



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 309 578**

51 Int. Cl.:
C12N 5/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04798154 .3**

96 Fecha de presentación : **03.11.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1685243**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.08.2006**

54 Título: **Líneas celulares aviares inmortalizadas para la producción viral.**

30 Prioridad: **03.11.2003 EP 03025158**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.12.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.12.2008

73 Titular/es: **ProBioGen AG.**
Goethestrasse 54
13086 Berlin, DE

72 Inventor/es: **Sandig, Volker y**
Jordan, Ingo

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 309 578 T3

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

DESCRIPCIÓN

Líneas celulares aviarias inmortalizadas para la producción viral.

5 La presente invención se refiere a líneas celulares aviarias inmortalizadas adecuadas para la producción de biológicos o virus para vacunación. En particular, las líneas celulares son derivadas de células primarias las cuales son transformadas con al menos dos genes virales o celulares, uno de ellos causa progresión del ciclo celular mientras el otro interfiere con los mecanismos de protección innata de la célula inducido por la replicación no regulada de la replicación. La invención se refiere además a la producción de dichas líneas celulares inmortalizadas y su empleo para la producción de biológicos o virus para vacunación.

Antecedentes

15 Los huevos embrionados de pollo todavía son uno de los principales sustratos para la producción de vacunas humanas. Ellos son capaces de sostener la replicación de una amplia variedad de virus humanos y animales. Este espectro incluye virus atenuados, esto es virus defectuosos que tienen el potencial afectado para replicarse en humano o células mamíferas y pueden así ser empleados como vacunas. La atenuación puede ser generada o mantenida por pasajes continuos en huevos embrionados. Los huevos de pollo empleados para la producción de vacunas humanas deben estar certificados de ser libres de un conjunto definido de contaminación viral y bacteriana (libre de patógeno específico o SPF). Los huevos SPF están disponibles por los suministradores comerciales. La extensa aplicabilidad y el largo camino internacional sin precedentes ha conservado esta estrategia vigente a pesar de las desventajas:

25 Colonias de pollos y huevos embrionados SPF son caras y pueden constituir hasta el 40% del costo de las vacunas. Además, es difícil el mantenimiento continuo de colonias SPF completamente libres de patógenos lo cual es evidenciado por brotes periódicos de enfermedad en las colonias SPF. El lote de vacuna no puede ser liberado hasta que el suministrador verifique que los pollos parentales de los huevos embrionados empleados para la producción del lote de vacuna estaban completamente libres de cualquier enfermedad. Esta incertidumbre añade un costo significativo a la preparación de estas vacunas. En situaciones pandémicas con necesidad repentina por una vacuna en particular (por ejemplo, influenza) el suministro de huevos SPF puede ser severamente limitado. Además, los procesos a gran escala para infectar huevos y mantener el crecimiento viral son consumidores de tiempo y a veces incompatibles entre los diferentes lotes de vacunas.

35 Con el desarrollo de las técnicas de cultivo celular los productores de vacuna han sustituido los huevos embrionados por los fibroblastos embrionarios aislados de pollo. Si bien el empleo de cultivos celulares primarios potencia el perfil de seguridad, eficiencia y fiabilidad del proceso de producción, también incrementa más los costos: fibroblastos de pollo son preparados a partir de huevos SPF por embriones afectados para establecer y amplificar células viables. Típico de células animales primarias los fibroblastos sufren senescencia: el tiempo de duplicación incrementa con el pasaje y eventualmente todas las células mueren. Este proceso ocurre después de aproximadamente 20 pasajes, mucho antes que para roedores o algunos sustratos celulares humanos actualmente empleados en la producción de vacuna (como el MRC-5 o WI-38). Los cultivos de fibroblastos tienen que ser mantenidos en presencia de suero fetal bovino 5-10%, añadiendo factores de riesgos adicionales al proceso de producción. Ellos también requieren una superficie sólida para la propagación y no crecen en suspensión, un estado preferido para las aplicaciones de biorreactores. Incluso con el empleo de fábricas de células multicapas se limita sustancialmente los procedimientos a gran escala. Debido al lapso de vida limitada un conjunto completo de pruebas de seguridad han de ser aplicadas para cada lote de fibroblastos de pollo.

45 Los fibroblastos son el único tipo de célula de la amplia variedad de tejidos diferentes a partir de embriones de pollo que proliferan bien. El predominio de fibroblastos comparado con otros tipos de células tiene en algunos casos un rendimiento teórico viral reducido porque en los huevos típicamente la membrana corioalantoica, una capa celular epitelial, es el principal sitio para la amplificación viral.

50 Los problemas discutidos han contribuido a una severa escasez de la vacuna de influenza en los últimos dos años (2003 y 2004). Para superar estas limitaciones, una línea celular de crecimiento permanente en un medio sintéticamente definido, preferiblemente en suspensión o al menos en portadores, sería muy deseada.

55 Algunos de los virus que crecen típicamente en fibroblastos de pollos han sido adaptados para ciertas líneas celulares. Las células BHK-21 (riñón de hámster cría) sostienen el crecimiento de varias vacunas, influenza, y cepas vacunales de rabia (Drexler, I. y otros, *J. Gen. Virol.* 79(Pt2):347-52 (1998); Gumusderelioglu M. y otros, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 33:167-72 (2001); Merten, O. W. y otros, *Adv. Exp. Med. Biol.* 397:141-51 (1996)) y fácilmente crecen en grandes fermentadores sobre portadores bajo condiciones libres de suero (Pay, T.W. y otros, *Dev. Biol. Stand.* 60:171-4 (1985); Gallegos Gallegos, R. M. y otros, *Arch. Med. Res.* 26:59-63 (1995)). Para la vacuna se aplica incluso la cepa altamente atenuada Ankara (MVA) la cual es desarrollada en células de pollo. La línea celular BHK-21 es aceptada para la producción de ciertas vacunas para animales de cría (Lubinieccki, A.S., *Bioprocess Technol.* 10:495-513 (1990)). Sin embargo, la línea BHK-21 no reúne los requisitos de seguridad para las vacunas vivas humanas. Las células BHK espontáneamente formadas, son altamente tumorigénicas y su historia esta inadecuadamente informada. De acuerdo con la FDA, el Debate CBER del 12 de Mayo, 2000 sobre sustratos celulares el desarrollo de "Vacunas virales y vacunas de vectores virales vivos-atenuados mínimamente purificados" en células neoplásicas derivadas de tumores naturalmente encontrados de humanos y otras células de mamíferos o a partir de células humanas y células mamíferas que han sido transformadas por mecanismos desconocidos es desalentador.

ES 2 309 578 T3

Como una excepción de la regla la línea celular VERO (originaria de mono verde africano) es aceptada como sustrato celular para la producción de vacunas basadas en un perfil de probada seguridad y la carencia de un fenotipo transformado para un número definido de pasajes. La línea celular ha sido empleada extensivamente para la producción de las vacunas de la polio y viruela para empleo clínico. Sin embargo, las células VERO requieren acoplamiento y son dóciles solamente para procesos con base/basados en portadores.

Adicionalmente las células MDCK (una línea celular espontánea de epitelio renal de perro) con una historia descrita han sido aplicadas para la producción del virus influenza (Tree, J.A. y otros, Vaccine 19:3444-50 (2001)).

Más recientemente, desencadenado por el desarrollo de enfoques de vacunas y terapia génica basadas en el vector, líneas celulares de origen humano de diseño y denominación nueva son intensamente discutidas e incluidas dentro del espectro de sustratos celulares potenciales para la producción de vacuna (comité de expertos en Vacunas y Productos Biológicos Asociados, sesión de Mayo 16, 2001). Nuevas líneas celulares permanentes fueron creadas para proporcionar genes que complementen a virus recombinantes que son deficientes en la replicación fuera del sistema de producción. Sin embargo, la introducción estable de los genes complementarios requiere de tiempos de incubación prolongados, los que exceden el límite natural del número de pasajes disponibles para células primarias o el límite tolerado del número de pasajes para células VERO antes de que ocurra la transformación completa.

Los diseños de líneas celulares son generados *in vitro* con extensiva documentación empleando genes caracterizados para la transformación. Por ejemplo, los genes complementarios a partir de la región E1 del adenovirus por ellos mismos exhiben propiedades transformantes y han aceptado el establecimiento de líneas celulares humanas, por ejemplo PER.C6 (Fallaux, F.J. y otros, Hum. Gene Ther. 9:1909-17 (1998)). La aplicación de estas líneas celulares no está limitada al vector viral para el que están diseñadas sino que pueden ser extendidas para otros virus. Por ejemplo, el virus influenza puede ser propagado en PER.C6 (Pau, M.G. y otros, Vaccine 19:2716-21 (2001)). Sin embargo, estos hallazgos no se aplican a todos los virus relevantes para el desarrollo de vacunas, en particular virus aviares como enfermedad de Marek, enfermedad bursal infecciosa, enfermedad de Newcastle, virus de herpes de pavo, o anémico de pollo. Si bien algunos de estos virus se replican bien en líneas celulares de mamíferos, el crecimiento del virus es a menudo pobre. Para otros virus, la replicación es pobre y limitada para cepas especialmente adaptadas en particular.

Además, con adaptación para sustratos celulares derivados de primates, los sitios de unión al receptor en el virus tienden al cambio resultando en un patrón de antígeno modificado y de este modo en el efecto general sobre la inmunogenicidad. Esta adaptación genética puede revertir la atenuación para las cepas que han sido desarrolladas vía pasajes en células aviares como MVA o virus de sarampión adaptado a pollo (Escoffier, C., Gerlier, D., J. Virol. 73:5220-4 (1999)), o crear nuevas cepas que se replican más eficientemente en células humanas comparados con sus aislados tipo salvaje. Tales virus también pueden conseguir un potencial patogénico superior.

Por las razones anteriores los fabricantes de vacunas están reacios a cambiar para líneas celulares de mamíferos y ha desarrollado una necesidad de líneas celulares aviares inmortales.

La investigación de la inducción de tumor en aves por el alfaretrovirus aviario proporciona las primeras señales moleculares en la transformación celular en general. Los oncogenes retrovirales son derivados a partir de genes celulares con dominios reguladores esenciales mutados o suprimidos. Algunos de estos factores que han sido identificados en el curso de estos estudios, como v-myc y v-ras, afectan directamente los componentes de ambas vías de la del retinoblastoma (RB) y la p53. Otras proteínas, como v-src o v-erbB, son transductores de señales constitutivamente activados (por lo tanto no regulados) que mimetizan afectando a mitógenos extracelulares. El problema con estos factores es que ellos dirigen exclusivamente una de las diferentes vías requeridas para una transformación eficiente. La presencia de v-src o v-myc predispone las células para la transformación y requiere además, de alteraciones espontáneas e impredecibles dentro de la célula para la completa transformación. Por consiguiente es difícil de estimar los riesgos representados para el paciente por las células transformadas con uno de los oncogenes retrovirales.

En otros casos un único antígeno de tumor fuerte (por ejemplo v-jun) es capaz de causar directamente la formación de tumor (Hartl, M. y otros, Curr. Cancer Drug Targets 3:41-55 (2003)). Muchos oncogenes virales aviares mantienen su potencial oncogénico en células de mamíferos.

Líneas celulares creadas por estos virus no son apropiadas para la fabricación de vacunas. Un retrovirus que porte un oncogén pueda resultar activado y transferido junto con la vacuna. Incluso un antígeno tumoral que no este encerrado por el LTRs viral puede representar un alto riesgo debido a que es capaz de transformar la células de mamíferos sin la ayuda de antígenos complementarios. Este riesgo es típicamente estimado tomando en consideración el potencial de transformación, el número de vacunas, y la cantidad de ácido nucleico celular transferido con el virus vacunal. Esta cantidad es limitada por la eficiencia del proceso de purificación y actualmente no puede ser reducido por debajo de 10 pg/dosis. Este criterio es especialmente estricto para la producción de vacuna donde una población sana es a menudo inoculada a una edad muy joven.

Los mismos argumentos se aplican para virus transformantes de ADN como papilomavirus y poliomavirus. Estos virus son equipados con oncogenes agresivos: antígeno T grande SV40 es una proteína multifuncional que afecta ambos controles en G1 del ciclo celular y la actividad p53. Por consiguiente, T grande fácilmente inmortaliza y transforma tejidos de mamíferos múltiples de origen roedor y humano. Con la adición del antígeno T pequeño (potenciando más la acción de T grande y además modulando la vía AKT3) fue posible inmortalizar las células aviares

(parte de la patente de aplicación US 2001-0016348). Sin embargo, incluso con sofisticados y modernos métodos de purificación el antígeno T grande SV40 es considerado demasiado agresivo para ser empleado en líneas celulares generadas para la aplicación en medicina humana. A diferencia de lo anterior, los genes propuestos en esta invención afectan el control de los factores separados regulación del ciclo celular y vía de inactivación de p53: un evento de transferencia simultánea requerido por los dos factores diferentes para que la transformación reduzca dramáticamente cualquier riesgo teórico para la vacuna.

La solicitud de patente US 2001-0016348 describe el empleo de una vía anti-apoptótica completamente sin relación con la presente invención. Esta no proporciona un segundo gen que cuente con una señal interna para apoptosis debido a la progresión forzada del ciclo celular causada por el primer gen. La apoptosis también puede ser inducida por una variedad de estímulos externos, por ejemplo la carencia de factores de crecimiento o la pérdida de anclaje. La transmisión de este tipo de señal pro-apoptótica puede ser inhibida por la familia de genes bcl-2, el foco de la patente de aplicación estadounidense 2001-0016348.

Mientras que el 90% de los carcinomas uterinos portan secuencias de papilomavirus, el adenovirus tipo C (que incluye los tipos 2 y 5) son considerados que no inducen tumores *in vivo*, y secuencias adenovirales no han sido detectadas en tejido tumoral humano.

Alternativamente, ha sido probado el desarrollo de líneas celulares por pasajes continuos de fibroblastos embrionarios de pollos. Mientras que células de roedores parecen sufrir inmortalización totalmente espontánea con gran facilidad (Curatolo y otros, *In vitro* 20:597-601 (1984)), células aviares y de primates son altamente resistentes a este enfoque (Harvey, y otros, *Genes and Development* 5:2375-2385 (1991); Pereira-Smith, J. *Cell Physiol.* 144:546-9 (1990); Smith y otros, *Science* 273:63-67 (1996)). Células somáticas de origen aviario o de primates carecen de telomerasa y la senescencia es causada por el acortamiento del terminal cromosomal (telómeros). No obstante, la línea de fibroblastos de pollo UMNSAH-DF1 ha sido desarrollada empleando este enfoque (patentes EEUU 5,672,485 y 6,207,415). La inmortalización por este enfoque es causada por mutaciones espontáneas en oncogenes múltiples o genes supresores de tumores. Este es un evento raro que es difícil de reproducir principalmente en células de otro origen de tejido. Lo más importante, tal enfoque contradice el enfoque de Riesgo Definido como regla general para vacunas vivas humanas proponiendo conocimientos detallados acerca de los genes inmortalizantes para evaluar el riesgo de transferencia oncogénica. En contra, del acuerdo con el FDA (Discusión CBER del día 12 de Mayo, 2000, sobre sustratos celulares) el empleo de células neoplásicas derivadas de tumores que ocurren naturalmente o células que han sido transformadas por mecanismos desconocidos es desalentador para el desarrollo de vacunas virales vivas atenuadas mínimamente purificadas y vacunas de vectores virales.

La línea fibroblástica de pollo UMNSAH-DF1 espontáneamente desarrollada exhibe alteraciones en E2F y la actividad p53 (Kim y otros, *Oncogene* 20:2671-82 (2001)). Esto no es sorprendente debido a que la actividad potenciada del ciclo celular requiere de E2F activo, y debido a esto es conocido a partir de estudios con células de mamíferos que la elevada actividad de E2F induce apoptosis en presencia de p53 activo. El estudio caracteriza la etapa inmortal sin emisión de luz en los acontecimientos causantes: mutaciones en un gran número de genes pueden haber causado inmortalización.

El proceso de transformación espontánea puede ser potenciado por el empleo de mutágenos químicos (Patente EEUU 5,989,805). Las líneas celulares particulares generadas empleando este enfoque han superado la senescencia pero mantuvieron una apariencia similar a fibroblastos y son no-tumorogénicas. Aunque este representa un rasgo de seguridad significativo, estas células son de bajo valor para las técnicas de la fermentación en gran escala. Además, este enfoque basado en el azar también contradice la directriz de Riesgo Definido.

Las líneas celulares aviares se originan a partir de tumores encontrados naturalmente como fibrosarcoma de codorniz (WO 97/08307) han sido también propuestos para la bioproducción. Otra vez, las directrices de Riesgo Definido para el empleo en la producción de vacunas humanas son violadas por un método que se basa en acontecimientos al casuales.

Los enfoques tomados en los estudios anteriormente descritos están en contraste notable con la introducción activa de grupos específicos de genes inmortalizados de acuerdo con esta invención, que define los agentes causantes para la inmortalización y permite evaluar riesgo, proporcionando alta flexibilidad con respecto a la selección de varios tejidos, y permite modular ciertos rasgos de la línea celular resultante.

A pesar del hecho que los huevos y fibroblastos de pollos tienen un registro de pista considerable estos también están asociados con un factor de riesgo muy específico que solo recientemente ha aparecido en gran foco: las células de pollo liberan al menos dos tipos de partículas retrovirales, el retrovirus aviario endógeno (EAV) y el virus endógeno de leucosis aviaria (ALV-E). El resultado es similar para la presencia de partículas de retrovirus endógenas en células de ratón que son empleadas para la producción de proteínas recombinantes (como NSO). Sin embargo, a diferencia de las células de ratón, ha sido demostrado que las células de pollo contienen transcriptasa inversa. Debido a las técnicas de detección más eficientes la actividad de la RT ha sido también detectada en vacunas de sarampión derivada de células de pollo, paperas y fiebre amarilla (Hussain A.I., y otros, *J. Virol.*, 77:1105-11 (2003); Shahabuddin, M. y otros, *J. Clin. Microbiol.* 39:675-84 (2001)). Si la presencia de la actividad de la transcriptasa inversa resulta en retrovirus transmisibles se mantiene la controversia: un análisis más detallado ha mostrado que CEF (del Leghorn Blanco) contiene cinco locis con EAV integrados, dos de los cuales pueden expresar ALV-E infeccioso mientras que los otros

ES 2 309 578 T3

tres están defectuosos (Johnson, J.A., Heneine, W., J. Virol. 75:3605-12 (2001)). Tsang, S.X. y otros, J. Virol. 73:5843-51 (1999) también encontró actividad RT y liberación de partículas virales pero no observó ninguna transmisión después del examen cuidadoso para secuencias EAV en células mononucleares sanguíneas de niños que recibieron la vacuna de paperas. De acuerdo con Registro Semanal Epidemiológico de la OMS (73) 28 (1998), laboratorios independientes han investigado la infectividad de las partículas para una variedad de células humanas y de otros mamíferos por co-cultivo extensivo y no pudieron detectar transmisión de actividad RT o infección productiva. Este hallazgo es apoyado por estudios epidemiológicos que han revelado la no asociación entre el empleo de vacunas derivadas de células de pollo y la incidencia de cánceres, incluyendo aquellos de la infancia.

Además, en el mencionado Registro Semanal Epidemiológico, la OMS enfatiza la importancia de las células hospederas de pollo para mantener la atenuación de ciertas cepas vacunales. Los procesos de producción alternativa no están actualmente disponibles, y esta carencia de alternativas es una importante razón para la aceptación de una fuente conocida y continua para un contaminante viral.

Sin embargo, estudios epidemiológicos superponen poblaciones y no investigan los acontecimientos casuales o estudios de casos. Estudios epidemiológicos no pueden refutar los riesgos teóricos, por ejemplo: la aceptada actividad RT endógena puede ocultar la actividad RT a partir de una contaminación exógena inaceptable, y el virus endógeno puede ser movilizado y activado si construcciones empaquetadas son introducidas en las células (Ronfort, C. y otros, Virology 207:271-5 (1995)).

Fue demostrado, sin embargo, que células de patos y gansos no contienen secuencias asociadas a EAV y ALV y que el codorniz japonés esta libre de transcriptasa inversa (Smith, L. M. y otros, J. Gen. Virol. 80(pt1):261-8 (1999); Brudno, I.A. y otros, Vopr. Virusol. 97-100 (1980)).

Los adenovirus (AdV) son virus desnudos (sin-envoltura) ubicuos, bien caracterizados. Para los serotipos más comunes Ad2 y Ad5 la seroprevalencia en la población humana se aproxima al 90%. Las versiones incompetentes para la replicación de estos virus son empleadas como terapia génica y vectores de vacunas en ensayos con pacientes humanos. Genes a partir de la región E1 del Adenovirus 5 humano han sido empleados para transformar algunas células específicas humanas *in vitro* (líneas celulares 293 y PER.C6; Fallaux, F.J. y otros, Hum. Gene Ther. 9:1909-17 (1998); Graham, F.L. y otros, J. Gen. Virol. 36:59-74 (1977)). El proceso general es ineficiente comparado con los fuertes oncogenes multifuncionales como el antígeno T grande SV40. Basado en la observación de que 293 muestra marcadores específicos neuronales y PER.C6 son de origen neuroectodermal fue sugerido que la transformación de Ad5 basada en E1 es limitada por las células neuronales (Shaw y otros, Faseb J 16(8): 869-71(2002)). Considerando la importante barrera de especies entre células humanas y aviares la inmortalización eficiente de múltiples tejidos aviares por transfección es incluso más inesperada.

Líneas celulares de mamíferos E1 transformadas han sido empleadas en ensayos clínicos para la producción de vectores de adenovirus vivos purificados. Con el monitoreo cuidadoso de la cantidad de ADN celular contaminante en la preparación de una vacuna y su tamaño, los genes transformados de Ad5 no son considerados un obstáculo seguro (comité de expertos en Vacunas y Productos Biológicos Asociados, sesión de Mayo 16, 2001).

El adenovirus se replica en los núcleos de la célula infectada. Debido a que células hospederas inactivas no son permisivas para un ciclo de vida viral completo los adenovirus han desarrollado un mecanismo para forzar las células en la fase-S. Para maximizar la extensión del tamaño de la progenie viral ellos han desarrollado un mecanismo para evadir la apoptosis como una respuesta de la célula hospedera a la penetración de la capsida y a la replicación viral. La región genómica que media tanto en la progresión del ciclo celular y la inhibición de apoptosis es la región E1.

La región E1 realmente se compone de dos casetes de expresión definidos, E1A y E1B, dispuestos en tándem y cada uno equipado con su propio promotor y sitio de poliadenilación. Al menos tres proteínas son traducidas a partir de la transcriptor principal E1A por acoplamiento alternativo. Entre otros, las proteínas E1A han sido encontradas para afectar los complejos RB/E2F y para interferir con los co-activadores transcripcionales p300 y CBP. El escape de E2Fs del represor RB induce progresión del ciclo celular de G1 a fase S, mientras el complejo E1A/p300 induce apoptosis a través de varias vías (Putzer, B.M. y otros, Cell Death Differ. 7:177-88 (2000)), incluyendo represión de la transcripción de Mdm2, un regulador negativo del sensor fundamental de apoptosis, p53.

Ya que E1A sensibiliza las células para la apoptosis inducida por TNF es considerado un agente antitumor, y es empleado en enfoques experimentales para tratamiento de tumor (Lee, W.P. y otros, Cancer Res. 63:6229-36 (2003)).

Además, actuando como un modulador de la transcripción este conduce las células hacia la de-diferenciación, un rasgo ventajoso para un potencial sustrato celular.

Fue mostrado por Guilhot y otros (Guilhot C. y otros, Oncogene 8:619-24 (1993)) que la transducción retroviral de la proteína 12S de E1A a partir de Ad5 puede llevar a la inmortalización de las células de codorniz. Esto es probable como consecuencia de la interacción entre el RB aviar y E1A. Sin embargo, el proceso falla cuando el gen es introducido por transfección del ADN desnudo en vez de por infección retroviral (observación personal). Nosotros proponemos que la transducción extremadamente eficiente y estable vía infección retroviral crea una gran combinación celular suficiente para esconder células individuales con cambios genómicos espontáneos que tienen bloqueada la apoptosis que normalmente es inducida con la inactivación de RB. Estos cambios requeridos pero desconocidos

aumentan el riesgo para las vacunas y la línea celular resultante no puede ser considerada una línea celular de diseño (el resultado de bloques definidos en vías específicas). Por otra parte, el gen transformante introducido vía retrovirus es flanqueado por repeticiones terminales invertidas y puede, por consiguiente, ser movilizado. Un evento así puede incluso ser más pronunciado en líneas celulares que expresen transcriptasa inversa a partir de retrovirus endógenos.

5

Resumen de la invención

En vista de lo anterior, es aún conveniente desarrollar una línea celular aviaria con propiedades de crecimiento convenientes para la producción a gran escala, empleando una combinación definida de genes inmortalizantes/transformantes. Es además deseable que ninguno de esos genes sea capaz de transformar células de mamíferos independientes de otros genes. Por otra parte, la acción de un único gen debería tener algún efecto no inmortalizante/transformante o resultar en apoptosis de células que expresen el gen respectivo. El riesgo de transferencia unida para el receptor de la vacuna debería además ser minimizado por la posición de los genes respectivos en unidades de expresión separadas. Finalmente, podría ser deseable - ya que la población humana es típicamente expuesta a los genes respectivos - que estos genes no son asociados con la formación de tumor en la población humana. La línea celular a ser generada debería no liberar partículas virales infecciosas a partir de retrovirus endógenos o no exhibir en absoluto actividad de transcriptasa inversa.

Fue encontrado que la transformación de células aviares con dos genes particulares viral y/o celular, uno de los cuales afecta las proteínas del retinoblastoma y la otra la proteína p53, proporcionaron una línea celular muy apropiada para la producción de virus para la vacunación.

La invención de este modo proporciona:

(1) una línea celular aviaria inmortalizada con una combinación de genes viral y/o celular (de aquí en adelante brevemente referida como "gen(es)"), al menos un primer gen afectando la función de la proteína del retinoblastoma por mediación de la ruptura de los complejos entre las proteínas del retinoblastoma y los factores de transcripción E2F y al menos un segundo gen afectando la proteína p53 o miembros de la familia de esta, en el que

el primer gen es un gen viral seleccionado a partir de un gen E1A de adenovirus a partir de mastadenovirus, un gen E7 de papilomavirus, un gen 22 orf de adenovirus aviar y un marco de lectura abierta E43 a partir de atadenovirus ovino o es un gen celular mediando la ruptura de los complejos entre las proteínas del retinoblastoma y los factores de transcripción E2F y siendo seleccionado a partir de las Ciclinas D1, D2 y D3, y un CDK4 mutado insensible a la inactivación por p16INK4a; y el segundo gen es un gen viral que codifica para una proteína que previene la inducción de la detención de crecimiento y apoptosis por p53 seleccionada a partir de la proteína E1B55K de todos los grupos de adenovirus, GAM-1 de CELO y la proteína E6 de papilomavirus, o es mdm2 siendo un gen celular que previene la detención de crecimiento y la apoptosis por p53;

(2) un método para preparar una línea celular como se definió anteriormente en (1), que consta de la transfección no-viral de una célula inicial con el primer y el segundo gen;

(3) el empleo de la línea celular como se definió anteriormente en (1), para la producción de biológicos o virus, preferiblemente para la preparación de vacunas o para terapia génica; y

(4) un método para producir virus y biológicos empleando una línea celular como se definió anteriormente en (1).

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Secciones esquemáticas de la expresión de plásmidos empleados para la inmortalización potenciada de las células primarias de pato (ejemplo 2). Las señales de poliadenilación son omitidas para claridad. Los alfanuméricos a la izquierda son identificadores cortos para los plásmidos. mPGK y hPGK, promotores de la quinasa fosfoglicerada de ratón y humano, respectivamente; Ad5, promotor endógeno E1 de Ad5; moCMV, promotor temprano inmediato de CMV en ratón; tk, promotor de la quinasa timidita del virus de herpes simple; orf 22 y gam1, genes virales CELO; E1A y E1B, genes de la región E1 del adenovirus 5.

55

Figura 2: Fotografías de la microscopía de contraste de fase como ejemplo de la formación focalizada en células embrionales de hígado de pato transfectadas con Ad5-E1 (plásmido 49E). A, magnificación inicial 4x para describir una focalización completa metida en células primarias senescentes. B, magnificación inicial 20x: perímetro de una focalización grande alrededor de pequeñas células dispuestas en una monocapa compacta visible a la derecha del panel, células primarias en avanzada senescencia hacia la izquierda.

60

Figura 3: Ensayo de inmunofluorescencia para proteínas E1A y E1B 55K (ejemplo 3). En las dos filas superiores, las mezclas del plásmido inmortalizado 49E y las células primarias de hígado de pato; en las dos filas inferiores, las células control positivo 293. En la columna izquierda imágenes de contraste de fase; en la columna media, inmunocolocación de las proteínas de E1A y E1B 55K como se indica en las imágenes; en la columna derecha, tinción DAPI. La proteína E1B 55K se localiza de modo característico en el citoplasma y se acumula en agregados para rendir una distribución desigual, irregular. E1A es una proteína nuclear. Note el núcleo compactado que se tiñe brillantemente con DAPI en las células de pato transformadas.

65

ES 2 309 578 T3

Figura 4: Ensayo de Q-PERT (ensayo PERT cuantitativo) en sobrenadante celular para detección de la actividad retroviral (ejemplo 4). Cuadrados en negrita, control positivo de CHO; cuadrados vacíos, control negativo agua; diamantes en negrita, fibroblastos embrionarios de pollo; triángulos en negrita, control negativo de la línea celular 293; círculos grises, control negativo solo con sustrato; triángulos vacíos, células inmortalizadas de hígado de pato con plásmido 49E; Rn delta, emisión del color del reportero sobre el fondo inicial de la fluorescencia.

Figura 5: Amplificación MVA en algunas de las líneas celulares de pato CEFp descritas (ejemplo 5). La infección fue realizada con un MOI de 0.1. La titulación fue realizada en células VERO 48 horas después de la infección (ejemplo 2). CEFp, fibroblastos embrionarios de pollo.

Figura 6: Pasaje seriado de MVA en células inmortalizadas de retina de pato con plásmido 49E (ejemplo 5). Cuadrados en negrita, tamaño de la expansión; barras, entrada viral ajustada a un MOI de 0.1. La entrada del virus es dada como referencia para demostrar que el tamaño de la expansión es independiente de las fluctuaciones experimentales en el número de células (la cual a su vez define la entrada viral a través de MOI).

Lista de Secuencias-Texto Libre

Secuencia ID NO:	Descripción- Texto libre
1	Cebador VS182
2	Cebador VS183
3	Cebador VS184
4	Cebador VS185
5	Cebador VintSA-F
6	Cebador VintSA-R
7	Plásmido pEFAd5E1A
8	Plásmido pEFAd5E1BSA
9	Plásmido 49E
10	Plásmido 25F
11	Cebador V206
12	Cebador V207
13	Cebador V208
14	Cebador V209
15	Cebador RT
16	Cebador ADNc 1
17	Cebador ADNc 2
18	Plásmido 60E
19	Plásmido 36E

Descripción detallada de la invención

“Inmortalizada”, “células inmortalizadas” y “línea celular inmortalizada” de acuerdo con la presente invención se refiere a células o línea celular que ha sido transfectada/transformada por ciertas secuencias de ADN funcionales confirmando el potencial para al menos 200 pasajes, preferiblemente un número ilimitado de pasajes, esto es inmortalidad, para las respectivas células iniciales.

El “casete genético” de la presente invención es entendido como una secuencia de ADN que consta de un gen que afecta la función de la proteína del retinoblastoma, es decir que directa o indirectamente (por ejemplo después de la expresión) media la ruptura de los complejos entre las proteínas del retinoblastoma y los factores de transcripción E2F, y que en adición consta de un gen viral que previene la inducción de la detención de crecimiento y apoptosis por p53 como la proteína E1B 55K de todos los grupos de adenovirus, la proteína E6 de papilomavirus, preferiblemente aquellas de papilomavirus humano de bajo riesgo (HPV) (como HPV1, HPV6 y HPV11, pero no HPV16, HPV18), o un gen celular que previene la detención de crecimiento y apoptosis por p53 como mdm2.

En más detalle, el casete genético anterior consta de un “primer gen” que directa o indirectamente (por ejemplo a través de inductores celulares) media la ruptura de los complejos entre las proteínas del retinoblastoma y los factores de transcripción E2F. Este primer gen puede ser un gen viral como un mastadenovirus E1A, gam1 y orf22 de papilomavirus CELO o E7, preferiblemente de papilomavirus humano de bajo riesgo (como HPV1, HPV6 y HPV11, pero no HPV16, HPV18) o un gen celular como un CDK4 constitutivamente activo o una ciclina tipo D sobre-expresada. La actividad del primer gen media la progresión del ciclo celular normalmente a expensas de la inducción de apoptosis o la detención del crecimiento con el aumento de los pasajes.

El “segundo gen” está presente en el casete genético anterior para contrarrestar el efecto del primer gen. Este previene la apoptosis o la detención del crecimiento y actúa preferiblemente por activación de la inhibición transcripcional por p53 a través del incremento de la degradación de p53 o convirtiendo p53 de un trans-activador a un represor de la transcripción. El “segundo gen” es capaz de prevenir la activación transcripcional por p53, incluyendo la represión de la función de p53 y causando un reducción en la estabilidad de p53. El “segundo gen” puede ser un gen viral como la proteína E1B 55K para todos los grupos de adenovirus, orf22 de CELO, la proteína E6 de papilomavirus, preferiblemente de papilomavirus humano de bajo riesgo (como HPV1, HPV6 y HPV11, pero no HPV16, HPV18) o un gen celular que previene la detención de crecimiento y apoptosis por p53 como mdm2. Preferiblemente el “segundo gen” es orf22 de CELO o adenovirus E1B 55K.

Esto es lo exactamente opuesto para la introducción del p53 tipo salvaje con actividad exógena activo que fue asociado con la generación de una línea de fibroblastos de pollo por un mecanismo desconocido (US 5,879,924).

“Biológicos” en el contexto de la presente invención comprende proteínas terapéuticas y recombinantes, incluyendo anticuerpos, enzimas, hormonas, receptores o sus ligandos y fusiones de ellos. Preferiblemente los biológicos son proteínas recombinantes.

Un aspecto preferido de la realización (1) es el empleo de una línea celular derivada de pollo, pato, ganso, codorniz o los similares embrionario o incubado, preferiblemente de pollo o pato. Un aspecto especialmente preferido de (1), es que adicionalmente esta línea celular está libre de actividad de la transcriptasa inversa, derivada de la inmortalización de células primarias originadas de embriones de pollo, pollo incubado, embriones de pato o patos incubados, es derivada de membrana extraembrionaria y/o es cultivada en un medio químicamente definido. El medio es preferiblemente libre de suero animal.

Otro aspecto preferido de la realización (1) es que las células sujetas a la inmortalización son células primarias incluyendo fibroblastos, células de segmentos corporales aislados (somites) u órganos individuales separados incluyendo tejidos neuronales, de cerebro, retina, riñón, hígado, corazón, músculo y extraembrionarios y membranas protectoras del embrión. Más preferiblemente, las células son de membrana extraembrionaria o retina.

La inmortalización conducida para las células de la realización (1) es preferiblemente efectuada por transfección no viral, incluyendo, pero no limitado para, la transfección mediada por liposomas, dendrímeros o hidroxipatita (“fosfato de calcio”) precipitados y electroporación.

Preferiblemente, el primer gen de la realización (1) es un gen viral que media la ruptura de los complejos entre las proteínas del retinoblastoma y los factores de transcripción E2F. Esto incluye, pero no es limitado a, un gen E1A de adenovirus a partir de mastadenovirus (preferiblemente a partir de mastadenovirus del grupo C), una proteína E7 de papilomavirus, preferiblemente de papilomavirus humano (HPV) de bajo riesgo (como HPV1, HPV6 y HPV11, pero no HPV16, HPV18), un gen orf 22 de adenovirus aviar y/o marco de lectura abierta E43 a partir de atadenovirus ovino. Alternativamente, el primer gen de la realización (1) es un gen celular que media la ruptura de los complejos entre las proteínas del retinoblastoma y los factores de transcripción E2F. Esto incluye, pero no es limitado para, ciclina D1, ciclina D2, ciclina D3 y/o un CDK4 mutado insensible a la inactivación por p16INK4a.

El segundo gen de la realización (1) es preferiblemente un gen viral que codifica para una proteína que previene la inducción de la detención del crecimiento y la apoptosis por p53. Esta incluye, pero no está limitada para, los genes que codifican para la proteína E1B55K de todos los grupos de adenovirus, GAM-1 de CELO, la proteína E6

ES 2 309 578 T3

de papilomavirus, preferiblemente aquellas de HPV de bajo riesgo (como HPV1, HPV6 y HPV11, pero no HPV16, HPV18). Más preferidos son los genes que codifican para la proteína E1B55K de adenovirus y GAM-1 de CELO. Alternativamente, el segundo gen codifica para una proteína que previene la detección del crecimiento y apoptosis por p53 como mdm2.

5

El primer gen y segundo gen de la realización (1) están preferiblemente o separados espacialmente por secuencias heterólogas o localizados en diferentes segmentos del ácido nucleico o plásmidos.

10

En un aspecto especialmente preferido de la realización (1) el primer gen es la región E1A y el segundo gen es la E1B de un adenovirus a partir del género Mastadenovirus, preferiblemente a partir de un adenovirus 5. Más preferiblemente dichas regiones E1A tienen la secuencia de pb 1193 a 2309, preferiblemente 1239 a 2309, de la secuencia ID NO:7 o de la secuencia complementaria para los pb de 4230 a 3113 de la secuencia ID NO:9. Además más preferiblemente dichas regiones E1B tienen la secuencia de pb de 1145 a 3007, preferiblemente de pb 1197 a 2810, de secuencia ID NO:8 o la secuencia complementaria para los pb 2345 a 550 de secuencia ID NO:9.

15

En un aspecto adicional especialmente preferido de la realización (1) el primer gen es orf22 y el segundo gen es GAM-1 a partir de un adenovirus, preferiblemente a partir del género aviadenovirus CELO, el que preferiblemente tiene la secuencia representada por la secuencia complementaria para pb de 1252 a 635 de secuencia ID NO:10, y la secuencia complementaria para los pb de 3138 a 2290 de secuencia ID NO:10.

20

En aún un aspecto adicional especialmente preferido de la realización (1) y (2) los plásmidos 36E (secuencia ID NO:19), 37E (figura 1), 49E (secuencia ID NO:9), 25F (secuencia ID NO:10) o 60E (secuencia ID NO:18) son empleados para la inmortalización de las células.

25

Además, combinaciones de ácidos nucleicos que codifican E1A y/o E1B con GAM-1 y/o Orf22 como se definió anteriormente son aspectos preferidos de la realización (1).

30

La línea celular de acuerdo con la realización (1) puede adicionalmente portar secuencias funcionales no-naturales incluyendo, pero no limitados a, transgenes como virus deficientes de genes complementarios (por ejemplo EBNA1, etc.), promotores (por ejemplo PGK-, EF1.alfa-, promotor-CMV, promotores-E1 de Ad5, promotor-tk etc.), potenciadores (por ejemplo RSV-LTR), marcadores de selección como resistencia a neomicina, resistencia a puomicina, etc. En un aspecto preferido el primer y segundo gen están bajo el control de promotores separados seleccionados independientemente a partir de promotores PGK, CMV, E1 y tk.

35

La línea celular de acuerdo con la realización (1) es un aspecto además preferido apropiado para la producción de biológicos o virus incluyendo las cepas vacunales (enfermedad de Marek, enfermedad bursal infecciosa, enfermedad de Newcastle, herpes turco, anemia de pollo, influenza, vacuna (MVA), rubéola, virus de la rabia, etc.) y vectores virales recombinantes (por ejemplo MVA o alfavirus recombinantes). Los virus más preferidos para la vacunación son los virus MVA y de influenza. El vector viral recombinante más preferido es el MVA.

40

En un aspecto de la realización (1) la línea celular es la línea celular 12A07-A10 (DSM ACC2695) derivada de la inmortalización de células de membrana extraembrionaria de pato con plásmido 49E (ejemplo 2).

45

Además preferida es la generación de líneas celulares de acuerdo con la realización (1) bajo condiciones cGMP que las hacen apropiadas para la aplicación farmacéutica.

50

El método de la realización (2) preferiblemente comprende la transfección no-viral de células iniciales como las listadas anteriormente. Lo más preferido es la transfección liposomal, especialmente la transfección por el reactivo Effectene.

55

El empleo preferido de acuerdo con la realización (3) es el empleo para la preparación de una vacuna o para terapia génica. Una cepa vacunal viral o un vector de terapia génica es mantenido en contacto con las células de la línea celular de acuerdo con la realización (1) de manera que la infección ocurra y el virus sea amplificado por dichas células. Pasajes continuos de virus (ciclos repetidos de infección y recolección de virus en dichas células) conducirán a la atenuación o adaptación del virus a esta línea celular hospedera en particular. Así, el vector o cepa vacunal viral con menos virulencia para la vacunación deseada (que no sea pato, preferiblemente no aviar) es generado. Los virus atenuados permiten al sistema inmune de los vacunados lanzar una respuesta que es más protectora que la vacunación con partículas completamente inactivadas, y que es menos severa que la infección con el patógeno (natural) tipo salvaje. Los virus preferidos para esta realización son virus sarampión y rabia.

60

El método para producir los virus de acuerdo a la realización (4) preferiblemente comprenden el contacto de dichos virus con una línea celular de acuerdo con la realización (1) y/o el cultivo de dichos virus en dicha línea celular. Especialmente este método puede ser empleado para producir el virus de la viruela, preferiblemente la cepa MVA, en una línea celular de pato, preferiblemente una línea celular originaria de tejidos de somites de pato o neuronal de pato, incluso más preferida a partir de retina de pato. Especialmente, células derivadas de retina y somites de pato obtenidas por transfección de la región E1-Ad5 bajo condiciones de cGMP que establemente apoyan la amplificación de MVA con una eficiencia comparable con o mejor que fibroblastos primarios embrionarios de pollo (ejemplo 5).

65

ES 2 309 578 T3

El método para la producción de biológicos, especialmente proteínas recombinantes, de acuerdo con la realización (4) comprende la introducción de un gen que codifica para una proteína recombinante, factiblemente unida a un promotor dentro de la línea celular de acuerdo con la realización (1), cultivando dicha línea celular modificada y recolectando la proteína recombinante.

El método de la realización (4) es preferiblemente empleado para la producción de virus y biológicos utilizables para la vacunación o la terapia génica.

Históricamente los huevos de pollo y sus respectivas células (fibroblastos de pollo) son los sustratos dominantes para la producción de vacunas. Para propósitos farmacéuticos los pollos están disponibles a partir de ambientes patógeno-controlado con un extenso sistema de monitoreo. Un amplio cuerpo bibliográfico sugiere a los huevos de pollo como el primer blanco para el desarrollo de una línea celular. Por consiguiente, las células de pollo son una fuente preferida para las células iniciales de la invención. Sin embargo, las células y líneas celulares derivadas de pollo serán más probables a RT positiva. La información bibliográfica sugiere un bajo riesgo para la liberación de virus infeccioso. Sin embargo, la ausencia de virus transmisible tendrás que ser monitoreada para cualquier línea celular siendo empleada en la producción. Verdaderamente, muchas de las líneas celulares aviares establecidas hasta aquí son originarias de pollo (US 5,830,723, US 5,879,924). Aunque fue posible generar un linaje de pollo (línea 0) libre de virus de leucosis aviaria, los retrovirus endógenos aviarios (EAV-HP) (Boyce-Jacino y otros, *J. Virol.* 66(8):4919-29 (1992)) están presentes en células de pollo incluyendo la línea 0. EAVs proporcionan una transcriptasa inversa activa, pero los niveles de expresión varían sustancialmente. Por consiguiente, incluso las células y líneas celulares primarias de pollo como DF1 que probó ser negativa a RT en ensayos menos sensibles (Crittenden y otros, *Virology* 57(1):128-38 (1974)) presumiblemente será positiva a la prueba en el enfoque del moderno PCR a tiempo real y puede esconder retrovirus que son activados bajo ciertas condiciones de crecimiento.

Alternativamente especies aviares preferidas de esta invención para el desarrollo de líneas celulares son aquellas que no contienen retrovirus endógenos o expresan transcriptasa inversa (RT). Esto incluye los patos, que son apropiados por dos razones adicionales: los huevos de pato están también disponibles a partir de reservas monitoreadas libres de patógeno y los patos son, en contraste con los gansos, menos probables a desarrollar tumores espontáneos. Si bien es conocido que muchas de las cepas vacunales relevantes se replican bien en células (embrionarias) de pato como lo hacen en células (embrionarias) de pollo (por ejemplo el virus de la enfermedad de Marek (Witter, R.L., *Avian Dis.* 46:925-37 (2002)) o rubéola (Rocchi, G., Salvadori, A., *Nuovi Ann. Ig Microbiol.* 21:336-40 (1970))), esto sigue siendo mostrado para cepas virales de interés principal. Para otras vacunas tal información no está disponible.

Para nuestro conocimiento es un hallazgo novedoso e inesperado de esta invención que la cepa MVA del virus de la viruela altamente atenuada (vacuna Ankara modificada) se replique en líneas celulares de pato con igual o superior eficiencia que en los comúnmente empleados fibroblastos primarios embrionarios de pollo. Una intención de los inventores fue proporcionar una alternativa segura y robusta a las células primarias para la amplificación de virus que requiere de un hospedero aviar, o cepas vacunales donde un hospedero no mamífero es preferido. Un importante virus para el cual las células hospederas convenientes no están disponibles es el MVA (Virus vacunal modificado Ankara). El MVA es un virus de viruela altamente atenuado y una herramienta extremadamente promisoría para las aplicaciones de vacunas terapéuticas y protectoras. El MVA servirá como virus modelo para la caracterización de células de pato pero no debería tomarse como un ejemplo exclusivo: los experimentos descritos pueden ser también realizados con una variedad de otros virus, ya sean vectores patógenos o terapéuticos como sarampión, rubéola, rabia o virus influenza.

Los fibroblastos han sido seleccionados como tipo celular preferido principalmente por razones históricas y prácticas. Los fibroblastos son las células primarias de más rápido crecimiento a partir de mamíferos así como especies aviares. Cuando una suspensión celular de embriones enteros de pollo es mantenida en cultivo, este no es el único pero sí el tipo celular predominante. Sin embargo, los fibroblastos crecen fuertemente adheridos y pierden este rasgo únicamente después de su transformación (tumorigénica) completa. Este proceso requiere de la presencia de genes transformados fuertes tales como v-ras interfiriendo con las vías de la señal de transducción. La temprana senescencia de los cultivos de fibroblastos es en parte causada por la ausencia total de la actividad telomerasa en aves y hombre (Forsyth, N. R. y otros, *Differentiation* 69 (4-5):188-97 (2002)).

Los fibroblastos primarios humanos son refractarios a la transformación con los genes E1 adenovirus tipo 5 los cuales directamente no hacen interferencia con esas vías (observación personal). La inmortalización eficiente y el crecimiento en suspensión del cultivo tiene una posibilidad superior para surtir efecto en las células epiteliales y neuronales. Además, el epitelio en vez de fibroblastos parece ser el sitio principal para la replicación de virus dentro del huevo de ave. Curiosamente, a diferencia de la situación humana, el riñón de ave no expresa telomerasa a lo largo de la vida lo cual hace de las células de riñón de ave un blanco bueno para la inmortalización. Considerando, que las células epiteliales de aves incluyendo las células de epitelio de riñón y las neuronales son consideradas los blancos más promisorios para el desarrollo de una línea celular de los rasgos requeridos.

Es por consiguiente solamente por la facilidad con que los fibroblastos son obtenidos que el desarrollo de la línea celular aviar se ha enfocado casi exclusivamente en estas células (Cowen, B. S., Braune, M.O., *Avian Dis* 32(2):282-97 (1988); US 5,830,723). En algunos casos los embriones completos han sido empleados (US 2001-0016348).

Los virus no solamente exhiben especificidad de especies sino también de órgano y tejidos basado en la distribución del receptor y factores celulares que apoyan la replicación. Por consiguiente, a diferencia del enfoque típico, un camino preferido para realizar la presente invención es la separación de órganos antes del cultivo para obtener las células hospederas más preferidas.

5 Para el virus influenza, cuya producción adecuada de vacunas es la principal aplicación para las líneas celulares de la presente invención, el sitio típico de la replicación no es el propio embrión sino las membranas extraembrionarias. Por lo tanto, un objetivo específico fue también desarrollar líneas celulares de material extraembrionario, incluyendo las membranas protectoras del embrión. Algunos cultivos primarios tejido específico incluyendo aquellos de las mem-
10 branas extraembrionarias tienen un tiempo de supervivencia muy breve comparados a los fibroblastos. Esto adiciona realces a la necesidad de la inmortalización diseñada para obtener células hospederas optimizadas. La inmortalización satisfactoria de múltiples tejidos en un marco de tiempo limitado requiere de la combinación específica de genes empleados en la presente invención.

15 No se conocía cual de los tejidos aviares tiene el mayor potencial replicativo para los virus pox como MVA o Canarypox. El proceso típico de producción para el MVA involucra una mezcla de células de un embrión excluyendo la cabeza la cual es eliminada antes de la desintegración. Es por consiguiente completamente inesperado que la línea celular de origen neuronal, desarrollada a partir de la retina, tenga una alta capacidad para la replicación de MVA mientras que otros tejidos no lo tienen.

20 La misma especificidad de tejido se aplica a la producción de proteínas. La capacidad transcripcional es dependiente del conjunto disponible de factores de transcripción e incluso de promotores fuertes ubicuos virales y celulares que presentan una resistencia variable en los diferentes tejidos. Además, los rendimientos de las proteínas secretadas depende fuertemente de la capacidad del tipo celular particular para plegar y procesar (por ejemplo glicosilar) la
25 proteína adecuadamente.

Los mecanismos que conducen a la inmortalización y la transformación en las células primarias han sido bien descritos (Hahn, W.C y otros, Nature 400:464-8 (1999)). Los elementos requeridos interfieren con (1) el control de la progresión del ciclo celular, (2) la muerte celular programada inducida por el ciclo celular no regulado, (3) trans-
30 ducción de señal del factor de crecimiento y para células humanas y aviares (4) el acortamiento de telómeros, la terminación lineal de los cromosomas. Un gran número de factores son conocidos que pueden conducir a las células primarias a un fenotipo inmortalizado y transformado pero la inmortalización se hace a expensas de la inhibición de los controles celulares que son responsables de minimizar la formación de tumor en el huésped. Es por consiguiente deseado seleccionar factores transformadores que puedan llevar a cabo la generación experimental de una línea celular
35 pero representar un riesgo mínimo para la inducción de tumor en los receptores de biológicos derivados de las células diseñadas. Este requerimiento necesita estar balanceado con la resistencia de los factores transformadores: ellos deberían ser suficiente fuertes para causar la transformación sin la necesidad de la acumulación de mutaciones espontáneas adicionales; esto es, la vía molecular que conduce a la línea celular resultante que debería ser conocida completamente (categoría I y II de acuerdo a la FDA CBER Oficina de presentación de Vacunas Mayo 2000, Comité de Expertos). Es
40 además deseada la selección de una combinación sinérgica de factores que individualmente no pueden transformar las células primarias para lo que una transferencia simultánea de material genético es requerida lo cual además minimiza el riesgo de una transformación inadvertida en vacunas o pacientes. Finalmente es deseado que el factor transformante provoque una respuesta inmune en el receptor de biológicos de manera que la vigilancia inmune del tumor sea activada en el evento improbable de formación de tumor debido a la aplicación del producto. El último criterio puede ser
45 realizado si proteínas transformadoras no-celulares pero extrañas, por ejemplo, virales son utilizadas.

Fue ahora encontrado que la región E1 de adenovirus humano 5 (Ad5) es idealmente apropiada para transformar células aviares pero que la célula resultante diseñada cumpla con todos los criterios anteriores.

50 La región E1B codifica dos marcos abiertos de lectura en un ARNm bicistrónico, las proteínas 21K y 55K. La proteína 55K se une al p53 y de este modo convierte el activador transcripcional pro-apoptótico en un represor. La proteína 21K complementa esta actividad anti-apoptótica uniéndose a Bax, manteniendo de este modo la integridad de la membrana mitocondrial y evitando la liberación del citocromo C. Esta proteína es esencial para conducir a las células adherentes hacia el crecimiento independientemente de los sustratos y de ahí que sea esencial para los procesos
55 de fermentación en suspensión.

No ha sido mostrado antes si el adenovirus humano E1B 55K puede afectar los homólogos aviares de p53. Además, los adenovirus aviares no están equipados con los genes semejantes a E1B de manera que la interferencia también no fue posible. Al contrario de todas las expectativas, los inventores han encontrado que la E1B puede proporcionar las
60 funciones esenciales para permitir la inmortalización por E1A.

Un factor crucial y novedoso para el logro aquí descrito fue la extracción de E1B de su débil contexto natural y la colocación bajo el control de un fuerte, promotor recombinante. Esta modificación y combinación novedosa permitió la eficiente inmortalización de múltiples tejidos de pato y pollo por transfección en lugar de la transducción retroviral.
65

Aunque el mecanismo subyacente para la transformación por E1 es una característica compleja es el rasgo mas deseable: E1A es un fuerte inductor de la proliferación celular y la apoptosis mientras que las proteínas E1B interfieren eficientemente con la apoptosis pero no pueden liberar la restricción sobre el control del ciclo celular.

ES 2 309 578 T3

De ahí, que no un factor individual como la continua presencia de las proteínas E1A y E1B sean requeridas para sostener los fenotipos transformados inducidos experimentalmente.

Desde la descripción de v-src en el 1970 (Brugge, J.S., Erikson, R.L., Nature 269: 346-8 (1977)) una colección de factores transformadores ha sido descubierta y caracterizada. Verdaderamente, este fue el estudio de inducción de tumores en aves por alfaretrovirus que proporcionó los primeros indicios moleculares (Martin G.S., Nature 227: 1021-3 (1970)). Los oncogenes retrovirales son derivados de genes celulares con dominios reguladores esenciales mutados o eliminados. Algunos de los factores que han sido identificados en el curso de estos estudios, tales como, v-myc o v-ras, directamente afectan los componentes de las vías de RB y p53. Otras proteínas, tales como, v-src o v-erbB, son transductores de señal constitutivamente activados (de ahí, no regulados) que mimetizan las afectaciones de los mitógenos extracelulares. El problema con esos factores es que ellos son blancos solamente de una de las diversas vías requeridas para la transformación eficiente. La presencia de v-src o v-myc predispone a la célula para la transformación y requiere alteraciones adicionales, espontáneas e impredecibles dentro de la célula para la transformación completa. Por consiguiente es difícil de estimar los riesgos para los pacientes representados por las células transformadas con uno de los oncogenes retrovirales.

Otros virus ADN tales como papilomavirus y poliomavirus son también conocidos que transforman las células *in vitro*. Sin embargo, los transgenes seleccionados no deberían ser demasiado agresivos para minimizar el riesgo de la inducción de tumores en los receptores de biológicos a través del ADN celular transferido inadvertidamente. Este criterio es especialmente riguroso para la producción de vacunas donde la población saludable frecuentemente es inoculada a una edad muy joven. Aún con los métodos modernos sofisticados el antígeno T grande de poliomavirus es considerado también agresivo para el uso en líneas celulares generadas para la aplicación en medicina humana. Mientras que el 90% de los carcinomas de cerviz portan secuencia de papilomavirus (Muñoz, N. y otros, N. Engl., J. Med. 348(16):518-27 (2003)) adenovirus tipo C (el cual incluye tipo 2 y tipo 5) no son considerados para inducir tumores *in vivo* y adenovirales que no ha sido detectadas en tejido de tumor humano.

Basado en los rasgos complementarios de los genes transformados mostrados arriba, fue encontrado que la combinación de cada uno de los genes que interfiere con las vías individuales en el ciclo celular y la apoptosis es necesaria para obtener una línea celular genéticamente estable que crece en suspensión.

Fue mostrado que la región completa E1 de adenovirus 5 puede cumplir estos requerimientos. Por cuanto fue mostrado, que la proteína 12S de E1A de Ad5 puede interactuar con la RB aviar (Guilhot, C. y otros, Oncogene 8:619-24 (1993)) la actividad funcional de las proteínas 55K y 21K en las células aviares es demostrada por primera vez en la presente invención. No es sorprendente que algunos clones de células de codorniz que expresan la proteína 12S de E1A muestren características transformadas (Guilhot, C. y otros Oncogene 8: 619-24 (1993)). La extremadamente eficiente y estable transducción de la infección vía retrovirus crea una suficiente gran combinación de células para permitir que las células individuales superen el bloqueo del ciclo celular o la inducción de la apoptosis por cambios genómicos espontáneos. Estos cambios requeridos pero desconocidos incrementan el riesgo medicinal y la línea celular resultante puede no ser considerada la línea celular diseñada, la cual debería estar basada en genes conocidos. Es más, la técnicas de transfección no son suficientes para crear la gran combinación de clones requeridos por selección natural. En su lugar la transducción de retrovirus fue requerida. Los genes transformados introducidos vía esta aproximación podrán ser flanqueados por ITRs y pueden, por lo tanto, ser inmovilizados, aun mas en la línea celular expresando inverso transcriptasa.

Recientemente, un adenovirus aviar, denominado cepa CELO de adenovirus tipo I de ave (para el embrión letal huérfano embrionario), ha sido descrito con más detalles (Chiocca, S. y otros, J. Virol. 70:2939-49) (1996)). Grandes tramos centrales genómicos de CELO son homólogos a Ad5 pero difieren en aspectos importantes - entre otros, CELO no es equipado con una región E1-homóloga. Además, CELO no puede complementar Ad5 mutagenizada en E1A y recíprocamente, las proteínas Ad5 E1 no pueden transactivar la transcripción de los genes CELO tempranamente tardíos (Li, P. y otros, J. Gen. Virol. 65 (Pt 10):1817-25 (1984)). Y aún, CELO es capaz de transformar las células hámster *in vitro* (May, J.T. y otros, Virology 68: 483-9 (1975)). Los genes que interfieren con el ciclo celular y la apoptosis, orf22 y GAM-1, han sido identificados en el virus CELO (Lehrmann, H., Cotton, M., J. Virol. 73:6517-25 (1999)). Orf22 codifica la proteína que interactúa con RB, y GAM-1 interfiere con la apoptosis de manera similar a la proteína prototípica 21K (Chiocca, S. y otros, J. Virol. 71:3168-77 (1997)).

Fue encontrado ahora que los genes orf22 y GAM-1 del virus CELO son sustitutos convenientes para E1A y E1B. El espectro de transgenes disponibles para la transformación de células aviares está aquí expandida. Estas proteínas no han sido usadas previamente para transformar células aviares.

Además, uno de los genes virales puede ser reemplazado por un gen celular. Los candidatos para tales reemplazos son los miembros de la familia E2F o ciclinas del grupo D para la región E1A de adenovirus y mdm2 para la región E1B.

Las siguientes líneas celulares fueron depositadas en el DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Alemania:

1. PBG04 como DSM ACC2577, depositada el 18 Septiembre, 2002;
2. 12A07-A10 como DSM ACC2695, depositado el 20 Octubre, 2004.

ES 2 309 578 T3

La invención podrá ser explicada en más detalle con referencia a los siguientes ejemplos, los cuales sin embargo, no son construidos para limitar la invención.

Ejemplos

5 Ejemplo 1

Inmortalización de las células primarias de pato con Adenovirus 5 E1A,B

10 Las secuencias de adenovirus para E1A y E1B fueron amplificadas a partir del cultivo del pasaje 8 de la primera generación (E1 eliminado) de adenovirus Admuc crecidos en HEK 293 las cuales fueron fuertemente contaminadas con un virus tipo salvaje usando polimerasa provestart (Qiagen).

15 Los siguientes cebadores fueron usados:

VS182 ACTCGAGCTGACGTGTAGTGTATT (SEQ ID NO:1)

20 VS183 CACACGCAATCACAGGTT (SEQ ID NO:2)

para amplificar la región E1 A y

25 VS184 ACTCGAGTCATGGAGGCTTGGGAGT (SEQ ID NO:3)

VS185 ACACATTTCACTACCTCA (SEQ ID NO:4)

30 para amplificar la región E1 B. Ambos fragmentos fueron primeros clonados dentro de pPCR4blunttopo (Invitrogene).

La construcción E1B pierde el aceptor de empalme del mensaje de E1B. Este fue por lo tanto reemplazado por uno sintético amplificado usando cebadores del intron líder de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana. Como plantilla, del ADN genómico del PBG04 (DMSZ ACC2577), fue usado un heterohibridoma humano-murino.

35

Cebadores:

40 VintSA-F AAGGTACCCTCCCTAGTCCCAGTGA (SEQ ID NO:5)

VintSA-R CAATGTACAGAGTGGGCTCCTGTGG (SEQ ID NO:6)

45 El aceptor de empalme fue directamente clonado dentro de pEFmyc, conteniendo el promotor alfa aEF1 y el péptido líder myc para crear proteínas de fusión. La región E1A fue eliminada de ptopoE1A usando los sitios EcoR I y Xho I y clonados en pEFmyc directamente, eliminando la secuencia líder myc y fusionando la E1A a la poly A de hormona de crecimiento bovino. La región E1B fue otra vez eliminada con las enzimas de restricción EcoRI y Xho I y clonados en pEFmycSA conteniendo el sitio aceptor de empalme heterólogo. Los plásmidos resultantes fueron llamados pEFAd5E1A (SECUENCIA ID NO:7) y pEFAd5E1BSA (SECUENCIA ID NO:8).

50

55 Huevos embrionarios de pato fueron incubados a 37°C, 60% de humedad del aire, por 12 días (los embriones más viejos rindieron más células pero también contenían un alto número de fibroblastos diferenciados, contaminantes). La cáscara fue esterilizada con 70% de isopropanol, abierta por el lado largo, y el embrión fue eliminado asépticamente a una placa petri estéril. El cerebro fetal y los riñones fueron eliminados, transferidos a placas petri separadas llenadas con Tripsina/EDTA y picados. Después de una breve incubación la suspensión fue mezclada con un exceso de medio F12 (Gibco/Invitrogen) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Biochrom) y 2% Ultrosor G (CIPHERGEN). Esta suspensión fue transferida a una placa petri y el cultivo fue realizado a 37°C (la que es menor que la temperatura fisiológica del pollo 41.6°C) y 5% de CO₂. El medio de cultivo con debris no adherente fue reemplazado al día siguiente y el cultivo continuó hasta que al menos 5 x 10⁵ células por placas de 3.5 cm fueron disponibles para la transfección de los plásmidos pEFAd5E1A y pEFAd5E1BSA.

60

65 Los experimentos iniciales comparando los reactivos de transfección liposomales (Effectene; Qiagen) y dendroméricos (Polyfect; Qiagen) sugirieron mejores eficiencias con Effectene. La transfección aquí fue realizada usando el reactivo Effectene; en resumen: 2 µg de plásmido ADN fueron diluidos en 200 µL de tampón EC conteniendo 16 µL de potenciador. Después de un tiempo de incubación de 5 minutos, 16 µL de Effectene fue añadido. Después de un tiempo de incubación de 10 minutos, el sobrenadante fue eliminado del cultivo en las placas de 3.5 cm y reemplazado con 1 ml de medio fresco conteniendo la mezcla de transfección. Después de un tiempo de incubación de 2 horas a 37°C y 5% de CO₂, fue añadido al cultivo 2.5 ml adicionales de medio fresco.

ES 2 309 578 T3

Las células transfectadas se dejaron alcanzar la confluencia, tripsinizadas, resuspendidas en medio F12 G-suplementado en FCS/Ultrosor, y re-sembradas en placas de 6 pocillos (correspondiendo a una expansión de 12 veces). Después de 5 y 10 días, el medio fue reemplazado con F12 suplementado solamente con 5% de FCS. Las placas fueron escaneadas para la aparición de focos de células con cambio de morfología (disminución en general del tamaño de la célula, incremento del tamaño del núcleo, incremento de la visibilidad de las membranas del plasma bajo el contraste de fase) y la confluencia incrementada.

Aproximadamente 14 días después de la transfección una vez que los focos alcanzaron un diámetro de 1-3 mm el medio fue aspirado y el cultivo lavado dos veces con tripsina/EDTA (Gibco). Los discos empapados con tripsina (Sigma) fueron colocados en la parte superior del foco aspirado durante 3 minutos, y luego transferidos a los pocillos de placas de 24 pocillos llenados con 500 μ L de medio F12 suplementado con 5% de FCS.

Las células transformadas, clonadas se les permitió proliferar hasta la confluencia, tripsinizadas, resuspendidas en medio F12 suplementado con 5% de FCS y transferidas a placas de 6 pocillos. Una vez el cultivo alcanzó la confluencia en las placas de 6 pocillos las células fueron transferidas a frascos T25 para los pasajes continuos.

Para la crio-conservación a intervalos definidos las células fueron tripsinizadas, resuspendidas en medio F12 conteniendo 5% de FCS, colectadas por centrifugación a 100 g por 10 minutos, resuspendidas en medio F12 conteniendo 50% de FCS y 10% de DMSO (Sigma) a una concentración aproximada de 3×10^6 células por ml, y colocadas en crio-frascos en un aparato de enfriamiento basado en isopropanol a -75°C . El aparato de enfriamiento asegura una velocidad constante de enfriamiento de 1°C por minuto. Después de 24 horas las células fueron transferidas a nitrógeno líquido para el almacenaje permanente.

25 Ejemplo 2

Preparación mejorada de las líneas celulares aviares inmortalizadas

a) *Preparación de células primarias*

La colonia de origen de los huevos de patos fue certificada libre de *Salmonella enteritidis* y *S. typhimurium*; *Mycoplasma gallisepticum* y *M. synoviae*; casos de leucosis, retículo-endoteliosis, psitacosis, influenza aviar, hepatitis de pato y enfermedad de Derzsy. Los animales intencionalmente no fueron vacunados contra parvovirus y no fueron detectados casos de parvovirus. Los animales en la colonia de origen han sido vacunado contra *S. enteritidis* y *S. typhimurium*; *Pasteurella multocida*; el metaneumovirus rinotraqueitis de pavo; y el paramixovirus causante de la enfermedad de Newcastle.

Los huevos se les permitió equilibrarse sin agitación a temperatura ambiente y después de dos días fueron incubados a 38°C en una cámara húmeda, frecuentemente rotada alternando $+45^{\circ}$ y -45°C .

Los embriones de pato fueron sacrificados para el aislamiento de las células primarias después de una a tres semanas de incubación. Los huevos fueron transferidos a una unidad de cGMP (laboratorio cerrado trabajando como se esbozó en las Buenas Prácticas de Fabricación Actuales) y la cáscara fue esterilizada limpiándola con isopropanol 70% bajo una cubierta de flujo laminar. Todos los pasos posteriores fueron ejecutados en la unidad GMP bajo condiciones estériles con soluciones medios definidos.

Los huevos fueron abiertos cuidadosamente, los embriones fueron transferidos a una placa petri grande y matados inmediatamente por decapitación. Las muestras de los siguientes órganos fueron eliminadas: cerebro, retina, hígado, esófago, corazón, y membranas extra-embriónicas.

Además, las células de somite fueron preparadas a partir de los embriones de 8 días de edad.

Todas las muestras fueron lavadas con PBS (tampón fosfato salino, Gibco/Invitrogen, USA), tratadas con tripsina (Gibco/Invitrogen, USA) durante 1 a 10 minutos, y trituradas en medio de cultivo DMEM:F12 (Gibco/Invitrogen, USA) suplementado con 10% de FCS (Biochrom AG, Germany) por pasajes repetitivos a través de jeringuillas 18G. Las muestras homogenizadas fueron cultivadas a 37°C y 5% de CO_2 . El debris fue eliminado de las células adherentes por cambio de medio al día siguiente.

b) *Construcciones de Plásmidos*

Los plásmidos de expresión para E1A, E1B, Orf22 y Gam1 fueron construidos por la extracción de las regiones blancas pertinentes del ADN genómico de adenovirus serotipo 5 o de virus tipo salvaje de embriones letales huérfanos de pollo (CELO), respectivamente, por PCR y la inserción en los vectores equipados con fosfoglicerato quinasa humana o de ratón (hPGK o mPGK), CMV de ratón (moCMV) o promotores tk (figura 1).

ES 2 309 578 T3

Las secuencias de adenovirus para E1A y E1B fueron amplificadas a partir del virus tipo salvaje usando polimerasa ProofStart (Qiagen, Alemania). Los siguientes cebadores fueron usados:

5 **VS182 ACTCGAGCTGACGTGTAGTGTATT (SEQ ID NO:1)**
 VS183 CACACGCAATCACAGGTT (SEQ ID NO:2)

10 para amplificar la región E1 A y

VS184 ACTCGAGTCATGGAGGCTTGGGAGT (SEQ ID NO:3)
15 **VS185 ACACATTTCACTACCTCA (SEQ ID NO:4)**

para amplificar la región E1 B. Ambos fragmentos fueron primeros clonados en pPCR4-Blunt-TOPO (Invitrogene, USA).

20 La construcción E1B pierde el aceptor de empalme del mensaje E1B. Este fue por lo tanto reemplazado por uno sintético amplificado usando cebadores a partir del intrón líder de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana. Como plantilla fue usado, el ADN genómico de PBG04 (DMSZ ACC2577) un heterohibridoma murino-humano.

25 Cebadores usados para la amplificación:

VintSA-F AAGGTACCCTCCCTAGTCCCAGTGA (SEQ ID NO:5)
30 **VintSA-R CAATGTACAGAGTGGGCTCCTGTGG (SEQ ID NO:6)**

Los genes GAM-1 y ORF-22 fueron amplificados del virus CELO tipo salvaje con los cebadores

35 **V206 AAC CTC GAG ACC CCC CTG TAC ATT CTA (SEQ ID NO:11)**
 y V207 GCC GTT AAC TTC AGG GAT TGG TTA CAG (SEQ ID NO:12), y

40 **V208 CAC CTC GAG TCC GGA TTA AGA TGA ACG (SEQ ID NO:13)**
45 **y V209 CCA GTT AAC AGG TGA ACC ATT TAT ACA G (SEQ ID NO:14),**

respectivamente.

50 Los ejemplos representativos para los plásmidos resultantes son dados con el plásmido 49E (factores adenovirales bajo el control de promotores de la PGK humana y CMV de ratón; SEQ ID NO:9), plásmido 25F (factores CELO bajo el control de promotores PGK de ratón y humano SEQ ID NO:10), plásmido 60E (factores adenovirales bajo el control de promotores PGK y tk humanos; SEQ ID NO:18) y plásmido 36E (factor CELO bajo el control de promotor PGK de ratón; SEQ ID NO:19) (Ver también figura 1).

La integridad de la expresión de los plásmidos fue confirmada por secuenciación. Los plásmidos no están preparados para expresar factores de resistencia contra antibióticos (tales como ampicilina) en células eucariotas.

60 c) *Transfección*

Los cultivos primarios fueron transfectados con los plásmidos de expresión para E1 o Orf22/Gam1 justo después del aislamiento o después de un único subcultivo. Dependiendo del experimento, los plásmidos fueron transfectados como superespirales o después de la linearización con la enzima de restricción Sca I (New England Biolabs, USA).
65 Los experimentos iniciales comparando los reactivos de transfección liposomal (Effectene; Qiagen, Alemania) y dendromérico (Polyfect; Qiagen, Alemania) sugirieron la mejor eficiencia con Effectene. La transfección fue realizada como sigue: 2 µg de ADN total fue diluido en 200 µl de tampón EC proporcionado y mezclado con 16 µl de potencia-

ES 2 309 578 T3

5 dor proporcionado. Después de una incubación de 2-5 minutos a temperatura ambiente fue añadido 20 μ l de reactivo Effectene. Después de 5-10 minutos a temperatura ambiente esta mezcla fue aplicada a las células en placa de 8 cm² bajo 1 ml de medio de cultivo. Después de 2-5 horas fue añadido 1.5ml de medio de cultivo adicional. Al día siguiente, el medio fue reemplazado con 2 ml de medio de cultivo fresco, y después de esto una vez por semana. La transfección exitosa fue confirmada en experimentos paralelos con un gen reportero.

Las células fueron continuamente pasadas en medio DMEM: F12 conteniendo 10% FCS.

10 Veinte días después de la transfección fueron observados cambios de morfología en sub-poblaciones definidas en algunos cultivos (foco; figura 2) en otros cultivos los focos no aparecieron o no fueron capaces de competir con una proliferación robusta de las células primarias; otra vez otros cultivos sufrieron muerte celular masiva y senescencia justo después de la transfección.

15 Un gran número de focos independientes fueron expandidos de cultivos transfectados del plásmido 49E con células derivadas de hígado, retina y membrana extra-embriónica. En el pasaje 10, por ejemplo, la línea celular 12A07-A10 derivada de células de la membrana extraembrional de pato transformadas con el plásmido 49E fue aislada y depositada en el DSMZ.

20 Los focos fueron también obtenidos de cultivos transfectados del plásmido 60E con células de retina y somites.

El plásmido 49E, los promotores PGK y CMV de ratón conducen la expresión de E1A y E1B, respectivamente. El plásmido 60E (SEQ ID NO:18) también codifica la región completa Ad5-E1 pero la expresión de la región E1B protectora es conducida por tk, es decir, un promotor que no es tan fuerte como el promotor CMV de ratón (pero más fuerte que el promotor nativo E1B). Consistente con el efecto protector conferido por E1B fueron obtenidas mucho menos focos en menos muestras de células con esta construcción cuando se comparó con los resultados del plásmido 49E.

30 La formación de focos tanto con apariencia de células primarias y fenotipos transformados fue también observada en cultivo de hígado transfectado con plásmidos 36E CELO (SEQ ID NO:19) y 25F (SEQ ID NO:10).

Los cultivos con focos fueron expandidos por tratamiento con tripsina durante 2-3 minutos y la resuspensión en medio DMEM:F12 para transferir a frascos de cultivo frescos.

35 Para la crio-conservación a intervalos regulares las células fueron eliminadas con tripsina resuspendidas en medio DMEM:F12 conteniendo 10% FCS, colectadas por centrifugación a 200 x g durante 10 minutos, resuspendidas en medio DMEM:F12 conteniendo 50% FCS y 10% DMSO (Sigma, USA) a una concentración aproximada de 3 x 10⁶ células por ml, y enfriadas a una velocidad de 1°C por minuto hasta -80°C. Después de 24 horas las células fueron transferidas a nitrógeno líquido para el almacenaje permanente.

40 Ejemplo 3

Ensayo de inmunofluorescencia para la transfección estable

45 Los cultivos de las células potencialmente inmortalizadas fueron sembrados en láminas de cristal y se dejaron proliferar por varios días antes de la fijación con metanol helado por 10 minutos. Las células fijadas fueron incubadas con anticuerpos contra las proteínas E1A y E1B 55K, anticuerpos secundarios, y tinte fluorescente específico contra el último de acuerdo a métodos estándares de inmunofluorescencia (Becton Dickinson, UK, anticuerpo #554155 contra E1A, diluido 1:30; Oncogene, USA, anticuerpo #DP08-100UG contra E1B 55K, diluido 1:30; anticuerpo secundario dirigido contra ratón o rata, respectivamente, y conjugado a biotina, ambos de Jackson Immuno Research, USA, diluido 1:80; la visualización con Jackson Immuno Research, USA, conjugado streptavidina-Texas Rojo #016-070-084, diluido 1:100). Las células primarias aún abundantes en el inicio, aún no completamente establecidas las líneas celulares inmortalizadas y fácilmente distinguidas por su morfología proporcionó un control negativo interno conveniente para la especificidad del anticuerpo. Las células 293 (células embrionarias de riñón humano) que establemente expresan la región Ad5-E1 sirvieron como control positivo. DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol; Sigma, USA) a 1 μ g/ml fue añadido en el paso de incubación final para teñir los núcleos de las células para propósitos de orientación.

60 Una fuerte señal para E1A y 55K fue observada solamente en las células que sufrían cambios característicos en la morfología confirmando la inmortalización exitosa por los plásmidos transfectados (figura 3). Además, la transformación espontánea, una posibilidad formal, no fue observada ya que todas las células con el fenotipo alterado eran E1 positivas. Ninguna de las células con fenotipo primario expresó proteínas E1. Aunque es posible en las transfecciones de superespiral donde la linearización de los plásmidos en el proceso de integración ocurre en posiciones aleatorias ninguno de los focos examinados exhibió expresión de E1A en ausencia de expresión de E1B, además enfatizando el requerimiento para la vía dual de ruptura para la inmortalización.

65

ES 2 309 578 T3

Ejemplo 4

Ensayo para los retrovirus endógenos y exógenos

5 Un problema común encontrado cuando las vacunas son producidas en fibroblastos primarios de pollo es la contaminación con retrovirus exógenos o endógenos. La diversidad de la familia de retrovirus es también compleja de predecir si una especie dada es portadora de retrovirus. Los reportes de la literatura por lo tanto usualmente están limitados a un subconjunto de la familia de retrovirus, por ejemplo subgrupo J EAV-HP/ALV (Smith, L. M. y otros, J. Gen. Virol. 80 (pt1): 261-8 (1999)), y entonces solamente a un subconjunto de especies aviares.

10 Una confirmación confiable de la contaminación con retrovirus por lo tanto debe enfocarse sobre un motivo común presente en estos virus. La diversidad de secuencia excluye los métodos de detección basados en los ácidos nucleicos. Sin embargo, común a todos los retrovirus es la presencia de la enzima transcriptasa inversa. El sobrenadante de los focos expandidos de las células de hígado de pato inmortalizadas con el plásmido 49E fue por lo tanto ensayado
15 por PCR potenciada del producto basado en sonda cuantitativa para transcriptasa inversa (Q-PERT) y comparado a varios controles, *inter alia* CHO como control positivo y las células 293 como control negativo (ver debajo y figura 4), para detectar tanto la actividad retroviral endógena o la contaminación con retrovirus libres. El ensayo es una modificación de la literatura (Lovatt, A. y otros, J. Virol. Methods 82(2):185-200(1999)). En resumen: los retrovirus fueron enriquecidos a partir de los sobrenadantes de cultivo por ultracentrifugación con 100000 x g a través de una
20 barrera de sucrosa 20% en PBS para eliminar el debris celular. Los viriones (si estaban presentes) fueron resuspendidos en tampón de lisis (50 mM Tris pH 7.8, 80 mM KCl, 2.5 mM DTT, 0.75 mM EDTA, 0.5% Tritón X-100) y mezclado con el tampón sustrato (10 mM de cada dATp, dCTP, dGTP y dTTP; 15 μ M de cebador específico [GCC TTT GAG AGT TAC TCT TTG; SEQ ID NO:15]; y 0.5 mg/ml de ADN fragmentado de esperma de arenque [Promega Corp, # D1811])
25 # D1541]) que es el transcripto inverso si la actividad RT está presente en la muestra. cADN de ARN modelo es amplificado por PCR con los cebadores (AAA CAC TGT ACG GCA CCC GCA TT; SEQ ID NO:16) y (GCC TTT GAG AGT TAC TCT TTG; SEQ ID NO:17) y detectado vía fluorescencia verde SYBR en un Sistema de Detección de Secuencia AB 7000 usando el QPCR SYBR Green ROX Mix #AB-1163 de Abgene, UK de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

30 La figura 4 muestra un fuerte actividad RT en células CHO como se esperaba de los reportes en la literatura (por ejemplo, Anderson, K. P. y otros, Virology 181(1): 305-311 (1991)). Con estas células como control positivo y las células humanas 293 libres de actividad retroviral como control negativo el corchete es definido que permite la interpretación de la actividad RT desconocida en los sobrenadantes de los cultivos de células (figura 4, cuadrantes en
35 negrita y triángulos en negrita).

Hemos encontrado actividad RT moderada en los fibroblastos de embriones de pollo (figura 4, símbolos diamantes en negrita).

40 La señal para la actividad RT en los sobrenadantes de célula de pato fue congruente con la señal para la actividad de RT en las células 293, y ambos otra vez congruente con un control que representa el límite de detección para nuestro ensayo que consiste del modelo de ARN no incubado con RT (la figura 4, compara las curvas con triángulos abiertos y en negrita y círculos grises). Niveles equivalentes de intensidad de la señal (ΔR_n) fueron separados por lo menos dos números de ciclos entre las muestras de las células CHO y los fibroblastos de embriones de pollo (que
45 para estos experimentos son derivados de una fuente conocida para ser sólo débilmente RT positivo) y por al menos cuatro números de ciclos entre las muestras de las células CHO y las control negativo 293 y el cultivo celular de pato. Así, contrariamente a las células de pollo las células de pato descritas no exhiben actividad RT y de esta manera cumplen un atributo esencial para la conveniencia en las aplicaciones farmacéuticas.

50

Ejemplo 5

Virus Ankara vaccinia modificado (MVA)

55 La conveniencia de los focos expandidos como sustratos para la amplificación de MVA fue determinada para líneas de hígado, retina, somites y membranas extraembrionarias. La tabla 1 y la figura 5 muestran los resultados obtenidos por la infección de las líneas celulares con un inóculo preparado a partir de la preparación a gran escala de MVA (ATCC #VR-1508) en CEFp, fibroblastos primarios embrionarios de pollo. Los datos en la tabla obtenidos por la infección con MOI (multiplicidad de la infección o número de partículas infecciosas por célula huésped) de 0.1 muestra que la
60 producción viral de las células somite y de retina (en unidades formadoras de placa por ml) son comparables o incluso excedieron el producto obtenido con las células CEFp.

65

ES 2 309 578 T3

TABLA 1

Comparación de título de virus obtenidos en infecciones paralelas de 1 a 5 x 10⁵ células en cavidades de las placas de 24 pocillos. El virus de entrada fue ajustado para una MOI de 0.1. CEFp, fibroblastos frescos primarios de pollo; membrana, membrana extraembrionaria

Rendimiento MVA en pfu/ml (después de 48h, infección con MOI de 0.1)	
CEFp	3.54×10^7
retina	2.06×10^7
hígado	3.20×10^4
somite	4.60×10^7
membrana	4.03×10^3

Las unidades formadoras de placa de MVA en células de pato fueron determinadas como sigue: virus MVA fue recuperado de las células infectadas después de 48 horas del sobrenadante y de las células adheridas abiertas por repetidas congelación-descongelación. Las células VERO (riñón de mono verde Africano) fueron sembradas en placas de 96 pocillos (2 x 10⁴ células por pocillo) e infectadas con diluciones seriadas 10 veces de suspensión conteniendo MVA al día siguiente. Dos días después de esto, los cultivos fueron fijados con metanol y las células infectadas se incubaron con anticuerpos policlonales del virus vaccinia (Quartett, Alemania, #9503-2057, a una dilución 1:1000 en PBS conteniendo 1% de suero fetal bovino) por una hora a 37°C. Dos pasos de lavados fueron realizados con PBS conteniendo 0.05% de Tween 20 (Sigma Corp, USA) y el anticuerpo secundario al anticuerpo específico de vaccinia es añadido a una dilución 1:1000 en PBS conteniendo 1% de suero fetal bovino. Este anticuerpo secundario es acoplado a la enzima peroxidasa que cataliza la reacción de color en la incubación con reactivo AEC (3-amino-9-etil-carbozol; 0.3 mg/ml en tampón de acetato pH 5 conteniendo 0.015% H₂O₂). Los focos infectados son identificados por microscopio de luz y las unidades formadoras de placa son calculadas de la máxima dilución de la suspensión MVA que produce una reacción de color positiva.

La figura 5 describe la producción de virus por célula. La producción de virus por célula se correlaciona con la permisibilidad de una célula huésped dada para un virus particular. La permisibilidad está influenciada por las propiedades bioquímicas tales como la densidad de receptor de procesamiento de las proteínas estructurales virales. La figura 5 muestra que el número de partículas infecciosas liberadas por las células de la retina o por las células somite se compara favorablemente con las partículas infecciosas obtenidas por fibroblastos embrionarios de pollo.

La división de "producción de virus por célula" por la MOI produce el tamaño de expansión, la relación del virus de entrada al virus de salida. El tamaño de la extensión es equivalente a la amplificación del virus y así es importante para estimar el costo y los recursos necesarios para la producción a gran escala. El tamaño de la expansión determinado en el ejemplo descrito son 374 para el CEFp, 513 para las células de la retina, y 1108 para las células derivadas de somite. Las células de la retina y las células de somite producen valores mejores que los fibroblastos frescos primarios de embriones de pollo y así debe proporcionar sustratos superiores para la producción a gran escala de MVA.

Los resultados insatisfactorios para la amplificación de MVA obtenidos con las células derivadas de hígado o membranas extraembrionaria no pueden ser extendidos a otras familias de virus: es evidente para una persona familiarizada con el arte que la amplificación de otros virus, por ejemplo virus de influenza pertinentes para vacunas, puede ser extremadamente exitosa en estas células.

Es concebible que con los pasajes posteriores de virus en una línea huésped dada la producción de títulos decrece. Tales eventos pueden ocurrir si las células huésped soportan la mayoría pero no todos los pasos en varias etapas del ciclo infeccioso. Para direccionar esta pregunta un pasaje seriado de MVA fue realizado en células de retina de pato transformadas con el plásmido 49E. Los datos en la figura 6 muestran que el MVA no se pierde con los pasajes en estas células: niveles similares de entrada de virus ajustados a una MOI de 0.3 (dado por las barras en la figura 6) el tamaño de expansión (cuadrados en negrita) aumenta nueve veces de 35 a 315. La razón para el aumento del tamaño de la expansión puede ser debido a propiedades mejoradas de la célula huésped ya que aumenta el número de pasajes.

En conclusión, las células de retina de pato y derivadas de somite obtenidas por la transfección de la región Ad5-E1 bajo condiciones cGMP establemente soportan la amplificación de MVA con una eficiencia comparable o mejor que los fibroblastos primarios de embriones de pollo. Debido a la naturaleza altamente atenuada de las líneas celulares convencionales de MVA, no son adecuadas para la producción a gran escala de los virus. Es un hallazgo sorprendente que las líneas celulares de pato diseñadas funcionan mejor que las células primarias de pollo en la propagación de MVA y así son capaces de proporcionar nuevas plataformas de producción para este importante candidato vacunal. Las líneas celulares descritas fueron generadas bajo condiciones cGMP y son por lo tanto adecuadas para aplicaciones farmacéuticas.

REIVINDICACIONES

1. Una línea celular aviar immortalizada por transfección no viral con una combinación de gen(es) viral(es) y/o celular(es), al menos un primer gen que afecta la función de la proteína de retinoblastoma por mediación de la ruptura de complejos entre las proteínas del retinoblastoma y los factores de transcripción E2F y al menos un segundo gen que afecta la proteína p53 o un miembro de la familia de la misma, donde el primer gen es un gen viral seleccionado de un gen de adenovirus E1A de mastadenovirus, un gen E7 de papilomavirus, un gen orf 22 de adenovirus aviar y marcos de lectura abierta E43 de atadenovirus ovino o es un gen celular que media la ruptura de los complejos entre proteínas de retinoblastoma y factores de transcripción E2F y siendo seleccionados de Ciclinas D1, D2 y D3, y una CDK4 mutada que no es susceptible a la inactivación por p16INK4a; y el segundo gen es un gen viral que codifica para una proteína que previene la inducción del arresto del crecimiento y la apoptosis por p53 seleccionada de la proteína E1B55K de todos los grupos de adenovirus, GAM-1 de CELO y la proteína E6 de papilomavirus, o es mdm2 siendo un gen celular que previene el arresto del crecimiento y la apoptosis por p53.

2. La línea celular aviar de la reivindicación 1, donde el primer gen supera el control del punto de inspección G1 y el segundo gen previene la apoptosis inducida por el primer gen.

3. La línea celular acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, donde

(i) la línea celular es derivada de pollo, pato, ganso o codorniz embrionario o incubado, preferiblemente de pollo o pato; y/o

(ii) las células sometidas a la immortalización son células primarias incluyendo fibroblastos, células de segmentos del cuerpo aislados (somites) o de órganos individuales separados incluyendo tejidos neuronal, de cerebro, retina, riñón, hígado, corazón, músculo y extraembrionario y membranas protectoras del embrión; y/o

(iii) la immortalización por transfección no-viral, incluye, pero no está limitada a, la transfección y electroporación mediada por liposoma y dendrímero; y/o

(iv) en el primer gen del gen de adenovirus E1A de mastadenovirus es de mastadenovirus del grupo C, el gen E7 de papilomavirus es del virus de papilomavirus humano de bajo riesgo (HPV), como HPV 1, HPV 6 y HPV11, pero no HPV16 y HPV18; y/o

(v) en el segundo gen la proteína E6 es de HPV de bajo riesgo, como HPV 1, HPV6 y HPV11, pero no HPV16 y HPV18; y/o

(vi) el primer gen y segundo gen son separados espacialmente por secuencias heterólogas o son localizados en diferentes segmentos de ácidos nucleicos o plásmidos.

4. La línea celular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que es immortalizada con

(i) la región E1A (primer gen) y E1B (segundo gen) de un adenovirus del género Mastadenovirus, preferiblemente dicha región E1A y E1B es derivada de adenovirus 5, más preferiblemente dichas regiones E1A tienen la secuencia de pb 1193 a 2309 de SEQ ID NO:7 o la secuencia complementaria para pb 4230 a 3113 de SEQ ID NO:9, y dichas regiones E1B tienen la secuencia de pb 1145 a 3007 de SEQ ID NO:8 o la secuencia complementaria para pb 2345 a 550 de SEQ ID NO:9; y/o

(ii) los genes orf22 (primer gen) y GAM-1 (segundo gen) de un adenovirus, preferiblemente del género aviadenovirus CELO, que preferiblemente tiene la secuencia representada por la secuencia complementaria para pb 1252 a 635 de SEQ ID NO:10, y la secuencia complementaria para pb 3138 a 2290 de SEQ ID NO:10, respectivamente; y/o

(iii) combinaciones de los ácidos nucleicos que codifican E1A y/o E1B con GAM-1 y/o Orf22 como se definió anteriormente en (i) y (ii).

5. La línea celular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, la cual

(i) adicionalmente porta secuencias funcionales no-naturales incluyendo, pero no limitadas a, transgenes como virus deficientes de genes complementarios (por ejemplo EBNA1), promotores (por ejemplo promotores PGK, EF1.alfa, CMV y tk), potencializadores (por ejemplo RSV-LTR) y marcadores de selección como resistencia a la neomicina, resistencia a la puromicina; y/o

(ii) es adecuada para la producción de biológicos o virus incluyendo vectores virales recombinantes y cepas vacuinales.

ES 2 309 578 T3

6. La línea celular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, la cual

(i) está libre de transcriptasa inversa

5 (ii) es derivada de la inmortalización de una célula primaria originaria de embriones de pato o patos incubados; y/o

(iii) es derivada de membrana extraembrionaria; y/o

10 (iv) es cultivada en un medio químicamente definido que está preferiblemente libre de suero animal.

7. La línea celular de las reivindicaciones 1 ó 6 la cual es una línea celular aviar 12A07-A10 (DSM ACC2695).

15 8. Un método para preparar una línea celular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende la transfección no-viral de una célula inicial con el primer y el segundo gen.

9. Empleo de la línea celular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para la producción de biológicos o virus.

20 10. Un método para la producción de virus que comprende

(i) contactar dichos virus con una línea celular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y/o

25 (ii) cultivar dichos virus en dicha línea celular.

30 11. El método de la reivindicación 10 para producir un virus pox, preferiblemente la cepa MVA, en una línea celular de pato, preferiblemente una línea celular originaria de somites de pato o tejido neuronal de pato, incluso más preferido de retina de pato.

12. Un método para producir proteínas recombinantes que comprende

35 (i) introducir un gen que codifica para una proteína recombinante, operablemente unida a un promotor, dentro de una línea celular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7,

(ii) cultivar dicha línea celular modificada y

40 (iii) cosechar la proteína recombinante.

45

50

55

60

65

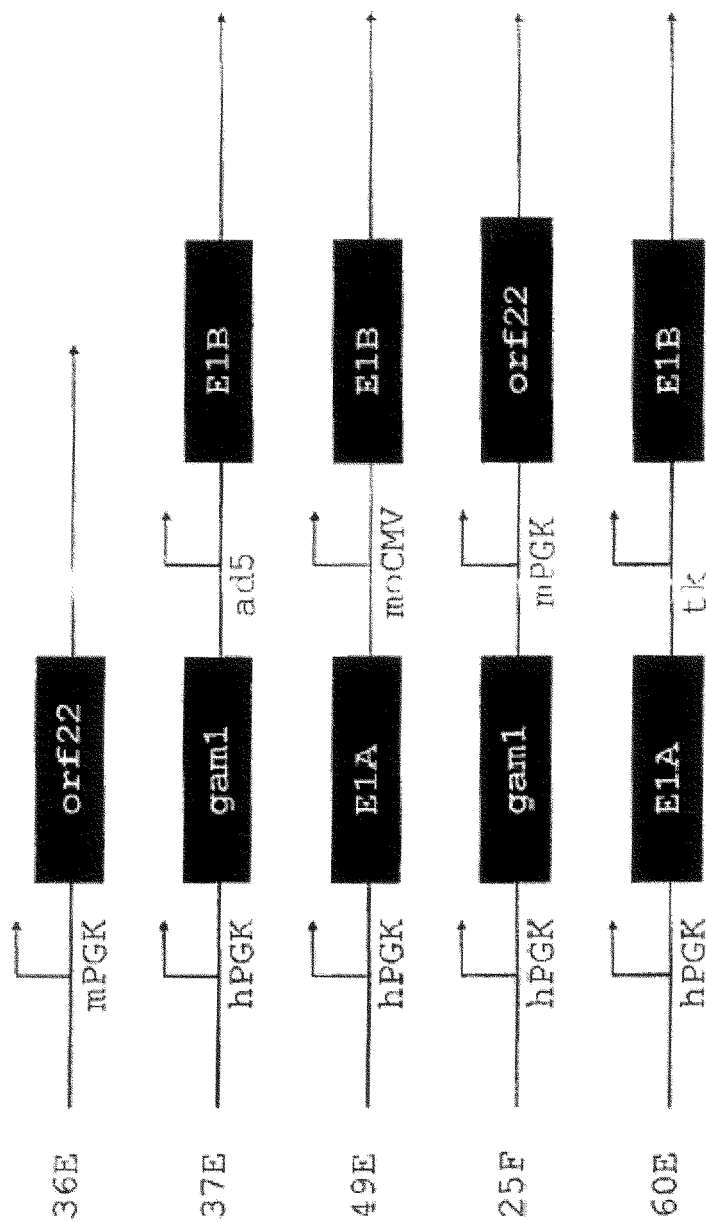


Figura 1



Figura 2

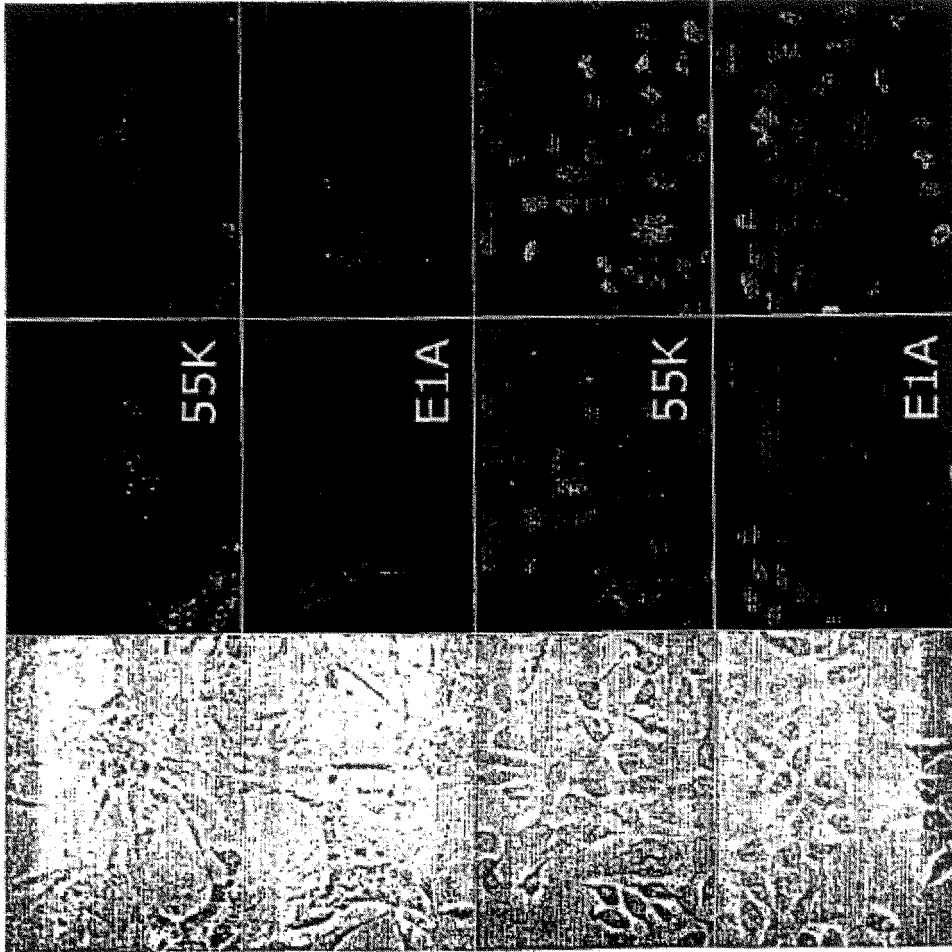


Figura 3

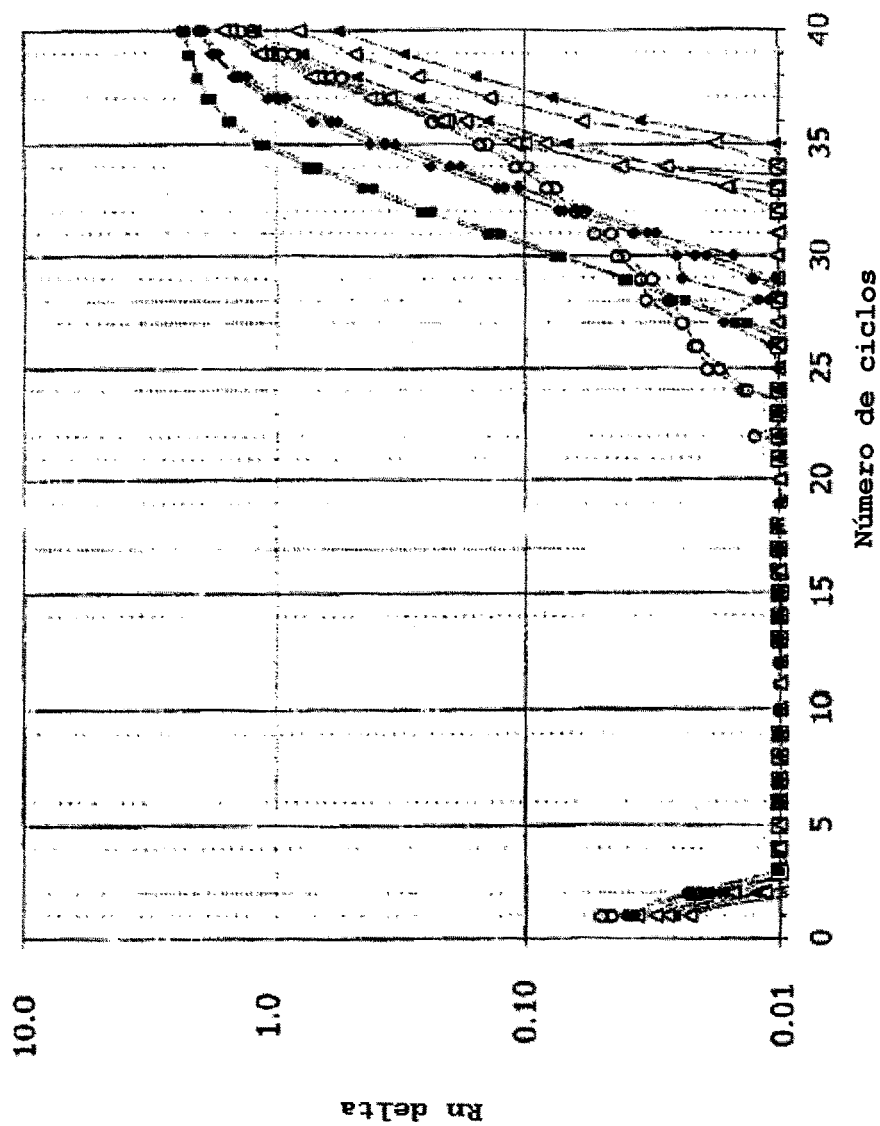


Figura 4

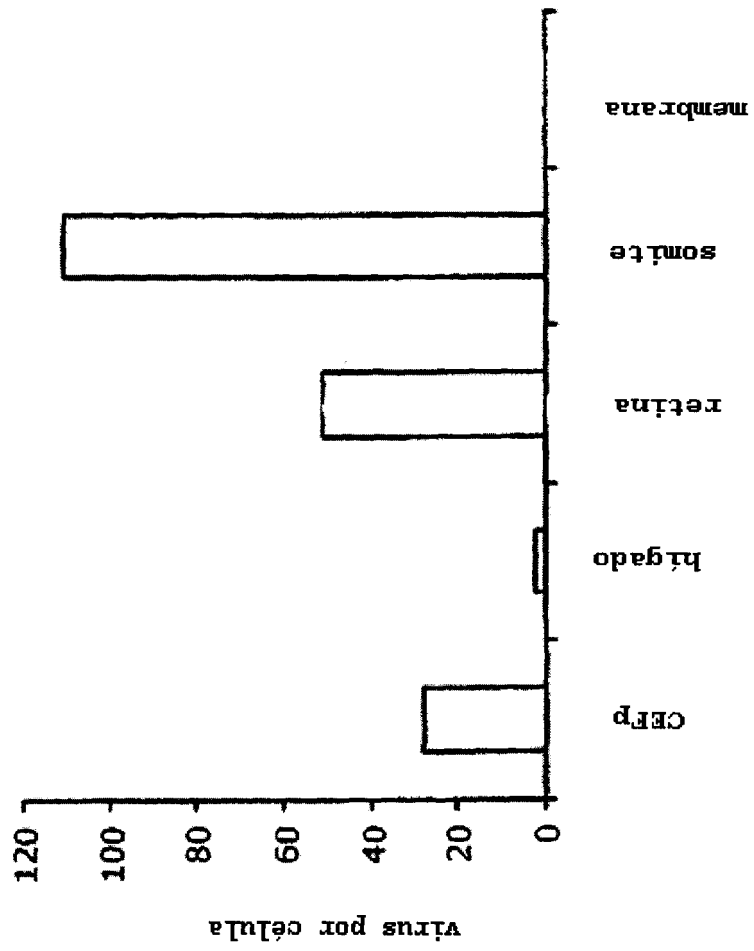


Figura 5

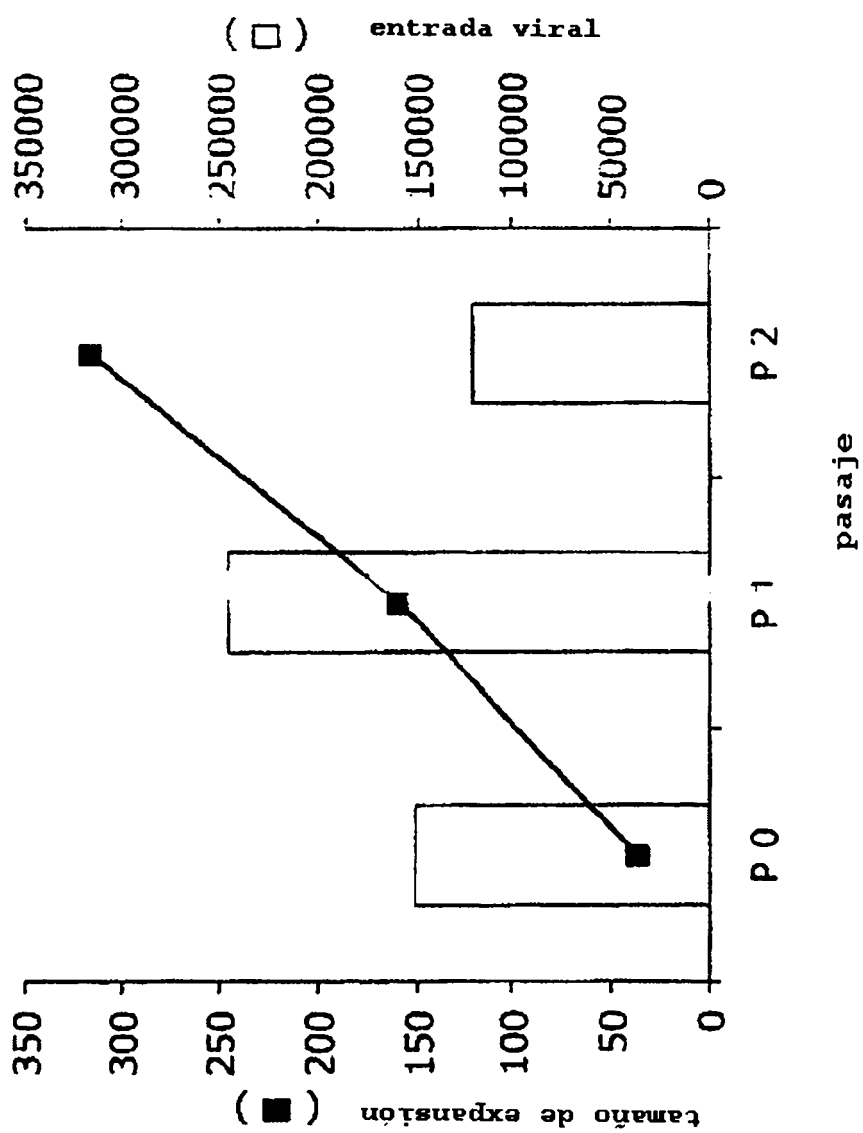


Figura 6

ES 2 309 578 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Probiogen AG
- 5 <120> Líneas celulares aviares inmortalizadas para la producción de virus.
- <130> 042666wo/JH/PCH
- 10 <140>
<141>
- <150> 03025158.1
- 15 <151> 2003-11-03
- <160> 19
- 20 <170> PatentIn Ver.2.1
- <210> 1
<211> 24
- 25 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
- <220>
- 30 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador VS182
- <400> 1
- 35 **actcgagctg acggtagtg tatt** 24
- <210> 2
- 40 <211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador VS183
- 50 <400> 2
- cacacgcaat cacaggtt** 18
- 55 <210> 3
<211> 25
<212> ADN
- 60 <213> Secuencia Artificial
- <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador VS184
- 65

ES 2 309 578 T3

<400> 3

actcgagtca tggaggcttg ggagt

5 25

<210> 4
<211> 18
10 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
15 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador VS185

<400> 4

20 **acacatttca gtacctca** 18

<210> 5
25 <211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador VintSA-F

<400> 5

35 **aaggtaacct cctagtcctc agtga** 25

40 <210> 6
<211> 25
<212> ADN
45 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador VintSA-R

50 <400> 6

caatgtacag agtgggctcc tgtgg

55 25

<210> 7
<211> 6471
60 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
65 <223> Descripción de la secuencia artificial: Plásmido pEFAd5E1A

ES 2 309 578 T3

<400> 7

	gt accgaatt	caagcttcgt	gaggctccgg	tgcccgtcag	tgggcagagc	gcacatcgcc	60
5	ca cagtcccc	gagaagttgg	ggggagsggt	cggcaattga	accggtgcct	agagaaggtg	120
	gcgcggggta	aactgggaaa	gtgatgtcgt	gtactggctc	cgcccttttc	ccgagggtag	180
	gggagaacog	tatataagtg	cagtagtcgc	cgtgaacggt	ctttttcgc	acgggtttgc	240
	gcccagaaca	caggtaaagtg	ccgtgtgtgg	ttcccggggg	cctggccctc	ttacgggtta	300
10	tggcccttgc	gtgccttgaa	ttacttccac	ctggctccag	tacgtgattc	ttgatccoga	360
	gctggagcca	ggggcggggc	ttggccttta	ggagcccctt	cgcctcgtgc	ttgagtlgag	420
	gcctggactg	ggcgtgggg	ccgcgcgctg	cgaatctggt	ggcaccttcg	cgctgtctc	480
	gctgctttcg	ataagctctc	agccatttaa	aatttttgat	gacctgctgc	gacgctttct	540
	ttctggcaag	atagctctgt	aaatgcgggc	caggatctgc	acaactggtat	ttcggttttt	600
15	gggcccggcg	ccggcgacgg	ggcccgtgcg	tcccagcgca	catgctcggc	gaggcggggc	660
	ctgcgagcgc	ggccaccgag	aatcggacgg	gggtagctctc	aagctggccg	gcctgctctg	720
	gtgcctggcc	tgcgcgcgcc	gtgtatcgcc	ccgcccgggg	cggcaaggct	ggcccggtag	780
	gcaccagttg	cgtgagcggc	aagatggccg	cttcccggcc	ctgctccagg	ggctcaaaa	840
20	tggaggacgc	ggcgttcggg	agagcggggc	ggtgagtcac	ccacacaaag	gaaaaggggc	900
	tttccgtctc	cagccgtcgc	ttcatgtgac	tccacggagt	accggggcgc	gtccaggcac	960
	ctcgattagt	tctggagctt	ttggagtaag	tctcttttag	gttgggggga	ggggttttat	1020
	gcgatggagt	ttcccacac	tgagtgggtg	gagactgaag	ttaggccagc	ttggcaactg	1080
25	atgtaattct	ccctgggaatt	cggccttttt	gagtttggat	cttgggttc	ttccaagcct	1140
	cagacagtgg	ttcaaagttt	ttttcttcca	tttcaggtgt	cgtgaacact	cgagctgacg	1200
	tgragtgrat	ttataccogg	tgagttctctc	zagaggccac	tcttgagtgc	cagcgagtag	1260
	agttttctcc	tcogagccgc	tcogacaccg	ggactgaaaa	tgagacatat	tatctgccac	1320
30	ggaggtgata	ttaccgaaga	aatggccggc	agtcttttgg	accagctgat	cgaaagagta	1380
	ctggctgata	atcttccacc	tcctagccat	tttgaaccac	ctacccttca	cgaaactgtag	1440

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 309 578 T3

5 gatttagaag tgaagggccc ogaagatccc aacgaggagg cggtttcgca gatttttccc 1500
 gactctgtaa tgttggcggg gcaggaaggg attgacttac tcacttttcc gccggcggcc 1560
 ggttccggg agccgcctca cctttcccgg cagcccgagc agccggagca gagagccttg 1620
 10 ggttccggg ctatgccaaa ccttgaaccg gagggtatcg atcttacctg ccacggagct 1680
 ggttccccc ccagtgacga cyaggatgaa gagggtgagg agtttgggtt agattatgtg 1740
 gagcaacccg ggcacgggtg caggtcttgt cattatcacc ggaggaatac gggggaccca 1800
 garattatgt gttccgcttg ctatatgagg acctgtggca tgtttgtcta cagtaagtga 1860
 aaattatggg cagtcgggtg tagagtggtg ggtttgggtg ggttaattttt tttttaattt 1920
 15 ttacagtttt gtggtttaaa gaattttgta ttgtgatttt tttaaaaggt cctgtgtctg 1980
 aacctgagcc tgaagcccgag ccagaacccg acctgcaag acctaccctc cgtctctaaa 2040
 tggcggctgc tctcctgaga cgcocgacat cactctgttc tagagaatgc aatcgttaga 2100
 cggatagctg ccttctaaca ccttctga cactctga gatcaccccg gtggtcccg 2160
 20 tgtgcccctat taaccagtt gccgtgagag ttggtggggc tgcgccaggct ggggaatgta 2220
 tccaggaact gottaacggg cctgggcaac ctttggactt gagctgtaaa cgcocccaggc 2280
 cataaggtgt aaacctgtga ttgctgtgtg aaltctagaa gctcgtgat cagcctcgac 2340
 tgtgcctctc agttgccagc catctgttgt ttgccctcc cccgtgcctt ccttgacct 2400
 ggaaggtgcc actcccactg tcttttctta ataaaatgag gaaatfgcat cgcattgtct 2460
 gegtaggtgt caltctatct tggggggtgg ggtggggcag gacagcaagg gggaggattg 2520
 25 ggaagacaat agcagccatg ctgggatgg ccggggctct atgggtctg agggcgagg 2580
 aaccagctgg ggtctaggg ggtatcccca cgcgcctgt agcggcgcat taagcgggc 2640
 ggtgtggtg gttaccgcca gctgaccgc tacacttggc agcgcctag cgcocctcc 2700
 ttctgcttcc ttccttctt ttctcgccac gttccggcc ttctcccgtc aagctctaaa 2760
 30 tccgggcatc cctttagggt tccgatttag tgccttacc gactctgacc ccaaaaaact 2820
 tgattagggg gatggttcac gtaglgggccc atcgccctga tagacggtt ttgcoccttt 2880
 gacgttggag tccacgttct ttaatatgtg acctctgttc caaactggaa caacaactca 2940
 cctatctcgg gctattctt aaaaatllaa cgcgaatcaa gggatttcgg cctattgggt 3000
 35 ttagggtgtg gaaagtcctc aggtcctcca ggcaggcaga agtatgcaaa ggtgtgag 3060
 caattagtca gcaaccaggt gtggaagtc cccaggtcc ccagcaggca gaagtatgca 3120
 aagcatgat ctcaattagt cagcaacct agtcccgccc ctaactccgc caatcccgcc 3180
 cctaactccg ccagltccg cccattctcc gcccttaggc tgaclaatlt tttttattta 3240
 tgcagaggcc gaggcggcct ctgctctga gctattccag aagtadtgag gaggctttt 3300
 40 tggaggccta gctttttgca aaaagctccc gggaggteca caatgattga acaagatgga 3360
 ttgcocagag gttccccggc cgttgggtg gagaggctat teggtatga cggggcaal 3420
 cagacaalag gctcctctga tgcoccggtg gtcocggctt cagcgcaggg ggcoccggt 3480
 ctttttctca agaccgacct ttccgggtcc ctgaatgaa bccaggacga ggcagcggg 3540
 45 clatcgtggc tggccacgac gggcgttct tgcgcagctg tgcctcagct tgcctcagct 3600
 gccggaagg actggctgct attggggaa gtgcocgggc aggatctct tgcctcagct 3660
 50 cltgcctctg ccgagaaagt atccatcat gctgatgcaa tggggcggct gcatacgtt 3720
 gatccggcta cctgccatt cyaccacca gccnaacatc gcatcgagcg agcacgtaact 3780
 cggatggaag ccggtcttgt cgatcaggat gatctggaag aagagcatca ggggtctcg 3840
 ccagccgaac tcttgcag gctcaaggc cglatgccc agggcgagga tctcgtcgtg 3900
 55 actcatggcg atgctgctt gccgaatata algglggaaa atggccgctt ttctggattc 4020
 atcgaactgt gccggctgg gttggcggac cgctatcagg acatagcgtt ggtaccctg 4080
 gatattgctg aagagcttgg cygcgaatgg gctgaccgt tectcgtgct ttacggtatc 4140
 gccgctcccg attcgcagcg catcgccttc tctcgccttc ttgacgagtt cltctgagcg 4200
 60 ggaactctgg gttcgaaatg accgaccaag cgaagcccaa cctgcatca cgagatttcg 4260
 attccacccg cgcctctat gaaaggttg gcttcggaat cgttttccgg gacgcggct 4320
 ggatgatcct ccagecggg gatctcatgc tggagttctt cgcaccccc aactlgttta 4380
 ttgcaactta taatggttac aaataaagca atagcatcac aaatttaca aataaagcal 4440
 65 tttttcact gcallctagt tbtggttigt ccaactcat caatgtatct latcatgct 4500
 gtataccgga tctttccgct tctcgcctca ctgactcgt ggcctcggtc gttcggctgc 4560
 ggcgagcggg atcagctcac tcaaagccg taatacggtt atccacagaa tcaggggata 4620
 accgaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaagcc caggaaaccgt aaaaagccg 4680
 cgttgcctgg gtttttccat aggtcccgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacct 4740
 caagtccagag gttggcgaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt cccctggaa 4800
 gctccctcgt gggctctct gttccgacc ttcccgact tgcocgttac cggatacctg tccgccttc 4860
 70 tccctcggg aagcgtggcg cttctcaat gctcacgct taggtatct agtctgggtg 4920
 aggtcgttgg ctccaagctg cttgtgtgc acgaacccc egttcagccc gaccgctgcg 4980
 ccttatccgg taactatcct cttgagtcca acccggtaa acagactta tccgcaactg 5040
 cagcagccac lggtaacagg attagcagag cagcgtatgt aggcggtgct acagagttct 5100
 tgaagtgggt gcctaactac ggtacacta gaaggacagt atttgglatc tgcgctctgc 5160
 tgaagccagt tacctcggg aaaaaggtg gttagcttgc atccggcaaa caaaccccg 5220

ES 2 309 578 T3

```

5  ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc agcagattac gccagaaaa aaaggatctc 5280
   aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcaegt 5340
   aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaattaaa 5400
   aatgaagttt taaatcaate taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat 5460
   gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcgttcatcc atagttgct 5520
   gactccccgt cgtgtagata actacgatac gggagggtt accatctggc ccagtgctg 5580
   caatgatacc gcgagaccca cgtcacggg ctccagattt atcagcaata aaccagccag 5640
   ccggaggggc cgagcgcaga agtggctctg caactttatc cgcctccatc cagtctatta 5700
10  attgttgccg ggaagctaga gtaagtagtt cgcagttaa taqtttccc aacgtggtg 5760
   ccattgctac aggcacgtg ggtcacgtt cgtcgtttg taaggctca tccagctccg 5820
   gttcccaacg atcaaggcga gttacatgat ccccatgtt gtgcaaaaaa ggggttaget 5880
   ccttcggtcc tccgatcgtt gtcagaagta agttggcgc agtgtatca ctcatggtta 5940
15  tggcagcact gcataattct cttactgtca tgccatcctt aagatgcttt tctgtgactg 6000
   gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgct ggcaccgagt tgcctctgcc 6060
   cggcgtcaat accggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg ctcatcatg 6120
   gaaaacgttc ttggggcga aaactctcaa gcatctacc gctgttgaga tccagttcga 6180
20  tctaaccac tctgtccacc aactgatctt cagcatctt tactttcacc agcgtttctg 6240
   ggtgagcaaa aacaggaagg caaatgccc caaaaaggg aataaggggc acacggaaat 6300
   gttgaatact catactcttc cttttcaat attattgaag catttatcag ggttattgct 6360
   tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg gttccggcca 6420
25  cattccccg aaaagtgcca cctgacgtca gatcgacgga tggggagatc g 6472

```

<210> 8

<211> 6629

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Plásmido pEFAd5E1BSA

ES 2 309 578 T3

<400> 8

	tcttccgctc	cctcgetcac	tgaactcgctg	cgcctcgetcg	ctcgggtgag	gcaagcggta	60
5	tccagctcact	caaaggcggg	aataccggtta	tccacagaat	caggggataa	cgcaggaaag	120
	aacatgtgag	caaaagycca	gcaaaagccc	aggaaccgta	aaaaggccgc	gttgctggcg	180
	ttttccala	ggctccgccc	ccctgacqag	catcacaaaa	atcgacgctc	aagttagagg	240
	tggcgaacc	cgacaggact	ataaagatac	caggcgtttc	ccccgggaag	ctccctcgtg	300
10	cgetctcctg	ttccgaccct	gccgettacc	ggataacctgt	ccgcctttct	cccttcggga	360
	aggctggcgc	tttctcatag	ctcaagctgt	aggtatctca	gttcgggtgt	ggtcgttcgc	420
	tccaagctgg	gctgtgtgca	cgaacccccc	gttcagcccg	accgctgoge	cttatecggg	480
	aactatcgtc	ttgagtccaa	cccggtaaga	cacgacttat	cgccactggc	agcagccact	540
	gglaacagga	ttagcagagc	gaggtatgta	ggcgggtgct	cagagttctt	gaagtgggtg	600
15	ccraactacg	gctacactag	aaggacagta	tttggatctt	gcgctctgct	gaagccactt	660
	accttcggaa	aaagagttgg	tagctcttga	tcggcaaac	aaaccaccgc	tggtagcggg	720
	ggtttttttg	tttgcaagca	gcagattacg	cgcaaaaaaa	aaggatctca	agaagatcct	780
	ttgatctttt	ctacggggtc	tgacgctcag	tggaaacgaaa	actcacggtta	agggatcttg	840
20	gtcatgagat	tatcaaaaag	gatcttcacc	tagatccttt	taaattaaaa	atgaagtttt	900
	aatcaatct	aaagtatata	tgagtaaact	tggtctgaca	gttaccaatg	cttaatcagt	960
	gaggcaccta	tctcagcgat	ctgtctatit	cgttcactca	tagttgcctg	actccccttc	1020
	gtgtagataa	ctacgatacg	ggagggttta	ccatctggcc	ccagtgetgc	aatgataccg	1080
25	cgagaccac	gctcaccggc	tccagattta	tcagcaataa	accagccagc	cggaaagggc	1140
	gagcgcagaa	gtggtcctgc	aactttatcc	gctccatcc	agtctattaa	ttgttgccgg	1200
	gaagctagag	taagtagttc	gccagttaat	agtttgogca	acgttgttgc	catttgctaca	1260
	ggcatcgtgg	tgtcacgctc	gtcgtttggg	atggcttcat	tcagctccgg	ttcccaacga	1320
30	tcaaggcag	ttacatgac	ccccatggtg	tgcaaaaaag	cggttagctc	cttcgggtcct	1380
	ccgatcgttg	tcagaagtaa	gttggccgca	gtgttatcac	tcatggttat	ggcagcactg	1440
	cataaictct	ttactgtcat	gccatccgta	agatgctttt	ctgtgactgg	tgagtactca	1500
	accaagtcat	tctgagaata	gtgtatgogg	cgaccgagtt	gctcttgccc	ggcgtcaata	1560
35	cgggataata	ccgcgcacaca	tagcagaact	htaanaqfgr	tcattcattgg	aaaacggtct	1620
	tcggggcgaa	aactctcaag	gatcttaccg	ctggtgagat	ccagttcgat	gtaaccactt	1680
	cgtgcaccca	actgatcttc	agcatctttt	actttacca	gcggttctgg	ctgagcaaaa	1740
	acaggaaqgc	aaaatgcgcg	aaaaaagggg	ataagggcga	cacggaatg	ttgaalactc	1800

40

45

50

55

60

65

ES 2 309 578 T3

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

```

atacctctcc ttttcaata ttattgaagc atttatcagg gttattgctc catgagcggg 1860
tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttncggcgcac atttccccga 1920
aaagtgcac ctgtatggcg tglgaaatac cgcacagatg cgtaaaggaga aaataaccqa 1980
tcaggaaatt gtaagcgtta ataattcaga ageactcgtc aagaaggcga tagaaggcqa 2040
tgcgctggga atcgggagcg gogataccgt aaagcagcag gaagcggcca gccattcgc 2100
cgccaagctc ttcaagcaata tcacgggtag ccaacgctat gtcctgatag cggctccgca 2160
cacccagccg gccacagtcg atgaatccag aaaagcggcc atttccacc atgatattcg 2220
gcaagcagcc atcggcatgg gtcacagcga gatectcgcc gtcgggcctg ctgccttga 2280
gcctggcgaa cagttcggct ggccggagcc cctgatctc ttcgtccaga tcatctgat 2340
cvaacaagacc gcttccate cagtagctg ctgcctgat gpalgttgc gctgggtgt 2400
cgaatgggca ggtagccgga tcaagcgtat ccagccgcg catgualca gocatgatg 2460
atcctttctc ggcaggagca agctgagatg acaggagatc ctgcuccgpc acttcggcca 2520
atagcagcca gtccttccc gcttcagtga caacgtcgag cacagctgg caaggaaacc 2580
cggctcgtgc cagccacgat agcccgctg cctcgtctt cagttcttc agggcaccgg 2640
acagctcggc cttgacaaaa agaacgggg gccctcgcg tgacagcgg aacacgggg 2700
catcagagca gccgatgtc tgttgtgccc agtcatagcc gaatagcctc tccacccaag 2760
cgcccgagga acctcgtgc aatccatctt gttcaatcat gcgaaaccat cctcatctg 2820
tctctcgtat agagcttgat cccctgcgce atcagatcct tggcggcgag aaagccatc 2880
agtctacttt gcaaggcttc ccaacctac cagaggcgc cccagctggc aattccggtt 2940
cgcttgcctg ccataaaacc gcccagctc gctatcgcca tgaagccc ctgcaagctc 3000
cctgcttct ctttgcgctt gcttttccc tctccagat accccagt ag ctgacatca 3060
tcggggctca gcaacgttcc tgggactgg cttctcact gaaaggatc tagtgaaga 3120
tccttttga taatctcatg cctgacattt atattcccc gaacatcagg ttaatggct 3180
tttctgatgc atttccggg tggctgagat cagccacttc tccccgata acgggaccg 3240
gcacactggc catatcggty gtcatcatgc gccagcttc atccccgata tgcaccacc 3300
ggtaaagtcc accggagact ttatctgaca gcagactgc cagactgc ccaaaacaga cgaacaggc 3360
tcctcggccc cggcgtgca ataatacac tctgtacat ccaaaacaga cgaacaggc 3420
tctctcttt ataggtgtaa acctaaact gcgtaacta taggtgccc aactgttgg 3480
aaggccgac ggtcggggcc tctcgtctat tacgccagct ggcgaaagg ggatgtctg 3540
caaggcgatt aagttgggt aagccagggt tttcccagtc acgactgtt gaaacggag 3600
ccagtgcaat gtaatacagc tcaatlatag gcaaltgaa tttagcggcc gcgaattct 3660
ccgggtaagg gaggccttt tcccaggca gtctggagca tgcctttag cagccccct 3720
gcacttggc gctacacaag tggctctgg cctgcacac attccacatc caccgtagg 3780
cgcaaacgg ctcgcttctt gggggccc ttggcgcac cttctaccoc tcccctgic 3840
aggaactlcc ccccggccc cagctcggc tctgtcagga cgtgacaaat ggaagtgca 3900
cgtctcacta gctcctgca gatggacagc accgctgagc aatggaagcg ggtaggctt 3960
tggggcagcg gccaatagca gcttctctc ttcgtttct gggctcagag gctgggaag 4020
ggtgggtccc gggcgggct caggggggg ctcaggggg gggcgggcg ccgaaggtc 4080
tccggaggcc cggcattctc gcacgctca aaagcgcac tctcggcgc tctctctc 4140
ttctctctc cgggcccctt ctgagcatg gaggcttgg agtgtttgg agatttct 4200
gctgtccta acctgctgga acagactct aacagtacct cttggtttg gaggttct 4260
tggactctat cccaggcaa gttagtctg agaattagg aggattaca ggggaatt 4320
gaaagcttt tgaatcctg tggtagctg tttgattct tgaatctgg taccaggcg 4380
cttttccag agaaggtcat caagacttt gattttcca caccggggcg cgtcggct 4440
gctgttctt tttgagttt tataaaggat aatggagcg aagaaacca tctgagcgg 4500
gggtacctgc lggattttc ggccatgat ctgtggagag cggttgtgag acacaagaat 4560
cgctcctac tgtgtcttc cgtccggcc gcgataaac cgaaggagg catggaacc gagagcccg 4620
cagcaggagg aagccaggcg gggcggcag gagcagagcc catggaacc ctgagcgc 4680
ctggaccctc ggaatgaat gttctacag tggctgaact gtatccaga ctgagcgc 4740
tttgacaat tacagaggat gggcagggg taagggggt aaagaggag cgggggtct 4800
gtgagctac agaggagct agaatctag cttttagctt aatgaccaga cccgtctg 4860
agtgtattac tttcaacag atcaaggata attgcctaa tgagcttgat ctgctggcg 4920
agsagtattc catagagcag ctgaccact actggctgca gccaggggat gattttgag 4980
aggctattag ggtatatgca aaggtggcc ttaggccaga ttgcaagtac aagatcagca 5040
aacttgtaaa tctcaggaat tgttctaca tttctgggaa cggggccgag gttgagatg 5100
atacggagga tagggggcc tttagatgta gcatgabaa tatgtggcc ggggtgctt 5160
gcatggacgg ggtggttatt atgaatgtaa ggttactgg cccaatttt agcggtagg 5220
tttccctggc caataccaac cttactact acggtgcaag cttctatgg ttaacaata 5280
cctgtgtgga agcclggacc gatgtaagg ttccggggcty tgccttttac tctgtgga 5340
agggggtggt gtgtggccc aaagcaggg cttaactaa gasatgccc tttgaaagg 5400
gtacctggg tatcctgtct gagggttaact ccagggtgcg ccacaatgt gctccgact 5460
gtggtgctt catgctagtg aaaagcgtg ctgtcaata gcataacatg gtatgtgca 5520
actgcgagga cagggctctc cagatgctga cctgctcgga cggcaactgt cacctgctga 5580
  
```

ES 2 309 578 T3

agaccattca cgtagccagc cactctcgca aggcctggcc agtgtttgag cataacatac 5640
 tgaccgcgtg ttccttgcac ttgggtaaca ggaggggggt gttcctacct taccaatgca 5700
 atttgagtca cactaagata ttgcttgagc ccgagagcat gtccaagggt aacctgaacg 5760
 5 gggigtgttga catgaccatg aagatctgga aggtgctgag gtacgatgag acccgacca 5820
 ggtgcagacc ctgcgagtgt ggcggtaaac atattaggaa ccagcctgtg atcctggatg 5880
 tgaccgagga gctgaggccc gatcacttgg tcttggcctg caccgcgctt gactttggtt 5940
 ctacgcatga agatacagat tgacgtactg aatggctag cagtgtacco tccctagtc 6000
 cagtgatgag aaagagattg agtccagtc agggagatct catccacttc tgtgtctct 6060
 10 ccacaggagc ccactctgta caagtaaac ggcggcga cttagatcata atcagccata 6120
 ccacatttgt agagggttta ottgctttaa aaaaacctcc acacctcccc ctgaacctga 6180
 aacataaaat gaatgcaatt gttgttgtta acctgttat tgcagttat aatggttaca 6240
 aataaagcaa tagcatcaca aatttcacaa ataaagcatt ttttccactg cttctagtt 6300
 15 gtggtttgtc caaacctcacc aatgtatctt aagatcaagg gcaatctgt ttaaacctgc 6360
 agcactagtc ccttttagtga gggttaatlc tgagcttggc gtaatcattg tcatagctgt 6420
 ttcctgtgtg aaattgttat ccgctcaca ttccacacaa cataccagcc ggaagcataa 6480
 agtgtaaagc ctgggggtgc taatgagtga gtaacctcac attaatggcg ttgcgctcac 6540
 20 tgcccgtttt ccagtgggga aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgcg 6600
 cggggagagc cggtttgcgt attggggcgc 6629

<210> 9

<211> 8297

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Plásmido 49E

30

<400> 9

agcgcaccaat acgcaaacgg cctctccccg cgcgttggcc gattcattaa tgcagctggc 60
 accgacaggtt tcccgactgg aaagcgggca gtgagggcaa cgcattaat gtaggttagc 120
 35 tcaactcatta ggcaccccag gcttlacact tlatgctacc ggctcgtatg tctgtgtgaa 180
 ttgtgagcgg ataaccaatt cacacaggaa acagctatga ccattgattc gccaaagctca 240
 gaactaaacc ccactaaagg gactagtcct gcaggtttaa accaatctgt cctcaatctc 300
 aagctgcgcg ccggagcttg gctgcgagcc ctgggccttc acccgaactt ggggggtggg 360
 40 gtggggaaaa ggaagaaacg cggggttath ggcaccaatg gggctctcgt ggggtatcga 420
 cagagtgcac gccctgggac cgaaccaccg gtttatgaac aaaccgacca acaccgtgcg 480
 ttttattctg tcttttattt gccgtcatag cgggggttcc ttcgggtatt gtctccttcc 540
 gtgttatcct caatctgtat ctctcatcgt agagccaaac tcagcgcggg tgcaggcag 600
 caccagtga tgggctca gctctcagc cacatccagc atcacaggct ggttctaat 660
 45 atgthtacc ccacctcgc aggtctgca ctgggtgcgg gtctcatcgt acctcagac 720
 ctccagacc tccatggtca tgtcaaacac ccggtcagg ttcacctgg acatgctctc 780
 gggctcaagc aatattctag tgtgactcaa attgcatgg taaggttaga acacccccct 840
 cctgttacc aaatgcaagg aacagcgggt cagtatgtta tgcctaaaca ctggccagcc 900
 cttgcgagag tggctggcta cgtgaatggt ctccagcagg tgacagttgc cgtccgagca 960
 50 ggtcagcacc tgagaggccc tgtctctgca gttgccacat accatgttat gcttaatcac 1020
 agccacgctt ttcactagca tgaagcaacc acagtcggag gccacattgt ggcgcacct 1080
 ggggttacc tcagacagga taaccaaggt acactttca aagaggcatt tcttaattga 1140
 agcctgctt ttggggcgac acaccacccc ctccagcag cagtaaaagg cacagccccg 1200
 aaccttaca tgggtccagg ctccacaca ggtattglla aacctataga agcttacacc 1260
 55 gtgtaggata aggttgggat tggccaggaa accgtaacc ctanaattgg gcccagtaaa 1320
 ccttacattc ataataacca ccccgctaat gccaagcacc cccggccaca tctttatcat 1380
 gctacatcta aeggcacccc tatctctcgt atctatctcc acctcggccc cgttcccaga 1440
 aatgtagcaa caatctctga tatttacaag ttigtgtatc tigtacttgc aatctggcct 1500
 60 aagtgcaccc ttgtcatata cctcaatagc cctctcaaaa tcatccccg gctgcagcca 1560
 gtaagtgctg agctgctcta tggaaactt ctgcggcagc agatcaagct cattagcaca 1620
 atttctcttg atctgtgaa aagtaataca ctcaggcagg tgtctggtca ttaagctaaa 1680
 agctagatte cttagcctct ctgtagcttc acaaagcccc cgtctctctt ttacccccct 1740
 tagccccctg ccatctctct taattgtcaa aatggctctc agttctggat acagttcagc 1800
 caactgtaca acattctatc ccgagggtcc aggcgggctc tggggttcca tgggctctgc 1860
 65 tctgcccgcg gccgcctggc ttcctactgc tggctgctgt gctctccctg cggttatttc 1920
 gccgggcgga cggaaagaca cagttagcag cgatcttgtt gctctcaaac cgtctctcac 1980
 agatgcatgg ccagaaaatc cagcaggtac ccccgctca gatgggttcc ttcgctccat 2040

ES 2 309 578 T3

ttatccottta taaactcaa aaaaqcaaca gcagccgcag cgcgccccgg tgtgaaaaa 2100
 tccaaagtct tgatgacctt ctcttggaaa agcgcctggg gaccagatt caaagaatca 2160
 aacagctcac cacaggattt caaaagctct tcaaatccc ucttctaat cctcttaatt 2220
 ctgcagacta actttgcoctg ggatgagccc cacagaacc tccaaaacca agaggtactg 2280
 ttacagctct gttccagcaa gttacgtaca gcagaaaaat ctccaaaaca ctcccagcc 2340
 tccatgctcg accggtccct accgacgctg gtccgcctc ttataccca gtagaacgca 2400
 gctcagccaa tgaatgagt gccaatatgg tcccaatga cgtctatgg ctccagaaag gtagcttcc 2460
 cctltggctt gccctttcac tcccaatga cgtctatgg ctccagaaag gtagcttcc 2520
 atcctcagc tatgggaaag tcccgtttae aggtccgctt gccctagctt caatagccca 2580
 tngagctcaa tggtygcaae gtacatggcg ctctataaat ggcctgaaaa acccaatcac 2640
 tcaaccctac tgaacttatg caagtgccaa taatgggaaa aaccataga ctcccctct 2700
 attgacctt tctactgggc aaaaaccaat ggaagctccc tattgactca gtagactg 2760
 ctccaatgg actttctctg tgaltaccc claltgact tatgtactgg gcaaaacca 2820
 ttgcaagtc cctaactgact cagttatagg cggccgatac ttggcctcgg tggccgatga 2880
 cctcgagggg yggcccggtc cccggtggat gtggaatgg tggcagcca gaggccact 2940
 gtgtagccc aagtgcacg gggcctgcta aagcgcctgc tccagactgc cctggcaaaa 3000
 ggcctcccc taccggtag aatccgtacc caagattagc ccacggcca ttatatccc 3060
 tttaaagccc gcccaatta caagccatg caagltaac attatctac cctttattaa 3120
 acttatatca accctatcag caaaccaagg cgttlaacca acagcaatc acaggtttac 3180
 acctatggc ctggggctt tacagctcaa gtccaaaggt tgcaccgct cgttaagcaa 3240
 gctctcagat cactccacag cctggcgacg cccaccaact ctccagcca ctgglttaat 3300
 gggccacagc gggaccacgg ggtgtatctc aggaggtgtg ttagaagcag cggagtcaca 3360
 gctatccgta ctactatgc abctctaga caccggtgat gtcggcgtc ccaggtatgc 3420
 aggcgcatc ttaggacggc ggttaggtct tccagctcc aggtctgct cgggctcagg 3480
 ctcaggtlca gacacaggac ctttcaaaa actcaata caaatctct taaaaccaaa 3540
 actatgtaa attaaaaaa aaatlccac accaaacca ccaactctac acccactgc 3600
 cataatctt acttactgta gacaaactg ccacaggtcc tcatatagca aagcgaacac 3660
 ataatatct ggtccccgl attcctcgg tgataatgac aagacctgca accgtgccc 3720
 gggctctccc cataactaa cacaactcc tccactctt catctctgc tcaactggg 3780
 ggaagccag cctcgtggca ggttagatcg atcactccg ctacaagggt tggctagaa 3840
 accggaccac aggtctctg cctcggctgc tgggctacc gggaaaagtg aggcggctcc 3900
 yggagaccgg cgcggggcgg aaaaagtggt aagctaatcc cttcctgca cgcacaact 3960
 acagagctgg gaaaactcgc caaaacggct cctcgttgg gatctcggg gcccgctcag 4020
 cctaaatca acagttggc agggctggc ggttcaaat ggcctaggag tcccaagctc 4080
 tccagccgta cctctcagat cagctggtcc aaaaagctgg cggccattc ttccgtaata 4140
 acactccgt ggcagataat atgctctat ttcagctccg gttcggagc ggtccggag 4200
 agaaactct actcgtgct actcaagat gactcttga ggaactcac ggttataat 4260
 acactcacg tcaactcag ataaactcag aacggggag ccgactgccc accgtcgtc 4320
 cggagcctt cagaatcgg aacaccggc gggcaggaac agggcccaca ctaccgccc 4380
 acaccccgcc tcccgaccg ccccttccc gcgctgctc tggcgcgc ctgctgagca 4440
 gccctattt gccacagccc atcgcgctc gcgctgctc attgctccc ggcgtgta 4500
 gctcgcaggg gtaactagt gaactcggc ttcggttgt caagtcggc accgcccag 4560
 ccgcaagga ccttcccgc ttacggggc acgaggaag gtcgcccggg gcccacaag 4620
 ggtagcggc aagatccgg tgacgctgc aacggactg aagaatgtc gagaaccag 4680
 gtcggcggc ctgcttccc cggaaaccg cccagagcag ccgctccc ggcacaacc 4740
 agggctgct tggaaaggc gcaacccca ccattaata ctaatgcat ggcgtataac 4800
 ggttatccc agaatcagg gataacgca gaaagaacat ggtacggcag tttaaggtt 4860
 acacctata aagagagagc cgttatctc tgttltgga tgtacagag gatattatg 4920
 acacccggg gcaacggat gtagtccc gggccaglyc aggtctgctg ccagataaag 4980
 tccccglga actttaccgg gtagtgcata tgggggatga aagctgggc atgctgaca 5040
 ccgatatgg cagtgtcgc gttcccgtta tgggggaaga agggctgat ctccagccc 5100
 gcaaaaatga catcaaaaac gccattaacc tgatgtctc gggaaataa atgtcaggca 5160
 tgagattatc aaaaaggatc tccactaga ccttttcc gtgaaaagc agtccqaga 5220
 accgtgctg accccgagc aatgtcagct actgggtat ctggcaagg gaaaaccgca 5280
 ggcgaagag aaagcaggtc ccttgcagtg gcttaaatg gcatagcta gactggcgg 5340
 ttttatggc agcaagcga cccgaatgc cagctgggg gccctctggt aaggttggga 5400
 agcctgcaa eqcaactgg atgcttct cgcggccag gatctgatg gcaaggggat 5460
 caagctctc tcaagagaca gtagaggtt cgttctgcat gattgaacca gatggatgc 5520
 accaggttc tccggcggct tgggtgaga gctattcgg ctatgactg gcaaacaga 5580
 caatcggct cctgatgac gctgttcc gctgtcagc gcaagggcga ccggtctct 5640
 ttgtcaagc cgaactgtc ggtcccctga algaactgca agacagggca cgcggctat 5700
 cgtcgtgct caagacgggc gttccttgc cagctgtgt cagcgttct 5760
 gaagggactg gctcctattg ggcgaagtgc cggggcagga tctcctgta 5820

65

ES 2 309 578 T3

ctccctgcaga gaaagtatacc atccatggctg atgcaatggg ggggctgcac aagcttgata 5880
 cgggtacactg cccattccgac caccaagcga aacatccgat ccgagccagca cgtactccga 5940
 tggaaagccgg tcttctcgat caggatgata tggacgaaga gcatacaggg ctcgcccag 6000
 ccgaactgltt ccgacagctc aaggngagca tgcgccacgg ccgaggatctc ctccgtgacc 6060
 5 atggcgatgg ctgcttgcgg aatatacatgg tggaaaaatgg ccgcttctct ccatccatcg 6120
 actgttggccg gctgggtgtg ggggacccgt atcaggacat agcgttggct acccgtgata 6180
 ttgctgaaga gcttggcggc gaatgggctg accgcttccg cctgctctac ggtatccgg 6240
 ctcccgactc ccagccgata gctctctatc gcttcttga ccagttcttc tgaattatta 6300
 accgttccaa lttccctgatc cgglatcttc tccctaacga tctgtccggc atttccacac 6360
 10 gcaaacagat ggccttctc ggggaaatgt gcccggaaac cctattccct tctctctctc 6420
 aatcacattca aatcgtatc cgtctatgag accataaccc tcatcaatgc tcccaataca 6480
 ttgaaaaggg aagagtatga gtattcaaca tttccggtac gcccttattc cctcttttgc 6540
 ggcattttgc ctctctgtt ttgctcacc ttgggttacc cgaactggat ctcaaccggc gtaagatctc 6600
 15 agatccgttg ggtgcacgag aacgttcttc aatgatggc ccttttaaaq tctcgtatg 6720
 tggagccggtc ttatcccgta ttgacgccgg gcaagcgcaa ctccgtccgc gcatacactc 6780
 ttctcagaat gacttggctg agtacccacc agtccacaga aagcctctta cgyatggcat 6840
 gacagttaaa gacttatgca cgtctgccat aaccatcagt gataaccctg ccgccaactt 6900
 acttctgaca ccgatccgag gaccgaagga gctaacccgt cttttgcaca acatggggg 6960
 20 tcatgttaac ccgcttgalc gttgggaacc gtagctgat caagccatac caaanccgca 7020
 ccgtgacacc ccgatgctg tagcaatggc accaaccttg ccgaaactat taactggcg 7080
 actcttact ctactctcc ggaaccatt ggaaccatt aatagactgg atggagccgg ataaagtgc 7140
 aggaccactt ctggcctccg ccttccggc tqqctgctt atggctgata aactggagc 7200
 25 ccgtgagccg gggctcccg gtatcattgc agcactggg ccagatggtc agccctcccg 7260
 tatcgtagtt actacacga ccgggactca ggcactatg gatgaaccas atagacgat 7320
 ctactgagata ggtgctcac tgattacgca ttggtaactg ccagaccag ttaactata 7380
 taractttag attgatttae aacttcttt taatttaaa aggatctagg tgaagatct 7440
 ltttgataat cccatgacca aatccctta ccgtgagtt ccttctact gggcgtcaga 7500
 cccctgagaa aagatcaaaq gatcttctc agatctttt tttctggcg taatctgctg 7560
 30 ctgcaaaaca aaaaaaccac cgtaccagc ggtgcttct ttgcccgath ccagccctc 7620
 aactctttt ccgaggtaa ctggcttccg ccagccctag ataccaaata ctgtcttct 7680
 agtctagccg tagttaggcc accacttcaa gaactctgta ccaccgctc caaacctgc 7740
 tctctaatc cgtttaccag tggctactgc ccgtgggat aactcgtgt ttaccgggt 7800
 35 caacacagcc cgtatgctc ccgataaggg cagagggcgg ggcgcaagg ggggtccgg 7860
 caacacagcc agcttggagc caacgactg cccnqaactg agatacctac agcgtgagct 7920
 atgagaaagc gccacgctc ccgaaggag ccgaaggag aggtatccgg taagcggcg 7980
 ggtccgaaac ccagagccga ccagggagct tccagggga aacgcctggt atctctatg 8040
 tctctccggg ttccgccacc ctgacttga gctctgatt ttgtgatgct cgtccgggg 8100
 40 gccgagccta tggaaaaag ccagcaacc ggccttctc ccgttccgg gcttttctc 8160
 cccttctgct cacatgtct tctctggtt atccctgat tctgtggata accgtattac 8220
 cccttctgag ttagctgata ccgtcccg ccgcccagc accgagccca ccaggtcagt 8280
 gagccagga ggggaag 8297

- <210> 10
- <211> 7174
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Plásmido 25F

<400> 10
 55 agcgcaccaat acccaaaccc cctctccccc cgcgcttggcc gattcattaa tgcagctggc 60
 accgacaggtt tcccgactgg aaagcgggca gtgagcgcaa ccgaattaat gtgagttagc 120
 tcaactcatta ggcaccccag gctttacact tcatgcttcc ggctcgtatg ttgtgtgaa 180
 60 ttgtgagccg ataacaattt cacacaggaa acagctatga ccatgattac gccaagetca 240
 gaattaaccc tcaactaaag gactagtctc gcaggtttaa accaattcgc ccttaattct 300
 aagctccggga ctacgagatg ccccggggag aggagtgtta gtaaccgcca ccctgggtgg 360
 ggtccgcttg ttaagagggg ccgtgctaac gctgcaagag tcccttctca ccctggggcc 420
 ggtgctactg gaatcgatac ccgcatgatt gacagcctgg ccgaggatgt cacctgatgg 480
 65 tgataaagaag acacgggaga cttagtacgg ttccacaggg gtgacacgct tattgagtag 540
 gattacagag tataacatag agtataatat agagtataca atagtacgt gggatccgct 600

ES 2 309 578 T3

	aacagggtgaa	ccattttatac	agtctcacgt	ctcttttattg	catacgcctcc	gclaaatggt	660
	tcatttcgct	cattttgccag	taatacagca	gatttcgcaa	ctcactgaac	caatcttctg	720
	tataaaaatg	tacggcgtgc	gtgtccaaal	caacatcaat	tttctcata	tacagacagg	780
	ggctgccacc	cgcctccccc	aagcgcgaca	cngcaattag	gaatggtagc	ctgctgtgca	840
5	ggtccacgltg	aattaacatc	ccgcacacgt	tcccgatcgg	tgcctgcata	aatactggag	900
	agaaatcgct	aaaccocggg	gacgccaca	tagccacgaa	gtacacocct	gouacatlca	960
	acgcatcctc	caacctggcc	caaacataag	tggccaatc	gaaaggagcc	aggtggcaag	1020
	ccgataaccc	catacagatgc	naaggtaacc	cgtggcaagc	gcataccccc	aaatgaagtc	1080
	cgaaagaatc	gtaacacagt	agctgatagg	catgaagcgg	cgtcggcacc	tgaagacccg	1140
10	catacatctc	ccogtcttcc	atgltcatcc	caacttctcc	ccogcctccc	gcttcccgta	1200
	ggcggcgcctg	ctgggtgctgc	agcaccatct	ccaggatctg	ctogtctgtc	actttaatcc	1260
	ggactcgaga	aaggcccgga	gatgaggaag	aggagaacag	cggggcagac	gtgctgtttt	1320
	gaagcgtgcg	agaatgccgg	gcctccggag	gaccttcggg	cgcccgcccc	ccocctgagc	1380
	ccgcccctga	gccccccccc	ggacccaccc	cttcccagcc	tctgagcccc	gaaagcgaag	1440
15	gagcaaaagt	gctattggcc	gctgccccaa	agcctaccc	gcttccattg	ctcagcggtg	1500
	ctgccarct	gcacgagact	agtgagacgt	ytacttccca	tttgtcacgt	cctgcacgac	1560
	gcgagctgcg	ggggcggggg	gaacttctctg	actaggggag	gagtagaagg	tggcgggaag	1620
	ggcccaccaa	agaaccggagc	cgtttggccc	ctacccggtg	atgtggaatg	tgtgagaggc	1680
	cagaggccac	tgtgttagcg	ccaagtgcac	gcccggcctgc	taaagcgcac	gctccagact	1740
20	gccttgggaa	aaggcctccc	cctaccocgt	agaattcccg	gcctcgacgg	cctcgggtgg	1800
	cagtctagtc	aataatcaat	gtccgagctc	gaatacactc	ccttatcgtc	acctgactgg	1860
	gtcatggctg	cgcoccgaca	cccgcacaac	ccocgtgacg	cgcctcgacg	gcctgtctctg	1920
	ctcccggcat	ccgcttacag	acaagctgtg	accgtctccg	ggagctgcac	gtctcagagg	1980
25	tttccaccgt	catcaccgaa	acgcgcgagg	cagccggatc	ataatcagcc	ataccacatt	2040
	tgttagaggt	ttacttgcct	taaaaacct	cccacacctc	ccoclgaac	tgaaacataa	2100
	aatgaatgca	attgttgttg	ttaaacttgt	tattgcaact	tataatgggt	acaaataaag	2160
	caatagcatc	acaaatttca	caataaaagc	atttttttca	ctgcattcta	gttgggggtt	2220
	gtccaaactc	atcaatglat	cttatcatgt	ctggatcgaa	gctctagagc	ggccaacttc	2280
	agggatgggt	tacagagaat	ggtaggggtg	gtgcccagac	ccgagtcccc	ccgagtcacc	2340
30	acgttaggcag	gtttccatga	caccocagct	tgcaccaatc	tggagagaat	ggggatttct	2400
	gggttcattt	ctctcggggg	cggggctalc	ccggccgaga	gtcalacacc	aaatttctgt	2460
	agaaaaocga	tttttgccag	tcttgatggc	adaaacttcc	ggagtttgg	taaaaaatcg	2520
	gctgaagaa	gcttctggaa	gtgttctttt	caatctttt	tgtgtanaaa	ctccagtggt	2580
35	caggagocga	tattgtccgg	ggctttgat	qgtggggc	ccacagagac	cccatagccc	2640
	agggaccccc	actccgcgag	ggacatggat	cttcagtgctg	cttagcccca	tcttcagggc	2700
	atgcacggaa	ccaatgggga	agcccaggtc	ccccacgtgg	gttatgccgt	gggggagggg	2760
	atccaggtat	tccctggcca	cccaatcagg	aaccgcgaac	gcgccacgga	ccgcctctcc	2820
	catcataatg	agggcctcac	tgggggtctt	gggttcccg	gagcccccc	taatggtaac	2880
40	gtggataatg	cgttggggac	cctcgtagtc	tgggaagatt	gcctttctcc	coatggacac	2940
	tagggggcctg	aatgagttat	cccgcagttg	ctcgcgggtc	aggttagggt	taaaaatcag	3000
	gccggtggtc	accatttctc	taagcctagt	ggtgggatcc	cgtggctag	ggtccacagg	3060
	gaccaccgaa	gtaaaggaaa	tggctcccc	gtagtatgga	aggtccccag	ggacatggc	3120
	gaatgggttg	ggggccatag	ctgtagaatg	tacagggggg	tctcgagaac	gagggagccg	3180
45	actgocgaoc	tggcctccgg	agccttgcag	aatgcggaac	accgcgcggg	cagggaacagg	3240
	gcccacacta	ccgccccaca	ccccgcctcc	cgcaaccgccc	cttcccggcc	gctgctctcg	3300
	gcgcccocctg	ctgagcagcc	gctattggcc	acagcccacc	gcgctcggcg	cgtgccatt	3360
	gctccctggc	gctgtccgtc	tgcgagggta	ctagtgcagc	gtgccccttc	cgttcgtcac	3420
	gtccggcacc	ccgcgaaccg	caaggaaacct	tcccgactta	ggggcggacc	aggaagcgtc	3480
50	gcgggggggc	ccacaagggt	agcggcgaag	atcccgggtg	cgtgcgaa	ggagctgaag	3540
	aatgtccgag	accacgggtc	ggcgcgcgtg	cgtttccggg	aaccacgccc	agagcagccg	3600
	cgtccctcgg	caaacccagg	gctgcttgg	aaaaggcgca	accccacaac	ttaataacta	3660
	atgcattggc	gtaatacggg	tctccacaga	atcaggggat	aaccgaggaa	agaacatggt	3720
	acggcagttt	aaggtttaca	cctataaaag	agagagccgt	tatcgtctgt	tgtggatggt	3780
55	acagagtgat	atttattgaca	cgccggggcg	acggatgggtg	atccccctgg	ccagtgcacg	3840
	tctgctgtca	gataaagctc	ccogtgaact	ttaccocggtg	gtgcatactg	gggatgaaag	3900
	ctggcgcctg	atgaccaccg	atatggccag	tgtgcccgtc	tccgttatcg	gggaagaagt	3960
	ggctgatctc	agccaccggc	aaaatgacat	caaaacgccc	atbaacctga	tgttctgggg	4020
	aatacaaatg	tccaggeatga	gattatcaaa	aaggatcttc	acctagatcc	tttccacgta	4080
60	gaaagccagt	ccgcagaaac	ggtgctgacc	ccggatgaat	gtcagctact	ggcctatctg	4140
	gacaagggaa	aacgcaagcg	caaagagaaa	gcaggtagct	tgcagtgggc	ttacatggcg	4200
	atagctlagac	tggggcggttt	tatggacagc	aagcgaaccg	gaattgccag	ctggggcggc	4260
	ctctggtaag	gttgggaagc	cctgcaaaagt	aaactggatg	gctttctcgc	cgccaaggat	4320
65	ctgatggcgc	aggggatcaa	gctctgatca	agagacagga	tgaggatcgt	ttcgcattgat	4380

ES 2 309 578 T3

5 tgacaagat ggattgcacg caggttctcc ggcgcttg gtggagaggc tattcggcta 4440
 tgactgggca caacagacaa tgggtgctc tgatgccgcc gtgttcggc tgtcagcga 4500
 gggggcccg gttctttttg tcaagaccga cctgcccggg gccctgaatg aactgcaaga 4560
 cgaggcagcy cggclatcgt ggcctggccac gacggggcgt ccttggcgag ctgtgctcga 4620
 cgttgtcact gaagcgggaa gggactggct gctattgggc gaagtgcggy ggcaggatct 4680
 cctgtcatct caccttctc ctgccgagaa agtatccalc atggctgatg caatgcqcg 4740
 gctgcatacg ettgatccgy ctacctgccc attccaccac caagcgaaac atcgcatoga 4800
 qcagagcagt actcggatgy aagccggctc tgtcgatcag gatgatctgg acgaagagca 4860
 10 tcaggggctc ggcaccagcy aactgttcgc caggctcaag gcgagcatgc ccgacggcga 4920
 ggatctcgtc gtgacccatg gcgatgootg ctggccgaat atctgggtgg aaatggccg 4980
 ctctctcggg ttcactgact gtggccggct ggggtggcgy gaccgctatc aggacatagc 5040
 gtggctacc cgtgatattg ctgaagagct tggggcgaa tggctgacc gcttctctct 5100
 15 cctttaccgt atcgccctc ccgattcgca ggcctcgc tctctatgcc ctcttgaga 5160
 gttctctga attattaacg cttacaatct cctgatggc tttttctcc ttaccatct 5220
 gttgggtatt tcacaccgca tacagggtgg acttttcggg gaaalgtgc cgaacccct 5280
 atttgtttat tttctaat acattcaat atgtatccg teatgagaca aaaccctga 5340
 20 laaalgtctc aataatattg aaaaaggaaq agtatgagta tcaacatct cctgtctcgc 5400
 ctctctccct tttttgggc attttgcct cctgtttttg ctaccaccga aagcctggg 5460
 aaagtaaaag atgctgaaga tcagttgggt gcacgagtg gttacatcga actggatctc 5520
 aacagcggta agatcctga gattttcgc ccgaagaac gttttccat gatgagcact 5580
 tttaaagttc tgcatalggy ccgggtatta tcccgattg acgcccggca agagcaactc 5640
 25 ggtcgcgcga tacactatc tcagaatgac tgggtgagt acaccaccgt cacagaaaag 5700
 catcttacgy atggcatgac agtaagagaa ttatgcagty ctgccataac catgagtgal 5760
 aacactgcgy ccaacttact tctgacaacg atcggaggac cgaaggagct aacccgttt 5820
 ttgcacaaca tgggggatca tgyaacctgc cttgatcgtt ggaaccgga gctgaatgaa 5880
 30 gccataccaa acgacgagcy tgacaccacg atgctgtag caatggcaac aacgtgcgc 5940
 aaactattaa ctggcgaact acctactctc gcttccggc acaatlaat agactggatg 6000
 gagcgggata aagttgcag accactctc cgtccggcc tccggctgg ctggtttat 6060
 gctgataaat ctggagccgy tgagcgtggg tctcgcgta tcaatgcagc actggggcca 6120
 gatggtaaac cctcccgat ctgagtatc tacacgaggy ggagtccggc aactatgat 6180
 35 gaacgaaata gacagatcgc tgagataggt gctcactga ttaagcattg gtaactgtc 6240
 gaccaagttt actcatabat actttagatt gatttaaac ttcattttta atttaaaagg 6300
 atctaggtga agatccttt tgataatctc atgaccaaaa tccctaacg tgaattctc 6360
 tccactggc cgtcagacc cgtagaagay atcaaaaggat cctcttgagc tcccttttt 6420
 40 ctgcccgtaa tctgctgctt gcaaacaaaa aaaccaccgc taccagcggg ggtttggtt 6480
 ccggatcaag agctaccac tctttttccg aaggttaactg gcttcagcag agcgcagata 6540
 ccaataactg tcttctagat gtagccgtag ttaggccacc acttcaagaa ctctgtagca 6600
 ccgctacat acctcgtct gctaactctg ttaccagtgy ctctgccag tggcgataag 6660
 tctgtctta ccgggttggg ctcaagacga tagttaccgy ataaggcga gccgtcgggc 6720
 45 tgaacggggg gttcgtgcac acagcccagc ttggagcgaa cgaactcac cgaactgaga 6780
 tactacagc gtagatag agaaagcgc acgcttccc aaggagaaa ggcgacag 6840
 tatccggtaa gggcagggc cgaacagga gagcgcaaga gggagcttc aggggaaac 6900
 gctcggatc tttatagtc tgtcgggtt ogccacctct gacttgagcy tcatTTTTT 6960
 50 tgatgctcgt cagggggcg ggcctatgy aaaaacgcca gcaacgggc ctttttacgy 7020
 ttctgggt tttgctggc tttgtcac atgttcttc ctgcttate cctgattct 7080
 gtggataacc gtattaccg ctttgagtga gctgataccg ctccgcgag ccgaacgacc 7140
 gagcgcagc agtcagtga cgaagagcg gaag

- 55 <210> 11
- <211> 27
- <212> ADN
- 60 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador V206
- 65

ES 2 309 578 T3

<400> 11

aacctcgaga cccccctgta cattota

5

27

<210> 12

<211> 27

10 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador V207

<400> 12

gocgttaact tcagggattg gttacag

20

27

<210> 13

25 <211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador V208

<400> 13

35

cacctcgagt ccggattaag atgaacg

27

40 <210> 14

<211> 28

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

45

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador V209

50 <400> 14

ccaqtaaca ggtgaaccat tlatacag

55

28

<210> 15

<211> 21

60 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

65 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador RT

ES 2 309 578 T3

<400> 15		
5	gcctttgaga gttactcttt g	21
	<210> 16	
	<211> 23	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador ADNc 1	
	<400> 16	
20	aaacactgta cggcaccgcg att	23
	<210> 17	
25	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador ADNc 2	
	<400> 17	
35	gcctttgaga gttactcttt g	21
40	<210> 18	
	<211> 8681	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Plásmido 60E	
50		
55		
60		
65		

ES 2 309 578 T3

<400> 18

5 agcgcaccaat acgcaaaaccg cctctccccg cgcggttggcc gactcattaa tgcagctggc 60
 acgacaggtt tcccgactgg aaagcgggca gtgagcgcaa cgcaattaat gtaggttagc 120
 tcactcakte ggcaccccag gccttacact ttatgcttcc ggctcgtatg ttgtgtggaa 180
 ttgtgagcgg alaacaattt cacacaggaa acagctatga ccatgattac gccaaagctca 240
 gaalteaacc tcactaaagg gactagtcct gcaggtttct agtccctqag gtttaaacga 300
 attcgcctt aatcttaagc tgcggccccg acggttggctg cgagccctgg gccttcaccc 360
 10 gaacttgggg ggtggggtgg ggaaaaggaa gaaaacgggg cgtattggcc ccaatggggc 420
 ctgggtgggg tatcgacaga gtgccagccc tgggaccgaa ccccgcgttt atgsacaaac 480
 gacccaacac cgtgcglttt attctgtctt ttatttggcg tcatagcggg ggttctctcc 540
 ggtattgtct ccttcctgtt tatcctcaat ctgtatcttc atcgctagag ccaaaactcag 600
 15 cgggggtgca ggccagcacc aagtgatcgg gcctcagctc ctcggtcaca tccagcatca 660
 caggctggtt cctaataatg ttaccggcac actcgcaggg tctgcacctg gtgcgggtct 720
 catcgtacct cagcaacctc cagatcttca tggctatgtc aaacaccccg ttcaggttca 780
 ccttgacat gctctcgggc tcaagcaata tcttagtgtg actcaaatg cattsqtaag 840
 20 gtaggaacac cccctcctg ttacccaaat gcaaggaaca gggggtcagt atgttatgct 900
 caaacactgg ccaggccttg cgagagtggc tggctacgtg aatggctctc agcaggtgac 960
 agtgcgcgtc ctagcagctc agcatctgag aggcctcttc ctgcagttg ccacatacca 1020
 tgttaacccc aatcacagct acgctctcca ctagcatgaa gcaaccacag tccgagggca 1080
 25 cattgtggcg caccctggag ttaccctcag acaggatacc caaggtacac ctctcaaaaga 1140
 ggcatttctt aattgaagcc ctgcttttgg ggcgacacac caccctctc cagcagcagt 1200
 aaaaggcaca gccccgaacc ctlacatcgg tccaggcttc cacacaggtc ttgttaaac 1260
 catagaagct tacaccgtgt aggataaggt tggatttggc caggaaaacc gtaccgctaa 1320
 aattggggcc agtaaacctt acattcataa taaccacccc gtccatgcca agcacccccg 1380
 30 gccacalatt tatcatgcta catctaaagg ccacctatc ctccgtatct atctccacct 1440
 cggccccgtt ccagaaatg tagcaacaat tctgtatatt tacaagttg ctgatcttgt 1500
 acttgcaatc tggcctaagt gccacctttg catataacct aatagcctcc tcaaaatcat 1560
 cccctggctg cagccagtta gtggtcagct gctctatgga atacttctgc gccagcagat 1620
 35 caagctcatt agcgcaatta tccctgactt gttgaaaagt aatacactca ggacggtgtc 1680
 tggtcattaa gctaaaagct agattcctag cctcctctgt agcctcaca gcccccggct 1740
 cctcttttac ccccttttag cctgccccat cctctgtaat tgtcaaatg cgtctcagtt 1800
 ctggatcacg ttragccacc tgtacaacat tcatccoga ggytccaggc cggctctcgg 1860
 40 gttccatggg ctctgtctct gcggccggcg cctggtcttc tctgctgct gctgctgctc 1920
 ctccgtcggg attatcggcg ggcggaacga agacaacagt agcagggcat tcttgtgtct 1980
 cacaaccgct ctccacagat gcatggccag aaaatccagc aggtacccc cgtcagatg 2040
 ggtttcttcg ctccatttat cctttataaa actcaaaaaa gcaacagcag ccgcagcgcg 2100
 ccccggtgtg gaaaaatcca aagtcttgat gaccttctct tggaaaagcg cctggtgacc 2160
 45 cegattcaaa gaatcaaaaca gctcaccaca ggatttcaaa agctcttcaa attcccactt 2220
 gtaatcctcc ttaattctgc agactaactt tgcctgggat gagccccaca gaaacctcca 2280
 aaaccaagag gtactgttag agctctgttc cagcaagtta cgcacagcag aaaaatcttc 2340
 caaacactcc caagcctcca tgotcgagat ccttctctct cgggcggtg tggaccaccg 2400
 50 cctcgcctct ctccggaaaa aaaaaatgaa ataaacaaca aaaccgaaca aaagcgaaac 2460
 gccacggatg gagcgcaaaa cctctctoga agttctgcga ctgcacacag acagtcaaat 2520
 ggagcagagc caggcgagcg accgcccag cgcagtagc ggcaggtct ggggaagaga 2580
 ggcgcaggtc aacgatctga gtccgctagc gatctcgggc acgctgttga ngctgttaag 2640
 55 cgggtcctg cagggtcgt cggatctga ggccacacgc gtcacctaa tatgcgaagt 2700
 ggacctggga ccgcgcgcgc ccgactgat ctgcggttgc gaattcgcca atgacaagac 2760
 gctgggctgg gtttgtgtca tcatagaact aaagacatgc aatatattt ctccggggga 2820

60

65

ES 2 309 578 T3

	caacgctagc	aaacgogagc	aacggggcac	ggggatgaag	cagctgcgcc	act.cctgaa	2880
	gclcctgcag	tccctcgggc	ctccgggtga	caagatagtg	tacctgtgcc	ccgt.cctggt	2940
	gtttgtcgcc	caacggagcg	tcogcgtcag	ccgctgacc	ggcctcgtcc	cgcagaaggt	3000
	ctccgtaat	atcaccgcag	tcgtcgggat	gctccagagc	ctgtccacgt	atacgggtccc	3060
5	cattgagcct	aggaccccagc	gagcccgtcg	ccgcccgggc	ggcgcgcgcc	gggggtctgc	3120
	gagcagaccg	aaaaggtcac	actctggggc	ggcggaccoc	cccgagtcag	ggcccggcca	3180
	gttaccaccc	ggcgaccaaa	cccccaacct	cacggagggc	gggggggtgc	ttangaggat	3240
	cgggggcctc	ttctcggctgc	ccgtggccac	caagaccaaa	cccgagcccg	cctccgaatg	3300
	agagtgcttc	gttccctccc	cctcccoccg	cgtcagacaa	accctaacca	ccgcttaagc	3360
10	ggcccccgcg	aggtccgaag	actcatttgg	atccactaga	aaagatttcg	taaccaagat	3420
	tagcccacgg	cgatttatat	accctttaag	ccccgcccc	cttaacacgc	catgcaagtt	3480
	aaacattatc	tcacccctta	ttaaacttac	atcaactcat	tcagcaaaac	aaggcgttaa	3540
	ccacacacgc	aatccacaggt	ttacacctta	tggcctgggg	cgcttacagc	tcaagtccaa	3600
	aggttgccca	ggctcgttaa	gcaagtcctc	gatcacattcc	acagcctggc	gacgcccacc	3660
15	aaactctcag	gcaactggtt	taatggggca	cagcgggacc	accgggtgta	tcctaggagg	3720
	tgtgttagaa	ggaccggagt	ccagctatc	cgtactacta	tigcattctc	tagacacagg	3780
	tgatgtccgg	cgctcagga	tagcaggcgc	cattttagga	cgccgggtag	gtcttgcaag	3840
	ctccggttct	ggctcgggct	caggtccagg	tlcagacaca	ggacctttta	aaaaaatcac	3900
	aatacaaaat	tctttaaac	acaaaactgt	aaaaattaaa	aaaaaaatta	ccacaccaaa	3960
20	ccaccaccctc	tatcaccacc	tgcaccataat	tttcaacttac	lgtagacaaa	catgcccacag	4020
	gtctccatct	agcaaaagcga	acacataata	tctgggtccc	ccgtatctct	ccggtgataa	4080
	tgacaagacc	tgcacccgtg	cccggggctc	tcacataaat	ctaacacaaa	ccctccacc	4140
	tcttcctcct	cgtcgtcact	gggtggaaag	ccagcctcgt	ggcaggtlaag	ctcgatcac	4200
	tcgggtacaa	ggcttggcat	agaaaccgga	cccaagctc	tctgctccgg	ctgctcgggc	4260
25	lgccgggaaa	ggcgaggcgg	ctccggagaa	ccgggcgcgc	ggggaaaagt	gagtaagtca	4320
	atcccttctc	gcaccgccaa	cattacagag	tgggaaaaaa	tctgcgaaac	cgctccctcg	4380
	ttgggatctt	cgggggccgt	cacgtctaaa	tcatacagtt	cgltgaagggt	aggtggttca	4440
	aatggctag	ggggtggaag	attatcacgc	agtaacctct	cgatcagctg	gtccaaaaga	4500
	ctggcgycca	ttctctgggt	aataacacc	ccgtggcaga	taatatgtct	cattctcagt	4560
30	ccgggtctcg	gagcggctcg	gaggagaaaa	ctctactcgc	tggcactcaa	gagtgccctc	4620
	ttgaggaaact	caccgggtat	aaatacacta	cacgtcagct	gactataact	cgagaacgag	4680
	ggagccgact	ggcgacgtgc	gctccggagg	cttgcaaat	ggggaacacc	ggcggggcag	4740
	gaacagggcc	ccactacccg	ccccacacc	cgctccgc	accgcccctt	cccggccgct	4800
	gctctccggc	ggccctgctg	ggcagccgct	attggccaca	ggccatcgcg	gtccggcgcc	4860
35	tgccattgct	cccggccgct	gtccgtctcg	gagggtaact	gtgagaactg	cggttccgt	4920
	ttgtccacgt	cgccagcccg	cgaaccgca	ggcaacttcc	cgacttaggg	ggcagcagg	4980
	aagcgtccgc	ggggggccca	caagggtagc	ggcaagatc	cggttgango	tgcgaaagg	5040
	cgtgaagaat	gtggagagcc	caagggtggc	ggcgtgctg	ttcccggaa	cacgcccaga	5100
40	gcagcccgct	ccctgggcac	accagggct	gccttggaaa	agggcgaacc	ccaaccatte	5160
	ataactaatg	catggcggta	ataccggtat	ccacagaatc	aggggataac	gcaggaaaga	5220
	acatggtacg	gcagtttaaag	gtttacacct	ataaaagaga	gagccggtat	cgctcgtttg	5280
	tgatgtaca	gagtgatatt	attgacacgc	cggggcgacg	gatgggtgatc	ccctcgcca	5340
	gtgcacgtct	gctgtcagat	aaagtctccc	gtgaacttta	cccgggtggtg	cabatcggg	5400
45	atgaaagctg	ggcgtatgatg	accaccgata	tggccagtg	ggcggctccc	gttatcgggg	5460
	aagaagtgcc	tgatctcagc	caccgcgaaa	atgacatcaa	aaacgccatt	aacctgatgt	5520
	tctggggaat	ataaatgtca	ggcatgagat	tatcaaaaag	gatcttcacc	tagatccttt	5580
	tcacgtagaa	agccagtcgc	cagaaaccgt	gctgaccccg	gatgaatgtc	agctactggg	5640
	ctatctggac	aaqggaaaac	gcaagccgca	agagaaagca	ggtagcttgc	agtgggctta	5700
50	catggcgata	gctagactgg	gggttttat	ggacagcaag	cgaaaccgaa	ttgcccagctg	5760
	ggcgccctc	tggtaagggtt	gggaagccct	gcaagtaaa	ctggatggct	ttctcgcgc	5820
	caaggatctg	atggcgcagg	ggatcaagct	ctgatcaaga	gacaggatga	ggatcgtttc	5880
	gcatgattga	acaagatgga	ttgcacgcag	gttctccggc	cgcttgggtg	gagaggetat	5940
	tcggctatga	ctgggcacaa	cagacaatcg	gctgctctga	tggccgcctg	ttccggctgt	6000
55	cagcgcaggg	ggcccgggtt	ctttttgtca	agaccgacct	gtccggtgcc	ctgaatgaac	6060
	tgcaagacga	ggcagcgcgg	ctatcgtggc	tggccacgac	ggcgttccct	tggcagctg	6120
	tgctcagcgt	tgtcactgaa	gggggaagg	actggctgct	attgggggaa	gtcccggggc	6180
	aggatctcct	gtcactctac	cttgcctcctg	ccgagaaagt	atccatcatg	gctgatgaa	6240
	tgcggccct	gcatacgtt	cgtccgcta	cccgccatt	cgaccaccaa	gcgaaacatc	6300
60	gcactcagcg	agcacgtact	cggttggaa	ccggtcttctg	cgatcaggat	gatctggacg	6360
	aaagacatca	ggggctcggc	ccagccgaac	tgttcggccag	gctcaaggcg	agcatgcccg	6420
	acggcgaqga	tctcgtcgtg	accatggcg	atgctcgtt	ggcgaatata	atggtggaaa	6480
	atggccgctt	ttctgqatc	atcgactgtg	ggcggctggg	tgtggcggac	cgctatcagg	6540
65	acatagcgtt	ggctaccctg	gatattcctg	aagagcttgg	ggcgaatgg	gctgaccctc	6600

ES 2 309 578 T3

```

1  tccctcgtgct ttaecgtatc gccgctcccg attcgcagcg catcgccttc tatcgccttc 6660
2  ttgacgagtt cttctgaatt attaacgctt acaatttctt gatcgggtat tttctcctta 6720
3  cgcactctgtg cggatattca caccgcatac aggtggcact tttcggggaa atgtgcggcg 6780
5  aacccctatt tgtttatctt tctaaataca ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata 6840
6  accctgataa atgcttcaat aatattgaaa aaggaagagt atgagtatc aacatttccg 6900
7  tgtcgccttt attccctttt ttgcccatt ttgccttctt gtttttgcct accagaaaac 6960
8  gctggtgaaa gtaaaagatg ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact 7020
10 ggatctcaac agcggtaaga tctttgagag ttttcgcccc gaagaacggt ttccaatgat 7080
11 gagcactttt aaagttctgc tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga 7140
12 ccaactcggc cccgcatac actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagctac 7200
13 aqaaaagcat cttacggatg gcctgacagt aagagaatta tgcagtgctg ccataaccat 7260
14 gagtgataac actcgggcca acttacttct gacaacgatc ggaggaccca agtagctaac 7320
15 cgttttttg cacaacatgg gggatcatgt aactcgcctt gatcgttggg aaccgcgct 7380
16 gattgaaagg atacaaaacg acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac 7440
17 gttgcgcaaa ctattaactg gcgaactact tactctagct tcccgcaac cattaataga 7500
18 ctggatggag gggataaag ttgcaggacc actctctgct tgggctctc cggctggctg 7560
20 gtttattgct gataaatctg gacccggtga gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact 7620
21 ggggcccagat ggtaaagcct cccgtatcgt agttatctac accacgggga gtcaggcaac 7680
22 tatggatgaa cgaatagac agatcgcrga gatagggtgc ccactgatta agcattggta 7740
23 actgtcagac caagtttact catatatact ttgattgat ttaaaacttc atttttaatt 7800
24 taaaaggatc taggtgaaga tcccttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacctga 7860
25 gttttcgttc cactgagcgt cagaccctgt agaaaagatc aaaggatctt ctgagatcc 7920
26 tttttttctg cgcgtaactc gctgcttgc acaaaaaaaa ccaccgctac cagcgggtgt 7980
27 ttgtttgccg gatcaagagc taccaactct ttttcggaag gtaactggtc tcagcagagc 8040
28 gcagatacca aatactgtcc ttctagtqta gccgtagtta ggcaccact tcagaactc 8100
30 tgtagcaccg cctacatacc tctctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgcccagtg 8160
31 cgataagtcg tgtcttaccc ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg 8220
32 gtcgggctga accgggggtt cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga cctacaccga 8280
33 actgagatac ctacagcgtg agctatgaga aagcgcacag ctcccggaag ggagaaggc 8340
34 ggacaggtat ccggtzagcg gcagggctcg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg 8400
35 gggaaacgcc tggtatcttt atagtcctgt cgggtttcgc cactctgac ttgagcgtg 8460
36 atttttgtga tgcctctcag gggggcggag cctatggaaa aacgccagca accgcgctt 8520
37 tttacggttc ctgggctttt gctggccttt tctcacaatg ttctttctg cgttatcccc 8580
38 tpatctctgg gataaccgta ttaccgctt tgaatgagct gataccgctc gcgcagccg 8640
40 aacgaccgag cgcagcaggt cagtgagcga ggaagccgaa g 8681

```

<210> 19

45 <211> 5428

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

50 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Plásmido 36E

55

60

65

ES 2 309 578 T3

<400> 19

5 tcttcgctt cctcgtcac tgactogctg cgtcggctcg ttccggtgcg gcgagcggta 60
 tcagctcact caaaggcggg aatacggtta tccacagaat caggggataa cgcaggaaag 120
 aacatgtgag caaaaggcca gcaaaagccc aggaaccgta aaaaggcccg gttgctggcg 180
 tttttccata ggctccgccc cctgacgag catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg 240
 tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg 300
 10 cgtctcctg ttccgacct gccgcttacc ggatacctgt ccgcctttct cccttcggga 360
 agcgtggcgc tttctcatag ctccagctgt aggtatctca gttcgggtga cgtcgttcgc 420
 tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc gttcagcccg accgctgcgc cttatccggg 480
 aactatcgtc ttgagtccaa cccggtaaga cagcacttat cgcactcggc agcagccact 540
 ggtaacagga ttgacgagc gaggatgta ggcggtgcta cagagttctt gaagtggtag 600
 15 cctaaactag gctacactag aaggacagta ttgggtatct gcgctctgct gaagccagtt 660
 accttcggaa aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg 720
 ggtttttttg ttgcaagca gcagattacg ccagaaaaaa aaggatctca agaagatcct 780
 ttgatctttt ctacggggtc tgacgctcag tggaaagaaa actcagctta agggatcttg 840
 20 ytcagagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa atgaagtttt 900
 aaatcaatct aaagtatata tgagtaaaact tggctgaca gttaccaaug ctlaatcagt 960
 gaggcacctt tctcagcgat ctgtctattt cgttcaccca tagttgctg actccccgic 1020

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 309 578 T3

gtgtagataa ctacgatacg ggagggotta ccatctggcc ccagtgtctgc aatgataccg 1080
 cgagaccac gctcaccggc tccagattta tcagcaataa accagccagc cggaagggcc 1140
 gagcgcagaa gtggtcctgc aactttatcc gcctccatcc agtctattaa ttgttgccgg 1200
 5 gaagctagag taagtagttc gccagttaat agtttgcgca acgttgttgc cattgtaca 1260
 ggcatcgtgg tgtcacgctc gtcgtttggt atggctcat tcagctccgg tcccaacga 1320
 tcaagggcag ttacatgate ccccatgttg tgcaaaaaag cggtagctc cttcggctct 1380
 ccgatcgttg tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac tcatggttat ggcagcactg 1440
 caaattctc ttaactgtcat gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca 1500
 10 accaagtcat tctgagaata gtgtatcggg cgaccgagtt gctcttgccc ggcgtcaata 1560
 cgggataata ccgcgccaca taqcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct 1620
 tggggggcga aactctcaag gatcttaccg ctggtgagac ccagttcgat gtaaccact 1680
 cgtgcaccca agcatcttt agctttacca cgtttctgg gtggtcaaaa 1740
 acaggaagge aaaaagccgc aaaaaaggga ataagggcga cacggaaatg ttgaatactc 1800
 15 aactcttcc ttttcaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct catgagcggc 1860
 tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac atttcccga 1920
 aaagtgccac ctgtatcggg tgtgaaatac cgcacagatg cgttaaggaga aataaccgca 1980
 tcaggaatt gttagcgtta ataattcaga agaactcgtc aagaaggcga tagaaggcga 2040
 20 tgcgctgcga atcgggagcg gcgataccgt aaagcacgag gaagcggta gccattcgc 2100
 cgccagctc ttcagcaata tcacgggtag caaacgctat gtcctgatag cggctccgca 2160
 ccccagccg ccacacgtcg atgaatccag aaaagcggcc atttccacc atgatattcg 2220
 gcaagcagge atcgccatgg gtcacgacga gatcctcgcg gtcgggcagc atcgccttga 2280
 gcctggcgaa cagtccgct ggccgcgagcc cctgatgctc ttcgtccaga tcatcctgat 2340
 25 cgacaagacc ggctccatc cgagtacgtg ctcgctcgat gcgatgtttc gcttgggtgt 2400
 cgaatgggca ggtagccgga tcaagcgtat gcagccgcgg cattgcatca gccatgatgg 2460
 aactttctc ggcaggagca aggtgagatg acaggagatc ctgcccggc acttcgcca 2520
 atagcagcca gtccctccc gcttcagtga caacgtcgag cctcgtctg cagttcattc agggcaccgg 2580
 ccgtcgtggc cagccacgat agccgcgctg cctcgtctg cagttcattc agggcaccgg 2640
 30 acaggtcggc cttgacaaaa agaaccgggc gccctcgcg tgacagccgg taagtgaaaga 2700
 catcagagca gccgatgtc tgttgtgccc agtcatagcc gaatagcctc tccaccsaag 2760
 cggccggaga acctggtgc aatccatctt gttcaatcat gcgaaacgat cctcatcctg 2820
 tctcttgatc agagcttgat cccctgcgcc atcagatcct tggcggcgag aaagccatcc 2880
 agtttacttt gcagggcttc ccaaccttac cagagggcgc cccagctggc aattccggtt 2940
 35 cgcttctgtt ccataaaaac gcccagctca gctatcgcca tctaagccca ctgcaagctc 3000
 ccttgccttc ccttgcctt gcccttccc gcttccagat agcccagtag ctgacattca 3060
 tccggggtea gcaccgtttc tgccgactgg ctttctacgt gaaaaggatc taagtgaaaga 3120
 tcccttttga taatctcatg cctgacattt atattcccca gaacatcagg ttaatggcgt 3180
 ttttgatgtc attttcggg tggctgagat cagccacttc ttcccagata acggagaccg 3240
 40 gcacactggc catatcggtg gtcatcatgc gccagcttcc atcccagata tgcaccaccg 3300
 ggtaaagttc acgggagact ttatctgaca gcagacgtgc actggccagg gggatcacca 3360
 tccgtcgcce cggcgtgtca ataatatcac tetgtacatc cacaaacaga cgataaccggc 3420
 tctctctttc ataggtgtaa accttaact gccctacgta taggtgcgc aactgttggg 3480
 aaggcgcatt ggtgcggcc tottcgctat tccgcagct ggcgaaaggg ggtgtgctg 3540
 45 caaggcgatt aagtgggta acgccagggt tttccagtc acgacgttg ttaagcggc gcgaattcta 3600
 ccagtgaatt gtaatacgac tcaactatagg gcgaattgaa tttagcggcc gcgaattcta 3660
 ccgggtaggg gaggcgctt tcccaggca gtctggagca tgcgcttag cagccccgct 3720
 ggcaacttgg gctacacaag tggcctctgg cctcgcacac attccacatc caccggtagg 3780
 cgccaaccgg ctccgttctt tggtgcccc ttcgcgccac cttctactcc tcccctagtc 3840
 50 aggaagttcc ccccccccc gcagctcgcg tcgtgcagga cgtgacaaat ggaagtagca 3900
 cgtctcacta gctcgtgca gatggacagc accgctgagc aatggaagcg ggtaggcctt 3960
 tggggcagcg gccaatagca gctttgctcc ttcgcttctc gggctcagag gctgggaagg 4020
 ggtgggtccg ggggcgggct cagggggggg ctcagggggg gggcggggcg ccgaaggtcc 4080
 tccggaggcc cggcattctc gcaecgttca aaagcgcacg tctgccgcg tgttctctc 4140
 55 ttctcatct ccgggccttt ctcgagctcg gattaagatg aacgacgagc agatcctgga 4200
 gatggtgctg cagcaccagc agcgcgccca acaggaagcg gagcgcgagg aggaagttgg 4260
 ggtgacatg gaagacgacg aagatgatga cggctctcag atgccgacgc cgttcatgc 4320
 ctatcagcta ctgtgtacg attctttcga acttcatttc gggggatgcg cttgccaccg 4380
 gttaccttgg catcgtatgg gttatcggc ttgccactg gctcctcog atttggccc 4440
 60 ttatgtttgg gccaggttgg aggatgactt gaatgtggca ggggtgtact tctgtgctat 4500
 gtgggcgctc ccggggttta gcgatttctc tccagtattt atgcagcagc cgatcgggaa 4560
 cgtgtgcggg atgttaattc acgtggacct gcacagcagg ctaccattcc laattgcgg 4620
 gtcgcgcttg gggagggcg gtggcagccc ctgtctgtat atgaggaaa ttgatgttga 4680
 tttggacacg cagcgcgtac atttttatc agaagattgg ttcagtgagt ttgcaatct 4740
 65 gctgtattac tggcaaatga gcgaatgaa acattagcg gagcgtatgc aataaagaga 4800

ES 2 309 578 T3

5 cgtgagactg tataaatggt tcacctgta acggatecca cgtcactatt gtatacteta 4860
 tattatactc tatgttatac tctgtaatcc tactcaataa asgtgtcacg cctgtgaaac 4920
 cgtactaagt ctcccggtgc ttcttatcac cctcaggtga catcctogcc caggetgtca 4980
 atcatqccgg taticgatcc agtagcaccg gcccccacgt gacaaccacn tcttgcagcg 5040
 ttanagagoc ccclcttaac Aagccgaccg ccaccagcgt cgcggttact aacactcctc 5100
 tccccyyyyc alcccgctact ccgagcctta agattaaggg cgaattcgtt taaacctgca 5160
 ggactagtcg ctttaqtgag ggttaattct gagcttggcg taatcatggt catagctgtt 5220
 10 tctgtgtgca aattgltatc cgtcacaat tccacacacn atccgagncg caagcataaa 5280
 yugtaaaagc tggggtcctt aalyugtgay ctaaclcaca ctattcctt tgccttact 5340
 cccccccttc cagtccggaa acctgtcgtg ccagctgcat taanraanng gccaangccc 5400
 yggganagcc ggttcgctc tgggccc 5460

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65