
 CCTTCGAACCAATCCCGATCCATTACTGTGCCCTGCCGATTTCGGATCCTCAAGTGTAACAACAAGACC
 TTCGACGGGAAGGGCCTGTGCACCAACGTGACGACGGTGCAGTGCACCCATGGCATCCGCCCCGTCGTGAG
 CACCCAGCTGCTGCTGAACGGGTCCCTGGCTGAGGAGGAGGTGGTGTATCCGGTCGGACAACCTCATGGACA
 ACACCAAGACAATCATCGTCCAGCTGAACGAGTCTGTGGCGATTAACTGTACCCGGCCTAACACAACACC
 CGTAAGGGCATCCACATCGGGCCTGGACGGGCCTTCTATGCCGCCCGCAAGATCATCGGGCAGATCCGGCA
 GGCCATTGCAACCTCTCCCGCGCCAGTGGGAATAACACCCTGAAGCAGATCGTGATCAAGCTGAGAGAGC
 ACTTTGGAACAAGACCATCAAGTTCAATCAGAGTTCTGGCGGAGACCCCGAGATCGTGCGGCACTCCTTC
 AACTGCGGGGGCGAGTTCTTCTACTGCGATACGACACAGCTCTTCAACTCCACCTGGAACGGCACCGAGGG
 CAACAACACAGAGGGAACTCCACTATCACCTCCCTTGCCGCATCAAGCAGATCATCAACATGTGGCAGG
 AGGTGGGAAGGCCATGTATGCCCCCCCCATCGGGGGCCAGATCCGCTGCTCCTCCAACATCACCGGCCTG
 CTGCTCACAGAGACGGGGGCACCGAGGGCAACGGCACGGAGAACGAGACGGAGATCTTCAGGCCCGGCGG
 CGGCGACATGAGGGATAACTGGCGGAGCGAGCTGTACAAGTACAAGGTGGTGAAGGTGGAGCCGCTCGGCG
 TGGCCCCACCCGGGCCAAGCGCCGCGTCTGCGAGAGAATGGGTGCCCGAGCTTCGGTACTGTCTGGTGGGA
 GAGCTGGACAGATGGGAGAAAATTAGGCTGCGCCCGGGAGGCAAAAAGAAATACAAGCTCAAGCATATCGT
 GTGGGCCTCGAGGGAGCTTGAACGGTTTGGCGTGAACCCAGGCCTGTGGAACATCTGAGGGATGTGCGC
 AGATCCTGGGGCAATTGCAGCCATCCCTCCAGACCGGGAGTGAAGAGCTGAGGTCTTGTATAACACAGTG
 GCTACCCTCTACTGCGTACACCAGAGGATCGAGATTAAGGATACCAAGGAGGCCTTGGACAAAATTGAGGA
 GGAGCAAAACAAGAGCAAGAAGAAGGCCACGAGGCAGCTGCTGACACTGGGCATAGCAACCAGGTATCAC
 AGAACTATCTATTGTCCAAAACATTACGGGCCAGATGGTTTCATCAGGCCATCAGCCCCGGACGCTCAAT
 GCCTGGGTGAAGTTGTGGAAGAGAAGGCCTTTCTCCTGAGGTTATCCCCATGTTCTCCGCTTTGAGTGA
 GGGGGCCACTCCTCAGGACCTCAATACAATGCTTAATACCGTGGGCGGCCATCAGGCCGCCATGCAATGT

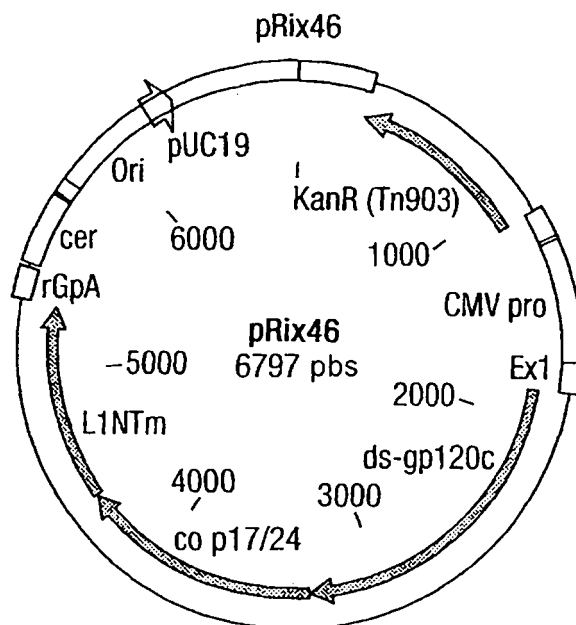
Fig.18 (Cont).

TGAAGGAGACTATCAACGAGGAGGCAGCCGAGTGGGACAGAGTGCATCCCGTCCACGCTGGCCCAATCGCG
 CCCGGACAGATGCGGGAGCCTCGCGGCTCTGACATTGCCGGCACCACCTCTACACTGCAAGAGCAAATCGG
 ATGGATGACCAACAATCCTCCCATCCCAGTTGGAGAAATCTATAAACGGTGGATCATTCTCGGTCTCAATA
 AAATTGTTAGAATGTACTCTCCGACATCCATCCTTGACATTAGACAGGGACCCAAAGAGCCTTTTAGGGAT
 TACGTCGACCGGTTTTATAAGACCCTGCGAGCAGAGCAGGCCCTCTCAGGAGGTCAAAAACCTGGATGACGGA
 GACACTCCTGGTACAGAACGCTAACCCCGACTGCAAAACAATCTTGAAGGCACTAGGCCCGGCTGCCACCC
 TGGGAAGAGATGATGACCGCCTGTCAGGGAGTAGGCGGACCCGGACACAAAGCCAGAGTGTTGATGGGCAAG
 TGGTCAAAAAGTAGTGTTGGTGGATGGCCTACTGTAAGGGAAAGAATGAGACGAGCTGAGCCAGCAGCAGA
 TGGGGTGGGAGCAGCATCTCGAGACCTGGAACCAATGGAGCAATCACAAGTAGCAATACAGCAGCTACCA
 ATGCTGCTTGTGCTGGCTAGAAGCACAAGAGGAGGAGGAGGTGGGTTTTCCAGTCACACCTCAGGTACCT
 TTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGG
 GCTAATTCACTCCCAACGAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGGATCTACCACACACAAGGCTACTTCCCTG
 ATTGGCAGAACTACACACCAGGGCCAGGGGTGAGATATCCACTGACCTTTGGATGGTGTACAAGCTAGTA
 CCAGTTGAGCCAGATAAGGTAGAAGAGGCCAATAAAGGAGAGAACACCAGCGCCGCACACCTGTGAGCCT
 GCATGGAATGGATGACCTGAGAGAGAAGTGTTAGAGTGGAGTTTGACAGCCGCTTAGCATTTCATCACG
 TGGCCCGAGAGCTGCATCCGGAGTACTTCAAGAACTGCACTAGTGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCC
 TGGGAAGCATCCAGGAAGTCAGCCTAAAACCTGCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTTGCTTTCATTG
 CCAAGTTTGTTCATAACAGCTGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAC
 CTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAACCCACCTCCCAATCAAAGGGGAGCCG
 ACAGCCCCGAAGGAATAA [SEQ ID NO: 78]

Secuencia de aminoácidos del inserto:

MAEQLWVTVYYGVVWKEATTLFCASDAKAYDTEVHNWATHACVPTDPNPQEVVLGNVTEYFNMWKNM
 VDQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLDCDDVNTTNSTTTTSGWTGEIRKGEIKNCSFNIITSIRDKV
 QKEYALFYNLDVPIDDDNATTNKTTRNFRLIHCNSSVMTQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCNKNT
 FDGKGLCTNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLLNGSLAEEVIRSDNFMDNTKTIIVQLNESVAINCTRPNNNT
 RKGIIHGPGRAFYAARKIIGDIRQAHCNLSRAQWNNTLQIVIKLREHFGNKTIKFNQSSGGDEIVRHSF
 NCGGEFFYCDTTLFNSTWNGTEGNNTEGNSTITLPCRIKQIINMWQEVGKAMYAPPIGGQIRCSSNITGL
 LLTRDGGTEGNGTENETEIFRPGGDMRDNRSELYKYKVVEPLGVAPTRAKRRVVQRMGARASVLSGG
 ELDRWEKIRLRPGGKKKYKLKHIVWASRELERFAVNPGLLETSEGCRIILGQLQPSLQTGSEELRSLYNTV
 ATLYCVHQRIEIKDTKEALDKIEEEQNKSKKKAQQAADTGHSNQVSQNYPIVQNIQGMVHQAI SPRTLN
 AWVKVVEEKAFSPEVIMFSALEGATPQDLNMLNTVGGHQAAMQMLKETINEEAAEWDRVHPVHAGPIA
 PGQMREPRGSDIAGTTSTLQEQIGWMTNPNPIPVGEIYKRWIILGLNKIVRMYSPTSILDIRQGPKEPFRD
 YVDRFYKTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQANPDCKTILKALGPAATLEEMMTACQGVGGPGHKARVLMGK
 WSKSSVVGWPTVRERMRAEPAADGVGAASRDLEKHGAITSSNTAATNAACAWLEAQEEEEVGFPVTPQVP
 LRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGLEGLIHSQRRQDILDLWIYHTQGYFPDQNYTPGPGVRYPLTFGWCYKLV
 PVEPDKVEEANKGENTSAAHPVSLHGMDDPEREVLEWRFDLSRLAFHHVARELHPEYFKNCTSEPVDPRLP
 WKHPGSQPKTACTNICYCKCCFHCQVCFITAAALGISYGRKKRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSKGEP
 TGPKE [SEQ ID NO: 79]

Fig.19.



Secuencia de ADN del inserto

ATGGCCGAGCAGCTGTGGGTACCGTCTACTACGGCGTGCCTGTGTGGAAGGAGGCCACGACCACCCTCTT
 CTGCGCGAGCGACGCCAAGGCTACGACACGGAAGTGCATAACGTGTGGGCGACGCATGCTTGCGTGCCTA
 CGGACCCCAACCCCAAGGAGTGGTGCTGGGAAACGTGACCGAGTACTTCAACATGTGGAAGAATAACATG
 GTGGATCAGATGCACGAGGACATCATCTCTGTGGGACCAGTCCCTGAAGCCCTGCGTGAAGCTGACGCC
 TCTCTGCGTGACACTGGACTGTGACGACGTCAACACCACCAACAGCACTACCACCACCAGCAACGGCTGGA
 CCGGAGAGATTTCGGAAGGGCGAGATCAAGAAGTCTCCTTCAATATCAGGACCTCGATCAGAGACAAGGTG
 CAGAAGGAATACGCGCTGTTTATAATCTCGATGTGGTCCCCATCGACGACGACAATGCCACCACCAAGAA
 CAAGACGACGCGTAATTTTCACTGCAACAGCAGCGTCATGACGCAGGCCTGCCCCAAGGTGT
 CCTTCGAACCAATCCCGATCCATTACTGTGCCCTGCCGGATTCCGGATCCTCAAGTGTAAACAACAGACC
 TTCGACGGGAAGGGCCTGTGCACCAACGTGACGACGGTGCAGTGCACCCATGGCATCCGCCCCGTCGTGAG
 CACCCAGCTGCTGCTGAACGGTCCCTGGCTGAGGAGGAGGTGGTGTCCGGTCGGACAACCTTCATGGACA
 ACACCAAGACAATCATCGTCCAGCTGAACGAGTCTGTGGCGATTAAGTGTACCCGGCCTAACAACAACACC
 CGTAAGGGCATCCACATCGGGCCTGGACGGGCCTTCTATGCCGCCCGCAAGATCATCGGCGACATCCGGCA
 GGCCCATTGCAACCTCTCCCGCGCCAGTGGAATAACACCCTGAAGCAGATCGTGATCAAGCTGAGAGAGC
 ACTTTGGAACAAGACCATCAAGTTCAATCAGAGTTCTGGCGGAGACCCGAGATCGTGCGGCACTCCTTC
 AACTGCGGGGGCGAGTTCTTCTACTGCGATACGACAGCTCTTCACTCCACCTGGAACGGCACCAGGGG
 CAACAACACAGAGGGAACTCCACTATCACCTCCCTTGGCGCATCAAGCAGATCATCAACATGTGGCAGG
 AGGTGGGAAAGGCCATGTATGCCCCCCCCATCGGGGGCCAGATCCGCTGCTCCTCCAACATCACCGGCCTG
 CTGCTCACCAGAGACGGGGCACCGAGGGCAACGGCACGGAGAACGAGACGGAGATCTTCAGGCCCCGGCGG
 CGGCGACATGAGGGATAACTGGCGGAGCGAGCTGTACAAGTACAAGTGGTGAAGGTGGAGCCGCTCGGCG
 TGGCCCCCACCCGGGCCAAGCGCCGCTCGTGACAGAGATGGGTGCCGAGCTTCGGTACTGTCTGGTGA
 GAGCTGGACAGATGGGAGAAAATTAGGCTGCGCCCGGAGGCAAAAAGAAATACAAGCTCAAGCATATCGT
 GTGGGCCTCGAGGGAGCTTGAACGGTTTGCCGTGAACCCAGGCCTGCTGGAAACATCTGAGGGATGTCGCC
 AGATCCTGGGGCAATTGCAGCCATCCCTCCAGACCGGAGTGAAGAGCTGAGGTCTTGTATAACACAGTG
 GCTACCCTCTACTGCGTACACCAGAGGATCGAGATTAAGGATACCAAGGAGGCCTTGACAAAAATTGAGGA
 GGAGCAAAACAAGAGCAAGAAGAAGGCCACGAGGCGAGCTGCTGACACTGGGCATAGCAACCAGGTATCAC
 AGAATATCCTATTGTCCAAACATTGAGGGCCAGATGGTTTATCAGGCCATCAGCCCCGGGACGCTCAAT
 GCCTGGGTGAAGGTTGTGGAAGAGAAGGCCCTTTTCTCTGAGGTTATCCCCATGTTCTCCGCTTTGAGTGA
 GGGGGCCACTCCTCAGGACCTCAATACAATGCTTAATACCGTGGGCGGCCATCAGGCCGCCATGCAATGT

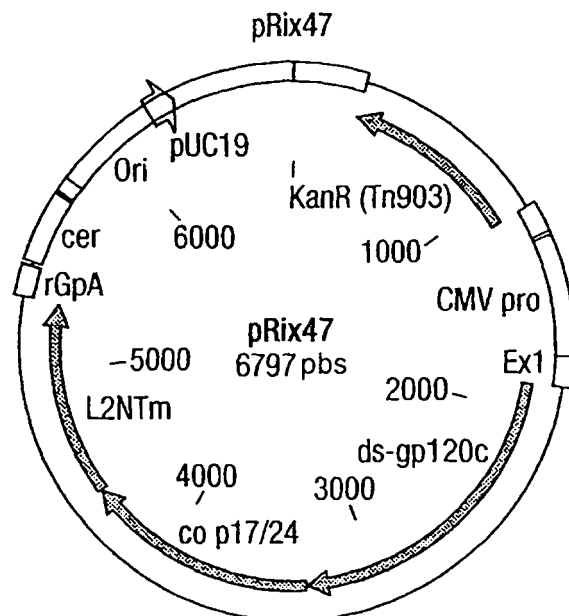
Fig.19 (Cont).

TGAAGGAGACTATCAACGAGGAGGCAGCCGAGTGGGACAGAGTGCATCCCGTCCACGCTGGCCCAATCGCG
 CCCGGACAGATGCGGGAGCCTCGCGGCTCTGACATTGCCGGCACCACCTCTACACTGCAAGAGCAAATCGG
 ATGGATGACCAACAATCCTCCCATCCCAGTTGGAGAAATCTATAAACGGTGGATCATTCTCGGTCTCAATA
 AAATTGTTAGATGTACTCTCCGACATCCATCCTTGACATTAGACAGGGACCCAAAGAGCCTTTTAGGGAT
 TACGTCGACCCGGTTTATAAGACCCTGCGAGCAGAGCAGGCCTCTCAGGAGGTCAAAAAGTGGATGACGGA
 GACACTCCTGGTACAGAACGCTAACCCCGACTGCAAAAACAATCTTGAAGGCACTAGGCCCGGCTGCCACCC
 TGGAAGAGATGATGACCGCCTGTCAGGGAGTAGGCGGACCCGGACACAAAGCCAGAGTGTGATGGGCAAG
 TGGTCAAAAAGTAGTGTGGTTGGATGGCCTACTGTAAGGGAAAGAATGAGACGAGCTGAGCCAGCAGCAGA
 TGGGGTGGGAGCAGCATCTCGAGACCTGGAAAAACATGGAGCAATCACAACTAGCAATACAGCAGCTACCA
 ATGCTGCTTGTGCTTGGCTAGAAGCACAAGAGGAGGAGGAGGTGGGTTTTCCAGTCACACCTCAGGTACCT
 TTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGG
 GCTAATTAAGTCCCAACGAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGGATCTACCACACACAAGGCTACTTCCCTG
 ATTGGCAGAACTACACACCAGGGCCAGGGGTGAGATATCCACTGACCTTTGGATGGTGCTACAAGCTAGTA
 CCAGTTGAGCCAGATAAGGTAGAAGAGGCCAATAAAGGAGAGAACACCAGCGCCTTACACCCTGTGAGCCT
 GCATGGAAATGGATGACCCGTGAGAGAGAAGTGTAGAGTGGAGGTTTGACAGCCGCTTAGCATTTTCATCAGG
 TGGCCCGAGAGCTGCATCCGGAGTACTTCAAGAACTGCACTAGTGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCC
 TGGAAGCATCCAGGAAGTCAGCCTAAACTGCTTGATACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTGCTTTCATTG
 CCAAGTTTGTTCATAACAGCTGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAC
 CTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAACCCACCTCCCAATCCAAAGGGGAGCCG
 ACAGGCCCCGAAGGAATAA [SEQ ID NO: 80]

Secuencia de aminoácidos del inserto:

MAEQLWVTVYYGVVPWKEATTTLFCASDAKAYDTEVHNVWATHACVPTDPNPQEVVLGNVTEYFNMWKNM
 VDQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLDCDDVNTNSTTTTNSNGWTGEIRKGEIKNCSFNITTSIRDKV
 QKEYALFYNLDVVPIDDDNATTKNKTTRNFRLIHCNSSVMTQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCNKNT
 FDGKGLCTNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGSLAEFEVIRSDNFMNTKTIIVQLNESVAINCTRPNNNT
 RKGIIHGPGRAFYAARKIIGDIRQAHCNLSRAQWNNTLKQIVIKLREHFGNKTIFNQSSGGDPEIVRHSF
 NCGGEFFYCDTTQLFNSTWNGTEGNNTGNSTITLPCRIKQIINMWQEVGKAMYAPPPIGGQIRCSSNITGL
 LLTRDGGTEGNGTENETEIFRPGGDMRDNRSELYKYKVVKVEPLGVAPTRAKRRVVQRMGARASVLSGG
 ELDRWEKIRLRPGGKKKYKLKHIVWASRELERFAVNPGLLETSEGCRQILGQLQPSLQTGSEELRSLYNTV
 ATLYCVHQRIEIKDTEALDKIEEEQNKSKKKAQAAADTGHSNQVSQNYPIVQNIQGMVHQAI SPRTL N
 AWVKVVEEKAFSPEVIPMFSALSEGATPQDLNMLNTVGGHQAAMQMLKETINEEAAEWDRVHPVHAGPIA
 PGQMRPREPRGSDIAGTTSTLQEQIGWMTNPNPIPVGEIYKRWIILGLNKIVRMYSPITSILDIRQGPKEPFRD
 YVDRFYKTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQNaNPDCKTILKALGPAATLEEMMTACQGVGGPGHKARVLMGK
 WSKSSVVGWPTVRERMRAEPAADGVGAASRDLEKHGAITSSNTAATNAACAWLEAQEEEEVGFPVTPQVP
 LRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGLEGLIHSQRRQDILDWLYHTQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWICYKLV
 PVEPDKVEEANKGENTSALHPVSLHGMDPEREVLEWRFDSRLAFHHVARELHPEYFKNCTSEVPDRLEP
 WKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFITAAALGISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSKGEP
 TGPKE [SEQ ID NO: 81]

Fig.20.



Secuencia de ADN del inserto

ATGGCCGAGCAGCTGTGGGTACCGTCTACTACGGCGTGCCTGTGTGGAAGGAGGCCACGACCACCCTCTT
 CTGCGCGAGCGACGCCAAGGCCTACGACACGGAAGTGCATAACGTGTGGGCGACGCATGCTTGCCTGCCTA
 CGGACCCCAACCCCAAGGAGGTGGTGTGGGAAACGTGACCGAGTACTTCAACATGTGGAAGAATAACATG
 GTGGATCAGATGCACGAGGACATCATCTCTGTGGGACCAGTCCCTGAAGCCCTGCGTGAAGCTGACGCC
 TCTCTGCGTGACACTGGACTGTGACGACGTCAACACCACCAACAGCACTACCACCACCAGCAACGGCTGGA
 CCGGAGAGATTGGAAGGGCGAGATCAAGAAGTCTCTTCAATATCAGGACCTCGATCAGAGACAAGGTG
 CAGAAGGAATACGCGCTGTTTTATAATCTCGATGTGGTCCCATCGACGACGACAATGCCACCACCAAGAA
 CAAGACGACGCGTAATTTTCACTCATTTCACTGCAACAGCAGCGTCATGACGCAGGCCTGCCCAAGGTGT
 CCTTCGAACCAATCCCGATCCATTACTGTGCCCCCTGCCGGATTGCGGATCCTCAAGTGTAAACAAGACC
 TTCGACGGGAAGGGCCTGTGCACCAACGTGACGACGGTGCAGTGCACCCATGGCATCCGCCCCGTGCTGAG
 CACCCAGCTGCTGCTGAACGGGTCCCTGGCTGAGGAGGAGGTGGTGTATCCGGTCGGACAACCTTCATGGACA
 ACACCAAGACAATCATCGTCCAGCTGAACGAGTCTGTGGCGATTAACTGTACCCGGCCTAACACAACACC
 CGTAAGGCATCCACATCGGGCCTGGACGGGCCTTCTATGCCGCCCGCAAGATCATCGGCGACATCCGGCA
 GGCCCATTGCAACCTCTCCGCGCCAGTGGGAATAACCCCTGAAGCAGATCGTGATCAAGCTGAGAGAGC
 ACTTTGGAACAAGACCATCAAGTTCAATCAGAGTCTGTGGCGAGACCCGAGATCGTGCGGCACTCCTTC
 AACTGCGGGGGCGAGTTCTTCTACTGCGATACGACACAGCTTTCAACTCCACCTGGAACGGCACCGAGGG
 CAACAACACAGAGGGGAACTCCACTATCACCTCCCTTGCCGATCAAGCAGATCATCAACATGTGGCAGG
 AGGTGGGAAAGGCCATGTATGCCCCCCCCATCGGGGGCCAGATCCGCTGCTCCTCCAACATCACCGGCCTG
 CTGCTCACCAGAGACGGGGGACCGAGGGCAACGGCACGGAGAACGAGACGGAGATCTTCAGGCCCCGGCG
 CGGCGACATGAGGGATAACTGGCGGAGCGAGCTGTACAAGTACAAGGTGGTGAAGGTGGAGCCGCTCGGCG
 TGGCCCCACCCGGGCCAAGCGCCGCTGCTGCAGAGAATGGGTGCCCGAGCTTCGGTACTGTCTGGTGGA
 GAGCTGGACAGATGGGAGAAAATTAGGCTGCGCCCGGAGGCAAAAAGAAATACAAGCTCAAGCATATCGT
 GTGGGCTCGAGGGAGCTTGAACGGTTTGCCGTGAACCCAGGCCTGCTGGAAACATCTGAGGGATGTGCGC
 AGATCCTGGGGCAATTGCAGCCATCCCTCCAGACCGGGAGTGAAGAGCTGAGGTCTTGTATAACACAGTG
 GCTACCTCTACTGCGTACACCAGAGGATCGAGATTAAGGATACCAAGGAGGCCTTGACAAAATTGAGGA
 GGAGCAAACAAGAGCAAGAAGAAGGCCAGCAGGCAGCTGCTGACACTGGGCATAGCAACCAGGTATCAC
 AGAATATCCTATTGTCCAAAACATTCAGGGCCAGATGGTTTCATCAGGCCATCAGCCCCCGACGCTCAAT
 GCCTGGGTGAAGGTGTGCGAAGAGAAGGCCTTTCTCTGAGGTTATCCCATGTTCTCCGCTTTGAGTGA
 GGGGGCCACTCCTCAGGACCTCAATACAATGCTTAATACCGTGGGCGGCCATCAGGCCGCCATGCAATGT

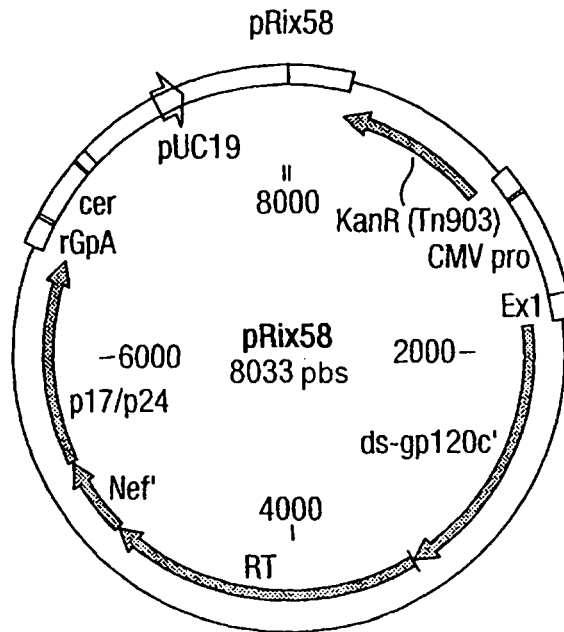
Fig.20 (Cont).

TGAAGGAGACTATCAACGAGGAGGCAGCCGAGTGGGACAGAGTGCATCCCGTCCACGCTGGCCCAATCGCG
 CCCGGACAGATGCGGGAGCCTCGCGGCTCTGACATTGCCGGCACCACCTCTACACTGCAAGAGCAAATCGG
 ATGGATGACCAACAATCCTCCCATCCCAGTTGGAGAAATCTATAAACGGTGGATCATTCTCGGTCTCAATA
 AAATTGTTAGAAATGTACTCTCCGACATCCATCCTTGACATTAGACAGGGACCCAAAGAGCCTTTTAGGGAT
 TACGTCGACCGGTTTTATAAGACCCTGCGAGCAGAGCAGGCCTCTCAGGAGGTCAAAAACCTGGATGACGGA
 GACACTCCTGGTACAGAACGCTAACCCCGACTGCAAAACAATCTTGAAGGCACTAGGCCCGGCTGCCACCC
 TGAAGAGATGATGACCGCCTGTCAGGGAGTAGGCGGACCCGGACACAAAGCCAGAGTGTTGATGGGCAAG
 TGGTCAAAAAGTAGTGTGGTTGGATGGCCTACTGTAAGGGAAAGAATGAGACGAGCTGAGCCAGCAGCAGA
 TGGGGTGGGAGCAGCATCTCGAGACCTGGAAAAACATGGAGCAATCACAAGTAGCAATACAGCAGCTACCA
 ATGCTGCTTGTGCCTGGCTAGAAGCACAAGAGGAGGAGGAGGTGGGTTTCCAGTCACACCTCAGGTACCT
 TTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGG
 GCTAATTCACCTCCCAACGAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGGATCTACCACACACAAGGCTACTTCCCTG
 ATTGGCAGAACTACACACCAGGGCCAGGGGTGAGATACCACTGACCTTGGATGGTGCTACAAGCTAGTA
 CCAGTTGAGCCAGATAAGGTAGAAGAGGCCAATAAAGGAGAGAACACCAGCTTGGCACACCCCTGTGAGCCT
 GCATGGAATGGATGACCTGAGAGAGAAGTGTTAGAGTGGAGGTTTGACAGCCGCTAGCATTTTCATCACG
 TGGCCCGAGAGCTGCATCCGGAGTACTTCAAGAACTGCACTAGTGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCC
 TGAAGCATCCAGGAAGTCAGCCTAAACTGCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTGCTTTCATTG
 CCAAGTTTGTTCATAACAGCTGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAC
 CTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAACCCACCTCCCAATCCAAAGGGGAGCCG
 ACAGGCCCGAAGGAATAA [SEQ ID NO: 82]

Secuencia de aminoácidos del inserto:

MAEQLWVTVYYGVVWKEATTTLFCASDAKAYDTEVHNWATHACVPTDPNPQEVVLGNVTEYFNMWKNM
 VDQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLDCDDVNTNSTTTTNSNGWTGEIRKGEIKNCSFNITTSIRDKV
 QKEYALFYNLDVVPIDDDNATTKNKTTRNFRLIHCNSSVMTQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCNKNT
 FDGKGLCTNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNLGSLAEVEVIRSDNFMNDTKTIIVQLNESVAINCTRPNNNT
 RKGIIHGPGAFYAARKIIGDIRQAHCNLSRAQWNNTLKQIVIKLREHFGNKTIKFNQSSGGDPEIVRHSF
 NCGGEFFYCDTTQLFNSTWNGTEGNNTEGNSTITLPCRIKQIINMWQEVGKAMYAPPIGGQIRCSSNITGL
 LLTRDGGTEGNGTENETEIFRPGGDMRDNRSELYKYKVVKVEPLGVAPTRAKRRVVQRMGARASVLSGG
 ELDRWEKIRLRPGGKKYKYLKHIVWASRELERFAVNPGLLETSEGCRQILGQLQPSLQTGSEELRSLYNTV
 ATLYCVHQRIEIKDTKEALDKIEEQNKSKKKAQQAADTGHNSQVSNYPYVQNIQGQMVHQAI SPRTL N
 AWVKVVEEKAFSPEVIMFSALSEGATPQDLNTMLNTVGGHQAAMQMLKETINEEAAEWDRVHPVHAGPIA
 PGQMREPRGSDIAGTTSTLQEQIGWMTNNPPIPVGEIYKRWIILGLNKIVRMYSPSILDIRQGPKEPFRD
 YVDRFYKTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQNaNPDCKTILKALGPAATLEEMMTACQGVGGPGHKARVLMGK
 WSKSSVVGWPTVRERMRRAEPAADGVGAASRDLEKHGAISSNTAATNAACAWLEAQEEEEVGFPVTPQVP
 LRPMTYKAAVDLSHFLKEKGLEGLIHSQRRQDILDWIYHTQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWYKLV
 PVEPKVEEANKGENTSLAHPVSLHGMDPEREVLWRFRDSRLAFHHVARELHPEYFKNCTSEPVDPRLP
 WKHPGSQPKTACTNICYCKCCFHCQVCFITAALGISYGRKKRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSKGEP
 TGPKE [SEQ ID NO: 83]

Fig.21.



Secuencia de ADN del inserto

ATGGCCGAGCAGCTGTGGGTCACCGTCTACTACGGCGTGCCTGTGTGGAAGGAGGCCACGACCACCCTCTT
 CTGCGCGAGCGACGCCAAGGCCTACGACACGGAAGTGCATAACGTGTGGGCGACGCATGCTTGCGTGCCTA
 CGGACCCCAACCCAGGAGGTGGTGTGGGAAACGTGACCGAGTACTTCAACATGTGGAAGAATAACATG
 GTGGATCAGATGCACGAGGACATCATCTCTGTGGGACCAGTCCCTGAAGCCCTGCGTGAAGCTGACGCC
 TCTCTGCGTGACACTGGACTGTGACGACGTCAACACCACCAACAGCACTACCACCACCAGCAACGGCTGGA
 CCGGAGAGATTCCGAAGGGCGAGATCAAGAACTGCTCCTTCAATATCACGACCTCGATCAGAGACAAGGTG
 CAGAAGGAATACGCGCTGTTTTATAATCTCGATGTGGTCCCCATCGACGACGACAATGCCACCACCAAGAA
 CAAGACGACGCGTAATTTCACTCATTCACTGCAACAGCAGCGTCATGACGACGGCCTGCCCAAGGTGT
 CCTTCGAACCAATCCCGATCCATTACTGTGCCCCGCGGATTTCGCGATCCTCAAGTGTAAACAAGACC
 TTCGACGGGAAGGGCTGTGCACCAACGTGACGACGGTGCAGTGCACCCATGGCATCCGCCCCGTCGTGAG
 CACCCAGCTGCTGTGAACGGGTCCCTGGCTGAGGAGGAGGTGGTGATCCGGTCGGACAACCTCATGGACA
 ACACCAAGACAATCATCGTCCAGCTGAACGAGTCTGTGGCGATTAAGTGTACCCGGCCTAACAACAACACC
 CGTAAGGGCATCCACATCGGGCCTGGACGGGCTTCTATGCCGCCGCAAGATCATCGGCACATCCGGCA
 GGCCCATTTGCAACCTCTCCCGCGCCAGTGGAAATAACACCTGAAGCAGATCGTGATCAAGCTGAGAGAGC
 ACTTTGGAACAAGACCATCAAGTTCAATCAGAGTTCTGGCGGAGACCCGAGATCGTGCGGCACTCCTTC
 AACTGCGGGGGCGAGTTCTTCTACTGCGATACGACACAGCTCTTCAACTCCACCTGGAACGGCACCGAGGG
 CAACAACACAGAGGGAACTCCACTATCACCTCCCTTGCCGCATCAAGCAGATCATCAACATGTGGCAGG
 AGGTGGGAAAGGCCATGTATGCCCCCCCCATCGGGGGCCAGATCCGCTGCTCCTCCAACATCACCGGCTG
 CTGCTCACCAGAGACGGGGCACCGAGGGCAACGGCACGGAGAACGAGACGGAGATCTTCAGGCCCCGGCGG
 CGGCGACATGAGGGATAACTGGCGGAGCGAGCTGTACAAGTACAAGGTGGTGAAGGTGGAGCCGCTCGGCG
 TGGCCCCACCCGGGCCAAGCGCCGCGTCTGTGCAGAGAAATGGGCCCCATCAGTCCCATCGAGACCGTGCCG
 GTGAAGCTGAAACCCGGGATGGACGGCCCCAAGGTCAAGCAGTGGCCACTCACCGAGGAGAAGATCAAGGC
 CCTGGTGGAGATCTGCACCGAGATGGAGAAAGAGGGCAAGATCAGCAAGATCGGGCCTGAGAACCATACA
 ACACCCCGTGTGTGCCATCAAGAAGAAGGACAGCACCAGTGGCGCAAGCTGGTGGATTTCGGGAGCTG
 AATAAGCGGACCCAGGATTTCTGGGAGGTCCAGCTGGGCATCCCCCATCCGGCCGGCCTGAAGAAGAAGAA
 GAGCGTGACCGTGTGGACGTGGGCGACGCTTACTTCAGCGTCCCTCTGGACGAGGACTTTAGAAAGTACA
 CCGCCTTTACCATCCCATCTATCAACAACGAGACCCCTGGCATCAGATATCAGTACAACGTCTCTCCCCAG
 GGCTGGAAGGGCTCTCCCGCCATTTTCCAGAGCTCCATGACCAAGATCCTGGAGCCGTTTCGGAAGCAGAA
 CCCCAGATATCGTCATCTACCAGTACATGGACGACCTGTACGTGGGCTCTGACCTGGAATCGGGCAGCATC

Fig.21 (Cont I).

GCACGAAGATTGAGGAGCTGAGGCAGCATCTGCTGAGATGGGGCCTGACCACTCCGGACAAGAAGCATCAG
AAGGAGCCGCCATTCTGAAGATGGGCTACGAGCTCCATCCCGACAAGTGGACCGTGCAGCCTATCGTCTCT
CCCCGAGAAGGACAGCTGGACCGTGAACGACATCCAGAAGCTGGTGGGCAAGCTCAACTGGGCTAGCCAGA
TCTATCCCGGGATCAAGGTGCGCCAGCTCTGCAAGCTGCTGCGCGGCACCAAGGCCCTGACCGAGGTGATT
CCCCTCACGGAGGAAGCCGAGCTCGAGCTGGCTGAGAACCGGGAGATCCTGAAGGAGCCCCGTGCACGGCGT
GTACTATGACCCCTCCAAGGACCTGATCGCCGAAATCCAGAAGCAGGGCCAGGGGCAGTGACATACCAGA
TTTACCAGGAGCCTTTCAAGAACCTCAAGACCGGCAAGTACGCCCCGATGAGGGGCGCCACACCAACGAT
GTCAAGCAGCTGACCGAGGCCGTCCAGAAGATCACGACCGAGTCCATCGTGATCTGGGGGAAGACACCCAA
GTTCAAGCTGCCTATCCAGAAGGAGACCTGGGAGACGTGGTGGACCGAATATTGGCAGGCCACCTGGATTTC
CCGAGTGGGAGTTTCGTGAATACACCTCCTCTGGTGAAGCTGTGGTACCAGCTCGAGAAGGAGCCCATCGTG
GGCGCGGAGACATTCTACGTGGACGGCGCGGCCAACCGCGAAACAAAGCTCGGGAAGGCCGGGTACGTCAC
CAACCGGGCCGCGAGAGTTCGTCACCTGACCGACACCAACCAAGACGAGCTGCAGGCCATCT
ATCTCGCTCTCCAGGACTCCGGCCTGGAGGTGAACATCTGAGGGATGTCCGAGATCCTGGGGCAATTAT
CAGGCCCAGCCGACAGTCCGAGAGCGAACTGGTGAACAGATTATCGAGCAGCTGATCAAGAAAGAGAA
GGTCTACCTCGCCTGGGTCCCGGCCATAAGGGCATTGGCGCAACGAGCAGGTGACAAGCTGGTGAAGTG
CGGGGATTAGAAAGGTGCTGATGGTGGGTTTTCCAGTCACACCTCAGGTACCTTTAAGACCAATGACTTAC
AAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCACCTCCCAAAG
AAGACAAGATATCCTTGATCTGTGGATCTACCACACACAAGGCTACTTCCCTGATTGGCAGAACTACACAC
CAGGGCCAGGGGTGAGATATCCACTGACCTTTGGATGGTGTACAAGCTAGTACCAGTTGAGCCAGATAAG
GTAGAAGAGGCCAATAAAGGAGAGAACACCAGCTTGTTACACCTGTGAGCCTGCATGGGATGGATGACCC
GGAGAGAGAAGTGTAGAGTGGAGGTTTGACAGCCGCTAGCATTTCATCACGTGGCCCGAGAGCTGCATC
CGGAGTACTTCAAGAACTGCATGGGTGCCCCGAGCTTCGGTACTGTCTGGTGGAGAGCTGGACAGATGGGAG
AAAATTAGGCTGCGCCCGGGAGGCAAAAAGAAATACAAGCTCAAGCATATCGTGTGGGCCCTCGAGGGAGCT
TGAACGGTTTTGCCGTGAACCCAGGCCTGCTGGAACATCTGAGGGATGTCCGAGATCCTGGGGCAATTGC
AGCCATCCCTCCAGACCGGGAGTGAAGAGCTGAGGTCTTGTATAACACAGTGGCTACCTCTACTGCGTA
CACCAGAGGATCGAGATTAAGGATACCAAGGAGGCCTTGACAAAATTGAGGAGGAGCAAAACAAGAGCAA
GAAGAAGGCCCAGCAGGCAGCTGCTGACACTGGGCATAGCAACCAGGTATCACAGAACTATCCTATTGTCC
AAAACATTCAGGGCCAGATGGTTCATCAGGCCATCAGCCCCCGACGCTCAATGCCTGGGTGAAGGTTGTC
GAAGAGAAGGCCTTTTCTCCTGAGGTTATCCCCATGTTCTCCGCTTTGAGTGAGGGGGCCACTCCTCAGGA
CCTCAATACAATGCTTAATACCGTGGGCGGCCATCAGGCCGCCATGCAATGTTGAAGGAGACTATCAACG
AGGAGGCAGCCGAGTGGGACAGAGTGCATCCCGTCCACGCTGGCCCAATCGCGCCCCGACAGATGCGGGAG
CCTCGCGGCTCTGACATTGCCGGCACCACCTCTACACTGCAAGAGCAAATCGGATGGATGACCAACAATCC
TCCCATCCCAGTTGGAGAAATCTATAACGGTGGATCATCTGGGCCTGAACAAGATCGTGCAGTGTACT
CTCCGACATCCATCCTTGACATTAGACAGGGACCCAAAGAGCCTTTTAGGGATTACGTGACGCGTTTTAT
AAGACCCTGCGAGCAGAGCAGGCCTCTCAGGAGGTCAAAAAGTGGATGACGGAGACACTCCTGGTACAGAA
CGCTAACCCCGACTGCAAAACAATCTTGAAGGCACTAGGCCCGGCTGCCACCCTGGAAGAGATGATGACCG
CCTGTCAGGGAGTAGGCGGACCCGACACAAAGCCAGAGTGTGTAA [SEQ ID NO: 84]

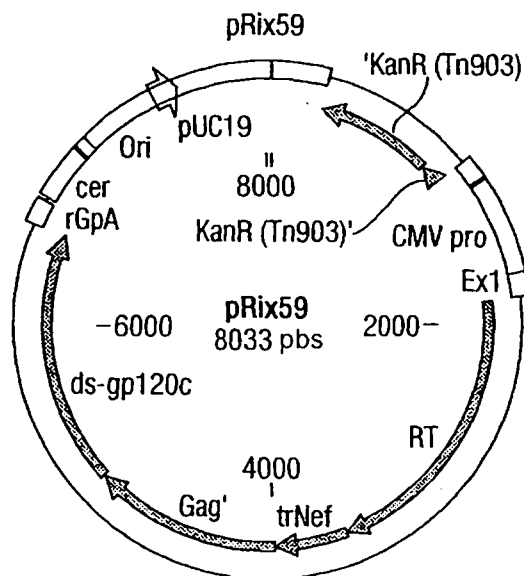
Secuencia de aminoácidos del inserto:

MAEQLWVTVYYGVPVWKEATTLFCASDAKAYDTEVHNWATHACVPTDPNPQEVVLGNVTEYFNMWKNNM
VDQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLDCDDVNTNSTTTTSNGWTGEIRKGEIKNCSFNITTSIRDKV
QKEYALFYNLDVVPIDDDNATTKNKTTRNFRLIHCNSSVMTQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCNKNT
FDGKGLCTNVSTTGAGATHGIRPVVSTQLLNLGSLAEVIVIRSDNFMNTKTIIVQLNESVAINCTRPNNNT
RKGIHIGPGRAFYAARKIIGDIRQAHCNLSRAQWNNLTQIKVILKREHFGNKTIFKNQSSGGDPEIVRHSF
NCGGEFFYCDTTQLFNSTWNGTEGNTEGNSTITLPCRIKQIINMWQEVGKAMYAPPIGGQIRCSSNITGL
LLTRDGGTEGNTEGNTEIFRPGGDMRDNRSELYKYKVVKVEPLGVAPTRAKRRVVQRMGPISPIETVP
VKLKPMDGPKVKQWPLTEEKIKALVEICTEMEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKDKSTKWRKLVDFREL
NKRTQDFWEVQLGI PHPAGLKKKSVTVLVDGDAYFSVPLDEDFRKYTAFTIP SINNETPGIRYQYNVLPQ
GWKGS PAIFQSSMTKILEPFRKQNPDI VIYQYMDLDLYVGS DLEIGQHRTKIEELRQHLLRWGLTTPDKKHQ
KEPPFLKMGYELHPDKWTVQPIVLPEKDSWTVNDIQKLVGKLNWASQIYPGIKVRQLCKLLRGTKALTEVI
PLTEEALELEAENREILKEPVHGVYDPSKDLIAEIQKQGGQWYQIYQEPFKNLKTGKYARMRGHTND
VKQLTEAVQKITTESIWIWGT PKFKLPIQKETWETWTEYWQATWIPEWEFVNTPLVLKWLWYQLEKEPIV
GAETFYVDGAANRETKLGKAGYVTNRGRQKVVTLTDTTNQKTELQAIYLALQDSGLEVNIVTDSQYALGII

Fig.21 (Cont II).

QAQPDQSESELVNQIIEQLIKKEKVYLAWVPAHKGIGGNEQVDKLVSAQIRKVLVGVFPVTPQVPLRPMTY
KAAVDLSHFLKEKGGLEGLIHSQRRQDILDWYHTQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWCYKLVPEPDK
VEEANKGENTSLLHPVSLHGMDPPEREVLEWRFDRLAFHHVARELHPEYFKNCMGARASVLSGGELDRWE
KIRLRPGGKKKYKLKHIVWASRELERFAVNPGLLETSEGCRQILGQLQPSLQTGSEELRSYNTVATLYCV
HQRIEIKDTKEALDKIEEEEQNKSKKKAQQAADTGHSNQVSQNYPIVQNIQGQMVHQAI SPRTLNAWVKV
EEKAFSPFVPMFSALSEGATPQDLNMLNTVGGHQAAMQMLKETINEEAAEWDRVHPVHAGPIAPGQMR
PRGSDIAGTTSTLQEQIGWMTNNPPIPVGEIYKRWII LGLNKIVRMYSPSILDIRQGPKEPFRDYVDRFY
KTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQNANPDCKTILKALGPAATLEEMMTACQGVGGPGHKARVL [SEQ ID
NO: 85]

Fig.22.



Secuencia de ADN del inserto

ATGGGCCCCATCAGTCCCATCGAGACCGTGCCGGTGAAGCTGAAACCCGGGATGGACGGCCCCAAGGTCAA
 GCAGTGGCCACTCACCGAGGAGAAGATCAAGGCCCTGGTGGAGATCTGCACCGAGATGGAGAAAGAGGGCA
 AGATCAGCAAGATCGGGCCGAGAAACCCATACAACACCCCGTGTGTCATCAAGAAGAAGGACAGCACC
 AAGTGGCGCAAGCTGGTGGATTTCCGGGAGCTGAATAAGCGGACCCAGGATTCTGGGAGGTCCAGCTGGG
 CATCCCCATCCGGCCGGCCTGAAGAAGAAGAAGAGCGTGACCGTGCTGGACGTGGGCGACGCTTACTTCA
 GCGTCCCTCTGGACGAGGACTTTAGAAAGTACACCGCCTTTACCATCCCATCTATCAACAACGAGACCCCT
 GGCATCAGATATCAGTACAACGTCTCCCCAGGGCTGGAAGGGCTCTCCCGCCATTTCCAGAGCTCCAT
 GACCAAGATCCTGGAGCCGTTTCGGAAGCAGAACCCGATATCGTCATCTACCAGTACATGGACGACCTGT
 ACGTGGGCTCTGACCTGGAATCGGGCAGCATCGCACGAAGATTGAGGAGCTGAGGCAGCATCTGCTGAGA
 TGGGGCCTGACCACTCCGGACAAGAAGCATCAGAAGGAGCCGCCATTCTGAAGATGGGTACGAGCTCCA
 TCCCGACAAGTGGACCGTGCAGCCTATCGTCTCCCCGAGAAGGACAGCTGGACCGTGAACGACATCCAGA
 AGCTGGTGGCAAGCTCAACTGGGCTAGCCAGATCTATCCCGGATCAAGGTGCGCCAGCTCTGCAAGCTG
 CTGCGCGGCACCAAGGCCCTGACCGAGGTGATTCCCTCACGGAGGAAGCCGAGCTCGAGCTGGCTGAGAA
 CCGGGAGATCCTGAAGGAGCCGTGCACGGCGTGACTATGACCCCTCCAAGGACCTGATCGCCGAAATCC
 AGAAGCAGGGCCAGGGGCGAGTGGACATACCAGATTTACCAGGAGCCTTTCAAGAACCTCAAGACCGCAAG
 TACGCCCGCATGAGGGGCGCCACACCAACGATGTCAAGCAGCTGACCGAGGCCGTCCAGAAGATCACGAC
 CGAGTCCATCGTGATCTGGGGGAAGACACCAAGTTCAAGCTGCCTATCCAGAAGGAGACCTGGGAGACGT
 GGTGGACCGAATATTGGCAGGCCACCTGGATTCCCGAGTGGGAGTTCTGTGAATACACCTCCTCTGGTGAAG
 CTGTGGTACCAGCTCGAGAAGGAGCCCATCGTGGGCGCGGAGACATTCTACGTGGACGGCGCGGCCAACCG
 CGAAACAAAGCTCGGGAAGGCCGGGTACGTACCAACCGGGCGCCAGAGGTGCTCACCCCTGACCGACA
 CCACCAACCAGAAGACGGAGCTGCAGGCCATCTATCTCGCTCTCCAGGACTCCGGCCTGGAGGTGAACATC
 GTGACGGACAGCCAGTACGCGCTGGGCATTATTACGGCCAGCCGACAGTCCGAGAGCGAACTGGTGAA
 CCAGATTATCGAGCAGCTGATCAAGAAAGAGAAGGTCTACCTCGCCTGGGTCCCGGCCATAAGGGCATTG
 GCGGCAACGAGCAGGTGCAACAAGCTGGTGAGTGCGGGGATTAGAAAGGTGCTGATGGTGGGTTTTCCAGTC
 ACACCTCAGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAGAAAA
 GGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCACCTCCAAAGAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGGATCTACCACACAC
 AAGGCTACTTCCCTGATTGCGAGAATACACACCGGGCCAGGGGTGAGATATCCACTGACCTTTGGATGG
 TGCTACAAGCTAGTACCAAGTTGAGCCAGATAAGGTAGAAGAGGCCAATAAAGGAGAGAACACCAAGCTTGT
 ACACCTGTGAGCCTGCATGGGATGGATGACCCGGAGAGAGAAGTGTAGACTGGAGGTTTGACAGCCGCC

Fig.22 (Cont I).

TAGCATTTTCATCACGTGGCCCGAGAGCTGCGGAGTACTTCAAGAACTGCATGGGTGCCCCGAGCTTCG
 GTACTGTCTGGTGGAGAGCTGGACAGATGGGAGAAAATTAGGCTGCGCCCGGAGGCAAAAAGAAATACAA
 GCTCAAGCATATCGTGTGGGCTCGAGGGAGCTTGAACGGTTTGGCGTGAACCCAGGCCTGCTGGAAACAT
 CTGAGGGATGTGCGCAGATCCTGGGGCAATTGCGCCATCCCTCCAGACCGGGAGTGAAGAGCTGAGGTCC
 TTGTATAACACAGTGGCTACCTCTACTGCGTACACCAGAGGATCGAGATTAAGGATACCAAGGAGGCCTT
 GGACAAAATTGAGGAGGAGCAAAACAAGAGCAAGAAGAAGGCCAGCAGGCAGCTGCTGACACTGGGCATA
 GCAACCAGGTATCACAGAACTATCCTATTGTCCAAAACATTTCAGGGCCAGATGGTTTCATCAGGCCATCAGC
 CCCCAGGAGCTCAATGCGCTGGGTGAAGGTTGTGGAAGAGAAGGCCTTTCTCCTGAGGTTATCCCATGTT
 CTCCGCTTTGAGTGAGGGGGCCACTCCTCAGGACCTCAATACAATGCTTAATACCGTGGGCGGCCATCAGG
 CCGCCATGCAAAATGTTGAAGGAGACTATCAACGAGGAGGCGAGCCGAGTGGGACAGAGTGCATCCCGTCCAC
 GCTGGCCCCAATCGCGCCCGGACAGATGCGGGGAGCTCGCGGCTTGACATTGCGCGCACCACCTCTACACT
 GCAAGAGCAAAATCGGATGGATGACCAACAATCTCCCATCCAGTTGGAGAAAATCTATAAACGGTGGCTCA
 TCCTGGGCCTGAACAAGATCGTGCGCATGTACTCTCCGACATCCATCCTTGACATTAGACAGGGACCCAAA
 GAGCCTTTTAGGGATTACGTGACCGGTTTTATAAGACCCTGCGAGCAGAGCAGGCCTCTCAGGAGGTCAA
 AAAGTGGATGACGGAGACACTCCTGGTACAGAACGCTAACCCGACTGCAAAACAATCTTGAAGGCACTAG
 GCCCCGCTGCCACCTTGAAGAGATGATGACCGCTGTGAGGGAGTAGGCGGACCCGGACACAAAGCCAGA
 GTGTTGATGGCCGAGCAGCTGTGGGTACCGTCTACTACGGCGTGCTGTGTGGAAGGAGGCCACGACCAC
 CCTCTTCTGCGCGAGCGACGCCAAGGCCTACGACACGGAAGTGCATAACGTGTGGGCGACGCATGCTTGCG
 TGCCTACGGACCCCAACCCCGAGGAGTGGTCTGCTGTTGGGACAGTCCCTGAAGCCCTGCGTGAAGCT
 AACATGGTGGATCAGATGCACGAGGACATCATCTCTGTGGGACAGTCCCTGAAGCCCTGCGTGAAGCT
 GACGCTCTCTGCGTGACACTGGACTGTGACGACGTCAACACCACCAACAGCACTACCACCACAGCAACG
 GCTGGACCGGAGAGATTGGAAGGGCGAGATCAAGAAGTGTCTCTCAATATCAGGACCTCGATCAGAGAC
 AAGGTGCAGAAGGAATACCGCTGTTTTATAATCTCGATGTGGTCCCATCGACGACGACAAATGCCACCAC
 CAAGAACAAGACGACGCGTAATTTAGACTCAATCACTGCAACAGCAGCGTCATGACGACGCGCTGCCCA
 AGGTGTCTTCGAACCAATCCCGATCCATTACTGTGCCCTGCCGGATTGCGGATCCTCAAGTGAACAAC
 AAGACCTTCGACGGGAAGGGCCTGTGCACCAACGTGACACGGTGACGTGCACCCATGGCATCCGCCCCGT
 CGTGAGCACCCAGCTGCTGCTGAACGGGTCCCTGGCTGAGGAGGAGTGGTGTATCCGGTCGGACAATTTCA
 TGGACAACACCAAGACAATCATCGTCCAGCTGAACGAGTCTGTGGCGATTAACTGTACCCGCGCTAACAA
 AACACCCGTAAGGGCATCCACATCGGGCCTGGACGGGCCTTCTATGCCGCGCGCAAGATCATCGGCGACAT
 CCGGCAGGCCCCATTGCAACCTCTCCCGCGCCAGTGAATAACACCCCTGAAGCAGATCGTGATCAAGCTGA
 GAGAGCACTTTGGAAACAAGACCATCAAGTTCAATCAGAGTTCTGGCGGAGACCCGAGATCGTGCGGCAC
 TCCTTCAACTGCGGGGGCGAGTTCTTCTACTGCGATACGACACAGCTCTTCAACTCCACCTGGAACGGCAC
 CGAGGGCAACAACAGAGGGAACTCCACTATCACCTCCCTTGCCGATCAAGCAGATCATCAACATGT
 GGCAGGAGGTGGGAAAGGCCATGTATGCCCCCCCCATCGGGGGCCAGATCCGCTGCTCTCCAACATCACC
 GCGCTGCTGCTCACCAGAGACGGGGGACCGAGGGCAACGGCACGGAGAACGAGACGGAGATCTTCAGGCC
 CGGCGGCGGCGACATGAGGGATAACTGGCGGAGCGAGCTGTACAAGTACAAGGTGGAAGGTGGAGCCGC
 TCGGCGTGGCCCCCACCAGGGCCAAAGCGCCGCTGCTGCAGAGATGA [SEQ ID NO: 86]

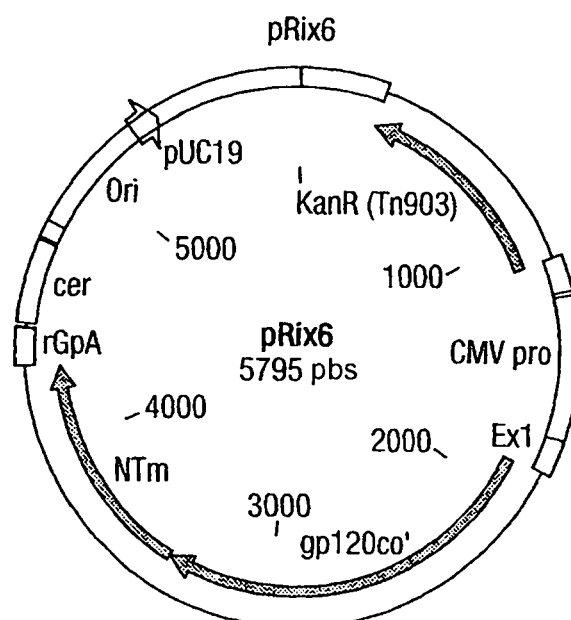
Secuencia de aminoácidos del inserto:

MGPISPIETVPVKLKPMDGPKVKQWPLTEEKIKALVEICTEMEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKKDST
 KWRKLVDFRELNRKTQDFWEVQLGIPHPAGLKKKSVTVLDVGDAYFSVPLDEDFRKYTAFTIPSINNETP
 GIRYQYNVLPQGWKGSIPAIFQSSMTKILEPFRKQNPDIYIYQYMDLYVGSLEIGQHRTKIEELRQHLLR
 WGLTTPDKKHQKEPFLKMGYELHPDKWTVQPIVLPKEDSWTVNDIQKLVGKLNWASQIYPGIKVRQLCKL
 LRGTALTEVIPLTEEALELAENREILKEPVHGVYDPSKDLIAEIQKQGQWQTYQIYQEPFKNLKTGK
 YARMRGAHTNDVKQLTEAVQKITTESIVIWGKTPKFKLPIQKETWETWWTEYWQATWIPEWEFVNTPLVK
 LWYQLEKEPIVGAETFYVDGAANRETKLGKAGYVTNRGRQKVVTLTDTTNQKTELQAIYLALQDSGLEVNI
 VTDSQYALGIIQAQPDQSESELVNQIIIEQLIKKEKVYLAHVPAHKGIGGNEQVDKLVSAGIRKVLMMVGFV
 TPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGLEGLIHSQRRQDILDWLYHTQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGW
 CYKLVPVEPDKVEEANKGENTSLHPVSLHGMDDPEREVLEWRFSRLAFHHVARELHPEYFKNCMGARAS
 VLSGGELDRWEKIRLRPGGKKYKLKHIVASRELERFAVNPGLLETSEGCRQILGQLQPSLQTSSEELRS
 LYNTVATLYCVHQRIEIKDTKEALDKIEEQNKSKKKAQAADTGHSNQVSNQYPIVQNIQGMVHQAIS
 PRTLNAWVKVVEKAFSPEVIMFSALSEGATPDQNTMLNTVGGHQAAMQMLKETINEAAEWDRVHPVH
 AGPIAPGQMRGSDIAGTTSTLQEQIGWMTNPPIPVGEIYKRWIIILGLNKIVRMYSPTSILDIRQGP
 EPFRDYVDRFYKTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQNANPDCKTILKALGPAATLEEMMTACQGVGGPGHKAR

Fig.22 (Cont II).

VLMAEQLWVTYYYGVPVWKEATTTLFCASDAKAYDTEVHNWVATHACVPTDPNPQEVVLGNVTEYFNMWKN
NMVDQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLDCDDVNTTNSTTTTSNGWTGEIRKGEIKNCSFNITTSIRD
KVQKEYALFYNLDVVPIDDDNATTKNKTTRNFRLIHCNSSVMTQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCNN
KTFDGKGLCTNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLLNGSLAEDEVVIRSDNFMDNTKTIIVQLNESVAINCTRPNN
NTRKGIHIGPGRAFYAARKIIGDIRQAHCNLSRAQWNNTLKQIVIKLREHFGNKTIFNQSSGGDPEIVRH
SFNCGGEFFYCDTTQLFNSTWNGTEGNNTEGNSTITLPCRIKQIINMWQEVGKAMYAPPIGGQIRCSSNIT
GLLLTRDGGTEGNGTENETEIFRPGGGDMRDNRSELYKYKVVKVEPLGVAPTRAKRRVVQR [SEQ ID
NO: 87]

Fig.23.



Secuencia de ADN del inserto

ATGAAGGTCAAGGAGACCAGAAAGAACTACCAGCATCTGTGGCGCTGGGGCACCATGCTCCTGGGAATGCT
 GATGATCTGCTCCGCCGCGAGCAGCTGTGGGTACCGTCTACTACGGCGTGCTGTGTGGAAGGAGGCCA
 CGACCACCTCTTCTGCGCGAGCGACGCCAAGGCCACGACACGGAAGTGCATAACGTGTGGGCGACGCAT
 GCTTGGCTGCCCTACGGACCCCAACCCCAAGGAGTGGTGTGGGAAACGTGACCGAGTACTTCAACATGTG
 GAAGAATAACATGGTGGATCAGATGCACGAGGACATCATCTCTGTGGGACCAGTCCCTGAAGCCCTGCG
 TGAAGCTGACGCCCTCTGCGTGACACTGGACTGTGACGACGTCAACACCACCAACAGCACTACCACCACC
 AGCAACGGCTGGACCGGAGAGATTTCGGAAGGGCGAGATCAAGAAGTGTCTTCAATATCAGACCTCGAT
 CAGAGACAAGGTGCAGAAGGAATACGCGCTGTTTTATAATCTCGATGTGGTCCCCATCGACGACGACAATG
 CCACCACCAAGAACAAGACGACGCGTAATTCAGACTCATTCACTGCAACAGCAGCGTCATGACGCAGGCC
 TGCCCAAGGTGTCTTCGAACCAATCCCGATCCATTACTGTGCCCTGCCGATTTCGCGATCCTCAAGTG
 TAACAACAAGACCTTCGACGGGAAGGCCGTGTGACCAACGTGACACGGTGCAGTGCACCCATGGCATCC
 GCCCGTCTGTGAGCACCCAGCTGCTGCTGAACGGGTCCCTGGCTGAGGAGGAGGTGGTGTATCCGGTCCGGAC
 AACTTCATGGACAACACCAAGACAATCATCGTCCAGCTGAACGAGTCTGTGGCGATTAACTGTACCCCGGCC
 TAACAACAACACCCGTAAGGGCATCCACATCGGGCTGGACGGGCCCTTCTATGCCGCCGCAAGATCATCG
 GCGACATCCGGCAGGCCCATTTGCAACCTCTCCCGCGCCAGTGGAATAACACCCTGAAGCAGATCGTGATC
 AAGCTGAGAGAGCACTTTGGAAACAAGACCATCAAGTTCAATCAGAGTTCTGGCGGAGACCCCGAGATCGT
 GCGGCACTCCTTCAACTGCGGGGGCGAGTTCTTCTACTGCGATACGACACAGCTCTTCAACTCCACCTGGA
 ACGGCACCGAGGGCAACAACACAGAGGGAACTCCACTATCACCTCCCTTGCCGCATCAAGCAGATCATC
 AACATGTGGCAGGAGGTGGGAAAGGCCATGTATGCCCCCCCCATCGGGGGCCAGATCCGCTGCTCCTCCAA
 CATCACCGGCTGCTGCTCACCAGAGACGGGGCACCGAGGGCAACGGCACGGAGAACGAGACGGAGATCT
 TCAGGCCCCGGCGGCGGACATGAGGGATAACTGGCGGAGCGAGCTGTACAAGTACAAGGTGGTGAAGGTG
 GAGCCGCTCGGCGTGGCCCCCACCCGGGCAAGCGCCGCTCGTGCAGAGAATGGGTGGCAAGTGGTCAAAA
 AAGTAGTGTGGTTGGATGGCCTACTGTAAGGGAAAGAATGAGACGAGCTGAGCCAGCAGCAGATGGGGTGG
 GAGCAGCATCTCGAGACCTGGAAAAACATGGAGCAATCACAAGTAGCAATACAGCAGCTACCAATGCTGCT
 TGTGCTTGCTAGAAAGCACAAGAGGAGGAGGAGGTGGGTTTTCCAGTCACACCTCAGGTACCTTTAAGACC
 AATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTC
 ACTCCCAACGAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGGATCTACCACACAAGGCTACTTCCCTGATTGGCAG
 AACTACACACAGGGCCAGGGTCAGATATCCACTGACCTTTGGATGGTGTACAAGCTAGTACCAGTTGA
 GCCAGATAAGGTAGAAGAGGCCAATAAAGGAGAGAACACCAGCTTGTACACCCTGTGAGCCTGCATGGAA

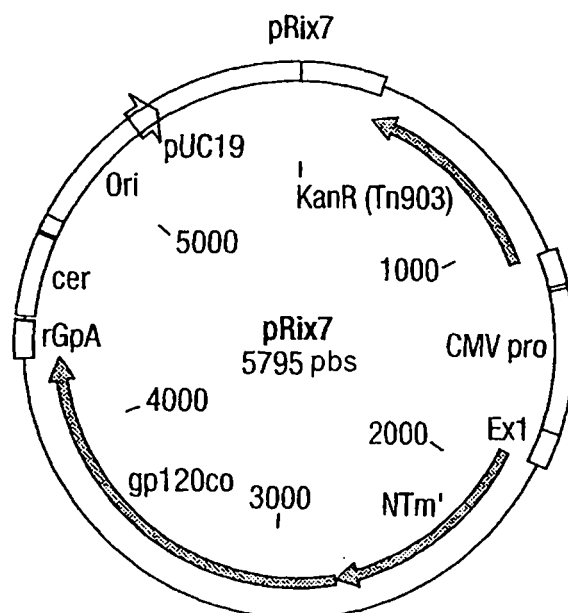
Fig.23 (Cont).

TGGATGACCTGAGAGAGAAGTGTAGAGTGGAGGTTTGACAGCCGCTAGCATTTTCATCACGTGGCCCGA
GAGCTGCATCCGGAGTACTTCAAGAAGTGCCTAGTGGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCA
TCCAGGAAGTCAGCCTAAAGTGTGTTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTGCTTTTCATTGCCAAGTTT
GTTTCATAACAGCTGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAA
GGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAACCCACCTCCCAATCCAAGGGGAGCCGACAGGCC
GAAGGAATAA [SEQ ID NO: 88]

Secuencia de aminoácidos del inserto:

MKVKETRKNYQHLWRWGTMLLGLMLICSAAEQLVTVVYGVVWKEATTLFCASDAKAYDTEVHNWATH
ACVPTDPNPQEVVLGNVTEYFNMWKNMVDQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLDCDDVNTNSTTTT
SNGWTGEIRKGEIKNCSENIITSIRDKVQKEYALFYNLDVVPIDDDNATTKNKTTRNFRLIHCNSSVMTQA
CPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCNKTFDGKGLCTNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGSLAEEVVIRSD
NEMDNKTIIIVQLNESVAINCTRPNNNTRKGIHIGPGRFYAARKIIGDIRQAHCNLSRAQWNNLTKQIVI
KLREHFGNKTIFNQSSGGDPEIVRHSFNCGGEFFYCDTTQLFNSTWNGTEGNTEGNSTITLPCRIKQII
NMWQEVGKAMYAPPIGGQIRCSSNITGLLLTRDGGTEGNGTENETEIFRPGGGDMRDNRSELYKYKVVKV
EPLGVAPTRAKRRVVQRMGGKWSKSSVVGWPTVRRMRRAEPAADGVGAASRDLEKHGAITSSNTAATNAA
CAWLEAQEEEEVGFPVTPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGLEGLIHSQRRQDILDWIIYHTQGYFPDWQ
NYTPGPGVRYPLTFWCYKLVPEPDKVEEANKGENTSLLHPVSLHGMDDPEREVLEWRFDLSRLAFHHVAR
ELHPEYFKNCTSEPDPRLEPWKHPGSQPKTACTNICYCKCCFHCQVCFITAALGISYGRKKRRRPPQ
GSQTHQVLSKQPTSQSKGEPTGPKE [SEQ ID NO: 89]

Fig.24.



Secuencia de ADN del inserto

ATGGGTGGCAAGTGGTCAAAAAGTAGTGTGGTTGGATGGCCTACTGTAAGGGAAAGAATGAGACGAGCTGA
 GCCAGCAGCAGATGGGGTGGGAGCAGCATCTCGAGACCTGGAAAAACATGGAGCAATCACAAGTAGCAATA
 CAGCAGCTACCAATGCTGCTTGTGCCTGGCTAGAAGCACAAGAGGAGGAGGAGGTGGGTTTCCAGTCACA
 CCTCAGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTAAAAGAAAAGGG
 GGGACTGGAAGGGCTAATTCACCTCCCAACGAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGGATCTACCACACACAAG
 GCTACTTCCCTGATTGGCAGAACTACACACCAGGGCCAGGGGTCAGATATCCACTGACCTTTGGATGGTGC
 TACAAGCTAGTACCAGTTGAGCCAGATAAGGTAGAAGAGGCCAATAAAGGAGAGAACACCAGCTTGTTACA
 CCCTGTGAGCCTGCATGGAATGGATGACCCTGAGAGAGAAGTGTAGAGTGGAGGTTTGACAGCCGCTAG
 CATTCATCACGTGGCCCGAGAGCTGCATCCGGAGTACTTCAAGAACTGCCTAGTGAGCCAGTAGATCCT
 AGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAGTCAGCCTAAACTGCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTG
 TTGCTTTCATTGCCAAGTTTGTTCATAACAGCTGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGGAGAC
 AGCGACGAAGACCTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAACCCACCTCCCAATCC
 AAAGGGGAGCCGACAGGCCCAAGGAAATGAAGGTCAAGGAGACCAGAAAAGAACTACCAGCATCTGTGGCG
 CTGGGGCACCATGCTCCTGGGAATGCTGATGATCTGCTCCGCCGCCGAGCAGCTGTGGGTACCGTCTACT
 ACGGCGTGCCTGTGTGGAAGGAGGCCACGACCACCTCTTCTGCGCGAGCGACGCCAAGGCCTACGACACG
 GAAGTGCATAACGTGTGGGCGACGCATGCTTGCCTGCTACGGACCCCAACCCCAAGGAGGTGGTGTGGG
 AAACGTGACCGAGTACTTCAACATGTGGAAGAATAACATGGTGGATCAGATGCACGAGGACATCATCTCTC
 TGTGGGACCAAGTCCCTGAAGCCCTGCGTGAAGCTGACGCCCTCTTCTGCGTGACACTGGACTGTGACGACGTC
 AACACCACCAACAGCACTACCACCACCAGCAACCGCTGGACCGGAGAGATTTCGGAAGGGCGAGATCAAGAA
 CTGCTCCTTCAATATCACGACCTCGATCAGAGACAAGGTGCAGAAGGAATACGCGCTGTTTTATAATCTCG
 ATGTGGTCCCCATCGACGACGACAATGCCACCACCAAGAACAAGACGACGCGTAATTTTCAGACTCATTCAC
 TGCAACAGCAGCGTCATGACGACGCGCTGCCCAAGGTGTCCTTCGAACCAATCCCGATCCATTACTGTGC
 CCCTGCCGATTTCGCGATCCTCAAGTGTAACAACAAGACCTTCGACGGGAAGGGCTGTGCAACCAACGTCA
 GCACGGTGCAGTGCACCCATGGCATCCGCCCGCTGCTGAGCACCAGCTGCTGCTGAACGGGTCCCTGGCT
 GAGGAGGAGGTGGTGATCCGGTCGGACAACCTTCATGGACAACCAAGACAATCATCGTCCAGCTGAACGA
 GTCTGTGGCGATTAACTGTACCCGGCCTAACAACAACACCGTAAGGGCATCCACATCGGGCCTGGACGGG
 CCTTCTATGCCGCCCGCAAGATCATCGGCGACATCCGGCAGGCCATTGCAACCTCTCCCGCGCCAGTGG
 AATAACACCCCTGAAGCAGATCGTGATCAAGCTGAGAGAGCACTTTGGAACAAGACCATCAAGTTCAATCA
 GAGTTCTGGCGGAGACCCCGAGATCGTGCGGCACTCCTTCAACTGCGGGGGCGAGTTCTTCTACTGCGATA
 CGACACAGCTCTTCAACTCCACCTGGAACGGCACCGAGGGCAACAACACAGAGGGAACTCCACTATCACC

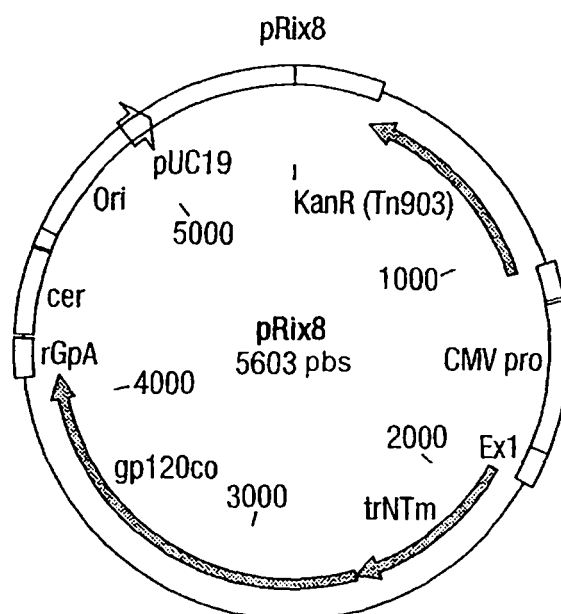
Fig.24 (Cont).

CTCCCTTGCCGCATCAAGCAGATCATCAACATGTGGCAGGAGGTGGGAAAGGCCATGTATGCCCCCCCCAT
CGGGGGCCAGATCCGCTGCTCCTCCACATCACCGGCCTGCTGCTCACCAGAGACGGGGGCACCGAGGGCA
ACGGCACGGAGAACGAGACGAGATCTTCAGGCCCCGGCGCGGCGACATGAGGGATAACTGGCGGAGCGAG
CTGTACAAGTACAAGGTGGTGAAGGTGGAGCCGCTCGGCGTGGCCCCACCGGGCCAAGCGCCGCTCGT
GCAGAGATGA [SEQ ID NO: 90]

Secuencia de aminoácidos del inserto:

MGGKWSKSSVVGWPTVRERMRAEPAADGVGAASRDLEKHGAITSSNTAATNAACAWLEAQEEEEVGFPVT
PQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGLEGLIHSQRRQDILDWYHTQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWC
YKLVPEPDKVEEANKGENTSLLHPVSLHGMDDPEREVLEWRFD SRLAFHHVARELHPEYFKNCTSEVPDP
RLEPWKHPGSQPKTACTNCYCKCCFHCQVCFITAALGISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQS
KGEPTGPKEMKVKETRKNYQHLWRWGTMLLGMMLICSAAEQWVTVYYGVPVWKEATTLFCASDAKAYDT
EVHNVWATHACVPTDNPQEVVLGNVTEYFNMWKNMVDQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLDCDDV
NTTNSTTTTSNGWTGEIRKGEIKNCSFNITTSIRDKVQKEYALFYNLDVVPIDDDNATTKNKTTNRNRLIH
CNSSVMTQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCNKTFDGKGLCTNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGLSLA
EEEVVIRSDNFMNDNTKTIIVQLNESVAINCTRPNNNTRKGIHIGPGRAFYAARKIIGDIRQAHCNLSRAQW
NNTLKQIVIKLREHFGNKTIFNQSSGGDPEIVRHSFNCGGEFFYCDTTQLFNSTWNGTEGNTEGNSTIT
LPCRIKQIINMWQEVGKAMYAPPIGGQIRCSSNITGLLLTRDGGTEGNGTENETEIFRPGGGDMRONWRSE
LYKYKVVKVEPLGVAPTRAKRRVVQR [SEQ ID NO: 91]

Fig.25.



Secuencia de ADN del inserto

ATGGTGGGTTTTCCAGTCACACCTCAGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAG
 CCACTTTTTAAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCACTCCCAACGAAGACAAGATATCCTTGATC
 TGTGGATCTACCACACACAAGGCTACTTCCCTGATTGGCAGAACTACACACCAGGGCCAGGGGTGAGATAT
 CCACTGACCTTTGGATGGTGCTACAAGCTAGTACCAGTTGAGCCAGATAAGGTAGAAGAGGCCAATAAAGG
 AGAGAACACCAGCTTGTACACCTGTGAGCCTGCATGGAATGGATGACCCTGAGAGAGAAGTGTAGAGT
 GGAGGTTTGACAGCCGCCTAGCATTTCATCACGTGGCCCCGAGAGCTGCATCCGGAGTACTTCAAGAACTGC
 ACTAGTGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAGTCAGCCTAAAACCTGCTTGAC
 CAATTGCTATTGTAAGAAAGTGTGCTTTCATTGCCAAGTTTGTTCATAACAGCTGCCTTAGGCATCTCCT
 ATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCA
 AAGCAACCCACCTCCCAATCCAAAGGGGAGCCGACAGGCCCGAAGGAAATGAAGGTCAAGGAGACCAGAAA
 GAACTACCAGCATCTGTGGCGCTGGGGCACCATGCTCCTGGGAATGCTGATGATCTGCTCCGCCGCCGAGC
 AGCTGTGGGTACCGTCTACTACGGCGTGCCTGTGTGGAAGGAGGCCACGACCACCTCTTCTGCGCGAGC
 GACGCCAAGGCCTACGACACGGAAGTGCATAACGTGTGGGCGACGCATGCTTGCCTGCTACGGACCCCAA
 CCCCCAGGAGGTGGTGTGGGAAACGTGACCGAGTACTTCAACATGTGGAAGAATAACATGGTGGATCAGA
 TGCACGAGGACATCATCTCTGTGGGACAGTCCCTGAAGCCCTGCGTGAAGCTGACGCCTCTCTGCGTG
 ACCTGGACTGTGACGACGTCAACACCACCAACAGCACTACCACCACAGCAACGGCTGGACCGGAGAGAT
 TCGGAAGGGCGAGATCAAGAACTGCTCCTTCAATATCACGACCTCGATCAGAGACAAGGTGCAGAAGGAAT
 ACGCGCTGTTTTATAATCTCGATGTGGTCCCCATCGACGACGACAATGCCACCACCAAGAACAAGACGACG
 CGTAATTTCACTGACTCATTCACTGCAACAGCAGCGTCATGACGACGGCCTGCCCCAAGGTGTCTTTCGAACC
 AATCCCGATCCATTACTGTGCCCTGCGGATTGCGGATCCTCAAGTGTAAACAACAAGACCTTCGACGGGA
 AGGGCCTGTGCACCAACGTGACGACGGTGCAGTGCACCCATGGCATCCGCCCCGTCGTGAGCACCAGCTG
 CTGCTGAACGGGTCCCTGGCTGAGGAGGAGGTGGTATCCGGTCCGACAACCTTCATGGACAACACCAAGAC
 AATCATCGTCCAGCTGAACGAGTCTGTGGCGATTAACTGTACCCGGCCTAACAAACAACCCGTAAGGGCA
 TCCACATCGGGCCTGGACGGGCCTTCTATGCCGCCGCAAGATCATCGGCGACATCCGGCAGGCCCATTCG
 AACCTCTCCCGCGCCAGTGAATAACACCTGAAGCAGATCGTGATCAAGCTGAGAGAGCACTTTGGAAA
 CAAGACCATCAAGTTCAATCAGAGTTCTGGCGGAGACCCGAGATCGTGCGGCACTCCTTCAACTGCGGGG
 GCGAGTTCTTCTACTGCGATACGACACAGCTCTTCAACTCCACCTGGAACGGCACCGAGGGCAACAACACA
 GAGGGAACTCCACTATCACCTCCCTTGC CGCATCAAGCAGATCATCAACATGTGGCAGGAGGTGGGAAA
 GGCCATGTATGCCCCCCCCATCGGGGGCCAGATCCGCTGCTCCTCAACATCACCGGCCTGTGCTACCA
 GAGACGGGGGCACCGAGGGCAACGGCACGGAGAACGAGACGGAGATCTTCAGGCCCGGCGGCGGACATG

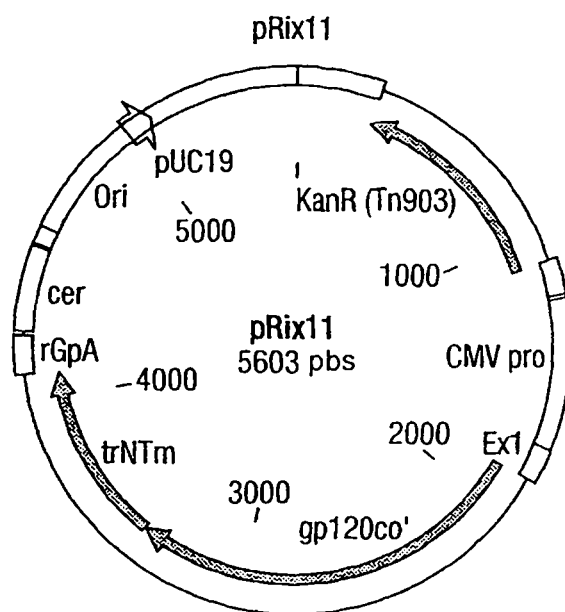
Fig.25 (Cont).

AGGGATAACTGGCGGAGCGAGCTGTACAAGTACAAGGTGGTGAAGGTGGAGCCGCTCGGCGTGGCCCCAC
CCGGGCCAAGCGCCGCGTCGTGCAGAGATGA [SEQ ID NO: 92]

Secuencia de aminoácidos del inserto:

MVGFPVTPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGLEGLIHSQRRQDILDWIIYHTQGYFPDWQNYTPGPGVRY
PLTFGWCYKLVPEPDKVEEANKGENTSLLHPVSLHGMDPEREVLEWRFDRLAFHHVARELHPEYFKNC
TSEPVDPRLEPWKHFGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFITAALGISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVSL
KQPTSQSKGEPTGPKEMKVKETRKNYQHLWRWGTMMLGMLMICSAAEQLVVTVYGVVPVWKEATTTLCAS
DAKAYDTEVHNWATHACVPTDPNPQEVVLGNVTEYFNMWKNMVDQMHEIIISLWDQSLKPCVKLTPLCV
TLDCDDVNTTNSTTTTNNGWTGEIRKGEIKNCSFNITTSIRDKVQKEYALFYNLDVVPIDDDNATTKNKTT
RNFRLIHCNSSVMTQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCNNKTFDGKGLCTNVSTVQCTHGIRPVVSTQL
LLNGSLAEEVIRSDNFMNDTKTIIIVQLNESVAINCTRPNNNTRKGIHIGPGRFYAARKIIGDIRQAH
NLSRAQWNNTLKQIVIKLREHFGNKTIFNQSSGDPFIVRHSFNCGGEFFYCDTQLFNSTWNGTEGNNT
EGNSTITLPCRIKQIINMWQEVGKAMYAPPIGGQIRCSSNITGLLLTRDGGTEGNGTENETEIFRPGGGDM
RDNWRSELYKYKVVKVEPLGVAPTRAKRRVVQR [SEQ ID NO: 93]

Fig.26.

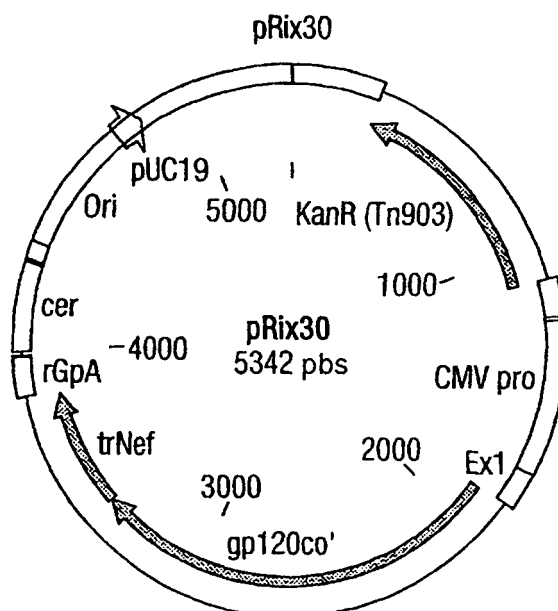


Secuencia de ADN del inserto

Secuencia de aminoácidos del inserto

MKVKETRKNYQHLWRWGTMLLGMMLICSAAEQLWVTVYYGVPVWKEATTTLCASDAKAYDTEVHNVWATH
ACVPTDPNPQEVVLGNVTEYFNMWKNNMVDQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLDCDDVNTTNSTTTT
SNGWTGEIRKGEIKNCSFNITTSIRDKVQKEYALFYNLDVVPIDDDNATTKNKTRNFRLIHCNSSVMTQA
CPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCNNKTFDGKGLCTNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGSLAEDEVIRSD
NEMDNTKTIIVQLNESVAINCTRPNNNTRKGIHIGPGRAFYAARKIIGDIRQAHCNLSRAQWNNTLKQIVI
KLREHFGNKTIKFNQSSGGDPEIVRHSFNCGGEFFYCDTTQLFNSTWNGTEGNTEGNSTITLPCRKQII
NMWQEVGKAMYAPPIGGQIRCSSNITGLLLTRDGGTEGNGTENETEIFRPGGDMRDNRSELYKYKVVKV
EPLGVAPTRAKRRVQRMVGFVPTQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGLEGLIHSQRRQDILDWIIYHTQ
GYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWICYKLVPEPDKVEEANKGENTSLLHPVSLHGMDPPEREVLEWRFD SRL
AFHHVARELHPEYFKNCTSEPVDPRLPEWPKHGPSQPKTACTNCYCKCCFHCQVCFITAALGISYGRKKRR
QRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSKGEPTGPKE [SEQ ID NO: 94]

Fig.27.



Secuencia de ADN del inserto

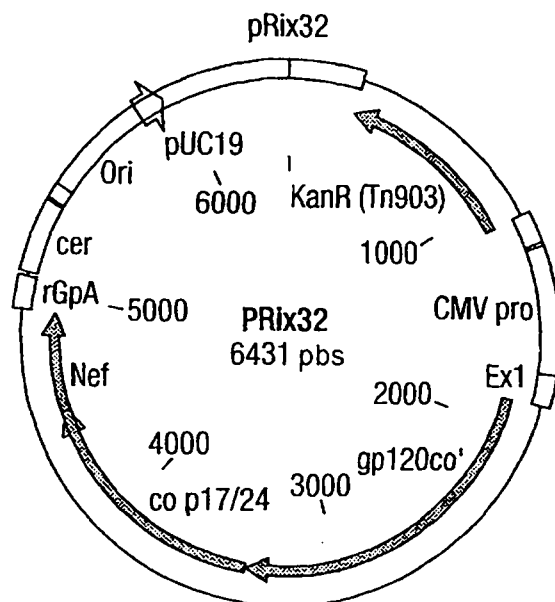
ATGAAGGTCAAGGAGACCAGAAAGAACTACCAGCATCTGTGGCGCTGGGGCACCATGCTCCTGGGAATGCT
 GATGATCTGCTCCGCCGCCGAGCAGCTGTGGGTACCGTCTACTACGGCGTGCTGTGTGGAAGGAGGCCA
 CGACCACCTCTTCTGCGCGAGCGACGCCAAGGCCTACGACACGGAAGTGCATAACGTGTGGGCGACGCAT
 GCTTGCCTGCTTACGGACCCCAACCCCCAGGAGGTGGTGCTGGGAAACGTGACCGAGTACTTCAACATGTG
 GAAGAATAACATGGTGGATCAGATGCACGAGGACATCATCTCTCTGTGGGACCAGTCCCTGAAGCCCTGCG
 TGAAGCTGACGCTCTCTGCGTGACACTGGACTGTGACGACGTCAACACCACCAACAGCACTACCACCACC
 AGCAACGGCTGGACCGGAGAGATTGGAAGGGCGAGATCAAGAAGTGTCTTCAATATCACGACCTCGAT
 CAGAGACAAGGTGCAGAAGGAATACGCGCTGTTTTATAATCTCGATGTGGTCCCCATCGACGACGACAATG
 CCACCACCAAGAACAAGACGACGCGTAATTTAGACTCATTCACTGCAACAGCAGCGTCATGACGCGAGGCC
 TGCCCCAAGGTGTCTTTCGAACCAATCCCGATCCATTACTGTGCCCTGCCGGATTTCGCGATCCTCAAGTG
 TAACAACAAGACCTTCGACGGGAAGGGCCTGTGCACCAACGTGACGACGGTGCAGTGCACCCATGGCATCC
 GCCCCGTGCTGAGCACCCAGCTGCTGCTGAACGGGTCCCTGGCTGAGGAGGAGGTGGTGATCCGGTCGGAC
 AACTTCATGGACAACACCAAGACAATCATCGTCCAGCTGAACGAGTCTGTGGCGATTAACTGTACCCGGCC
 TAACAACAACACCCGTAAGGGCATCCACATCGGGCCTGGACGGGCCCTTCTATGCCGCCCGCAAGATCATCG
 GCGACATCCGGCAGGCCCATTGCAACCTCTCCCGCGCCAGTGGAAATAACACCCTGAAGCAGATCGTGATC
 AAGCTGAGAGAGCACTTTGGAAACAAGACCATCAAGTTCAATCAGAGTTCTGGCGGAGACCCCGAGATCGT
 GCGGCACTCCTTCAACTGCGGGGGCGAGTTCTTCTACTGCGATACGACACAGCTCTTCAACTCCACCTGGA
 ACGGCACCGAGGGCAACAACACAGAGGGAACTCCACTATCACCCCTCCCTTGCCGCATCAAGCAGATCATC
 AACATGTGGCAGGAGGTGGGAAAGGCCATGTATGCCCCCCCCATCGGGGGCCAGATCCGCTGCTCCTCCAA
 CATCACCGCCTGCTGCTCACCAGAGACGGGGGACCGAGGGCAACGGCACGGAGAACGAGACGGAGATCT
 TCAGGCCCGGCGGGCGGACATGAGGGATAACTGGCGGAGCGAGCTGTACAAGTACAAGGTGGTGAAGGTG
 GAGCCGCTCGGCGTGGCCCCCACC CGGGCCAAGCGCCGCTCGTGACAGAGAATGGTGGGTTTTCCAGTCAC
 ACCTCAGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGG
 GGGACTGGAAGGGCTAATTCATCCCAACGAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGGATCTACCACACACAA
 GGCTACTTCCCTGATTGGCAGAACTACACACCGGGCCAGGGGTGAGATATCCACTGACCTTTGGATGGTG
 CTACAAGCTAGTACCAGTTGAGCCAGATAAGGTAGAAGAGGCCAATAAAGGAGAGAAACACAGCTTGTGTTAC
 ACCCTGTGAGCCTGCATGGAATGGATGACCTGAGAGAGAAGTGTAGAGTGGAGGTTTGACAGCCGCTTA
 GCATTTCATCACGTGGCCCGAGAGCTGCATCCGGAGTACTTCAAGAACTGCTAA [SEQ ID NO: 95]

Fig.27 (Cont).

Secuencia de aminoácidos del inserto:

MKVKETRKNYQHLWRWGTMLLGMLMICSAAEQLWVTVYYGVPVWKEATTTLFCASDAKAYDTEVHNWATH
ACVPTDPNPQEVVLGNVTEYFNMWKNNMVDQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLDCDDVNTTNSTTTT
SNGWTGEIRKGEIKNCSFNITTSIRDKVQKEYALFYNLDVVPIDDDNATTKNKTTRNFRLIHCNSSVMTQA
CPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCNNKTFDGKGLCTNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGSLAEEEVVIRSD
NFMONTKTIIVQLNESVAINCTRPNNNTRKGIHIGPGRFYAARKIIGDIRQAHCNLSRAQWNNTLKQIVI
KLREHFGNKTIKFNQSSGGDPEIVRHSFNCGGEFFYCDTTQLFNSTWNGTEGNNTTEGNSTITLPCRIKQII
NMWQEVGKAMYAPPIGGQIRCSSNITGLLLTRDGGTEGNGTENETEIFRPGGDMRDNRSELYKYKVVKV
EPLGVAPTRAKRRVVQRMVGFVTPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGLEGLIHSQRRQDILDWLYHTQ
GYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWCYKLVPEPDKVEEANKGENTSLLHPVSLHGMDPPEREVLEWRFDSRL
AFHHVARELHPEYFKNC [SEQ ID NO: 96]

Fig.28.



Secuencia de ADN del inserto

ATGAAGGTCAAGGAGACCAGAAAGAACTACCAGCATCTGTGGCGCTGGGGCACCATGCTCCTGGGAATGCT
 GATGATCTGCTCCGCCGCCGAGCAGCTGTGGGTACCGTCTACTACGGCGTGCCCTGTGTGGAAGGAGGCCA
 CGACCACCTCTTCTGCGCGAGCGACGCCAAGGCTACGACACGGAAGTGCATAACGTGTGGGCGACGCAT
 GCTTGGCGTGCTACGGACCCCAACCCCAAGGAGGTGGTGTCTGGGAAACGTGACCGAGTACTTCAACATGTG
 GAAGAATAACATGGTGGATCAGATGCACGAGGACATCATCTCTGTGGGACCAGTCCCTGAAGCCCTGCG
 TGAAGCTGACGCCTCTCTGCGTGACACTGGACTGTGACGACGTCAACACCACCAACAGCACTACCACCACC
 AGCAACGGCTGGACCGGAGAGATTTCGGAAGGGCGAGATCAAGAACTGCTCCTTCAATATCACGACCTCGAT
 CAGAGACAAGGTGCAGAAGGAATACGCGCTGTTTTATAATCTCGATGTGGTCCCCATCGACGACGACAATG
 CCACCACCAAGAACAAGACGACGCGTAATTTAGACTCATTCACTGCAACAGCAGCGTCATGACGCGAGGCC
 TGCCCCAAGGTGTCTTTCGAACCAATCCCGATCCATTACTGTGCCCTGCCGATTCGCGATCCTCAAGTG
 TAACAACAAGACCTTCGACGGAAGGGCTGTGCACCAACGTGACGAGGTGCAGTGCACCCATGGCATCC
 GCCCCGTGCTGAGCACCCAGCTGTGTGTAACGGGTCCCTGGCTGAGGAGGAGGTGGTGATCCGGTCCGAC
 AACTTCATGGACAACACCAAGACAATCATCGTCCAGCTGAACGAGTCTGTGGCGATTAACTGTACCCGGCC
 TAACAACAACACCCGTAAGGGCATCCACATCGGGCCTGGACGGGCTTCTATGCCGCCCGCAAGATCATCG
 GCGACATCCGGCAGGCCCCATTGCAACCTCTCCCGCGCCAGTGGAAATAACACCCTGAAGCAGATCGTGATC
 AAGCTGAGAGAGCACTTTGGAAACAAGACCATCAAGTTCAATCAGAGTTCTGGCGGAGACCCCGAGATCGT
 GCGGCACTCCTTCAACTGCGGGGGCGAGTTCTTCTACTGCGATACGACACAGCTCTTCAACTCCACCTGGA
 ACGGCACCGAGGGCAACAACACAGAGGGAACCTCACTATCACCTCCCTTGCCGCATCAAGCAGATCATC
 AACATGTGGCAGGAGGTGGGAAAGGCCATGTATGCCCCCCCCATCGGGGGCCAGATCCGCTGCTCCTCCAA
 CATCACCGGCTGTGTCTACCCAGAGACGGGGCACCGAGGGCAACGGCACGGAGAACGAGACGGAGATCT
 TCAGGCCCCGGCGGGCGGACATGAGGGATAACTGGCGGAGCGAGCTGTACAAGTACAAGGTGGTGAAGGTG
 GAGCCGCTCGGCGTGGCCCCACCCGGGCCAAGCGCCGCTCGTGACAGAGAATGGGTGCCGAGCTTCGGT
 ACTGTCTGGTGGAGAGCTGGACAGATGGGAGAAATAGGCTGCGCCCGGAGGCAAAAGAAATACAAGC
 TCAAGCATATCGTGTGGGCTCGAGGGAGCTTGAACGGTTTGGCGTGAACCCAGGCCCTGCTGGAAACATCT
 GAGGGATGTGCGCAGATCCTGGGGCAATTGCAGCCATCCCTCCAGACCGGGAGTGAAGAGCTGAGGTCTCT
 GTATAACACAGTGGCTACCTCTACTGCGTACACAGAGGATCGAGATTAAAGGATACCAAGGAGGCCCTTG
 ACAAAATTGAGGAGGAGCAAAACAAGAGCAAGAAGAAGGCCACGAGGAGCTGCTGACACTGGGCATAGC
 AACCAGGTATCACAGAACTATCCTATTGTCCAAAACATTCAGGGCCAGATGGTTTCATCAGGCCATCAGCCC
 CCGGACGCTCAATGCCTGGGTGAAGGTTGTGGAAGAGAAGGCCCTTTCTCCTGAGGTTATCCCCATGTTCT

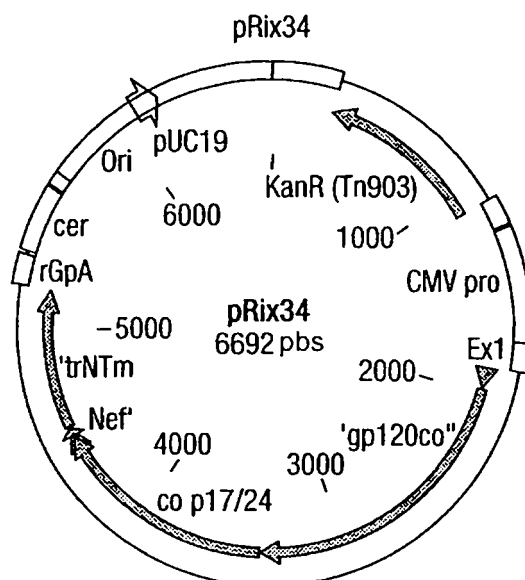
Fig.28 (Cont).

CCGCTTTGAGTGAGGGGGCCACTCCTCAGGACCTCAATACAATGCTTAATACCGTGGGCGGCCATCAGGCC
GCCATGCAAATGTTGAAGGAGACTATCAACGAGGAGGCAGCCGAGTGGGACAGAGTGCATCCCGTCCACGC
TGGCCCAATCGCGCCCGGACAGATGCGGGAGCCTCGCGGCTCTGACATTGCCGGCACCACCTCTACACTGC
AAGAGCAAATCGGATGGATGACCAACAATCCTCCCATCCCAGTTGGAGAAATCTATAAACGGTGGATCATT
CTCGGTCTCAATAAAATTGTTAGAATGTACTCTCCGACATCCATCCTTGACATTAGACAGGGACCCAAAGA
GCCTTTTAGGGATTACGTCGACCGGTTTTATAAGACCCCTGCGAGCAGAGCAGGCCTCTCAGGAGGTCAAAA
ACTGGATGACGGAGACACTCCTGGTACAGAACGCTAACCCCGACTGCAAAACAATCTTGAAGGCAC TAGGC
CCGGCTGCCACCCTGGAAGAGATGATGACCGCCTGTGAGGGAGTAGGCGGACCCGGACACAAAGCCAGAGT
GTTGATGGTGGGTTTTCCAGTCACACCTCAGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATC
TTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATCACTCCCAAAGAAGACAAGATATCCTT
GATCTGTGGATCTACCACACACAAGGCTACTTCCCTGATTGGCAGAACTACACACCAGGGCCAGGGGTCAG
ATATCCACTGACCTTTGGATGGTGCTACAAGCTAGTACCAGTTGAGCCAGATAAGGTAGAGAGGCCAATA
AAGGAGAGAACACCAGCTTGTTACACCTGTGAGCCTGCATGGGATGGATGACCCGGAGAGAGAAGTGTTA
GAGTGGAGGTTTTGACAGCCGCCTAGCATTTTCATCAGTGGCCCGAGAGCTGCATCCGGAGTACTTCAAGAA
CTGCTGA [SEQ ID NO: 97]

Secuencia de aminoácidos del inserto:

MKVKETRKNYQHLWRWGTMLLGLMLICSAAEQLWVTVYYGVPVWKEATTTLCASDAKAYDTEVHNWATH
ACVPTDPNPQEVVLGNVTEYFNMWKNMVDQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLDCDDVNTTNSTTTT
SNGWTGEIRKGEIKNCSFNITTSIRDKVQKEYALFYNLDVVPIDDDNATTKNKTTRNFRLIHCNSSVMTQA
CPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCNKTFDGKGLCTNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGLSLAESEVIRSD
NFMONTKTIIVQLNESVAINCTRPNNNTRKGIHIGPGRAFYAARKIIGDIRQAHCNLSRAQWNNTLKQIVI
KLREHFNGNTIKFNQSSGGDPEIVRHSFNCGGEFFYCDTTQLFNSTWNGTEGNTEGNSTITLPCRIKQII
NMWQEVGKAMYAPPIGGQIRCSSNITGLLLTRDGGTEGNGTENETEIFRPGGDMRDNRSELYKYKVVKV
EPLGVAPTRAKRRVVQRMGARASVLSGGELDRWEKIRLRPGGKKKYKLKHIVWASRELERFAVNPGLLET
EGCRQILGQLQPSLQTGSEELRSLYNTVATLYCVHQRIEIKDTKEALDKIEEQNKSKKKAQQAADTGHS
NQVSQNYPIVQNIQGMVHQAISPRTLNAWVKVVEEKAFSPEVIMFSAALSEGATPQDLNMTLNTVGGHQA
AMQMLKETINEEAEWDRVHPVHAGPIAPGQMRPRGSDIAGTTSTLQEQIGWMTNPNPIPVGGEIYKRWII
LGLNKIVRMYSPSILDIRQGPKEPFRDYVDRFYKTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQNPANPDCKTILKALG
PAATLEEMMTACQGVGGPGHKARVLMVGFVPTPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGLEGLIHSQRRQDIL
DLWIYHTQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWICYKLVPEPDKVEEANKGENTSLHPVSLHGMDDPEREVL
EWRFD SRLAFHHVARELHPEYFKNC [SEQ ID NO: 98]

Fig.29.



Secuencia de ADN del inserto

ATGAAGGTCAAGGAGACCAGAAAGAACTACCAGCATCTGTGGCGCTGGGGCACCATGCTCCTGGGAATGCT
 GATGATCTGCTCCGCCGCCGAGCAGCTGTGGGTCACCGTCTACTACGGCGTGCCTGTGTGGAAGGAGGCCA
 CGACCACCTCTTCTGCGCGAGCGACGCCAAGGCCCTACGACACGGAAGTGCATAACGTGTGGGCGACGCAT
 GCTTGCGTGCCTACGGACCCCAACCCCCAGGAGGTGGTGTCTGGGAAACGTGACCGAGTACTTCAACATGTG
 GAAGAATAACATGGTGGATCAGATGCACGAGGACATCATCTCTGTGGGACCAGTCCCTGAAGCCCTGCC
 TGAAGCTGACGCCTCTCTGCGTGACACTGGACTGTGACGACGTCAACACCACCAACAGCACTACCACCACC
 AGCAACGGCTGGACCGGAGAGATTGGAAGGGCGAGATCAAGAACTGCTCCTTCAATATCAGCACCTCGAT
 CAGAGACAAGGTGCAGAAGGAATACGCGCTGTTTTATAATCTCGATGTGGTCCCCATCGACGACGACAATG
 CCACCACCAAGAACAAGACGACGCGTAATTTAGACTCATTCATGCAACAGCAGCGTCATGACGCAGGCC
 TGCCCCAAGGTGTCTTGAACCAATCCCGATCCATTACTGTGCCCCCTGCCGATTTCGCGATCCTCAAGTG
 TAACAACAAGACCTTCGACGGGAAGGGCCTGTGCACCAACGTGACGACGGTGCAGTGCACCCATGGCATCC
 GCCCCGTCTGTGAGCACCAGCTGCTGCTGAACGGGTCCCTGGCTGAGGAGGAGGTGGTGTGCGGTCCGGAC
 AACTTCATGGACAACACCAAGACAATCATCGTCCAGCTGAACGAGTCTGTGGCGATTAACTGTACCCGGCC
 TAACAACAACACCCGTAAGGGCATCCACATCGGGCCTGGACGGGCCTTCTATGCCGCCCGCAAGATCATCG
 GCGACATCCGGCAGGCCATTGCAACCTCTCCCGCGCCAGTGAATAACACCTGAAGCAGATCGTGATC
 AAGCTGAGAGAGCACTTTGAAACAAGACCATCAAGTTCAATCAGAGTTCTGGCGGAGACCCCGAGATCGT
 GCGGCACTCCTTCAACTGCGGGGGCGAGTTCTTCTACTGCGATACGACACAGCTCTTCAACTCCACCTGGA
 ACGGCACCGAGGGCAACAACACAGAGGGAACTCCACTATCACCTCCCTTGCCGCATCAAGCAGATCATC
 AACATGTGGCAGGAGGTGGGAAAGGCCATGTATGCCCCCCCCATCGGGGCCAGATCCGCTGCTCCTCCAA
 CATCACCGGCTGCTGCTACACAGAGACGGGGGCACCGAGGGCAACGGCACGGAGAACGAGACGGAGATCT
 TCAGGCCCCGCGCGGGGACATGAGGGATAACTGGCGGAGCGAGCTGTACAAGTACAAGGTGGTGAAGGTG
 GAGCCGCTCGGCGTGGCCCCACCCGGGCCAAGCGCCGCGTGTGACAGAGAATGGGTGCCGAGCTTCGGT
 ACTGCTGGTGGAGAGCTGGACAGATGGGAGAAATTAGGCTGCGCCCGGAGGCAAAAAGAAATACAAGC
 TCAAGCATATCGTGTGGGCTCGAGGAGCTTGAACGGTTTGCGTGAACCCAGGCCTGCTGGAAACATCT
 GAGGGATGTGCGCAGATCCTGGGGCAATTGCAGCCATCCCTCCAGACCGGGAGTGAAGAGCTGAGGTCTT
 GTATAACACAGTGGCTACCTCTACTGCGTACACAGAGGATCGAGATTAAGGATACCAAGGAGGCCTTGG
 ACAAATGTAGGAGGAGCAAAACAAGAGCAAGAAGGCCAGCAGGCAGCTGCTGACACTGGGCATAGC
 AACCAGGTATCACAGAACTATCCTATTGTCCAAAACATTAGGGCCAGATGGTTTCATCAGGCCATCAGCCC
 CCGGACGCTCAATGCCTGGGTGAAGTTGTGCAAGAGAAGGCCCTTTCTCCTGAGGTTATCCCCATGTTCT
 CCGCTTTGAGTGAGGGGGCCACTCCTCAGGACCTCAATACAATGCTTAATACCGTGGGCGGCCATCAGGCC

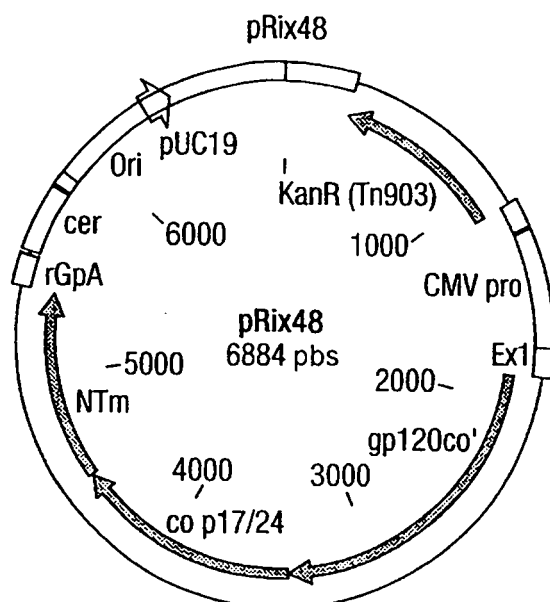
Fig.29 (Cont).

GCCATGCAAATGTTGAAGGAGACTATCAACGAGGAGGCAGCCGAGTGGGACAGAGTGCATCCCGTCCACGC
 TGGCCCAATCGCGCCCGGACAGATGCGGGAGCCTCGCGGCTCTGACATTGCCGGCACCACCTCTACACTGC
 AAGAGCAAATCGGATGGATGACCAACAATCCTCCCATCCCAGTTGGAGAAATCTATAAACGGTGGATCATT
 CTCGGTCTCAATAAAATTTAGTAATGTACTCTCCGACATCCATCCTTGACATTAGACAGGGACCCAAAGA
 GCCTTTTAGGGATTACGTCGACCGGTTTTATAAGACCCTGCGAGCAGAGCAGGCCTCTCAGGAGGTCAAAA
 ACTGGATGACGGAGACACTCCTGGTACAGAACGCTAACCCCGACTGCAAAAACAATCTTGAAGGCACTAGGC
 CCGGCTGCCACCCTGGAAGAGATGATGACCGCTGTGAGGGAGTAGGCGGACCCGGACACAAAGCCAGAGT
 GTTGATGGTGGGTTTTCCAGTCACACCTCAGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATC
 TTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCACCTCCAACGAAGACAAGATATCCTT
 GATCTGTGGATCTACCACACACAAGGCTACTTCCCTGATTGGCAGAACTACACACCAGGGCCAGGGGTCAG
 ATATCCACTGACCTTTGGATGGTGTCTACAAGCTAGTACCAGTTGAGCCAGATAAGGTAGAAGAGGCCAATA
 AAGGAGAGAACACCAGCTTGTACACCTGTGAGCCTGCATGGAATGGATGACCTTGAGAGAGAAGTGTTA
 GAGTGGAGGTTTGACAGCCGCTAGCATTTTCATCACGTGGCCCGAGAGCTGCATCCGGAGTACTTCAAGAA
 CTGCACTAGTGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAGTCAGCCTAAAAGTCTT
 GTACCAATTGCTATTGTAAAAGTGTGCTTTTCATTGCCAAGTTTGTTCATAACAGCTGCCTTAGGCATC
 TCCTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCT
 ATCAAAGCAACCCACCTCCCAATCCAAAGGGAGCCGACAGGCCCGAAGGAATAA [SEQ ID NO: 99]

Secuencia de aminoácidos del inserto:

MKVKETRKNYQHLWRWGTMLLGLMLICSAEQLWVTVYYGVVPVWKEATTTLFCASDAKAYDTEVHNVWATH
 ACVPTDPNPQEVVLGNVTEYFNMWKNMVDQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLDCDDVNTNSTTTT
 SNGWTGEIRKGEIKNCSFNITTSIRDKVQKEYALFYNLDVVPIDDDNATTKNKTTRNFRLIHCNSSVMTQA
 CPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCNKTFDGLKCTNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGLSLAEDEVVIRSD
 NFMONTKTIIVQLNESVAINCTRPNNNTRKGIHIGPGRFYAARKIIGDIRQAHCNLSRAQWNNTLKQIVI
 KLREHFNGKTIKFNQSSGDPFIVRHSFNCGEFFYCDTTQLFNSTWNGTEGNNTEGSTITLPCRIKQII
 NMWQEVGKAMYAPPIGGQIRCSSNITGLLLTRDGGTEGNGTENETEIFRPGGDMRDNRSELYKYKVVKV
 EPLGVAPTRAKRRVQRMGARASVLSGGEIDRWEKIRLRPGGKKYKLKHIVWASRELERFAVNPGLLETS
 EGCRQILGQLQPSLQTGSEELRSLYNTVATLYCVHQRIEIKDTKEALDKIEEQNKSKKKAQQAADTGHS
 NQVSQNYPIVQNIQGQMVHQAI SPRTLNWKVVEEKAFSPEVIMFSALESEGATPQDLNMLNTVGGHQA
 AMQMLKETINEEAEWDRVHPVHAGPIAPGQMREPRGSDIAGTTSTLQEQIGWMTNPPPIVGEIYKRWII
 LGLNKIVRMYSPITSILDIRQGPKEPFRDYVDRFYKTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQANANPDCKTILKALG
 PAATLEEMMTACQGVGGPGHKARVLMVGFVPVTPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGLEGLIHSQRRQDIL
 DLWIYHTQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFWCYKLVPEPDKVEEANKGENTSLLHPVSLHGMDDPEREVL
 EWRFD SRLAFHHVARELHPEYFKNCTSEPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNICYCKKCCFHCQVCFITAA LGI
 SYGRKKRRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSKGEPTGPKE [SEQ ID NO: 100]

Fig.30.



Secuencia de ADN del inserto

ATGAAGGTCAAGGAGACCAGAAAGAACTACCAGCATCTGTGGCGCTGGGGCACCATGCTCCTGGGAATGCT
 GATGATCTGCTCCGCCGCCGAGCAGCTGTGGGTACCGTCTACTACGGCGTGCCTGTGTGGAAGGAGGCCA
 CGACCACCTCTTCTGCGCGAGCGACGCCAAGGCCACGACACGGAAGTGCATAACGTGTGGGCGACGCAT
 GCTTGCGTGCCTACGGACCCCAACCCCCAGGAGGTGGTGCTGGGAAACGTGACCGAGTACTTCAACATGTG
 GAAGAATAACATGGTGGATCAGATGCACGAGGACATCATCTCTGTGGGACCAGTCCCTGAAGCCCTGCC
 TGAAGCTGACGCCTCTCTGCGTGACACTGGACTGTGACGACGTCAACACCACCAACAGCACTACCACCACC
 AGCAACGGCTGGACCGGAGAGATTCCGAAGGGCGAGATCAAGAAGTGTCTCTTCAATATCAGACCTCGAT
 CAGAGACAAGGTGCAGAAGGAATACGCGCTGTTTTATAATCTCGATGTGGTCCCCATCGACGACGACAATG
 CCACCACCAAGAACAAGACGACGCGTAATTTTCACTCATTCAGTCAACAGCAGCGTCATGACGAGGCC
 TGCCCCAAGGTGTCTTTCGAACCAATCCCGATCCATTACTGTGCCCTGCCGATTCGCGATCCTCAAGTG
 TAACAACAAGACCTTCGACGGGAAGGGCCTGTGCACCAACGTGACGACGGTGCAGTGCACCCATGGCATCC
 GCCCCGTCTGTGACACCCAGCTGCTGTGAACGGGTCCCTGGCTGAGGAGGAGGTGGTGATCCGGTCCGAC
 AACTTCATGGACAACACCAAGACAATCATCGTCCAGTGAACGAGTCTGTGGCGATTAACTGTACCCGGCC
 TAACAACAACACCCGTAAGGGCATCCACATCGGGCCTGGACGGGCCTTCTATGCCGCCCGCAAGATCATCG
 GCGACATCCGGCAGGCCCATTTGCAACCTCTCCCGCGCCAGTGGAAATAACACCCTGAAGCAGATCGTGATC
 AAGCTGAGAGAGCACTTTGGAAACAAGACCATCAAGTTCAATCAGAGTTCTGGCGGAGACCCCGAGATCGT
 GCGGCACTCCTTCAACTGCGGGGCGAGTTCTTCTACTGCGATACGACACAGCTCTTCAACTCCACCTGGA
 ACGGCACCGAGGGCAACAACACAGAGGGAACTCCACTATCACCTCCCTTGCCGCATCAAGCAGATCATC
 AACATGTGGCAGGAGGTGGGAAAGGCCATGTATGCCCCCCCCATCGGGGGCCAGATCCGCTGCTCCTCCAA
 CATCACCGCCTGCTGCTCACACAGACGCGGGGACCGAGGGCAACGGCACGGAGAACGAGACGGAGATCT
 TCAGGCCCGGCGGGCGGACATGAGGGATAACTGGCGGAGCGAGCTGTACAAGTACAAGGTGGTGAAGGTG
 GAGCCGCTCGGCGTGGCCCCCACC CGGGCAAGCGCCGCGTCTGTGCAGAGAATGGGTGCCCCGAGCTTCGGT
 ACTGTCTGGTGGAGAGCTGGACAGATGGGAGAAAATTAGGCTGCGCCCGGAGGCAAAAAGAAATACAAGC
 TCAAGCATATCGTGTGGGCTCGAGGGAGCTTGAACGGTTTGCCGTGAACCCAGGCCCTGCTGGAAACATCT
 GAGGGATGTGCGCAGATCCTGGGGCAATTGCAGCCATCCCTCCAGACCGGAGTGAAGAGCTGAGGTCTT
 GTATAACACAGTGGCTACCTCTACTGCGTACACAGAGGATCGAGATTAAGGATACCAAGGAGGCCCTTGG
 AAAAAATTGAGGAGGAGCAAAACAAGAGCAAGAAGAGGCCAGCAGGCAGCTGCTGACACTGGGCATAGC
 AACCAGGTATCACAGAATCTCTATTGTCCAAAACATTACAGGGCCAGATGGTTTCATCAGGCCATCAGCCC
 CCGGACGCTCAATGCCTGGGTGAAGTTGTGCAAGAGAAGGCCTTTTCTCCTGAGGTTATCCCCATGTTCT
 CCGCTTTGAGTGAGGGGGGCACTCCTCAGGACCTCAATACAATGCTTAATACCGTGGCGGCCATCAGGCC
 GCCATGCAAATGTTGAAGGAGACTATCAACGAGGAGGCAGCCGAGTGGGACAGAGTGCATCCCGTCCACGC

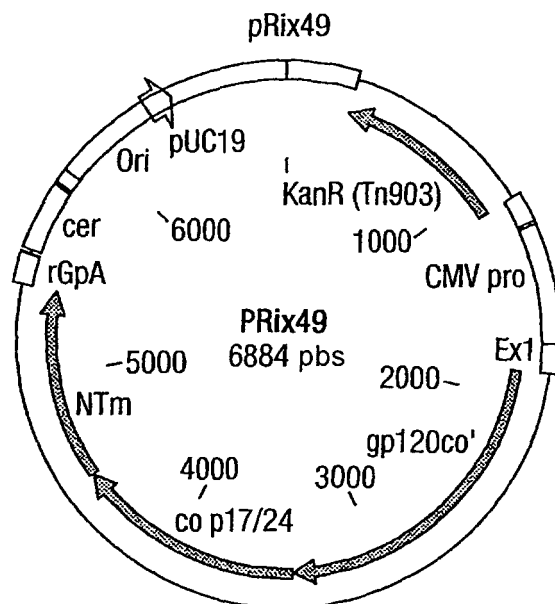
Fig.30 (Cont).

TGGCCCAATCGCGCCCGGACAGATGCGGGAGCCTCGCGGCTCTGACATTGCCGGCACCACCTCTACACTGC
 AAGAGCAAATCGGATGGATGACCAACAATCCTCCCATCCAGTTGGAGAAATCTATAAACGGTGGATCATT
 CTCGGTCTCAATAAAATTGTTAGAATGTACTCTCCGACATCCATCCTTGACATTAGACAGGGACCCAAAGA
 GCCTTTTAGGGATTACGTCGACCGGTTTTATAAGACCCTGCGAGCAGAGCAGGCCTCTCAGGAGGTCAAAA
 ACTGGATGACGGAGACACTCCTGGTACAGAACGCTAACCCCGACTGCAAAACAATCTTGAAGGCAC TAGGC
 CCGGCTGCCACCCTGGAAGAGATGATGACCGCCTGTGAGGGAGTAGGCGGACCCGGACACAAAGCCAGAGT
 GTTGATGGGTGGCAAGTGGTCAAAAAGTAGTGTGGTTGGATGGCCTACTGTAAGGGAAAGAATGAGACGAG
 CTGAGCCAGCAGCAGATGGGGTGGGAGCAGCATCTCGAGACCTGGAAAAACATGGAGCAATCACAAGTAGC
 AATACAGCAGCTACCAATGCTGCTTGTGCCTGGCTAGAAGCACAAGAGGAGGAGGAGGTGGGTTTTCCAGT
 CACACCTCAGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAA
 AGGGGGGACTGGAAGGGCTAATCACTCCCAACGAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGGATCTACCACACA
 CAAGGCTACTTCCCTGATTGGCAGAACTACACACCAGGGCCAGGGGTGAGATATCCACTGACCTTTGGATG
 TGCTACAAGCTAGTACCAGTTGAGCCAGATAAGGTAGAAGAGGCCAATAAAGGAGAGAACACCAGCTTGT
 TACACCTGTGAGCCTGCATGGAATGGATGACCTGAGAGAGAAGTGTAGAGTGGAGGTTTGACAGCCGC
 CTAGCATTTTCATCACGTGGCCCGAGAGCTGCATCCGGAGTACTTCAAGAACTGCACTAGTGAGCCAGTAGA
 TCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAGTCAGCCTAAAACCTGCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAA
 AGTGTGCTTTTCATTGCCAAGTTTGTTCATAACAGCTGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGG
 AGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAACCCACCTCCCA
 ATCCAAAGGGGAGCCGACAGGCCCGAAGGAATAA [SEQ ID NO: 101]

Secuencia de aminoácidos del inserto:

MKVKETRKNYQHLWRWGTMLLGMIMCSAAEQWLWTVVYGVVPVWKEATTTLFCASDAKAYDTEVHNVWATH
 ACVPTDPNPQEVVLGNVTEYFNMWKNMVDQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLDCDDVNTNSTTTT
 SNGWTGEIRKGEIKNCSFNITTSIRDKVQKEYALFYNLDVVPIDDDNATTKNKTRNFRLIHCNSSVMTQA
 CPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCNKTFDGKGLCTNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNLGSLAEEEVVIRSD
 NFMNNTKTIIVQLNESVAINCTRPNNNTRKGIHIGPGAFYAARKIIGDIRQAHCNLSRAQWNNTLKQIVI
 KLREHFGNKTIKFNQSSGGDPEIVRHSFNCGGEFFYCDTTLQFNSTWNGTEGNNTEGNSTITLPCRKQII
 NMWQEVGKAMYAPPIGGQIRCSSNITGLLLTRDGGTEGNGTENETEIFRPGGGDMRDNRSELYKYKVVKV
 EPLGVAPTRAKRRVVQRMGARASVLSGGELDRWEKIRLRPGGKKKYKLKHIVWASRELERFAVNPGLLET
 EGCRQILGQLQPSLQTGSEELRSLYNTVATLYCVHQRIEIKDTKEALDKIEEQNKSKKKAQQAADTGHS
 NQVSQNYPIVQNIQGMVHQAI SPRTLNAWVKVVEEKAFSPEVIPMFSALEGATPQDLNMLNTVGGHQA
 AMQMLKETINEEAAEWDRVHPVHAGPIAPGQMREPRGSDIAGTTSTLQEQIGWMTNNPPIPVGEIYKRWII
 LGLNKIVRMYSPTSILDIRQGPKEPFRDYVDRFYKTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQANANPDCKTILKALG
 PAATLEEMMTACQGVGGPGHKARVLMGGKWSKSSVVGWPTVRRMRRAEPAADGVGAASRDLEKHGAISS
 NTAATNAACAWLEAQEEEEVGFPVTPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGLEGLIHSQRRQDILDWIYHT
 QGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFWCYKLVPEPDKVEEANKGENTSLLHPVSLHGMDDPEREVLEWRFD
 LAFHHVARELHPEYFKNCTSEVPDPRLEPWKHPGSQPKTACTNCYCKKCFHCQVCFITAALGISYGRKKR
 RQRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSKGEPTGPKE [SEQ ID NO: 102]

Fig.31.



Secuencia de ADN del inserto

ATGAAGGTCAAGGAGACCAGAAAGAACTACCAGCATCTGTGGCGCTGGGGCACCATGCTCCTGGGAATGCT
 GATGATCTGCTCCGCCCGGAGCAGCTGTGGGTACCGTCTACTACGGCGTGCTGTGTGGAAGGAGGCCA
 CGACCACCTCTTCTGCGCGAGCGACGCCAAGGCCTACGACACGGAAGTGCATAACGTGTGGGCGACGCAT
 GCTTGCGTGCTTACGGACCCCAACCCCCAGGAGGTGGTGTGGGAAACGTGACCGAGTACTTCAACATGTG
 GAAGAATAACATGGTGGATCAGATGCACGAGGACATCATCTCTGTGGGACCAGTCCCTGAAGCCCTGCG
 TGAAGCTGACGCTCTCTGCGTGACACTGGACTGTGACGACGTCAACACCACCAACAGCACTACCACCACC
 AGCAACGGCTGGACCGGAGAGATTTCGGAAGGGCGAGATCAAGAAGTGTCTCTCAATATCACGACCTCGAT
 CAGAGACAAGGTGCAGAAGGAATACGCGCTGTTTTATAATCTCGATGTGGTCCCCATCGACGACGACAATG
 CCACCACCAAGAACAAGACGACGCGTAATTTAGACTCATTCACTGCAACAGCAGCGTCATGACGAGGCC
 TGCCCCAAGGTGTCTTTCGAACCAATCCCGATCCATTACTGTGCCCCGCGGATTGCGGATCCCTCAAGTG
 TAACAACAAGACCTTCGACGGGAAGGGCTGTGCACCAACGTGACGACGCGTGCAGTGCACCATGGCATCC
 GCCCCGTGCTGAGCACCCAGCTGCTGCTGAACGGGTCCCTGGCTGAGGAGGAGGTGGTGTATCCGGTCGGAC
 AACTTCATGGACAACACCAAGACAATCATCGTCCAGCTGAACGAGTCTGTGGCGATTAACTGTACCCGGCC
 TAACAACAACACCCGTAAGGGCATCCACATCGGGCCTGGACGGGCCTTCTATGCCGCCCGCAAGATCATCG
 GCGACATCCGGCAGGCCCCATTGCAACCTCTCCGCGCCCCAGTGGAATAACACCCTGAAGCAGATCGTGATC
 AAGCTGAGAGAGCACTTTGGAACAAGACCATCAAGTTCAATCAGAGTTCTGGCGGAGACCCCGAGATCGT
 GCGGCACTCCTTCAACTGCGGGGGCGAGTCTTCTACTGCGATACGACACAGCTCTTCAACTCCACCTGGA
 ACGGCACCGAGGGCAACAACAGAGGGAATCCACTATCACCTCCCTTGCCGCATCAAGCAGATCATC
 AACATGTGGCAGGAGGTGGGAAGGCCATGTATGCCCCCCCATCGGGGGCCAGATCCGCTGCTCCTCCAA
 CATCACCGGCTGCTGCTCACCAGAGACGGGGGACCGAGGGCAACGGCACGGAGAACGAGACGGAGATCT
 TCAGGCCCCGGCGGCGGACATGAGGGATAACTGGCGGAGCGAGCTGTACAAGTACAAGGTGGTGAAGGTG
 GAGCCGCTCGCGGTGGCCCCACCCGGGCCAAGCGCCGCTCGTGACAGAAATGGGTGCCCGAGCTTCGGT
 ACTGTCTGGTGGAGAGCTGGACAGATGGGAGAAAATTAGGCTGCGCCCCGGGAGGCAAAAAGAAATACAAGC
 TCAAGCATATCGTGTGGGCCTCGAGGGAGCTTGAACGGTTTGCCGTGAACCCAGGCCTGCTGGAAACATCT
 GAGGGATGTGCGCCAGATCCTGGGGCAATTGCAGCCATCCCTCCAGACCGGGAGTGAAGAGCTGAGGTCTCT
 GTATAACACAGTGGCTACCCTCTACTGCGTACACAGAGGATCGAGATTAAGGATACCAAGGAGGCCTTGG
 ACAAATTGAGGAGGAGCAAAACAAGAGCAAGAAGAGGCCAGCCAGCAGGCAGCTGCTGACACTGGGCATAGC
 AACCAGGTATCACAGAACTATCTATTGTCCAAAACATTACGGGCCAGATGGTTCATCAGGCCATCAGCCC
 CCGGACGCTCAATGCCTGGGTGAAGTTGTGCAAGAGAAGGCCTTTCTCCTGAGGTTATCCCCATGTTCT

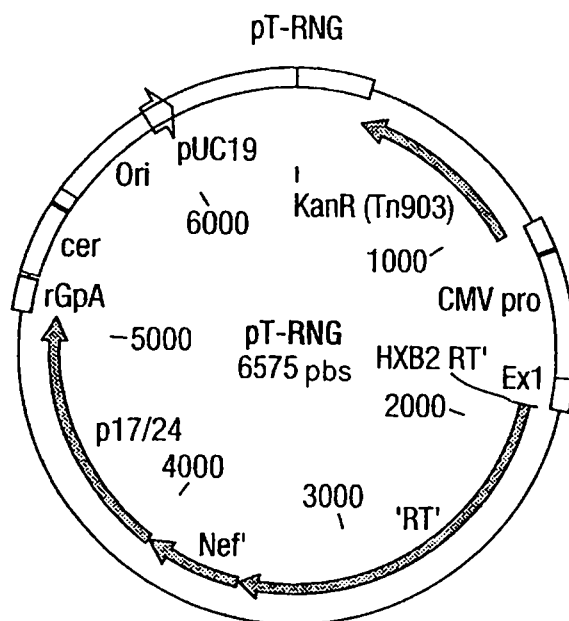
Fig.31 (Cont).

CCGCTTTGAGTGAGGGGGCCACTCCTCAGGACCTCAATACAATGCTTAATACCGTGGGCGGCCATCAGGCC
 GCCATGCAAATGTTGAAGGAGACTATCAACGAGGAGGCAGCCGAGTGGGACAGAGTGATCCCGTCCACGC
 TGGCCCAATCGCGCCCGGACAGATGCGGGAGCCTCGCGGCTCTGACATTGCCGGCACCACCTCTACACTGC
 AAGAGCAAATCGGATGGATGACCAACAATCCTCCCATCCCAGTTGGAGAAATCTATAAACGGTGGATCATT
 CTCGGTCTCAATAAAATTGTTAGAATGTACTCTCCGACATCCATCCTTGACATTAGACAGGGACCCAAAGA
 GCCTTTTAGGGATTACGTCGACCGGTTTTATAAGACCCTGCGAGCAGAGCAGGCCTCTCAGGAGGTCAAAA
 ACTGGATGACGGAGACACTCCTGGTACAGAACGCTAACCCCGACTGCAAAACAATCTTGAAGGCACTAGGC
 CCGGCTGCCACCCTGGAAGAGATGATGACCGCCTGTGAGGGAGTAGGCGGACCCGGACACAAAGCCAGAGT
 GTTGATGGGTGGCAAGTGGTCAAAAAGTAGTGTGGTTGGATGGCCTACTGTAAGGGAAAGAATGAGACGAG
 CTGAGCCAGCAGCAGATGGGGTGGGAGCAGCATCTCGAGACCTGGAAAAACATGGAGCAATCACAAGTAGC
 AATACAGCAGCTACCAATGCTGCTTGTGCTTGGCTAGAAGCACAAGAGGAGGAGGAGGTGGGTTTTCCAGT
 CACACCTCAGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAGAAA
 AGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCACTCCCAACGAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGGATCTACCACACA
 CAAGGCTACTTCCCTGATTGGCAGAACTACACACCAGGGCCAGGGGTCAGATATCCACTGACCTTTGGATG
 GTGCTACAAGCTAGTACCAGTTGAGCCAGATAAGGTAGAAGAGGCCAATAAAGGAGAGAACACCAGCGCCT
 TACACCCTGTGAGCCTGCATGGAATGGATGACCCTGAGAGAGAAGTGTAGAGTGGAGGTTTGACAGCCGC
 CTAGCATTTTCATCAGTGGCCCCGAGAGCTGCATCCGGAGTACTTCAAGAACTGCCTAGTGGAGCCAGTAGA
 TCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAGTCAGCCTAAAAGTCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAA
 AGTGTGCTTTTCATTGCCAAGTTTGTTCATAACAGTGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGG
 AGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAACCCACCTCCCA
 ATCCAAAGGGGAGCCGACAGGCCCGAAGGAATAA [SEQ ID NO: 103]

Secuencia de aminoácidos del inserto:

MKVKETRKNYQHLWRWGTMLLGMMLICSAAEQLWVTVYVGPVWKEATTTLFCASDAKAYDTEVHNVWATH
 ACVPTDPNPQEVVLGNVTEYFNMWKNMVDQMHEDIISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLDCDDVNTNSTTTT
 SNGWTGEIRKGEIKNCSFNITTSIRDKVQKEYALFYNLDVVPIDDDNATTKNKTTRNFRLIHCNSSVMTQA
 CPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCNKTFDGKGLCTNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLLNGSLAEDEVVIRSD
 NFMONTKTIIVQLNESVAINCTRPNNNTRKGIHIGPGRAFYAARKIIGDIRQAHCNLSRAQWNNTLQKIVI
 KLREHFNGKTIKFNQSSGGDPEIVRHSFNCGGEFFYCDTTLFNSTWNGTEGNTEGNSTITLPCRIKQII
 NMWQEVGKAMYAPPIGGQIRCSSNITGLLLTRDGGTEGNTEGNETEIFRPGGDMRDNRSELYKYKVVKV
 EPLGVAPTRAKRRVVQRMGARASVLSGGELDRWEKIRLRPGGKKYKYLKHIVWASRELERFAVNPGLLET
 EGCRQILGQLQPSLQTGSEELRSLYNTVATLYCVHQRIEIKDTKEALDKIEEEQNKSKKKAQQAADTGHS
 NQVSONYPIVQNIQGMVHQAISPRTLNAWKVVEEKAFSPEVIMFSALEGATPQDLNMTLNTVGGHQA
 AMQMLKETINEEAAEWDRVHPVHAGPIAPGQMREPRGSDIAGTTSTLQEQIGWMTNPNPIPVGEIYKRWII
 LGLNKIVRMYSPTSILDIRQGPKEPFRDYVDRFYKTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQANPDKTILKALG
 PAATLEEMMTACQGVGGPGHKARVLMGGKWSKSSVVGWPTVRERMRAEPAADGVGAASRDLEKHGAITSS
 NTAATNAACAWLEAQEEEEVGFPVTPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGLEGLIHSORRQDILDWIIYHT
 QGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWCYKLVPEPDKVEEANKGENTSALHPVSLHGMDDPEREVLEWRFSR
 LAFHHVARELHPEYFKNCTSEPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFITAAALGISYGRKKR
 RQRRRPQGSQTHQVSLSKQPTSQSKGEPTGPKE [SEQ ID NO: 104]

Fig.32.



Secuencia de ADN del inserto

```

ATGGGCCCCATCAGTCCCATCGAGACCGTGCCGGTGAAGCTGAAACCCGGGATGGACGGCCCCAAGGTCAA
GCAGTGGCCACTCACCAGAGGAGAAGATCAAGGCCCTGGTGGAGATCTGCACCGAGATGGAGAAAGAGGGCA
AGATCAGCAAGATCGGGCCTGAGAACCCATACAACACCCCGTGTTCGCCATCAAGAAGAAGGACAGCACC
AAGTGGCGCAAGCTGGTGGATTTCGGGGAGCTGAATAAGCGGACCCAGGATTTCTGGGAGGTCCAGCTGGG
CATCCCCCATCCGGCCGGCCTGAAGAAGAAGAAGAGCGTGACCGTGCTGGACGTGGGCGACGCTTACTTCA
GCGTCCCTCTGGACGAGGACTTTAGAAAGTACACCGCCTTACCATCCCATCTATCAACAACGAGACCCCT
GGCATCAGATATCAGTACAACGTCTCCCCAGGGCTGGAAGGGCTCTCCCGCCATTTCCAGAGCTCCAT
GACCAAGATCCTGGAGCCGTTTCGGAAGCAGAACCCGATATCGTCATCTACCAGTACATGGACGACCTGT
ACGTGGGCTCTGACCTGGAAATCGGGCAGCATCGCACGAAGATTGAGGAGCTGAGGCAGCATCTGCTGAGA
TGGGGCCTGACCACTCCGGACAAGAAGCATCAGAAGGAGCCGCCATTCTGAAGATGGGCTACGAGCTCCA
TCCCGACAAGTGGACCGTGCAGCCTATCGTCTCCCCGAGAAGGACAGCTGGACCGTGAACGACATCCAGA
AGCTGGTGGGCAAGCTCAACTGGGCTAGCCAGATCTATCCCGGGATCAAGGTGCGCCAGCTCTGCAAGCTG
CTGCGCGGCACCAAGGCCCTGACCGAGGTGATTCCCCCTACGGAGGAAGCCGAGCTCGAGCTGGCTGAGAA
CCGGGAGATCCTGAAGGAGCCCGTGACGGCGTGACTATGACCCCTCCAAGGACCTGATCGCCGAAATCC
AGAAGCAGGGCCAGGGGCAGTGGACATACCAGATTTACCAGGAGCCTTTCAAGAACCTCAAGACCGGCAAG
TACGCCCGCATGAGGGGCGCCACACCAACGATGTCAAGCAGCTGACCGAGGCGCTCCAGAAGATCACGAC
CGAGTCCATCGTGATCTGGGGGAAGACACCCAAGTTCAAGCTGCCTATCCAGAAGGAGACCTGGGAGACGT
GGTGGACCGAATATTGGCAGGCCACCTGGATTCCCGAGTGGGAGTTTCGTGAATACACCTCCTCTGGTGAAG
CTGTGGTACCAGCTCGAGAAGGAGCCCATCGTGGGCGCGGAGACATTCTACGTGGACGGCGCGGCCAACCG
CGAAACAAAGCTCGGGAAGGCCGGGTACGTACCAACCGGGGCGCCAGAAGGTCGTACCCCTGACCGACA
CCACCAACCAGAAGACGGAGCTGCAGGCCATCTATCTCGTCTCCAGGACTCCGGCCTGGAGGTGAACATC
GTGACGGACAGCCAGTACGCGCTGGGCATTATTACGGCCAGCCGAGTCCGAGAGCGAAGCTGGTGAAG
CCAGATTATCGAGCAGCTGATCAAGAAAGAGAAGGTCTACCTCGCCTGGGTCCCGGCCATAAGGGCATTG
GCGGCAACGAGCAGGTGACAAGCTGGTGAGTGCGGGGATTAGAAAGGTGCTGATGGTGGGTTTTCCAGTC
ACACCTCAGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAGAAAA
GGGGGACTGGAAGGGCTAATTCACTCCCAAAGAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGGATCTACCACACAC
AAGGCTACTTCCCTGATTGGCAGAACTACACACCAGGGCCAGGGGTGAGATATCCACTGACCTTTGGATGG
TGCTACAAGCTAGTACCAGTTGAGCCAGATAAGGTAGAAGAGGCCAATAAAGGAGAGAACACCAGCTTGT

```

Fig.32 (Cont).

ACACCCTGTGAGCCTGCATGGGATGGATGACCCGGAGAGAGAAGTGTAGAGTGGAGGTTTGACAGCCGCC
 TAGCATTTTCATCACGTGGCCCGAGAGCTGCATCCGGAGTACTTCAAGAACTGCATGGGTGCCCGAGCTTCG
 GTACTGTCTGGTGGAGAGCTGGACAGATGGGAGAAAATTAGGCTGCGCCCGGAGGCAAAAAGAAATACAA
 GCTCAAGCATATCGTGTGGGCCCTCGAGGGAGCTTGAACGGTTTGCCGTGAACCCAGGCCTGCTGGAACAT
 CTGAGGGATGTCGCCAGATCCTGGGGCAATTGCAGCCATCCCTCCAGACCCGGAGTGAAGAGCTGAGGTCC
 TTGTATAACACAGTGGCTACCCCTCTACTGCGTACACCAGAGGATCGAGATTAAGGATACCAAGGAGGCCTT
 GGACAAAATTGAGGAGGAGCAAAACAAGAGCAAGAAGAAGGCCAGCAGGCAGCTGCTGACACTGGGCATA
 GCAACCAGGTATCACAGAACTATCCTATTGTCCAAAACATTGAGGGCCAGATGGTTCATCAGGCCATCAGC
 CCCCAGGACGCTCAATGCCCTGGGTGAAGGTTGTGGAAGAGAAGGCCCTTTCTCCTGAGGTTATCCCCATGTT
 CTCCGCTTTGAGTGAGGGGGCCACTCCTCAGGACCTCAATACAATGCTTAATACCGTGGGCGGCCATCAGG
 CCGCCATGCAAAATGTTGAAGGAGACTATCAACGAGGAGGCAGCCGAGTGGGACAGAGTGCATCCCGTCCAC
 GCTGCGCCCAATCGCGCCCGGACAGATGCGGGAGCCTCGCGGCTCTGACATTGCCGGCACCACCTTACACT
 GCAAGAGCAAAATCGGATGGATGACCAACAATCCTCCCATCCAGTTGGAGAAAATCTATAAACGGTGGATCA
 TCCTGGGCCCTGAACAAGATCGTGCAGTGTACTCTCCGACATCCATCCTTGACATTAGACAGGGACCCAAA
 GAGCCTTTTAGGGATTACGTCGACCGGTTTTATAAGACCCTGCGAGCAGAGCAGGCCTCTCAGGAGGTCAA
 AAATGGATGACGAGACACTCCTGGTACAGAACGCTAACCCGACTGCAAAACAATCTTGAAGGCACTAG
 GCCCGGCTGCCACCCTGGAAGAGATGATGACCGCTGTGAGGAGTAGGCGGACCCGACACAAAGCCAGA
 GTGTTGTAA [SEQ ID NO: 88]

Secuencia de aminoácidos del inserto:

MGPISPIETVPVKLKPGMDGPKVKQWPLTEEKIKALVEICTEMEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKKDST
 KWRKLVDFRELNKRQTQDFWEVQLGIPHPAGLKKKSVTVLDVGDYFVSPLDEDFRKYTAFTIP SINNETP
 GIRYQYNVLPQGWKGSPAIFQSSMTKILEPFRKQNPDIYIYQYMDLYVGSLEIGQHRTKIEELRQHLLR
 WGLTTPDKKHQKEPFLKMGYELHPDKWTVQPIVLPEKDSWTVNDIQKLVGKLNWASQIYPGIKVRQLCKL
 LRGTALTEVIPLTEAELELAENREILKEPVHGVYDPSKDLIAEIQKQGQGWYQIYQEPFKNLTKGK
 YARMRGAHTNDVKQLTEAVQKITTESIVIWGKTPKFKLPIQKETWETWWTEYWQATWIPEWEFVNTPLVK
 LWYQLEKEPIVGAETFYVDGAANRETKLGKAGYVTNRGRQKVVTLTDTTNQKTELQAIYLLALQDSGLEVNI
 VTDSQYALGIIQAQPDQSESELVNQIIIEQLIKKEKVYLAWVPAHKGIGNEQVDKLVSAIRKVLVVGFPV
 TPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGLEGLIHSQRRQDILDWYHTQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGW
 CYKLVPEPDKVEEANKGENTSLHPVSLHGMDPEREVLEWRFD SRLAFHHVARELHPEYFKNCMGARAS
 VLSGGELDRWEKIRLRPGGKKYKLVKHIWASRELERFAVNPGLLETSEGCRQILGQLQPSLOTGSEELRS
 LYNTVATLYCVHQRIEIKDTKEALDKIEEQNKSKKKAQQAADTGHNSQVSNYPYQNIQGMVHQAI
 PRTLNAWVKVVEEKAFSPEVIMFSALESEGATPQDLNMLNTVGGHQAAQMMLKETINEEAAEWDRVHPVH
 AGPIAPGQMREPRGSDIAGTTSTLQEQIGWMTNPPIPVGEIYKRWII LGLNKIVRMYSPSILDIRQGP
 EPFRDYVDRFYKTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQNANPDCKTILKALGPAATLEEMMTACQVGGPGHKAR
 VL [SEQ ID NO: 89]

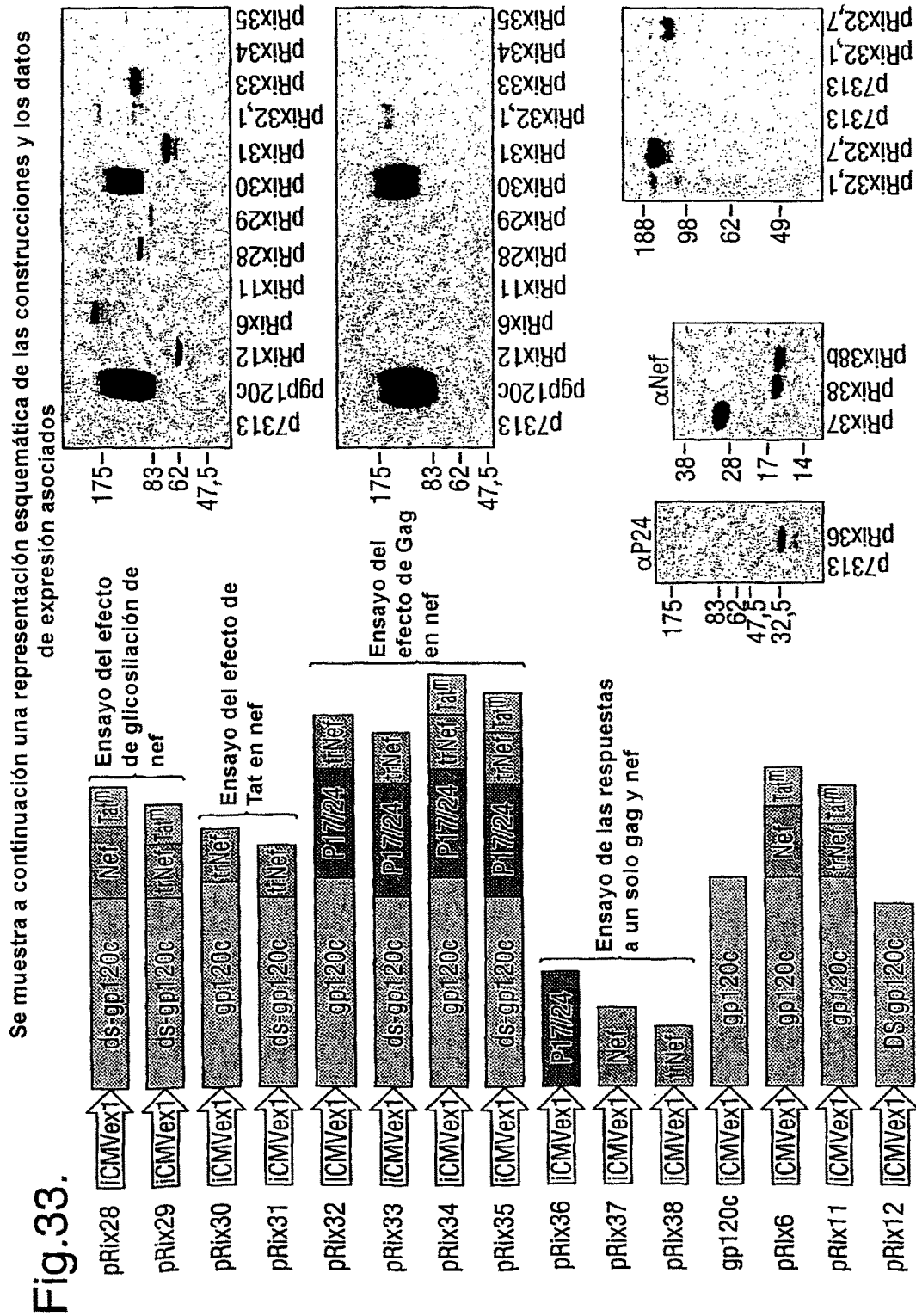


Fig.34.

Una representación esquemática de construcciones adicionales

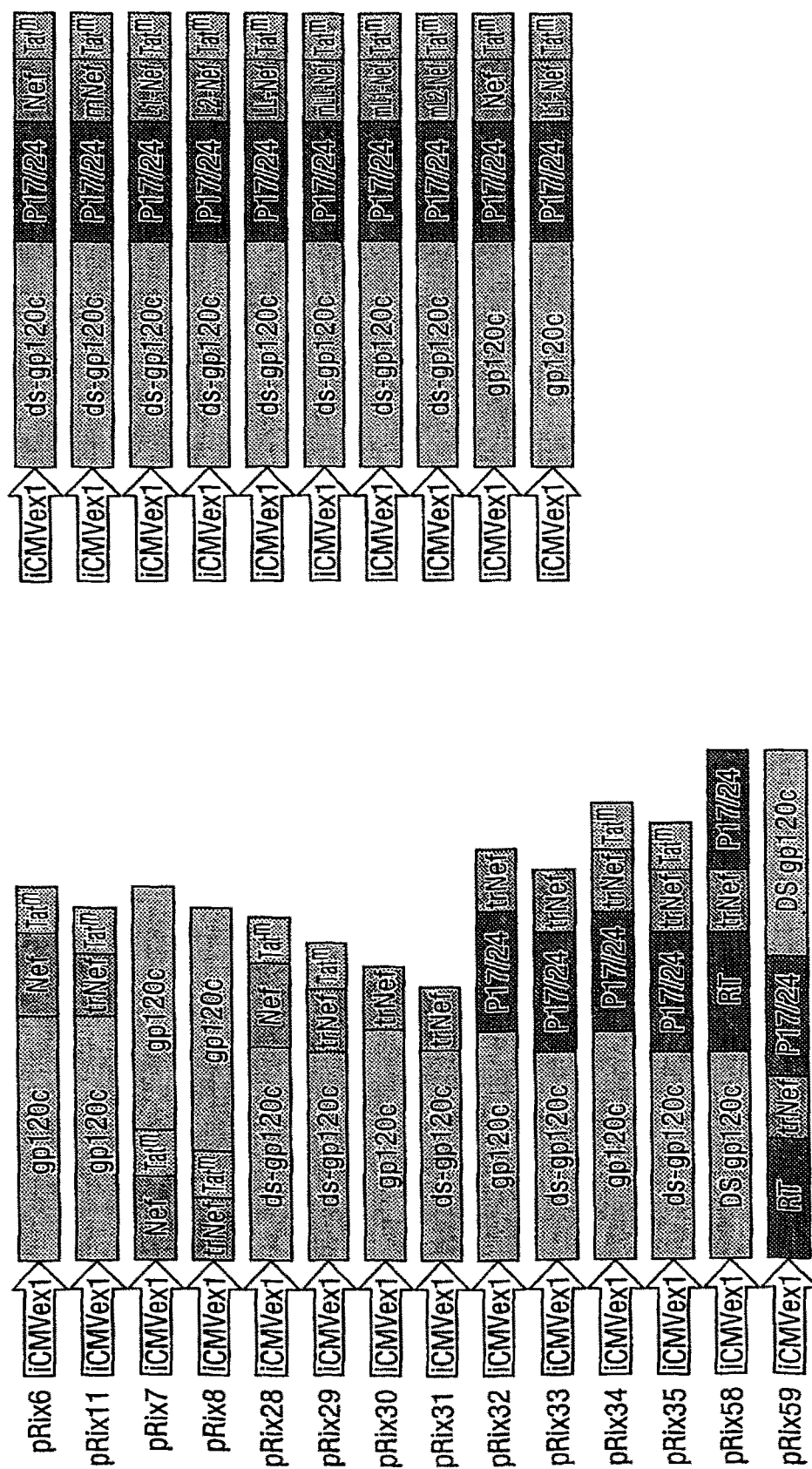
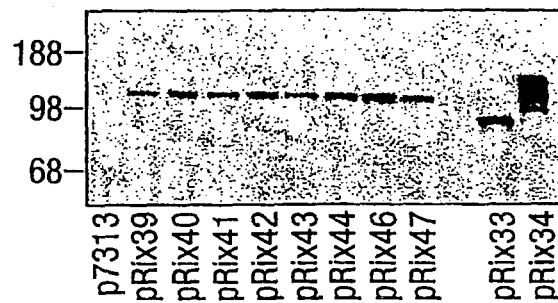
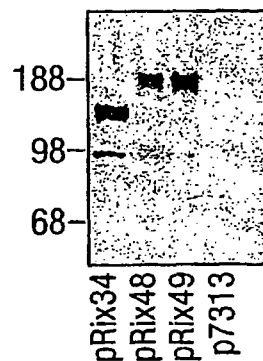


Fig.35.

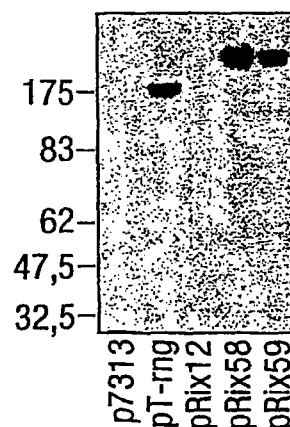
Datos de expresión (anti-Nef) de fusiones dsGP120/Gag/Nef/Tat con mutaciones en Nef (pRix40-47)



Datos de expresión (anti-Nef) de fusiones dsGP120/Gag/Nef/Tat con gp120 glicosilada (pRix48 y pRix49)



Datos de expresión (anti-Nef) de las proteínas de fusión cuadrivalente que contienen RT, Nef, Gag y dsGP120, comparado con la expresión de la fusión solo de RT, Nef, Gag



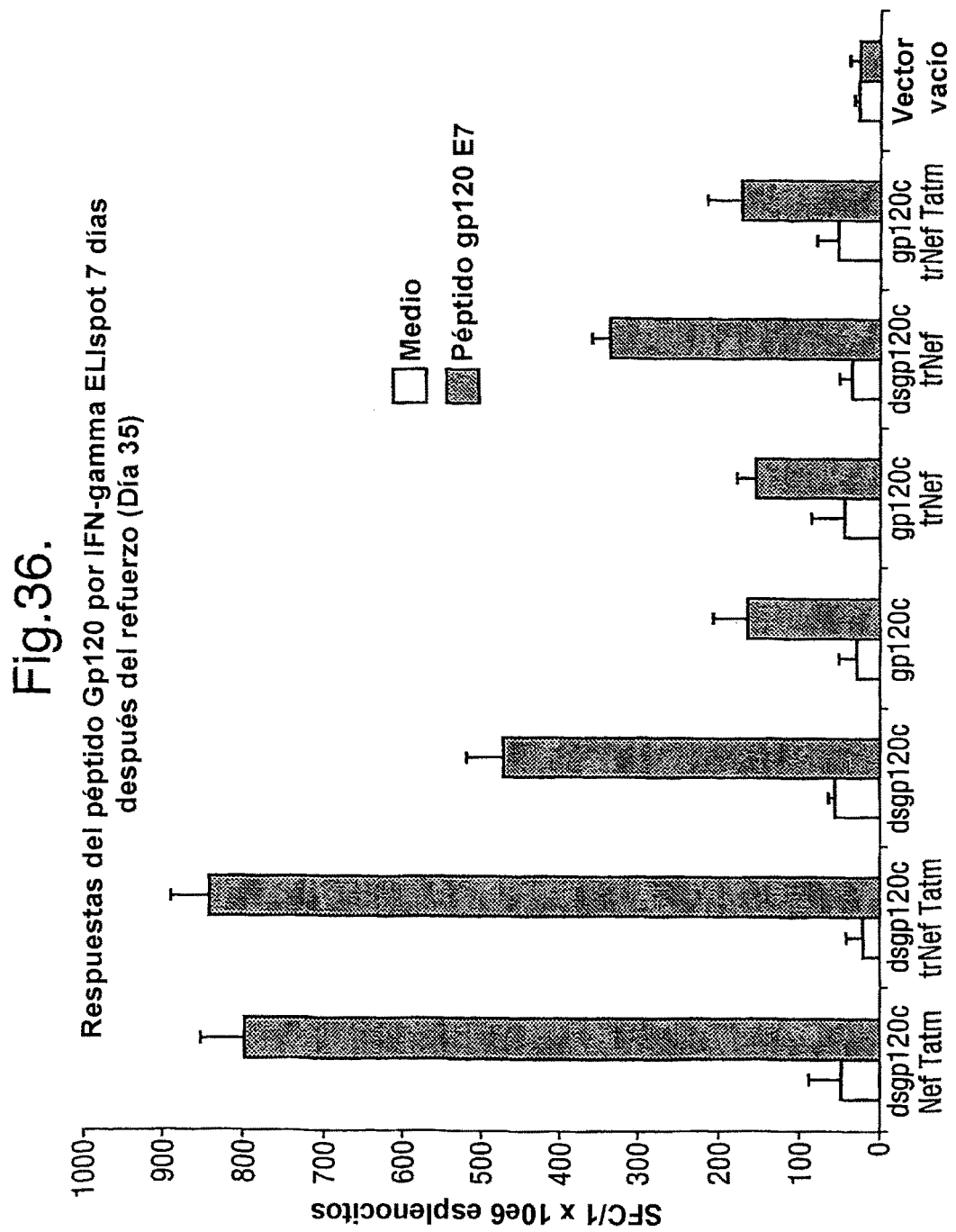


Fig.37.
 Respuestas del péptido Gp120 por IFN-gamma ELIsport 7 días
 después del refuerzo (Día 35)

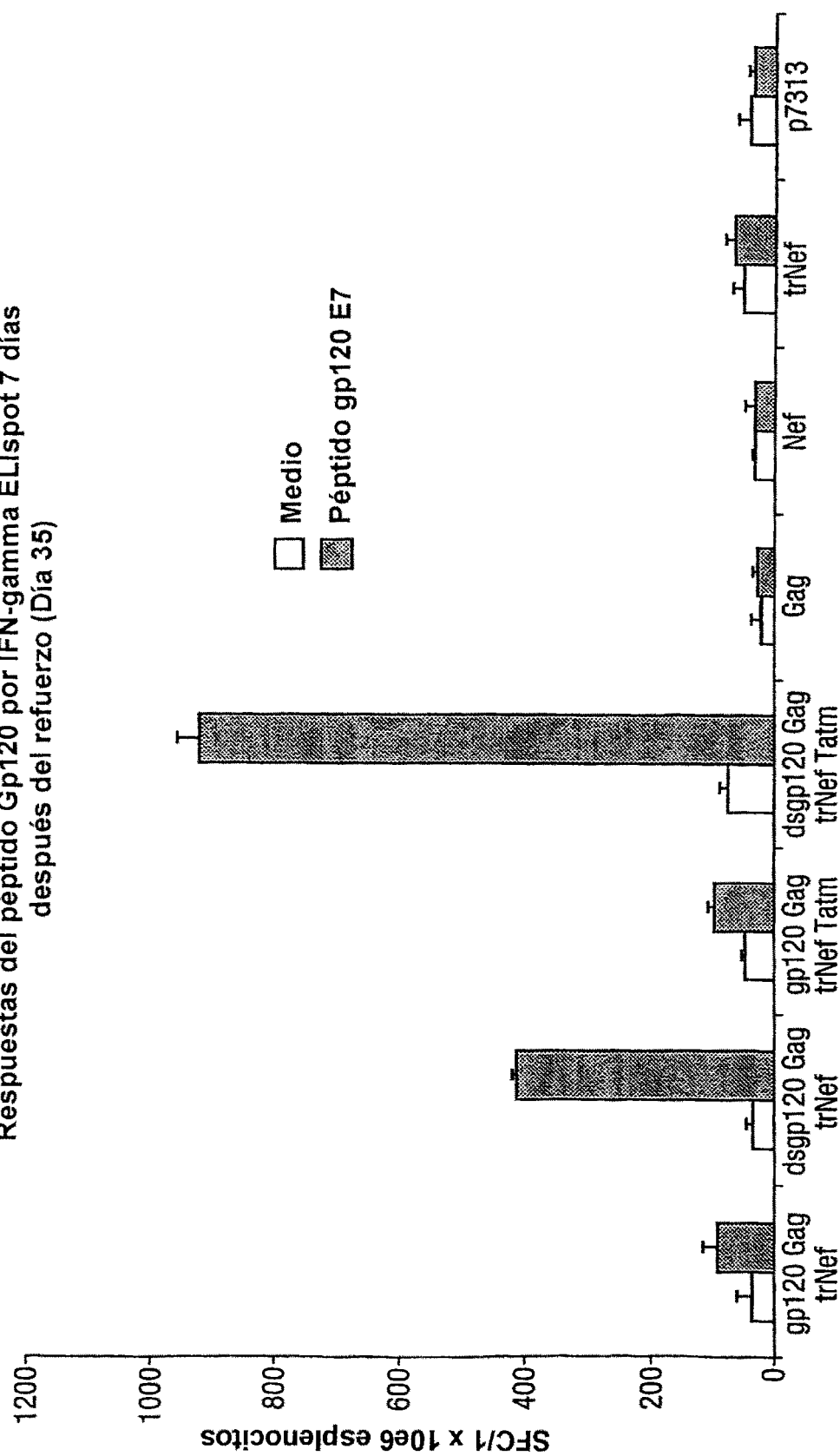


Fig.38.

Respuestas a la reestimulación in vitro con péptidos Gp120, Gag y RT 7 días después del refuerzo (Día 35) usando IFN-gamma ELISPOT

