

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 976 594**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 35/76 (2015.01)

C12N 15/864 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.11.2016** **PCT/CL2016/000070**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.05.2017** **WO17075729**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2016** **E 16861172 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2024** **EP 3372249**

54 Título: **Virus AAV/UPR-plus, proteína de fusión UPR-plus, método de tratamiento genético y su uso en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington, entre otras**

30 Prioridad:

04.11.2015 CL 20153242

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

05.08.2024

73 Titular/es:

UNIVERSIDAD DE CHILE (100.0%)
Av. Libertador Bernardo O'Higgins 1058,
Comuna de Santiago
8330111 Santiago, CL

72 Inventor/es:

HETZ FLORES, CLAUDIO ANDRÉS y
VIDAL GOMEZ, RENE LUIS

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 976 594 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

Virus AAV/UPR-plus, proteína de fusión UPR-plus, método de tratamiento genético y su uso en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington, entre otras

5 **Campo técnico de la presente invención**

La presente invención incluye un vector adenoasociado (AAV), que comprende un genoma viral recombinante donde dicho genoma comprende un casete de expresión que comprende una región reguladora de la transcripción específica para tejidos neuronales unida de forma operativa a un polinucleótido de interés que codifica una proteína de fusión, en el que la proteína de fusión comprende la forma activa de la proteína de unión a X-Box 1 (XBP1s), la forma activa del factor de transcripción activador 6 (ATF6f) y una secuencia puente o enlazadora.

Antecedentes y descripción de la técnica anterior

La investigación científica sobre enfermedades del SNC ha despertado gran interés en los últimos años, especialmente sobre enfermedades relacionadas con trastornos cognitivos y motores. El tratamiento de enfermedades relacionadas con problemas neurodegenerativos no cuenta actualmente con planteamientos terapéuticos genéticos para reducir los síntomas.

En la búsqueda del tratamiento de estas enfermedades motoras y cognitivas se han identificado dos factores de transcripción denominados XBP1 y ATF6. Están implicados en los mecanismos biológicos y moleculares para mejorar los procesos de agregación y plegamiento de proteínas. Principalmente, la nueva proteína de fusión tiene como objetivo activar la transcripción de clústeres de genes implicados en la mejora del plegamiento de proteínas. A continuación, reducir su agregación reprogramando la transcripción de genes específicos implicados en el plegamiento de proteínas, tales como las chaperonas. El fenómeno de agregación de proteínas es una característica común en las enfermedades neurodegenerativas y una causa de muerte neuronal selectiva.

Las terapias farmacológicas existentes hoy en día son solo paliativas, ya que están enfocadas a reducir los síntomas de los pacientes que padecen estas enfermedades y no consiguen frenar la muerte selectiva de las neuronas. En general consisten en terapias farmacológicas que regulan los niveles de neurotransmisores alterados a causa de la muerte de grupos neuronales fundamentales, que aseguran el correcto funcionamiento del cerebro. Un ejemplo de este tipo de terapia es la administración de L-dopa y sus derivados farmacológicos a pacientes con Parkinson. Este compuesto es capaz de restaurar los niveles de dopamina en los pacientes, pero no detiene la muerte selectiva de las neuronas dopaminérgicas que provocan esta enfermedad. La presente propuesta se centra en frenar la muerte neuronal mediante terapia génica y producir un tratamiento eficaz y definitivo para este tipo de patología.

Existen otras patologías relacionadas con enfermedades neuromotoras tales como la enfermedad de Huntington, donde sus tratamientos son limitados o inexistentes. Esta enfermedad es una patología neurodegenerativa hereditaria dominante causada por una mutación del gen IT15, que codifica la proteína huntingtina. La mutación da como resultado la expansión de un segmento de poliglutamina en el extremo N-terminal de la proteína, que genera agregados de proteínas en las neuronas espinales medias (MSN) de la región estriada. Esto desencadena degeneración neuronal y síntomas característicos de la enfermedad, tales como pérdida progresiva del control de los movimientos musculares voluntarios (corea), síntomas psiquiátricos y demencia (Atwal, 2007).

Hasta la fecha, la propuesta para el uso de una proteína de fusión sintética no se ha abordada en general. Existen publicaciones tales como los documentos WO2004/111194 y WO2006/028889, que apuntan a la formación de proteínas recombinantes que codifican para la XBP1, eIF2 α , S51A y ATF (formas posteriores a la delección mediante empalme), separadas, no como una proteína de fusión, lo cual no busca optimizar la mejora en el control de las enfermedades neurodegenerativas en un solo constructo.

Por otro lado, existen documentos individuales que apuntan a la disminución endógena de XBP1, como se presenta en la patente US2013197023, que se correlaciona con una mayor capacidad de plegamiento del retículo endoplasmático (RE) necesaria para mantener la homeostasis celular. Esta regulación negativa individual de la expresión de XBP1 se ha implicado en la generación de neuroprotección en la enfermedad de Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), como se presentó en la solicitud de patente WO2010/008860.

Otra patente relevante respecto a la medición del estrés del RE, donde está implicado el factor de transcripción XBP1, es la patente japonesa JP2007129970.

En general, este desarrollo se refiere a la síntesis y viabilidad de un nuevo péptido conformado por XBP1s, un péptido enlazador y ATF6f para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas tales como la Enfermedad de Parkinson y la Enfermedad de Huntington, sin limitarse únicamente a estas.

Una de las patentes que se acerca a este planteamiento es la solicitud de patente chilena 3590-2014, que presenta un método de tratamiento genético para mejorar la memoria con un virus recombinante AAV/XBP1S-HA. Este tratamiento acerca el péptido XBP1s-HA a mejorar una función cognitiva, pero no a tratar una enfermedad. Por otro

lado, no se habla de una proteína de fusión funcional que implique la XBP1s dentro de sus componentes.

El documento WO2016106458 divulga el virus AAV/XBP1S-HA, su método de terapia génica y su uso en la optimización y mejora del aprendizaje, la memoria y las capacidades cognitivas.

5 El documento US2017360961 divulga el virus AAV/XBP1S-HA, su método de terapia génica y su uso en la optimización y mejora del aprendizaje, la memoria y las capacidades cognitivas.

El documento WO2017059554 divulga un método para el tratamiento genético utilizando el virus aav-xbp1s/gfp y su uso en la prevención y el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica.

10 Zuleta A. et al., Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 420, núm. 3, (2012), págs. 558 - 563, divulga que la administración mediada por AAV del factor de transcripción XBP1s en el cuerpo estriado reduce la agregación de huntingtina mutante en un modelo de ratón de la enfermedad de Huntington.

Sado M. et al., Brain Research, Elsevier, Amsterdam, NL, vol. 1257, págs. 16 - 24, describe un efecto protector contra los insultos relacionados con la enfermedad de Parkinson mediante la activación de XBP1.

Byrd, A. E. et al., Cells., (20120000), vol. 1, núm. 4, págs. 738 - 753 divulga que los procesos están detalladamente regulados y describe una caja de herramientas celular para afinar la expresión y actividad de XBP1.

15 Acharya, A. et al., Journal of Structural Biology, (20060800), vol. 155, núm. 2, págs. 130 - 139 divulga la identificación experimental de familias B-ZIP homodimerizadoras en *Homo sapiens*.

Newman J. R. et al., Science, (20030600), vol. 300, n.º 5628, páginas 2097 - 2101, divulga una identificación exhaustiva de las interacciones de BZIP humanas con conjuntos de superhélices.

20 Yamamoto, K. et al., Developmental Cell, (20070900), vol. 13, n.º 3, págs. 365 - 376, divulga que la inducción de transcripción de proteínas de control de calidad en mamíferos está mediada por la acción única o combinada de ATF6a y XBP1.

Shoulders, M. D. et al., Cell Reports, (20130400), vol. 3, núm. 4, págs. 1279 - 1292, divulga la activación independiente del estrés de la XBP1s y/o ATF6 divulga tres entornos de proteostasis del RE funcionalmente diversos.

Resumen de la invención

25 Estudios recientes indican que la alteración crónica de la homeostasis de las proteínas en el RE (retículo endoplásmico) es un evento patológico transversal que se observa en prácticamente todas las enfermedades neurodegenerativas asociadas a los trastornos por plegamiento de proteínas, tales como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica, entre otras.

30 Diferentes condiciones interfieren con la síntesis de proteínas y el proceso de plegamiento en el lumen del RE, lo que resulta en una acumulación anormal de proteínas mal plegadas. Esta afección, llamada estrés del RE, puede estimularse por la expresión de determinadas proteínas mutantes, así como por la alteración en el proceso de síntesis y maduración de proteínas. En respuesta a este fenómeno, se activa una cascada de señalización intracelular integrada llamada UPR. La activación de la UPR da como resultado diferentes cambios en la expresión génica que tienen un efecto global sobre la homeostasis de las proteínas, disminuyendo, por ejemplo, los niveles de agregación anormal y mal plegamiento de proteínas resultantes de:

- (i) una mayor expresión de chaperonas y foldasas;
- (ii) un mejor control de la calidad de las proteínas; y
- (iii) la eliminación masiva de proteínas defectuosas.

40 El objetivo inicial de la UPR es recuperar el equilibrio proteico, manteniendo la viabilidad celular. Sin embargo, el estrés crónico del RE da lugar a la muerte celular por apoptosis, fenómeno observado en varias patologías neurodegenerativas.

La fase inicial de la UPR está mediada por tres "sensores de estrés" del RE:

1) PERK (proteína cinasa activada por ARN bicatenario [PKR] tal como la cinasa del retículo endoplásmico);

2) ATF6 (factor de transcripción activador 6); y

45 3) IRE1 (cinasa que requiere inositol 1)

Cada uno de estos sensores transmite información sobre el estado de plegamiento en el lumen del RE al núcleo mediante el control de factores de transcripción específicos, donde destaca la XBP1 (proteína de unión a X-Box-1). La XBP1 regula una serie de genes implicados en el control de calidad de las proteínas, el plegamiento, entre otros

procesos. Estas tres vías adaptativas actúan al unísono, manteniendo la homeostasis de las proteínas y la supervivencia celular. A diferencia de las respuestas dependientes de ATF6 y XBP1, la señalización mediada por el sensor PERK también se ha asociado con efectos proapoptóticos. Estas definiciones previas han colaborado en el desarrollo de este proyecto para definir el impacto de la UPR en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, además de diseñar nuevos modelos animales para medir estas respuestas.

Pruebas anteriores han descrito que una ganancia en la función XBP1 ralentiza el proceso neurodegenerativo en modelos animales de tres enfermedades neurodegenerativas: la enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica. Por otro lado, también se ha determinado que la carencia del factor de transcripción ATF6 provoca una pérdida de resistencia a la muerte neuronal en modelos preclínicos de la enfermedad de Parkinson. Estos antecedentes indican la importancia de estos factores de transcripción en los procesos neurodegenerativos debido a la formación de agregados proteicos tóxicos. Por lo tanto, UPRplus® se basa en la fusión de dos componentes activos de la UPR, tal como son la XBP1, el ATF6 y un péptido enlazador.

Actualmente UPRplus se ha desarrollado y presenta actividad de transcripción específica de un grupo (clúster) de genes relacionados con la UPR. UPRplus es una proteína de fusión y potencialmente puede participar en el proceso de aliviar la carga de los agregados proteicos tóxicos en las neuronas.

La invención se expone en el conjunto de reivindicaciones adjuntas.

Un primer aspecto de la presente invención está relacionado con incluye un vector adenoasociado (AAV), que comprende un genoma viral recombinante donde dicho genoma comprende un casete de expresión que comprende una región reguladora de la transcripción específica para tejidos neuronales unida de forma operativa a un polinucleótido de interés que codifica una proteína de fusión, en el que la proteína de fusión comprende la forma activa de la proteína de unión a X-Box 1 (*XBP1s*), la forma activa del factor de transcripción activador 6 (*ATF6f*) y una secuencia puente o enlazadora.

Depósito de microorganismos

El plásmido *pAAV_ATF6f-LFG-XBP1s-HA* fue depositado el 7 de octubre de 2015 en la Organización Internacional de Depósitos Biológicos, Instituto de Investigaciones Agropecuarias de Chile (INIA), con el número de depósito RGM 2232.

El plásmido *pAAV_ATF6f-LF-XBP1s-HA* fue depositado el 7 de octubre de 2015 en la Organización Internacional de Depósitos Biológicos, Instituto de Investigaciones Agropecuarias de Chile (INIA), con el número de depósito RGM 2231.

El plásmido *pAAV_ATF6f-L4H4-XBP1s-HA* fue depositado el 7 de octubre de 2015 en la Organización Internacional de Depósitos Biológicos, Instituto de Investigaciones Agropecuarias de Chile (INIA), con el número de depósito RGM 2233.

El plásmido *pAAV_XBP1s-LFG-ATF6f-HA* fue depositado el 7 de octubre de 2015 en la Organización Internacional de Depósitos Biológicos, Instituto de Investigaciones Agropecuarias de Chile (INIA), con el número de depósito RGM 2235.

El plásmido *pAAV_XBP1s-LF-ATF6f-HA* fue depositado el 7 de octubre de 2015 en la Organización Internacional de Depósitos Biológicos, Instituto de Investigaciones Agropecuarias de Chile (INIA), con el número de depósito RGM 2234.

El plásmido *pAAV_XBP1s-L4H4-ATF6f-HA* fue depositado el 7 de octubre de 2015 en la Organización Internacional de Depósitos Biológicos, Instituto de Investigaciones Agropecuarias de Chile (INIA), con el número de depósito RGM 2236.

Descripción detallada de la invención

Cabe destacar que la presente invención no se limita a la metodología, compuestos, materiales, técnicas de fabricación, usos y aplicaciones en particular descritos en la presente memoria, ya que estos pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en la presente memoria se utiliza con el único propósito de describir una representación concreta y no pretende limitar la perspectiva y el potencial de la invención. La materia objeto reivindicada queda abarcada en el conjunto de reivindicaciones adjuntas.

Cabe destacar que las formas en singular utilizadas en el uso y el método, tal como se expresa en el conjunto de reivindicaciones y a lo largo del texto, no excluye las formas en plural, a menos que sea dentro de un contexto que lo implique claramente. Así, por ejemplo, la referencia a un "uso o método" es una referencia a uno o más usos o métodos e incluye equivalentes conocidos por quienes tienen conocimiento de la materia objeto (técnica). De forma parecida, para mencionar otro ejemplo, la referencia a "una etapa", "un estadio" o "un modo" es una referencia a uno o más etapas, estadios o modos y puede incluir subetapas, subestadios o submodos, implícitos y/o consecuentes.

Todas las conjunciones deben entenderse en el sentido menos restrictivo y más inclusivo posible. Así, por ejemplo, la conjunción "o" debe entenderse en su sentido lógico ortodoxo, y no como "o excluyente", a menos que el contexto o el texto así lo requiera o lo indique expresamente. Las estructuras, materiales y/o elementos descritos en la presente memoria también deben entenderse como referencias a equivalentes funcionales para evitar enumeraciones exhaustivas e interminables.

Las expresiones utilizadas para indicar aproximaciones o conceptualizaciones deben entenderse como se expresan en la presente memoria, a menos que el contexto requiera una interpretación diferente.

Todos los nombres y términos técnicos y/o científicos utilizados en la presente memoria tienen el significado común que les atribuye una persona común, capacitada en estas materias, salvo que expresamente se indique lo contrario.

La presente invención describe vectores basados en los serotipos AAV2, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV10, AAV11 y AAV pseudotipificados y a partir de virus adenoasociados capaces de mediar eficazmente la transferencia de genes al sistema nervioso central.

La administración sistémica de estos vectores también da lugar a un suministro de genes eficaz tanto al cerebro como a la médula espinal. Se describe en la presente memoria que el vector AAV2 con regiones proximales del promotor del factor de transcripción UPRplus permite la generación de una respuesta inespecífica en un clúster de factores en el cerebro y la columna. En particular, la administración local del vector AAV2, que comprende una serie de casetes de expresión en los que los genes heterólogos XBP1s y ATF6f están bajo el control del promotor CMV, lo que mejora las capacidades motoras y cognitivas en individuos que padecen enfermedades neurodegenerativas. (Figuras 16/17 y 17/17 y figura 17/17).

I. Definición de términos y expresiones generales

Los términos "virus adenoasociado", "virus AAV", "virión AAV", "partícula viral AAV" y "partícula AAV" tal como se utilizan en la presente memoria son intercambiables. Se refieren a una partícula viral compuesta por, por lo menos, una proteína de la cápside de AAV (preferiblemente todas las proteínas de la cápside de un serotipo de AAV concreto) y un polinucleótido del genoma de AAV encapsulado. Si la partícula comprende un polinucleótido heterólogo (es decir, un polinucleótido distinto de un genoma de AAV nativo tal como un transgén que se administrará a una célula de mamífero) flanqueado por repeticiones terminales invertidas del AAV, que típicamente se denomina "vector de partículas de AAV" o "vector AAV". AAV se refiere a virus que pertenecen al género Dependovirus de la familia Parvoviridae. El genoma del AAV tiene aproximadamente 4,7 kilobases de largo y está compuesto por ácido desoxirribonucleico monocatenario (ADNss) que puede contarse como positivo o negativo. El genoma comprende repeticiones terminales invertidas (ITR) en ambos extremos de la cadena de ADN y dos marcos de lectura abiertos (ORF): REP y CAP (replicasa y cápside). El marco REP consiste en cuatro genes superpuestos que codifican las proteínas REP (REP 78, Rep 68, Rep 52 y Rep 40) necesarias para el ciclo de vida del AAV. El marco CAP contiene nucleótidos superpuestos de 20 secuencias de proteínas de la cápside: VP1, VP2 y VP3, que interactúan entre sí para formar una cápside de simetría icosaédrica.

El término "virus adenoasociado IRT" o "AAV IRT", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la repetición de terminal invertida presente en ambos extremos de la cadena de ADN de un genoma de virus adenoasociado. Se requieren secuencias IRT para la multiplicación eficaz del genoma de AAV. Otra propiedad de estas secuencias es su capacidad para formar una bifurcación. Esta característica contribuye a su autocopia, lo cual permite la síntesis primaria independiente de la segunda cadena de ADN. Las IRT también demostraron ser necesarias tanto para la integración del ADN de AAV nativo en el genoma de la célula huésped como para el rescate de la célula huésped, así como para la encapsulación eficaz del ADN de AAV combinado con la generación de su ensamblaje completo.

El término "AAV2", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere al serotipo 2 del virus adenoasociado con una secuencia genómica como se define en el número de acceso a GenBank AF043303.1, que se encuentra en el siguiente sitio web: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF043303.1>.

Actualmente, se han comunicado aproximadamente 11 serotipos de AAV humanos y aproximadamente 100 serotipos de AAV de primates que pueden utilizarse como vectores. Cada serotipo representa ventajas y desventajas con respecto a estabilidad, productividad, inmunogenidad, biodisponibilidad, tropismo, etc. Sin embargo, muchos laboratorios han desarrollado vectores pseudotípicos, es decir, AAV modificados que contienen proteínas de cubierta de diferentes serotipos, para obtener las ventajas de diferentes serotipos o evitar las desventajas de algunas proteínas de cubierta de algunos serotipos. A modo de ejemplo, en ocasiones se utiliza en la presente invención un virus AAV2/6, en el que se mezclan las características de los dos serotipos virales.

El término "vector de AAV", tal como se utiliza en la presente invención, también se refiere a un vector que comprende uno o más polinucleótidos de interés (o transgenes) que están flanqueados por secuencias de repetición terminales (ITR) de AAV. Dichos vectores de AAV pueden replicarse y empaquetarse en partículas virales infecciosas cuando están presentes en una célula huésped que se ha transfectado con un vector que codifica y expresa los genes REP y CAP (es decir, las proteínas REP y CAP de AAV), y donde la célula huésped se ha transfectado con un vector que codifica y expresa una proteína del marco de lectura del adenovirus E4orf6. Cuando un vector de AAV se incorpora en un polinucleótido más grande (por ejemplo, un cromosoma u otro vector tal como un plásmido que se utiliza para

clonar o transfectar), entonces el vector de AAV típicamente se denomina "provector". El provector se puede "rescatar" mediante replicación y encapsulación en presencia de las funciones de empaquetamiento de AAV y las funciones auxiliares necesarias suministradas por E4orf6.

5 El serotipo del vector AAV proporciona la especificidad del tipo de célula donde expresará el transgén dado el tropismo de cada serotipo.

10 El término "sitio de unión específico para la región reguladora de la transcripción UPRplus" como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una secuencia de ácido nucleico que funciona como un promotor (es decir, regula la expresión de una secuencia de ácido nucleico seleccionada, unida de forma operativa al promotor), y que afecta a la expresión de una secuencia de ácido nucleico seleccionada en las células de tejidos específicos, tales como las neuronas. El sitio de unión específico para el elemento regulador de la transcripción del tejido neuronal puede ser constituyente o inducible.

15 El término "gen CAP" o "gen CAP de AAV", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un gen que codifica una proteína CAP. El término "proteína CAP", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un polipéptido que tiene actividad de por lo menos una actividad funcional de la proteína CAP de un AAV nativo (VP1, VP2, VP3). Ejemplos de actividades funcionales de las proteínas VP1, VP2 y VP3 incluyen la capacidad de inducir la formación de la cápside, facilitar la acumulación de ADN de cadena simple, facilitar el empaquetamiento del ADN de AAV en la cápside (es decir, encapsulación), unirse a receptores celulares y facilitar la entrada del virus en un huésped.

20 El término "cápside", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la estructura en la que está empaquetado el genoma viral. Una cápside consiste en una estructura oligomérica con subunidades estructurales de proteínas CAP. Por ejemplo, el AAV tiene una cápside icosaédrica formada por la interacción de tres proteínas de la cápside: VP1, VP2 y VP3.

25 El término "composición celular", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un material de tipo compuesto que comprende las células descritas en la presente memoria y por lo menos otro componente. La composición puede formularse como una formulación única o puede presentarse como formulaciones separadas de cada uno de los componentes, que pueden combinarse para el uso conjunto como una preparación combinada. La composición puede ser un kit de piezas, donde cada uno de los componentes se formula y empaqueta individualmente.

El término "promotor constituyente", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un promotor cuya actividad se mantiene a un nivel relativamente constante en todo un organismo, o durante la mayoría de los estadios experimentales, con poca o ninguna consideración por las condiciones ambientales y externas de la célula.

30 El término "casete de expresión", tal como se utiliza aquí, se refiere a una construcción de ácidos nucleicos, generados sintéticamente o por recombinación, con una serie de elementos específicos de los ácidos nucleicos, que permiten la transcripción de un ácido nucleico concreto en una célula diana.

35 El término "genes que desempeñan funciones de soporte", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a genes que codifican polipéptidos, que realizan funciones en el AAV que son dependientes para la replicación (es decir, "funciones de soporte"). Las funciones auxiliares incluyen funciones que resultan necesarias para la replicación de AAV, incluidos estos fragmentos implicados en la activación de la transcripción del gen de AAV, los estadios específicos del empalme del ARNm de AAV, la replicación del ADN de AAV, la síntesis de productos CAP y el ensamblaje de la cápside de AAV. Las funciones virales accesorias pueden obtenerse a partir de cualquiera de los virus auxiliares conocidos tales como adenovirus, virus del herpes, lentivirus y virus vaccinia. Las funciones auxiliares incluyen, entre otras, el lentivirus WHV.

40 El término "unido de forma operativa", como se describe en la presente memoria, se refiere a la relación funcional y ubicación de una secuencia promotora con respecto a un polinucleótido de interés (p. ej., un promotor o potenciador está unido de forma operativa a una secuencia codificadora que afecta a la transcripción de esa secuencia). En general, un desarrollador unido de forma operativa está adyacente a la secuencia de interés. Sin embargo, no es necesario que un potenciador esté adyacente a la secuencia de interés para controlar su expresión.

45 El término "administrado localmente", tal como se utiliza en la presente memoria, significa que los polinucleótidos, vectores, polipéptidos y/o composiciones farmacéuticas de la invención se administran al sujeto en o cerca de un sitio específico.

50 Los términos "vehículos farmacéuticamente aceptables", "diluyentes farmacéuticamente aceptables", "excipiente farmacéuticamente aceptable" o "vehículo farmacéuticamente aceptable" son intercambiables en la presente memoria y se refieren a un sólido, semisólido o líquido de relleno, diluyente o material de encapsulación no tóxico, o una formulación auxiliar para cualquier tipo convencional. Un vehículo farmacéuticamente aceptable es fundamentalmente no tóxico para los recipientes utilizados en las dosis y concentraciones y es compatible con otros ingredientes de la formulación. El número y la naturaleza de los vehículos farmacéuticamente aceptables dependen del método de administración deseado. Se conocen vehículos farmacéuticamente aceptables y pueden prepararse mediante métodos técnicos bien conocidos.

- El término "promotor", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un ácido nucleico que controla la transcripción de uno o más polinucleótidos, ubicado aguas arriba de la secuencia del o los polinucleótidos, y que se identifica estructuralmente por la presencia de una ARN polimerasa dependiente. El sitio de unión al ADN, los sitios de iniciación de la transcripción y cualquier otra secuencia de ADN, incluidos, entre otros, los sitios de unión al factor de transcripción, los sitios de unión a proteínas represoras y activadoras, y cualquier otra secuencia de nucleótidos, conocida en la técnica por actuar directa o indirectamente en la regulación de la cantidad de transcripción del promotor. Un promotor "específico de tejido" se activa solo en determinados tipos de células o tejidos diferenciados.
- El término "polinucleótido", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una molécula de ácido nucleico, ya sea de ADN o ARN, que contiene desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, respectivamente. El ácido nucleico puede ser bicatenario, monocatenario o contener partes de una secuencia bicatenaria o monocatenaria. El término "polinucleótido" incluye, entre otras, secuencias de ácido nucleico con capacidad de codificar un polipéptido y secuencias de ácido nucleico que son parcial o totalmente complementarias a un polinucleótido endógeno de la célula o sujeto tratado por él de una manera que, después de la transcripción, genera una molécula de ARN (p. ej., microARN, ARNhc, ARNpi) capaz de hibridar e inhibir la expresión de polinucleótidos endógenos.
- El término "puente o enlazador", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una secuencia de polinucleótidos continua o discontinua, ya sea de ADN o de ARN, que permite la separación física de secuencias objetivas, posicionándolas de manera adecuada para que puedan ser traducidas y transcritas.
- El término "cadena" en la presente memoria se refiere a una secuencia de nucleótidos continua (que incluye o no los nucleótidos naturales o no naturales modificados). Las dos o más cadenas pueden ser, o cada una puede ser parte de, moléculas separadas, o pueden estar interconectadas de forma covalente, por ejemplo, mediante un acoplamiento (por ejemplo, un enlazador tal como polietilenglicol), para formar una molécula. Por lo menos una de las cadenas puede incluir una región que sea suficientemente complementaria a un ARN diana.
- Una segunda cadena del agente de ARNhc, que comprende una región complementaria a la cadena antisentido, se denomina "cadena de sentido". Sin embargo, también se puede formar un agente de ARNpi a partir de una única molécula de ARN que es por lo menos parcialmente autocomplementaria, formando, por ejemplo, una estructura de horquilla o de ojal, que incluye una región dúplex. Estos últimos se denominan en lo sucesivo ARN de horquilla corta o ARNhc. En dicho caso, el término "cadena" se refiere a una de las regiones de la molécula de ARN que es complementaria a otra región de la misma molécula de ARN.
- El término "genoma viral recombinante", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un genoma de AAV en el que por lo menos un casete de polinucleótidos no expresivo se inserta en el genoma de AAV nativo.
- El término "gen rep" o "gen rep de AAV", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un gen que codifica una proteína Rep. El término "proteína Rep", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un polipéptido que tiene por lo menos una actividad funcional de una proteína rep nativa de AAV (p. ej., Rep 40, 52, 68, 78). Una "actividad funcional" de una proteína Rep (p. ej., Rep 40, 52, 68, 78) es cualquier actividad asociada con la función fisiológica de la proteína, incluida la facilitación de la replicación del ADN mediante el reconocimiento, unión y corte del origen de la replicación del ADN de AAV, así como de la actividad helicoidal del ADN. Las funciones adicionales incluyen la modulación de los promotores de la transcripción de AAV (u otros heterólogos) y la integración específica del sitio del ADN de AAV en un cromosoma del huésped.
- El término "sujeto", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un individuo, planta, mamífero o animal, tal como un ser humano, un primate no humano (p. ej., chimpancé u otros simios y otras especies de monos), un animal (p. ej., aves, peces, ganado, ovejas, cerdos, cabras y caballos), un mamífero (p. ej., perros y gatos) o un animal de laboratorio (p. ej., roedores, tales como ratones, ratas, ratones con genes silenciados (ratones desactivados), ratones que sobreexpresan un gen (ratones transgénicos y cobayas). El término no indica una edad o sexo en particular. El término "sujeto" incluye un embrión y un feto.
- El término "administrado sistémicamente" y "administrado sistémicamente", tal como se utiliza en la presente memoria, significa que los polinucleótidos, vectores, polipéptidos o composiciones farmacéuticas de la presente invención se administran a un sujeto de forma no localizada. La administración sistémica de los polinucleótidos, vectores, polipéptidos o composiciones farmacéuticas de la invención puede llegar a varios órganos o tejidos en todo el cuerpo del sujeto, o puede llegar a nuevos órganos o tejidos específicos. Por ejemplo, la administración por vía intravenosa de una composición farmacéutica de la invención puede dar como resultado la transducción en más de un tejido u órgano en un sujeto.
- El término "elemento regulador de la transcripción", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un fragmento de ácido nucleico capaz de regular la expresión de uno o más genes. Los elementos reguladores de polinucleótidos de la invención incluyen un promotor.
- El término "transducción", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere al proceso mediante el cual una secuencia de nucleótidos extraños se introduce en una célula en un vector viral.

El término "transfección", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la introducción de ADN en las células eucariotas diana.

El término "vector", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una construcción capaz de administrar y, opcionalmente, expresar uno o más polinucleótidos de interés en una célula huésped. Ejemplos de vectores incluyen, entre otros, vectores virales, vectores de expresión de ADN o ARN desnudo, vectores de plásmidos, cósmicos o fagos, vectores de expresión de ARN o ADN asociados con agentes condensadores catiónicos, vectores de expresión de ADN o ARN encapsulados liposomales y determinadas células eucariotas, tales como las células productoras. Los vectores pueden ser estables y autorreplicantes.

No existen limitaciones en cuanto al tipo de vector que se puede utilizar. El vector puede ser un vector de clonación, adecuado para la propagación y para la obtención de polinucleótidos, constructos genéticos o vectores de expresión incorporados en varios organismos heterólogos. Los vectores adecuados incluyen vectores de expresión procarióticos, vectores de fagos y transportadores y vectores de expresión eucariotas basados en vectores virales (p. ej., adenovirus, virus adenoasociados tales como retrovirus y lentivirus), así como vectores no virales tales como pSilencer 4,1-CMV.

El término "UPRplus", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a secuencias que consisten en XBP1s, ATF6f, un promotor, una secuencia de conexión o puente y un epítopo de identificación.

Los métodos y composiciones descritos en la presente memoria (por ejemplo, los métodos y composiciones del virus AAV con los insertos mencionados anteriormente) se pueden utilizar con cualquier dosis y/o formulación descrita en la presente invención, así como con cualquier vía de administración descrita en la presente memoria.

Para el término "habilidades terapéuticas o de tratamiento cognitivo y motor", nos referimos a pruebas cognitivas y motoras realizadas en diferentes especies y/o sujetos con una patología tal como se define en la presente memoria.

El término "ADNc" o "ADN complementario" se refiere a una secuencia de ADN que complementa perfectamente una secuencia de ARN utilizada para formar una síntesis de la PCR-TR.

La frase "silenciamiento de un gen diana" se refiere al proceso mediante el cual una célula que contiene y/o expresa un producto concreto del gen diana cuando no está en contacto con el agente, contendrá y/o expresará por lo menos el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o menos del producto de dicho gen cuando está en contacto con el agente, en comparación con una célula parecida que no ha estado en contacto con el agente. Este producto génico diana puede ser, por ejemplo, un ARN mensajero (ARNm), una proteína o un elemento regulador.

El término "complementario" tal como se utiliza en la presente memoria indica un grado suficiente de complementariedad de modo que tiene lugar una unión estable y específica entre un compuesto y una molécula de ARN diana. La unión específica requiere un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica del compuesto oligomérico a secuencias no diana, en condiciones en las que se desea la unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de pruebas *in vivo* o tratamientos terapéuticos, o en el caso de pruebas *in vitro*, en las condiciones en que se hayan realizado las pruebas.

El término "sitios de restricción" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la secuencia de nucleótidos a la que se une y corta o escinde una enzima de restricción específica de dicha secuencia.

Ligandos

Las propiedades de un virus, incluidas sus propiedades farmacológicas, pueden verse influenciadas y adaptadas, por ejemplo, mediante la introducción de ligandos. Además, las propiedades farmacológicas de un agente viral se pueden mejorar mediante la incorporación de un ligando en una formulación de agente y un virus.

Los ligandos se pueden unir a una amplia variedad de entidades, tales como ligandos que se unen a un agente viral, o se pueden usar como conjugado o aditivo de formulación; por ejemplo, con el vehículo de una subunidad monomérica unida al ligando. Los ejemplos se describen a continuación en el contexto de una subunidad monomérica unida a un ligando, pero ese es solo el preferido, y las entidades pueden acoplarse en otro lugar con un virus.

Un ligando altera la distribución, dirección o vida útil del agente viral en el que está incrustado. En las modalidades preferidas, un ligando proporciona una mejor afinidad por una diana seleccionada; por ejemplo, una molécula, célula o tipo de célula, un compartimento (tal como un compartimento de célula u órgano, un tejido o región del cuerpo), en comparación con una especie en la que dicho ligando está ausente.

Los ligandos pueden mejorar las propiedades de transporte, hibridación y especificidad de la molécula diana en el virus.

Los ligandos en general pueden incluir modificadores terapéuticos, por ejemplo, para mejorar la absorción de la molécula en el individuo; compuestos de diagnóstico o grupos de indicadores, por ejemplo, para controlar la distribución; agentes reticulantes; fracciones que confieren resistencia a reacciones inmunes; y nucleobases naturales o inusuales.

5 Los ejemplos generales incluyen moléculas lipófilas, lípidos, lectinas (p. ej., hecigenina, diosgenina), terpenos (p. ej., triterpenos, sarsasapogenina, friedelina, ácido litocólico derivado del epifriedelanol), vitaminas, carbohidratos (p. ej., dextrano, pululano, quitina, quitosano), polímeros sintéticos (p. ej., oligolactato de 15-mer) y naturales (p. ej., de peso molecular bajo y medio), inulina, ciclodextrina o ácido hialurónico), proteínas, agentes de unión a proteínas, moléculas de unión a integrinas, policationes, péptidos, poliaminas, y miméticos de péptidos. Otros ejemplos incluyen células epiteliales o ligandos de receptores de ácido fólico, tales como transferrina.

10 El ligando puede ser una molécula sintética o recombinante de origen natural, tal como un polímero sintético (por ejemplo, un poliaminoácido sintético). Ejemplos de poliaminoácidos incluyen polilisina (PLL), ácido poliaspártico L-aspártico, poliácido L-glutámico, copolímero de estireno-anhídrido de ácido maleico, copolímero poli-(láctico-co-glicólico) de éter divinílico-anhídrido maleico, copolímero de N-(2-hidroxipropil)-metacrilamida (HMPA), polietilenglicol (PEG), alcohol polivinílico (PVA), poliuretano, poli(2-ácido etilacrílico), polímeros de N-isopropil-acrilamida o polifosfaceno. Los ejemplos de poliaminas incluyen: polietilenimina, polilisina (PLL), espermina, espermidina, poliamina, poliamina pseudopeptídica, poliamina peptidomimética, poliamina dendrímica, arginina, amidina, protamina, fracciones catiónicas, p. ej., lípido catiónico, porfirina catiónica, sal cuaternaria de una poliamina o un péptido alfa-helicoidal.

15 Los ligandos también pueden incluir grupos directores, por ejemplo, un agente director de una célula o tejido, tal como tirotopina, melanotropina, proteína tensioactiva A, carbohidrato de mucina, un poliaminoácido glicosilado, bifosfonato, poliglutamato, poliaspartato, un péptido Arg-Gly-Asp (RGD) o un mimético del péptido RGD.

20 Los ligandos pueden ser proteínas, por ejemplo, glicoproteínas o lipoproteínas tales como lipoproteínas de baja densidad (LDL), o albúmina, tal como seroalbúmina, o péptidos, tales como moléculas que tienen una afinidad específica por un coligando, o anticuerpos, tales como un anticuerpo que se une a un tipo de célula específica. Los ligandos también pueden incluir hormonas y receptores hormonales. También pueden incluir especies no peptídicas, tales como cofactores, lactosa multivalente, galactosa multivalente, N-acetil-galactosamina, N-acetil-glucosamina, manosa multivalente o fucosa multivalente.

25 El ligando puede ser una sustancia, tal como un fármaco, que puede aumentar la absorción del agente viral dentro de la célula; por ejemplo, alterando el citoesqueleto de la célula o sus microtúbulos, microfilamentos y/o filamentos intermedios.

En un sentido, un ligando es un lípido o una molécula basada en lípidos. Este lípido o molécula a base de lípidos está preferiblemente unido a una proteína del suero, tal como la seroalbúmina.

30 De forma alternativa, se pueden empaquetar virus.

La preparación de soluciones de virus inyectables, descrita en la presente memoria, se realiza diluyendo la concentración de virus necesaria en PBS (tampón de fosfato salino), que se formula de la siguiente manera.

1.- Disolver la dosis viral (previamente diluida en PBS 1x) en 800 ml de agua destilada con:

8 g de NaCl

35 0,2 g de KCl

1,44 g de Na_2HPO_4

0,24 g de KH_2PO_4

2.- Ajustar el pH a 7,4 con HCl.

3.- Ajustar el volumen a 1 L con agua destilada adicional H_2O .

40 4.- Esterilizar y autoclave.

Diseño y selección

Generación de variantes de moléculas UPRplus.

45 Uno de los objetivos de esta patente es generar las seis variantes de un ADN recombinante, compuesto por las secuencias humanas de la forma activa de XBP1, denominada XBP1s y la forma activa de ATF6, denominada ATF6f. Las variantes UPRplus incluyen dos variables en su diseño: el orden de las moléculas XBP1s y ATF6f (XBP1s-ATF6f y ATF6f-XBP1s) y el péptido de unión (también conocido como enlazador) entre ambas secuencias. Los enlazadores utilizados son los siguientes:

- Enlazador flexible de glicina 19-AA ("GFL");
- Enlazador de hélice alfa 25-AA ("AHL4"); y

- Enlazador flexible ("FL") 50-AA.

Se ha demostrado que estos tres tipos de uniones o puentes proporcionan la flexibilidad y distancia adecuada entre las proteínas unidas por sus extremos a fin de lograr una interacción entre ellas. La generación y evaluación de estos tres enlazadores entre las moléculas de XBP1s y ATF6f permitieron ampliar las posibilidades de generar un factor de transcripción funcional activo, que adopta una geometría tridimensional adecuada para unir los elementos específicos del gen.

Además, para detectar mejor la expresión de estas proteínas quiméricas, se añadió la secuencia de la proteína del péptido de hemaglutinina (HA) (entre otras, sin limitarse a este epítipo) en el extremo carboxílico terminal de todas las proteínas.

La estrategia de clonación utilizada generó las secuencias de ADN de XBP1s, ATF6f y los tres enlazadores diferentes mediante síntesis de novo, incluidos los sitios de restricción para el enlace posterior al vector de expresión pAAV. Este vector de expresión se utilizó para generar partículas virales anteriores a la selección de la variante UPRplus con mayor actividad neuroprotectora *in vitro*.

Mediante síntesis de novo se obtuvieron dos conjuntos de secuencias génicas. Estos incluían la secuencia HA en el tercer extremo y, dependiendo del enlazador, los diversos sitios de restricción que se muestran a continuación:

Conjunto 1 XBP1s-enlazador-ATF6f

SnaBI_XBP1s-LFG-ATF6f_Fsel

BspEI_XBPS1s-LF-ATF6f_KpnI

BspEI_XBPs-L4H4-Atf6f_KpnI

Conjunto 2 ATF6-enlazador-XBP1

SnaBI_ATF6-LFG-XBP1s_Fsel

KpnI_ATF6-L4H4-XBP1s_SfiI

KpnI_ATF6-LF-XBP1s_SfiI

Las secuencias de ARNm utilizadas para este fin se describen en las tablas VII y VIII, ATF6f y XBP1s, respectivamente.

Las secuencias de ARNm de los enlazadores o puentes se describen en la Tabla IX, que muestra los enlazadores LGF, L4H4 y LF.

Junto con la generación de estas 6 variantes UPRplus, se produjeron las versiones individuales de la XBP1s y ATF6f asociadas a AAV (tablas XI y XII, respectivamente), clonadas en el vector de expresión pAAV para comparar correctamente la actividad de UPRplus con respecto a la expresión individual de estos factores de transcripción.

La expresión de estas secuencias utiliza el mismo promotor de las variantes UPRplus y presenta el péptido HA, a diferencia de estudios previos realizados con el factor de transcripción XBP1s y ATF6f, que no contenían estos elementos.

Una vez obtenidas estas secuencias mediante síntesis de novo, se unieron al vector de expresión pAAV a través de los sitios de restricción mencionados anteriormente. Se secuenciaron las 8 versiones del ADN recombinante generado, confirmando que las secuencias eran correctas y congruentes con los resultados previstos.

La síntesis de novo de las secuencias mencionadas anteriormente y el enlace de estas secuencias al vector pAAV se realizaron por parte de la empresa GENEWIZ en los Estados Unidos.

Las secuencias obtenidas en los plásmidos se pueden ver como mapas en las figuras 1/17, 2/17, 3/17, 4/17, 5/17 y 6/17.

Para confirmar estos plásmidos se realizó un análisis de restricción de las secuencias obtenidas mediante digestión del ADN plasmídico utilizando la enzima de restricción EcoR1.

Los tamaños de fragmentos obtenidos en los ensayos de enzimas de restricción fueron los previstos, como se muestra en la figura 7/17.

Un análisis del alcance biomédico para su uso terapéutico aportó un método eficaz e innovador para tratar enfermedades neurodegenerativas, en las que el uso de esta tecnología arrojó resultados sorprendentes en su aplicación.

Para explorar la implicación UPRplus, se generaron las seis variantes de ADN recombinante descritas en los párrafos anteriores. Codifican secuencias humanas de la forma activa de XBP1, denominada XBP1s, y de la forma activa de ATF6, denominada ATF6f, unidas por diferentes enlazadores y unidas a un epítipo para la hemaglutinina (HA), entre otros posibles epítipos.

- 5 Con respecto al desarrollo del virus adenoasociado (AAV), éste comprende el genoma viral recombinante que incluye un casete de expresión con un elemento regulador de la transcripción unido de forma operativa al polinucleótido de interés. El tipo de serotipo de AAV aporta parte de la selectividad del tejido en el que se expresará el polinucleótido de interés, sin ser excluyente.

- 10 El virus adenoasociado (AAV) incluye cualquier serotipo conocido de los 42 tipos y se obtiene a partir de los parvovirus. En general, los diversos serotipos de AAV son secuencias genómicas significativamente homólogas en términos de aminoácidos y ácidos nucleicos, que proporcionan funciones genéticas idénticas, proporcionan bacterias *Vibrio* que son fundamentalmente idénticas en términos funcionales y físicos, y su replicación y ensamblaje utilizan prácticamente los mismos mecanismos.

- 15 En la presente invención en particular, se utilizó AAV de serotipo 2 (tales como los mencionados en el número de acceso a GenBank ((AAV2) NC_001401.2, (AAV6) AF028704.1, NC006260 (AAV7), NC006261 (AAV8), AX753250.1 (AAV9), (AAV10), (AAV11) y AAV pseudotipados, como se presenta para AAV2 en la Tabla X.

Para los virus AAV10 y AAV11, no se dispone de una secuencia completa ya que difieren en las proteínas de la cápside.

- 20 El genoma de AAV normalmente comprende un actuador en cis 5 y una secuencia repetida invertida en el terminal 3 y un casete de expresión. Las secuencias ITR o LTR tienen una longitud de 141 pares de bases. Preferiblemente, la secuencia completa de las LTR se utiliza en la molécula y solo se permiten ligeras modificaciones de las secuencias. Como se describe en la presente memoria, el genoma recombinante del AAV comprende la quinta y tercera LTR del AAV. Como se describe en la presente memoria, la quinta y tercera LTR de AAV se obtienen a partir del serotipo 2 de AAV. Además, como se describe, el genoma recombinante de los AAV carece del marco de lectura abierto Rep y Cap.

Por otro lado, las ITR pueden provenir de otros serotipos de AAV.

El AAV comprende una cápside de cualquier serotipo. En particular, para la presente invención, se prefieren las cápsides derivadas de los serotipos 2, 6, 7, 8, 9 y 10. Sin embargo, se prefiere la cápsida de AAV del serotipo 2.

- 30 En algunas implementaciones, una cap de AAV para su uso en el método descrito en la presente memoria puede generarse mediante mutagénesis (es decir, inserciones, eliminaciones o sustituciones) de una de las cap de AAV o sus ácidos nucleicos codificadores. En algunas producciones, como se describe en la presente memoria, el límite de AAV es por lo menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 99 % o más parecido a uno o más de los límites de AAV mencionados anteriormente.

- 35 En algunas implementaciones, la cap de AAV es quimérica y comprende los dominios de dos, tres, cuatro o más de las cap de AAV mencionadas anteriormente. En algunos diseños, la cap de AAV es un mosaico de los monómeros VP1, VP2, VP3 y proviene de dos o tres AAV diferentes o de un AAV recombinante (rAAV). En algunas producciones, una composición de rAAV comprende más de una de las CAP anteriores.

- 40 En algunas implementaciones, una CAP de AAV para su uso en una composición de rAAV está diseñado para contener una secuencia heteróloga u otra modificación. Por ejemplo, una secuencia peptídica o proteica que confiere orientación selectiva o la evasión inmunitaria puede manipularse genéticamente a partir de una proteína Cap. De forma alternativa, o, además, la Cap puede modificarse químicamente de modo que la superficie del rAAV presente modificaciones químicas específicas, tales como polietilenglicolatos, que pueden facilitar la evasión inmunitaria. La proteína Cap también puede generarse mediante mutaciones guiadas (p. ej., para eliminar su receptor de unión natural o para enmascarar un epítipo inmunógeno).

- 45 Como se describe en la presente memoria, el vector AAV puede contener un promotor con la adición de por lo menos una secuencia diana de por lo menos una secuencia de SnaBI_XBP1s-LFG-ATF6f_Fsel; o BspEI_XBPS1s-LF-ATF6f_KpnI; o BspEI_XBPs-L4H4-Atf6f_KpnI; o SnaBI_ATF6-LFG-XBP1s_Fsel; o KpnI_ATF6-L4H4-XBP1s_Sfil o KpnI_ATF6-LF-XBP1s_Sfil que se puede seleccionar de las tablas siguientes: Tabla I (XBP1s-LFG-ATF6f) o Tabla II (BspEI_XBPS1s-LF-ATF6f_KpnI) o Tabla III (BspEI_XBPs-L4H4-Atf6f_KpnI) o Tabla IV (ATF6-LFG-XBP1s) o Tabla V (ATF6-L4H4-XBP1s) o Tabla VI (KpnI_ATF6-LF-XBP1s_Sfil), obtenidas de GenBank.

- 50 Como se describe en la presente memoria, el vector AAV contiene un promotor con la adición de por lo menos una de las secuencias diana de SnaBI_XBP1s-LFG-ATF6f_Fsel; o BspEI_XBPS1s-LF-ATF6f_KpnI; o BspEI_XBPs-L4H4-Atf6f_KpnI; o SnaBI.

Como se describe en la presente memoria, el vector de AAV contiene un promotor con la adición de por lo menos una secuencia diana que es el 85 % homóloga con una secuencia diana seleccionada de las tablas mencionadas anteriormente.

5 Como se describe en la presente memoria, el vector de AAV contiene un promotor con la adición de por lo menos una secuencia diana que es el 70 % homóloga con una secuencia diana seleccionada de las tablas mencionadas anteriormente.

Como se describe en la presente memoria, el vector de AAV contiene un promotor con la adición de por lo menos una secuencia diana, que es un equivalente funcional de una secuencia diana seleccionada de las tablas mencionadas anteriormente.

10 El elemento regulador de la transcripción puede comprender un promotor y, opcionalmente, una región potenciadora. El promotor se selecciona preferiblemente de esta lista: CMV, PGK1, CAMKII, THY1, GAD34 entre otros. No es necesario que el potenciador sea específico del tejido neuronal.

En una implementación, el promotor es específico, por ejemplo, del citomegalovirus, también conocido como CMV.

15 En una implementación, el promotor es específico, por ejemplo, de la proteína fosfoglicerato cinasa 1, también conocida como PGK1.

En una implementación, el promotor es específico, por ejemplo, calcio calmodulina cinasa 2, también conocida como CAMKII.

En una implementación, el promotor es específico, por ejemplo, también conocido como Thy1.

20 En una implementación, el promotor es específico, por ejemplo, el de la descarboxilasa del ácido glutámico 34, también conocido como GAD34, que normalmente opera en las neuronas GABAérgicas.

En otra implementación, el casete de expresión que forma parte del AAV de la presente invención también comprende un elemento regulador posterior a la transcripción. En una implementación preferida, el elemento regulador posterior a la transcripción es el elemento regulador posterior a la transcripción del virus de la hepatitis de la marmota (WPPE) o variantes funcionales y fragmentos del mismo y el PPT-CTS o variantes funcionales y fragmentos mismos. En una implementación particular, el elemento regulador posterior a la transcripción es el WPPE.

25 El casete de expresión que forma parte del AAV según la invención comprende un "polinucleótido de interés". En una realización preferida, el polinucleótido de interés codifica una proteína que actúa sistémicamente. En otra implementación, el polinucleótido de interés codifica una proteína que actúa dentro de una neurona. En una implementación preferida, la proteína que actúa dentro de esa neurona es: XBP1s-LFG-ATF6f; o XBP1s-LF-ATF6f; o XBP1s-LF-ATF6f; o XBP1s-L4H4-ATF6f; o ATF6f-LFG-XBP1s; o ATF6-L4H4-XBP1s o ATF6f-LF-XBP1s, incluyendo cualquiera de sus isoenzimas que varían en ubicaciones subcelulares.

30 El límite de tamaño del empaquetamiento del vector de AAV se limita al tamaño del genoma de AAV de tipo silvestre, cuyo tamaño varía según el estereotipo de AAV (concretamente, entre 4087 y 4767). Por ejemplo, el AAV-2 nativo tiene un tamaño de genoma de 5382. En algunas formas de realización, la capacidad de clonación del vector de ARN recombinante puede ser limitada, y una secuencia codificadora deseada puede implicar la sustitución completa de 4,8 kilobases del genoma del virus. Por lo tanto, los genes de gran tamaño pueden no ser adecuados para su uso en un vector AAV recombinante estándar en algunos casos. El experto medio distinguirá que existen opciones en la técnica para superar una capacidad de codificación limitada. Por ejemplo, los dos genomas *IRT* AAV puede hibridarse para formar concatémeros de cabeza a cola, casi duplicando la capacidad del vector. La inserción de los sitios de empalme permite la eliminación de los *IRT* después de la transcripción. Otras opciones para superar una limitada capacidad de clonación resultarán evidentes para el experto en la materia.

35 Como objetivo siguiente, se sometió a prueba la expresión de estas variantes en una línea celular humana. Esta prueba se explica a continuación, pero no se reivindica. Para llevar a cabo este objetivo, las células derivadas del neuroblastoma SHSY5Y se sustituyeron por células HEK293, debido al bajo porcentaje de transfección (30 %) de las células SHSY5Y. Las células HEK293 corresponden a una línea celular embrionaria de riñón humano, que presenta un alto porcentaje de transfección (80 %) por el método del CaPO₄.

40 Las células HEK293 se transfectaron con las 6 variantes UPRplus. Como control, se incluyeron las versiones individuales de la XBP1s y ATF6f humanas (Tablas XI y XII, respectivamente) que se clonaron en el mismo vector de expresión. También se incluyó la expresión de dos versiones correspondientes a la secuencia de XBP1 en el ADN de ratón existente en el laboratorio.

50 Las células HEK293 se transfectaron mediante el método de CaPO₄ con los respectivos ADN recombinantes y después de 48 horas de expresión se realizó la extracción de proteínas con tampón RIPA y la cuantificación del total de proteínas.

Posteriormente se detectaron diferentes proteínas por medio de inmunoelectrotransferencia (WB), utilizando los anticuerpos anti-HA, anti-XBP1 y anti-ATF6.

El análisis de WB mostró que estas proteínas se expresaron correctamente, ya que fue posible detectar todas las variantes UPRplus con el anticuerpo anti-HA como se muestra en la figura 8/17. El epítipo de la hemaglutinina (HA) está presente en el extremo C-terminal de todas las variantes UPRplus y, por lo tanto, se utilizó como una primera aproximación. Los pesos moleculares obtenidos fueron aproximadamente ~100 kDa para las variantes UPRplus y ~50 kDa para las proteínas individuales.

El tamaño molecular obtenido para la versión individual de la XBP1s clonados en la expresión viral de las variantes UPRplus no difiere en comparación con las versiones de XBP1s de ratón ya caracterizadas y determinadas en el mismo ensayo (Figura 8/17, carriles 8 y 11). Los pesos moleculares obtenidos según la migración electroforética fueron superiores a los pesos moleculares previstos (véase la figura 8/17), tanto para las proteínas UPRplus como para las proteínas individuales.

Por otro lado, la expresión de la XBP1s humana se detectó en todas las variantes UPRplus (carriles 1 a 6, figura 9/17) así como en la variante individual (carril 8, figura 9/17) mediante el anticuerpo anti-XBP1 143F (Biolegend). Dado que este anticuerpo solo reconoce la forma humana de la XBP1s, no fue posible detectar la expresión de la secuencia de ratón de la XBP1s (carriles 9, 11 y 12, figura 9/17).

Finalmente, la proteína ATF6f presente en las variantes UPRplus también se detectó con un anticuerpo anti-ATF6 (abCam) como se muestra en la figura 10/17. Este anticuerpo reconoció las versiones humanas y de ratón de ATF6f (Figura 10/17).

Para determinar la ubicación subcelular de estas proteínas en las células HEK293, se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia indirecta (como se describe en la presente memoria, pero no se reivindica) en las células que expresan proteínas UPRplus y sus versiones individuales. Se utilizaron los mismos anticuerpos descritos anteriormente, utilizados en el análisis de WB. Se detectó la expresión del epítipo HA, de las proteínas XBP1 y ATF6 (Figuras 11/17, 12/17 y 13/17) en las células HEK293 transfectadas de forma transitoria con las diferentes variantes UPRplus y también en las células transfectadas con las versiones individuales de las proteínas XBP1s y ATF6. A partir de estos resultados, determinamos que la ubicación subcelular de las 6 variantes UPRplus corresponde a un patrón nuclear que se hizo evidente tras el comarcado con la sonda Hoechst, que tiñe específicamente los núcleos de las células (Figuras 11/17, 12/17 y 13/17). Para determinar la especificidad del anticuerpo anti-HA, se incluyeron como control negativo las células que se transfectaron de forma transitoria con el plásmido mXBP1s/EGFP correspondiente a la secuencia de ratón de la XBP1s (Figura 11B/17).

También se determinó que el anticuerpo anti-XBP1 reconoce específicamente la proteína XBP1 mediante inmunofluorescencia en todas las variantes UPRplus. La especificidad del anticuerpo anti-XBP1 se determinó mediante la ausencia de la marca en las células transfectadas con ATF6 individualmente o en las células no transfectadas. (Figura 12A/17). Con este ensayo, fue posible detectar la secuencia de ratón de la XBP1s utilizando el anticuerpo anti-XBP1 (Figura 12B/17). Este ensayo no se reivindica.

La expresión de ATF6 también fue corroborada mediante inmunofluorescencia en las células HEK293 transfectadas con las variantes UPRplus. La detección de la proteína ATF6 se observó en todas las variantes proteicas UPRplus, excepto en las células que se transfectaron con XBP1s individualmente, lo cual se utilizó como control negativo (Figura 13/17). Este método no se reivindica.

Posteriormente a la localización subcelular de la expresión de estas proteínas en las células HEK293 transfectadas, se evaluó la activación del elemento promotor en respuesta a la respuesta de la proteína desplegada, "UPR", mediada por el virus pAAV-UPRplus, utilizando indicadores acoplados a la actividad Luciferasa. Este método no se reivindica.

Este análisis de la actividad de transcripción de las variantes de pAAV-UPRplus se llevó a cabo utilizando el sistema de indicadores de la Luciferasa bajo el control del elemento UPR, denominado "UPRE", que responde preferiblemente al heterodímero entre ATF6f y XBP1s. Con esta finalidad, se transfectaron conjuntamente las células HEK293 con los plásmidos pAAV-UPRplus 1 a 6 junto con el plásmido indicador de la luciferasa-UPRE. Además, se transfectó un plásmido codificador de la Renilla, que se utilizó como control interno del ensayo para determinar el porcentaje de células que expresan todos los plásmidos, ya que expresa constitutivamente una molécula quimioluminiscente (Promega, sistema de ensayo de indicadores Dual-Luciferase®). Después de 48 horas de expresión, se midió la luminiscencia obtenida en un luminómetro. Los niveles de activación del elemento de respuesta a UPR por las variantes pAAV-UPRplus se compararon con los generados por la transfección del plásmido codificador para la forma activada de la XBP1s, denominada pAAV-XBP1s, y la forma activa de la ATF6, denominada pAAV-ATF6f, y la transfección conjunta de ambos plásmidos (pAAV-XBP1s y pAAV-ATF6f). También se incluyó como control positivo del experimento la transfección del plásmido pCDNA3-mXBP1s correspondiente a la versión de la secuencia de ratón de la XBP1s. La transfección del vector vacío pCDNA3 también se incluyó como actividad inicial del sistema de actividad de transcripción XBP1/ATF6 de los factores de transcripción XBP1/ATF6. Este método no se reivindica.

La figura 14/17 muestra la actividad de transcripción de las 6 variantes UPRplus y de los controles relevantes. Los valores mostrados representan el promedio de tres experimentos independientes. Como se muestra en la Tabla XIII:

Tabla XIII:

Plásmido	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Promedio	SEM
PAAV_ATF6f-LFG-XBP1s-HA	101,1517	99,62383	125,4241	108,73321	8,357091867
PAAV_ATF6f-LF-XBP1s-HA	88,52831	119,747	191,8758	133,3837033	30,60308089
PAAV_ATF6f-L4H4-XBP1s-HA	79,35313	77,71852	71,44357	76,17174	2,410717813
PAAV_XBP1s-LFG-ATF6f-HA	17,81713	12,53527	21,4335	17,26196667	2,583652391
PAAV_XBP1s-LF-ATF6f-HA	15,62922	11,8496	23,48904	16,98928667	3,428142203
PAAV_XBP1s-L4H4-ATF6f-HA	9,228968	11,24907	10,3266	10,26821267	0,583883502
PAAV_ATF6f-HA	120,188	122,1534	139,6209	127,3207667	6,17618165
PAAV_XBP1s-HA	47,8104	47,95798	46,66553	47,47797	0,408447887
PAAV_ATF6f-HA + PAAV_XBP1s-HA	100	100	100	100	0
pCDNA3_mXBP1	77,29633	120,5979	116,0251	104,6397767	13,73530344
pCDNA3	4,874095	6,953351	4,208801	5,345415667	0,826588582

- 5 La actividad máxima (100 % de la actividad de transcripción) se determinó como los valores de activación alcanzados por las variantes XBP1 y ATF6f transfectadas conjuntamente, y en base a este valor se normalizaron las actividades de cada una de las variantes en cada experimento no reivindicado.

Los resultados obtenidos muestran una actividad de transcripción de las variantes 1-3 parecida a la afección de la coexpresión de XBP1s y ATF6f. Estas variantes son capaces de unirse a la región promotora UPR y lograr activar la expresión del indicador de la Luciferasa. Las variantes 4-6 presentaron niveles de actividad de transcripción en torno al 20 % con respecto al control de la coexpresión ATF6f/XBP1s, por lo que es probable que no consigan unirse a la región promotora UPR o que la estructura que adopta esta proteína quimérica altere su unión a la secuencia de ADN.

Además, se determinó que las variantes individuales son capaces de activar la región promotora UPR y que la ATF6f presenta una mayor actividad que la proteína XBP1s.

- 15 Estos resultados verifican que tres de las variantes mixtas de "ATF6f-XBP1s", las asignadas como 1, 2 y 3, mantienen la propiedad activadora de la UPR, lo que indica que la estrategia propuesta en el proyecto es viable y posiblemente sea capaz de activar genes diana relacionados con la actividad de transcripción del heterodímero ATF6f/XBP1s.

La etapa siguiente en este desarrollo fue evaluar la activación de las dianas de transcripción de la UPR mediadas por la expresión de pAAV-UPRplus.

- 20 Se usaron células HEK293 para llevar a cabo este estudio (descrito en la presente memoria, pero no reivindicado), las cuales se transfectaron con los plásmidos codificadores para las seis variantes de pAAV-UPRplus y las variantes individuales de pAAV-XBP1 y pAAV-ATF6f. Además, se incluyó la transfección conjunta de ambas variantes (pAAV-XBP1s y pAAV-ATF6f), afección que se consideró como la máxima activación alcanzada por el heterodímero en estas pruebas experimentales.

- 25 Tras 24 horas de expresión, se midió la activación de la transcripción de genes asociados a la vía UPR mediante la cuantificación de los niveles de ARNm de un grupo de genes descritos como dianas de transcripción moduladas por el heterodímero ATF6f-XBP1s mediante la técnica de PCR en tiempo real. Este método no se reivindica.

En cuanto a la información general no reivindicada, los genes analizados durante este estadio del proyecto se describieron en un estudio reciente (Shoulders et al., 2013), que determinó, mediante secuenciación masiva, los genes regulados diferencialmente por XBP1s y/o ATF6 en las células HEK293. En este estudio se generaron células HEK293 que son capaces de expresar los factores de transcripción XBP1s y/o ATF6f de forma diferencial e inducida mediante la adición de fármacos que controlan la expresión de estas proteínas. Este sistema es capaz de expresar XBP1 mediante la adición de doxiciclina, ATF6f mediante el fármaco trimetoprima (TMP) y ambas proteínas (heterodímero) mediante la incubación con ambos fármacos.

35

Los genes descritos que se expresan diferencialmente mediante estos factores de transcripción se muestran en la Tabla XIV siguiente:

Table XIV:

XBP1	ATF6	XBP1 /ATF6
Erdj4	HspA5 (BiP)	Creld2
Sec24D	HerpUD	Edem1
Stt3a	Pdia4	Hyou1
	Sel1L	Sulf1

5 La Tabla XIV anterior presenta los genes regulados por XBP1 y/o ATF6 en las células HEK293 inducibles.

En base a esta información, se generaron secuencias de oligonucleótidos para determinar los niveles de expresión de los genes que se muestran en la Tabla XIV usando PCR en tiempo real en las células HEK tratadas con el fármaco tunicamicina, que induce el estrés del retículo endoplásmico (RE). Este método no se reivindica.

10 Con este ensayo no reivindicado pudimos probar la eficacia de amplificación de estos genes y corroborar que estos genes se activan en respuesta a la afección del estrés del RE.

Como se muestra en la figura 15/17, se determinó que los genes se amplificaron eficazmente y también se confirmó que aumentan su expresión en respuesta a la afección del estrés del RE.

15 Posteriormente, se compararon los niveles de ARNm de algunas de las dianas de transcripción de la UPR, obtenidas a partir de las células HEK293 transfectadas con cada una de las seis variantes de pAAV-UPRplus, pAAV-XBP1s o pAAV-ATF6f individualmente, y transfectadas conjuntamente con ambas variantes (pAAV- XBP1 y pAAV-ATF6f). Los métodos utilizados para ello no se reivindican.

20 Los genes que se eligieron para el análisis fueron los asociados con la activación del heterodímero. Los genes elegidos fueron: CRELD2, un gen asociado a la degradación de proteínas desplegadas asociadas al proceso RE 5 llamado ERAD (degradación de proteínas asociadas al retículo endoplásmico), HYOU1, relacionado con el proceso de plegamiento de proteínas, y EDEM 1, asociado a ERAD y SULF1, una enzima secretada implicada en la formación de la matriz extracelular. Además, se determinó la activación de BIP, asociada con el plegamiento de proteínas y la HERPUD implicada en el proceso ERAD. Para los ARN mensajeros asociados con la expresión del heterodímero tal como Creld2, Edem1, Hyou1 y Sulf1, se observa que las variantes 1, 2 y 3 son capaces de activar este grupo de genes en comparación con las variantes 4, 5 y 6. (Figura 16/17). Además, en el caso de la expresión del gen SULF1, la variante UPRplus3 presenta una mayor activación que la obtenida cuando se coexpresan las variantes XBP1s y ATF6f.

25 Este resultado nos muestra que las proteínas quiméricas UPRplus son capaces de activar genes asociados con la respuesta de la proteína desplegada. Además, los niveles de activación alcanzados por las variantes 1, 2 y 3 son parecidos o superiores a los obtenidos al coexpresar ambas proteínas (Figura 16/17). Respecto a la chaperona Bip y los genes HERPUD asociados con la ERAD, también observamos que las variantes 1, 2 y 3 UPRplus son capaces de activar preferiblemente estos genes, alcanzando unos niveles de inducción parecidos a los que se obtienen al coexpresar estos factores de transcripción. Los resultados obtenidos corresponden al promedio de tres experimentos independientes.

Vías de administración

35 Las vías de administración del virus están sujetas a su paso a través de la barrera hematoencefálica para infectar las neuronas diana.

Para lograr este objetivo, se han definido principalmente dos vías de administración que no se reivindican en la presente memoria.

40 La primera de estas vías es la vía nasal. En general, los fármacos administrados por vía nasal pueden entrar en el flujo sanguíneo a través de la circulación general, pueden penetrar directamente al cerebro o, en algunos casos, pueden seguir ambas vías. Sin embargo, muchos de los factores que controlan el flujo del fármaco a través de cada una de estas vías no están completamente definidos. En general, existen tres vías por las que puede circular un fármaco administrado en la cavidad nasal. Estas vías incluyen la entrada a la circulación sistémica directamente desde la mucosa nasal, la entrada al bulbo olfatorio mediante transporte axonal a través de las neuronas y la entrada directa al cerebro. A continuación, se resumen las pruebas que respaldan el papel de cada una de estas vías en una variedad de sustratos modelo para los diferentes tipos de virus.

Vías de transporte seguidas de varios solutos virales mediante administración nasal.			
Soluto	Modelo animal	Vía de administración	Vía recorrida
Virus	Ratón	Inoculación nasal	Nervio olfatorio
Virus de la hepatitis	Ratón	Gotas nasales	Directa, sistémica, nervio olfatorio
Virus del herpes simple	Ratón	Inoculación nasal	Nervio olfatorio
Virus de la encefalitis	Ratón	Gotas nasales	Directa
Neumococo			

Esta tabla no pretende ser exhaustiva por naturaleza, sino más bien resaltar algunos de los diferentes tipos de solutos que se ha demostrado que siguen una o más vías.

Otras vías de administración a las células del SNC son:

- 5 Inyección directa en compartimentos fluidos, tales como el humor vítreo del ojo; o hacia el líquido cerebral de la columna vertebral a través de diferentes vías, intraventricular o intratecal (**), para su administración al plexo coroideo, las capas endodurales/meningeas, y desde allí al cerebro adyacente a través de procesos que se extienden dentro de estas capas; y su paso a través de la barrera hematoencefálica o barreras hematotumorales mediante inyección intraarterial combinada con una interrupción osmótica o farmacológica temporal.
- 10 El término (**) intratecal (intra + teca, "dentro de una vaina") es un adjetivo que se refiere a algo que se produce o se introduce en un espacio anatómico o espacio potencial dentro de una vaina, más habitualmente la membrana aracnoidea del cerebro o la médula espinal.

Cálculo de la dosis

- 15 Según Ulusoy et al, la titulación de vectores requiere un intervalo entre 10^9 y 10^{13} copias del genoma (GC) por ml con una dosis comprobada de 10^{10} a 10^{12} gc/ml. Por otro lado, para cualquier relación de dilución de los vectores a valorar, estos deben tener un intervalo medio-bajo de 10^{11} gc/ml, lo que da como resultado la desaparición de la toxicidad. Esta información se proporciona como información general y no se reivindica.

Dosis en humanos:

- 20 El intervalo de la dosis en humanos se encuentra entre 10^9 y 10^{30} unidades virales/kg de peso corporal, sin restringir este intervalo a la aplicación en diferentes grupos de edad o con volúmenes de distribución modificados por edad o patología. La dosis reivindicada del virus está entre 10^9 a 10^{13} copias del genoma (GC) por ml de compuesto.

- 25 La mayor concentración o cantidad de una sustancia, encontrada mediante experimento u observación, que no provoca ninguna alteración negativa detectable de la morfología, capacidad funcional, crecimiento, desarrollo o duración de la vida de los organismos diana, distinguibles de las observadas en organismos normales (de control) de la misma especie y cepa en las condiciones de exposición definidas.

Método de aplicación (descrito en la presente memoria, pero no reivindicado)

- 30 Los vectores rAAV2 se inyectaron bilateralmente en el NS usando una jeringa Hamilton de 5 μ l equipada con un capilar de vidrio con un diámetro de punta de aproximadamente 60 a 80 micrómetros. Se inyectaron dos microlitros del tampón que contenía las concentraciones apropiadas de partículas virales a una velocidad de 0,4 μ l/minuto. La aguja se retiró lentamente 5 minutos después de finalizar la inyección.

Descripción de las figuras

Figura 1/17

Esta figura muestra un mapa de restricción del plásmido pAAV-XBP1s-LFG-ATF6f, con 7701 pb y la representación de los elementos genéticos presentes en el ADN recombinante generado.

- 35 Figura 2/17

Esta figura muestra un mapa de restricción del plásmido pAAV-XBP1s-LF-ATF6f, con 7809 pb y la representación de los elementos genéticos presentes en el ADN recombinante generado.

Figura 3/17

Esta figura muestra un mapa de restricción del plásmido AAV-XBP1s-L4H4-ATF6f, con 7719 pb y la representación de los elementos genéticos presentes en el ADN recombinante generado.

Figura 4/17

- 5 Esta figura muestra un mapa de restricción del plásmido AAV-ATF6f-LFG-XBP1s, con 7701 pb y la representación de los elementos genéticos presentes en el ADN recombinante generado.

Figura 5/17

Esta figura muestra un mapa de restricción del plásmido pAAV-ATF6f-L4H4-XBP1s, con 7719 pb y la representación de los elementos genéticos presentes en el ADN recombinante generado.

10 Figura 6/17

Esta figura muestra un mapa de restricción del plásmido pAAV-ATF6f-LF-XBP1s, con 7809 pb y la representación de los elementos genéticos presentes en el ADN recombinante generado.

Figura 7/17

- 15 Esta figura muestra una fotografía de la prueba de restricción de las variantes UPRplus. Se realizó una digestión de ADN plasmídico (este método se describe en la presente memoria, pero no se reivindica) con la enzima de restricción EcoR1 durante dos horas a 37 °C.

Los fragmentos obtenidos se establecieron en un gel de agarosa al 1 %. Se utilizaron dos tipos de marcadores de tamaño de peso molecular. Los tamaños se muestran en los extremos de la fotografía del gel:

1. pAAV_ATF6f-LFG-XBP1s-HA
- 20 2. pAAV_ATF6f-LF-XBP1s-HA
3. pAAV_ATF6f-L4H4-XBP1s-HA
4. pAAV_XBP1s-LFG-ATF6f-HA
5. pAAV_XBP1s-LF-ATF6f-HA
6. pAAV_XBP1s-L4H4-ATF6f-HA
- 25 7. pAAV_ATF6f-HA
8. pAAV_XBP1s-HA

Tamaños previstos después de la digestión con Eco R1:

1. 3.895, 1.928, 1.531, 347 tamaño total: 7.701
2. 3.895, 1.928, 1.639, 347 tamaño total: 7.809
- 30 3. 3.895, 1.928, 1.549, 347 tamaño total: 7.719
4. 4.262, 1.928, 818, 693 tamaño total: 7.701
5. 4.264, 1.928, 926, 693 tamaño total: 7.809
6. 4.264, 1.928, 836, 693 tamaño total: 7.719
7. 3.895, 1.928, 693 tamaño total: 6.516
- 35 8. 4.262, 1.928, 347 tamaño total: 6.537

Figura 8/17

- 40 Esta figura muestra la expresión de las variantes UPRplus en las células HEK293 y su detección mediante el epítipo de HA: Las células HEK293 se transfectaron de forma transitoria con las variantes UPRplus. Se utilizaron plásmidos codificadores como control para el XBP1s-HA, ATF6-HA y el XBP1s/GFP. Además, se incluyó un extracto de células no transfectadas (NT). Después de 48 horas de expresión, se extrajo el total de proteínas y se detectó el epítipo de HA utilizando el anticuerpo anti-HA de Covance (dilución 1:1.000). Se utilizó mXBP1-HA como control positivo. Se utilizó Hsp90 como control de carga. Los métodos utilizados aquí no se reivindican.

Los tamaños se muestran en los extremos de la fotografía del gel:

1. pAAV_ATF6f-LFG-XBP1s-HA peso molecular previsto 83 kDa
2. pAAV_ATF6f-LF-XBP1s-HA peso molecular previsto 87 kDa
3. pAAV_ATF6f-L4H4-XBP1s-HA peso molecular previsto 82 kDa
- 5 4. pAAV_XBP1s-LFG-ATF6f-HA peso molecular previsto 83 kDa
5. pAAV_XBP1s-LF-ATF6f-HA peso molecular previsto 87 kDa
6. pAAV_XBP1s-L4H4-ATF6f-HA peso molecular previsto 82 kDa
7. pAAV_ATF6f-HA peso molecular previsto 43 kDa
8. pAAV_XBP1s-HA peso molecular previsto 43 kDa
- 10 9. pAAV_mXBP1/GFP peso molecular previsto 40 kDa
10. NT
11. pAAV_mXBP1s-HA peso molecular previsto 43 kDa
12. pAAV_mXBP1s-HA peso molecular previsto 43 kDa

Figura 9/17

- 15 Esta figura muestra la expresión de las variantes UPRplus en las células HEK293 y la detección de XBP1s en las mismas. Las células HEK293 se transfectaron de forma transitoria con las variantes UPRplus y con los plásmidos codificadores para XBP1s-HA, ATF6-HA, XBP1s y mXBP1s. Además, los extractos de las células no transfectadas (NT) se utilizaron como control. Después de 48 horas de expresión, se extrajo el total de proteínas y se detectó la proteína XBP1 utilizando el anticuerpo anti-XBP1 de Biolegend, 143F (dilución 1:1.000). Se utilizó Hsp90 como control de carga. Los métodos utilizados aquí no se reivindican.
- 20

Identificación de los carriles de gel:

1. pAAV_ATF6f-LFG-XBP1s-HA
2. pAAV_ATF6f-LF-XBP1s-HA
3. pAAV_ATF6f-L4H4-XBP1s-HA
- 25 4. pAAV_XBP1s-LFG-ATF6f-HA
5. pAAV_XBP1s-LF-ATF6f-HA
6. pAAV_XBP1s-L4H4-ATF6f-HA
7. pAAV_ATF6f-HA
8. pAAV_XBP1s-HA
- 30 9. pAAV_mXBP1/GFP
10. NT
11. pAAV_mXBP1s-HA
12. pAAV_mXBP1s-HA

Figura 10/17

- 35 Esta figura muestra la expresión de las variantes UPRplus en las células HEK293 y la detección de ATF6. Las células HEK293 se transfectaron de forma transitoria con las variantes UPRplus y con los plásmidos codificadores para XBP1s-HA, ATF6-HA, XBP1s, mXBP1s. Además, se utilizaron células no transfectadas (NT) como control. Después de 48 horas de expresión, se extrajo el total de proteínas y se detectó la proteína ATF6 utilizando el anticuerpo anti-ATF6 de abCam (dilución 1:250). La expresión de la proteína ATF6 de ratón se utilizó como control positivo. Se utilizó Hsp90 como control de carga. Los métodos utilizados aquí no se reivindican.
- 40

Identificación de los carriles de gel:

Figura 11/17

Esta figura muestra dos grupos de fotografías, A y B, donde se puede observar la distribución subcelular de las variantes UPRplus en las células HEK293. No se reivindican los métodos utilizados para lograr estas fotografías.

5 El grupo identificado como (A) presenta las células HEK293 que se transfectaron con las diferentes variantes UPRplus, fijadas después de 48 horas de expresión y se tiñeron conjuntamente con anticuerpo anti-HA (rojo, panel superior) y Hoechst (azul, panel central) en cada afección. La superposición de imágenes se muestra en el panel inferior de cada afección.

10 El grupo identificado como (B) presenta las células HEK293 que se transfectaron con mXBP1s/EGFP, se fijaron después de 48 horas de expresión y se tiñeron conjuntamente con el anticuerpo anti-HA (rojo), fluorescencia intrínseca EGFP (verde) y Hoechst (azul).

La barra inferior de cada fotografía corresponde a 10 µm.

Figura 12/17

15 Esta figura muestra dos grupos de fotografías, A y B, que presentan la distribución subcelular de las variantes UPRplus en las células HEK293. No se reivindican los métodos utilizados para lograr estas fotografías.

(A) Las células HEK293 se transfectaron con las diferentes variantes UPRplus, se fijaron después de 48 horas de expresión y se tiñeron conjuntamente con el anticuerpo anti-XBP1 (rojo, panel superior) y tinción de Hoechst (azul, panel central) en cada afección. La superposición de imágenes se muestra en el panel inferior de cada afección.

20 (B) Las células HEK293 se transfectaron con mXBP1s/EGFP, se fijaron después de 48 horas de expresión y se tiñeron conjuntamente con el anticuerpo anti-XBP1 (rojo), fluorescencia intrínseca EGFP (verde) y tinción de Hoechst (azul).

La barra inferior de cada fotografía corresponde a 20 µm.

Figura 13/17

Esta figura analiza la distribución subcelular de las variantes UPRplus en las células HEK293. No se reivindican los métodos utilizados para lograr estas fotografías.

25 Las células HEK293 se transfectaron con las diferentes variantes UPRplus, se fijaron después de 48 horas de expresión y se tiñeron conjuntamente con el anticuerpo anti-ATF6 (rojo, panel superior) y la tinción de Hoechst (azul, panel central) en cada afección. La superposición de imágenes se muestra en el panel inferior de cada afección.

La barra inferior de cada fotografía corresponde a 20 µm.

Figura 14/17

30 Esta figura presenta un gráfico de barras que representa la actividad de transcripción de las variantes UPRplus. No se reivindican los métodos utilizados para producir esta figura.

Las células HEK293 se transfectaron de forma transitoria con tres plásmidos diferentes:

- los vectores que codifican las variantes UPRplus;
- el vector que porta la región promotora UPRE que controla la expresión de luciferasa; y
- 35 - el plásmido codificador de renilla, como control interno.

Los controles positivos utilizados fueron los plásmidos codificadores para ATF6-HA, XBP1s-HA y la transfección conjunta de ATF6-HA/XBP1s-HA. Asimismo, el vector vacío pCDNA3 transfectado se utilizó como control negativo. Después de 48 horas de expresión, se determinó la actividad de transcripción mediante un ensayo de luciferasa.

Se llevó a cabo la medición de la luminiscencia y se normalizó con la actividad de la renilla.

40 El gráfico (panel superior) representa el promedio de tres experimentos independientes y los valores son la media y el error estándar de la media (SEM).

La tabla (panel inferior) muestra los valores obtenidos en cada experimento para cada afección experimental.

Figura 15/17

Esta figura muestra un análisis de la expresión de genes diana UPR en las células HEK293 donde:

Los niveles de ARNm de las dianas de transcripción asociadas a la UPR se analizaron mediante PCR en tiempo real a partir de ADNc obtenido de las células HEK293 en las condiciones iniciales y se trataron con 1 µg/ml de tunicamicina durante 8 horas.

Todas las muestras se normalizaron con los niveles de expresión del gen de β-actina constitutivamente activo.

No se reivindican los métodos utilizados para producir esta figura.

Figura 16/17

Esta figura muestra un análisis de la expresión de genes diana UPR en las células HEK293 transfectadas con pAAV-UPRplus donde:

Los niveles de ARNm de las dianas de transcripción asociadas a UPR se analizaron mediante PCR en tiempo real a partir de ADNc obtenido de las células HEK293 transfectadas con los plásmidos codificadores para las seis variantes de pAAV-UPRplus y las variantes individuales de XBP1s y ATF6f, y la transfección conjunta de ambas variantes (pAAV-XBP1s y pAAV-ATF6f).

Todas las muestras se normalizaron con los niveles de expresión del gen de β-actina constitutivamente activo.

1. pAAV_ATF6f-LFG-XBP1s-HA

2. pAAV_ATF6f-LF-XBP1s-HA

3. pAAV_ATF6f-L4H4-XBP1s-HA

4. pAAV_XBP1s-LFG-ATF6f-HA

5. pAAV_XBP1s-LFATF6f-HA

6. pAAV_XBP1s-L4H4-ATF6f-HA

7. pAAV_ATF6f-HA

8. pAAV_XBP1s-HA

7+8. pAAV_ATF6f-HA + pAAV_XBP1s-HA

GFP. pAAV-EGFP

No se reivindican los métodos utilizados para producir esta figura.

Figura 17/17

Esta figura presenta un análisis de agregación proteica de la proteína poliQ79 (ejemplo de aplicación) frente a la expresión UPRplus donde:

(A) Las células N2A se transfectaron conjuntamente de forma transitoria con los vectores pAAV-UPRplus, pAAV-XBP1s o pAAV-ATF6f, y con el vector pEGFP-poly-Q79. La expresión de la proteína se analizó mediante inmunoelectrotransferencia, después de 24 horas (panel derecho) y 48 horas (panel izquierdo) de expresión. Se utilizó HSP90 como control de carga.

(B) Estas mismas muestras se analizaron mediante un ensayo de filtro con trampa después de 24 horas (panel derecho) y 48 horas (panel izquierdo) de expresión.

(C) Gráfico que representa la cuantificación de la agregación proteica de la proteína poliQ79 mediante inmunoelectrotransferencia después de 24 horas (panel derecho) y 48 horas (panel izquierdo) de expresión. Se muestran la media y el error estándar de los tres experimentos independientes.

(D) Gráfico que representa la cuantificación de la agregación proteica de poliQ79 usando el filtro con trampa después de 24 horas (panel derecho) y 48 horas (panel izquierdo) de expresión. Se muestran la media y el error estándar de los tres experimentos independientes.

No se reivindican los métodos utilizados para producir esta figura.

Ejemplo de aplicación: los métodos descritos a continuación no se reivindican.

Las enfermedades de Parkinson y Huntington están relacionadas con la formación de agregados proteicos que provocan la muerte neuronal selectiva, preferiblemente en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra. Para observar estos efectos, se realizó una prueba de inmunoelectrotransferencia, como se muestra en la figura 17/17, donde:

- 5 se sembraron 3×10^5 células N2A en pocillos de 30 mm. Después de 24 horas, se transfectaron conjuntamente los vectores pAAV-UPRplus, pAAV-XBP1s o pAAV-ATF6 y se utilizó el vector pEGFP-poly-Q79 con el método Effectene. Se mezclaron 0,6 µg de cada vector más 3,2 µl de potenciador y 100 µl de tampón EC. La mezcla se agitó con un vórtex durante 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se añadieron 8 µl de Effectene (Qiagen), se agitó con vórtex durante 10 segundos y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. La solución se mezcló con 500 µl de medio DMEM SFB al 10 % y se añadió a la placa de cultivo por goteo cubriendo toda la superficie.

- 15 Después de 24 o 48 horas de expresión, las células se retiraron de la placa de cultivo mediante un raspador celular, se recogieron y se centrifugaron a 2.000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. El precipitado se volvió a suspender en un tampón PBS con tritón al 1%, complementado con un inhibidor de proteasa (Roche). Las células se sonicaron 3 veces durante 5 segundos en hielo y, finalmente, se determinó la concentración de proteína en cada muestra utilizando el ensayo de proteínas BCA (Pierce, Rockford, IL) (Zhang et al. 2014).

- 20 Las muestras de proteínas se prepararon utilizando 25 µg del total de proteínas, se mezclaron con tampón de carga 4X (Tris-HCl 0,2 M [pH 6,8], SDS 10 %, azul de bromofenol 0,05 % y glicerol 20 %) y luego se calentaron durante 5 minutos a 95 °C, que se cargaron en geles desnaturalizantes al 8 %. El gel separador de poli(acrilamida) al 8 % se preparó con Tris-HCl 380 mM [pH 8,3], acrilamida-bis-acrilamida 8%, SDS 0,1%, persulfato de amonio 0,1 % y TEMED 0,06 %. El gel de poli(acrilamida) compresor se preparó con Tris-HCl 60 mM [pH 6,8], acrilamida-bis-acrilamida 4 %, SDS 0,1 %, persulfato de amonio 0,1 % y TEMED 0,06 %.

- 25 La electroforesis se llevó a cabo en un tampón de migración (Tris 25 mM, glicina 250 mM y SDS 0,1 %) a una tensión constante de 100 V. La migración electroforética se detuvo cuando el frente azul abandonó el gel. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF en un tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 250 mM y metanol al 20 %) a una tensión constante de 100 V durante 2 horas y 30 minutos en hielo. Luego se incubó la membrana en la solución de bloqueo (5 % de leche en PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación constante. Finalmente, las membranas se incubaron con cualquiera de los anticuerpos siguientes, diluidos en leche al 5% en PBS-Tween 0,02%; anti-GFP 1:1.000 (Santa Cruz) o anti-HSP90 1:3.000 (Santa Cruz), durante 16 horas a 4 °C en agitación constante. Al día siguiente, las membranas se lavaron 3 veces durante 5 minutos con PBS-Tween al 0,1 % y posteriormente se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación constante con los anticuerpos secundarios pertinentes: anti-HRP de conejo o anti-HRP de ratón (Invitrogen) diluidos 1:3.000 (leche al 5 % en PBS-Tween 0,02 %). Una vez transcurrido este período, las membranas se lavaron con PBS-Tween 0,1 %, esta vez 3 veces durante 5 minutos. Finalmente, el análisis de proteínas se realizó utilizando el kit de sustrato para inmunoelectrotransferencia (Pierce) y el sistema de detección de imágenes Chemidoc (Biorad).

Para confirmar los datos obtenidos anteriormente, se llevó a cabo un ensayo de filtro con trampa, donde se usaron 25 µg del total de proteína mezclada con tampón PBS-SDS 4X para llevarlo a cabo.

- 40 Estas muestras se cargaron en una placa de 96 pocillos acoplada a una bomba de vacío que contenía filtros de acetato de celulosa. Después de añadir las muestras, se aplicó vacío para retener solo las especies de alto peso molecular en el filtro. Posteriormente, los filtros se incubaron en una solución de bloqueo (5 % de leche en PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación constante. Posteriormente fueron incubadas con el anticuerpo anti-GFP 1:1.000 (Santa Cruz), diluido en leche al 5 % en PBS-Tween 0,02 % durante 16 horas a 4 °C con agitación constante. Al día siguiente, los filtros se lavaron 3 veces durante 5 minutos con PBS-Tween 0,1 % y posteriormente se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación constante con el anticuerpo secundario anti-HRP de ratón (Invitrogen) diluido 1:3.000 (5 % de leche en PBS-Tween 0,02 %).

Después de este período, las membranas se lavaron con PBS-Tween 0,1 %, esta vez 3 veces durante 5 minutos. Finalmente, el análisis de proteínas se realizó utilizando el kit de sustrato para inmunoelectrotransferencia (Pierce) y el sistema de detección de imágenes Chemidoc (Biorad).

Conclusiones:

- 50 Con la expresión de las proteínas UPRplus, XBP1s y ATF6f durante 24 horas se logró reducir el porcentaje de agregación de la proteína poliQ79-EGFP en la célula N2A. La expresión de las proteínas UPRplus, XBP1s y ATF6f logró reducirse al 23,2 %, 47 % y 51,4 %, respectivamente, el porcentaje de agregación determinado mediante WB.

El efecto antiagregación también se determinó mediante la técnica de filtro con trampa, en cuyo caso la expresión de las proteínas UPRplus, XBP1s y ATF6f cayó al 15,1 %, 15 % y 39,1 % respectivamente, después de 24 horas.

- 55 Además, se evaluó el efecto antiagregación de la expresión de las proteínas XBP1s, ATF6f y UPRplus utilizando WB después de 48 horas. Se observó que la agregación de poliQ79 disminuyó significativamente solo con el tratamiento UPRplus (disminución del 47 %).

Además, con la técnica de filtro con trampa se observó que la expresión de las proteínas XBP1s, ATF6f y UPRplus disminuyó la agregación proteica de poliQ79-GFP a 48,5 %; 65,6 % y 24 % respectivamente, con respecto al control, después de las 48 horas.

Materiales y métodos

5 Producción de los vectores adenoasociados

Las partículas del virus AAV serotipo 2 (AAV2/6) se produjeron mediante la transfección de células 293-AAV (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) y se purificaron en un gradiente de iodixanol seguido de cromatografía de afinidad en columna. El número de partículas de AAV que contiene el genoma en la suspensión, así como la infectividad de la suspensión del vector en las células HEK293T, se determinaron mediante ensayos TaqMan qPCR.

10 Preparación de los plásmidos adenovirales (pAAV) para las 6 variantes:

Para el desarrollo de esta diana se sintetizaron *de novo* las secuencias de XBP1s, secuencias de ATF6f humano y los respectivos enlazadores y se clonaron en el plásmido adenoviral pAAV-CMV-MCS, que expresa el transgén bajo el promotor CMV. La secuencia de la etiqueta HA (Figura 17/17 A) se incluyó en todos los constructos generados, lo que luego nos permitió identificar las células transducidas. Como control se utilizó el plásmido adenoviral vacío pAAV-CMV-MCS.

15 Para confirmar la expresión de los constructos generados transfectamos las células HEK con los diferentes constructos, después de 48 horas de la transfección realizamos la extracción de proteínas que fueron evaluadas mediante WB utilizando un anticuerpo anti-HA.

20 Como se muestra en la figura 10/17, detectamos una banda con el peso molecular previsto para las variantes UPRplus (130 kDa) junto con los controles de expresión para pAAV-XBP1s-HA (55 kDa), pAAV-ATF6f-HA (55 kDa) y pCDNA-mXBP1s (55 kDa).

PCR en tiempo real

25 Se aisló todo el ARN de las células HEK 293 transfectadas con los diferentes plásmidos. Después de la homogeneización en PBS, se siguió el protocolo de extracción de ARN con trizol recomendado por el fabricante. El ADNc se sintetizó con un kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems). Se utilizó SYBR Green y el sistema QPCR Mx3005P (Stratagene) para la PCR-TR cuantitativa. La cuantificación relativa del ARNm se calculó mediante el método del ciclo de umbral comparativo con β -actina como control. Los cebadores de las secuencias se obtuvieron de la base de datos PrimerBank (Tabla XV).

Tabla XV

Erdj4	5'-GGAAGGAGGAGCGCTAGGTC-3'	5'-ATCCTGCACCCTCCGACTAC-3'
HspA5 (BiP)	5'-GCCTGTATTCTAGACCTGCC-3'	5'-TTCATCTTGCCAGCCAGTTG-3'
HerpUD	5'-AACGGCATGTTTTGCATCTG-3'	5'-GGGGAAGAAAGGTTCCGAAG-3'
Hyou 1	5'-GCAGACCTGTTGGCACTGAG-3'	5'-TCACGATCACCGGTGTTTTTC-3'
Pdia4	5'-AGTGGGGAGGATGTCAATGC-3'	5'-TGGCTGGGATTTGATGACTG-3'
Sec24D	5'-AGCAGACTGTCCTGGGAAGC-3'	5'-TTTGTGTTGGGGCTGGAAAAG-3'
Sel1L	5'-ATCTCCAAAAGGCAGCAAGC-3'	5'-TGGGAGAGCCTTCCTCAGTC-3'
Stt3a	5'-TTCAACCTGGGTGACCAAGT-3'	5'-CATGACCTTCGCATCCTCTG-3'
Sulf1	5'-ATCAAGGAGGCTGCTCAGG-3'	5'-TGTCATGCGTGAAGCAAGTG-3'

30 Inmunoelectrotransferencia

Esta técnica se describe en detalle en el experimento 1.

Cultivos

35 Las células Neuro2A y HEK293T se obtuvieron a partir de ATCC y se cultivaron en el medio DMEM complementado con suero bovino al 10 % o 5 %, respectivamente, y antibióticos (10.000 U/ml de penicilina, 10 mg/ml de estreptomycinina), a 37 °C y el 5 % de CO₂.

Ensayos

40 Ensayo de filtro con trampa: se aplican 25 µg del total de proteína a una placa de 96 pocillos acoplada a una bomba de vacío (aparato de microfiltración, bio-rad, www.bio-rad.com/en-us/applications-technologies/protein-blotting-equipment-cells-power-supplies#3) que contiene filtros de acetato de celulosa.

Después de añadir las muestras, se aplicó vacío para retener solo las especies de alto peso molecular en el filtro. A continuación, los filtros se incubaron en una solución de bloqueo (5 % de leche en PBS) durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. A continuación, se incubaron con el anticuerpo anti-GFP 1:1.000 (Santa Cruz), diluido en leche al 5 % en PBS-Tween al 0,02 % durante 16 horas a 4 °C en agitación. Al día siguiente, los filtros se lavaron 3 veces durante 5 minutos con PBS-Tween al 0,1 % y, a continuación, se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación constante con el anticuerpo secundario anti-HRP de ratón (Invitrogen) diluido 1:3.000 (leche al 5 % en PBS-Tween 0,02 %).

Método con Effectene: Este método consiste en un método de transfección de plásmidos en las células eucariotas, que es descrito y estandarizado por el protocolo del fabricante (Qiagen) (www.qiagen.com/es/shop/assay-technologies/transfection-reagents/effectene-transfection-reagent/).

Este protocolo consiste en mezclar 0,6 µg de cada vector más 3,2 µl de potenciador y 100 µl de tampón EC. La mezcla se agita con un vórtex durante 10 segundos y se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos. A continuación, se añadieron 8 µl de Effectene, se agitó con vórtex durante 10 segundos y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Esta solución se mezcla con 500 µl de medio DMEM FBS al 10 % y se añade a la placa de cultivo por goteo de 30 mm cubriendo toda la superficie.

Estadística

Los datos se expresan como media y SEM. Dependiendo de los experimentos, los resultados se compararon estadísticamente mediante la prueba de la t de Student o la prueba de Mann-Whitney, ANOVA de dos factores, seguido de la prueba de Holm-Sidak o la prueba de Bonferroni como prueba post-hoc, o ANOVA de un factor de Kruskal-Wallis en rangos, seguido de la prueba de Dunn o la prueba de Bonferroni como prueba post-hoc.

Tabla 1

Serial clone: W2.30 -- 019-10-2015 16:59
 Maps de restricción de **paav** **gpf10-270-ggga2**
 Enzimas de restricción que cortan como máximo 4 vez (uso de RELibrary como biblioteca de enzimas de restricción):
###

[illegible]

[illegible]

3116 3120 3124 3128 3132 3136 3140 3144 3148 3152 3156 3160 3164 3168 3172 3176 3180 3184
 > promoter CMV
 3116 3120 3124 3128 3132 3136 3140 3144 3148 3152 3156 3160 3164 3168 3172 3176 3180 3184
 3188 3192 3196 3200 3204 3208 3212 3216 3220 3224 3228 3232 3236 3240 3244 3248 3252 3256 3260 3264 3268 3272 3276 3280 3284
 3288 3292 3296 3300 3304 3308 3312 3316 3320 3324 3328 3332 3336 3340 3344 3348 3352 3356 3360 3364 3368 3372 3376 3380 3384
 3388 3392 3396 3400 3404 3408 3412 3416 3420 3424 3428 3432 3436 3440 3444 3448 3452 3456 3460 3464 3468 3472 3476 3480 3484
 3488 3492 3496 3500 3504 3508 3512 3516 3520 3524 3528 3532 3536 3540 3544 3548 3552 3556 3560 3564 3568 3572 3576 3580 3584
 3588 3592 3596 3600 3604 3608 3612 3616 3620 3624 3628 3632 3636 3640 3644 3648 3652 3656 3660 3664 3668 3672 3676 3680 3684
 3688 3692 3696 3700 3704 3708 3712 3716 3720 3724 3728 3732 3736 3740 3744 3748 3752 3756 3760 3764 3768 3772 3776 3780 3784
 3788 3792 3796 3800 3804 3808 3812 3816 3820 3824 3828 3832 3836 3840 3844 3848 3852 3856 3860 3864 3868 3872 3876 3880 3884
 3888 3892 3896 3900 3904 3908 3912 3916 3920 3924 3928 3932 3936 3940 3944 3948 3952 3956 3960 3964 3968 3972 3976 3980 3984
 3988 3992 3996 4000 4004 4008 4012 4016 4020 4024 4028 4032 4036 4040 4044 4048 4052 4056 4060 4064 4068 4072 4076 4080 4084
 4088 4092 4096 4100 4104 4108 4112 4116 4120 4124 4128 4132 4136 4140 4144 4148 4152 4156 4160 4164 4168 4172 4176 4180 4184
 4188 4192 4196 4200 4204 4208 4212 4216 4220 4224 4228 4232 4236 4240 4244 4248 4252 4256 4260 4264 4268 4272 4276 4280 4284
 4288 4292 4296 4300 4304 4308 4312 4316 4320 4324 4328 4332 4336 4340 4344 4348 4352 4356 4360 4364 4368 4372 4376 4380 4384
 4388 4392 4396 4400 4404 4408 4412 4416 4420 4424 4428 4432 4436 4440 4444 4448 4452 4456 4460 4464 4468 4472 4476 4480 4484
 4488 4492 4496 4500 4504 4508 4512 4516 4520 4524 4528 4532 4536 4540 4544 4548 4552 4556 4560 4564 4568 4572 4576 4580 4584
 4588 4592 4596 4600 4604 4608 4612 4616 4620 4624 4628 4632 4636 4640 4644 4648 4652 4656 4660 4664 4668 4672 4676 4680 4684
 4688 4692 4696 4700 4704 4708 4712 4716 4720 4724 4728 4732 4736 4740 4744 4748 4752 4756 4760 4764 4768 4772 4776 4780 4784
 4788 4792 4796 4800 4804 4808 4812 4816 4820 4824 4828 4832 4836 4840 4844 4848 4852 4856 4860 4864 4868 4872 4876 4880 4884
 4888 4892 4896 4900 4904 4908 4912 4916 4920 4924 4928 4932 4936 4940 4944 4948 4952 4956 4960 4964 4968 4972 4976 4980 4984
 4988 4992 4996 5000 5004 5008 5012 5016 5020 5024 5028 5032 5036 5040 5044 5048 5052 5056 5060 5064 5068 5072 5076 5080 5084
 5088 5092 5096 5100 5104 5108 5112 5116 5120 5124 5128 5132 5136 5140 5144 5148 5152 5156 5160 5164 5168 5172 5176 5180 5184
 5188 5192 5196 5200 5204 5208 5212 5216 5220 5224 5228 5232 5236 5240 5244 5248 5252 5256 5260 5264 5268 5272 5276 5280 5284
 5288 5292 5296 5300 5304 5308 5312 5316 5320 5324 5328 5332 5336 5340 5344 5348 5352 5356 5360 5364 5368 5372 5376 5380 5384
 5388 5392 5396 5400 5404 5408 5412 5416 5420 5424 5428 5432 5436 5440 5444 5448 5452 5456 5460 5464 5468 5472 5476 5480 5484
 5488 5492 5496 5500 5504 5508 5512 5516 5520 5524 5528 5532 5536 5540 5544 5548 5552 5556 5560 5564 5568 5572 5576 5580 5584
 5588 5592 5596 5600 5604 5608 5612 5616 5620 5624 5628 5632 5636 5640 5644 5648 5652 5656 5660 5664 5668 5672 5676 5680 5684
 5688 5692 5696 5700 5704 5708 5712 5716 5720 5724 5728 5732 5736 5740 5744 5748 5752 5756 5760 5764 5768 5772 5776 5780 5784
 5788 5792 5796 5800 5804 5808 5812 5816 5820 5824 5828 5832 5836 5840 5844 5848 5852 5856 5860 5864 5868 5872 5876 5880 5884
 5888 5892 5896 5900 5904 5908 5912 5916 5920 5924 5928 5932 5936 5940 5944 5948 5952 5956 5960 5964 5968 5972 5976 5980 5984
 5988 5992 5996 6000 6004 6008 6012 6016 6020 6024 6028 6032 6036 6040 6044 6048 6052 6056 6060 6064 6068 6072 6076 6080 6084
 6088 6092 6096 6100 6104 6108 6112 6116 6120 6124 6128 6132 6136 6140 6144 6148 6152 6156 6160 6164 6168 6172 6176 6180 6184

>LSF
 < 4800
 < 4900
 < 5000
 < 5100
 < 5200
 < 5300
 < 5400
 < 5500
 < 5600
 < 5700
 < 5800
 < 5900
 < 6000

6210 6220 6230 6240 6250 6260 6270 6280 6290
 < 6300
 < 6400
 < 6500
 < 6600
 < 6700
 < 6800
 < 6900
 < 7000
 < 7100
 < 7200
 < 7300
 < 7400
 < 7500
 < 7600
 < 7700
 < 7800
 < 7900
 < 8000
 < 8100
 < 8200
 < 8300
 < 8400
 < 8500
 < 8600
 < 8700
 < 8800
 < 8900
 < 9000
 < 9100
 < 9200
 < 9300
 < 9400
 < 9500
 < 9600
 < 9700
 < 9800
 < 9900
 < 10000

Características:

XBP1s-LPG-ATF6f	: {3257 : 7081 - CW}
LSP	: {4721 : 4777 - CW}
ATF6f	: {4778 : 5914 - CW}
HA	: {5085 : 5914 - CW}
codón de terminación	: {5915 : 5917 - CW}
XBP1s	: {3593 : 4720 - CW}
promotor CMV	: {2979 : 3486 - CW}
T7	: {2587 : 2606 - CW}
T7	: {3532 : 3551 - CW}
SP6	: {259 : 242 - CCW}
origen Col1E1	: {1719 : 2347 - CW}
Amp ^r	: {508 : 1567 - CW}
SV40 polIA tardío	: {6475 : 6784 - CCW}
prom. Amp	: {640 : 668 - CW}

Tabla II

~~XXXXXX~~ XXXXXX 02-87 - 019-18-2018 13,684
~~XXXXXX~~ XXXXXX 02-87 - 019-18-2018 13,684

Asociación de personas con discapacidad

Enemas de associação que contenham como máximo 1 vez por dia 300mg de BBLiberty como biblioteca de enzimas de assistência.

३३३

၁၂၀

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----

[illegible][illegible]

၂၀၁၇-၂၀၁၈ ခုနှစ်တွင် အစိုးရက အကူအညီပေးခဲ့သည့် အစီအစဉ်များ၏ အသေးစိတ်အချက်အလက်များကို အောက်ဖော်ပြပါဇယားတွင် ဖော်ပြထားပါသည်။	၂၀၁၇-၂၀၁၈ ခုနှစ်တွင် အစိုးရက အကူအညီပေးခဲ့သည့် အစီအစဉ်များ၏ အသေးစိတ်အချက်အလက်များကို အောက်ဖော်ပြပါဇယားတွင် ဖော်ပြထားပါသည်။
၂၀၁၇-၂၀၁၈ ခုနှစ်တွင် အစိုးရက အကူအညီပေးခဲ့သည့် အစီအစဉ်များ၏ အသေးစိတ်အချက်အလက်များကို အောက်ဖော်ပြပါဇယားတွင် ဖော်ပြထားပါသည်။	၂၀၁၇-၂၀၁၈ ခုနှစ်တွင် အစိုးရက အကူအညီပေးခဲ့သည့် အစီအစဉ်များ၏ အသေးစိတ်အချက်အလက်များကို အောက်ဖော်ပြပါဇယားတွင် ဖော်ပြထားပါသည်။

အထွေထွေအချက်အလက်	၁	၂	၃	၄	၅	၆	၇	၈	၉	၁၀	၁၁	၁၂	၁၃	၁၄	၁၅	၁၆	၁၇	၁၈	၁၉	၂၀	၂၁	၂၂	၂၃	၂၄	၂၅	၂၆	၂၇	၂၈	၂၉	၃၀	၃၁	၃၂	၃၃	၃၄	၃၅	၃၆	၃၇	၃၈	၃၉	၄၀	၄၁	၄၂	၄၃	၄၄	၄၅	၄၆	၄၇	၄၈	၄၉	၅၀	၅၁	၅၂	၅၃	၅၄	၅၅	၅၆	၅၇	၅၈	၅၉	၆၀	၆၁	၆၂	၆၃	၆၄	၆၅	၆၆	၆၇	၆၈	၆၉	၇၀	၇၁	၇၂	၇၃	၇၄	၇၅	၇၆	၇၇	၇၈	၇၉	၈၀	၈၁	၈၂	၈၃	၈၄	၈၅	၈၆	၈၇	၈၈	၈၉	၉၀	၉၁	၉၂	၉၃	၉၄	၉၅	၉၆	၉၇	၉၈	၉၉	၁၀၀
------------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----

> prom. Amp
 61.0 62.0 63.0 64.0 65.0 66.0 67.0 68.0

၁၂၃၄၅၆၇၈၉၁၀၁၁၂၁၃၁၄၁၅၁၆၁၇၁၈၁၉၂၀၂၁၂၂၂၃၂၄၂၅၂၆၂၇၂၈၂၉၃၀၃၁၃၂၃၃၃၄၃၅၃၆၃၇၃၈၃၉၄၀၄၁၄၂၄၃၄၄၄၅၄၆၄၇၄၈၄၉၅၀၅၁၅၂၅၃၅၄၅၅၅၆၅၇၅၈၅၉၆၀၆၁၆၂၆၃၆၄၆၅၆၆၆၇၆၈၆၉၇၀၇၁၇၂၇၃၇၄၇၅၇၆၇၇၇၈၇၉၈၀၈၁၈၂၈၃၈၄၈၅၈၆၈၇၈၈၈၉၉၀၉၁၉၂၉၃၉၄၉၅၉၆၉၇၉၈၉၉၁၀၀၁၀၂၀၃၀၄၀၅၀၆၀၇၀၈၀၉၁၀၁၁၁၂၁၃၁၄၁၅၁၆၁၇၁၈၁၉၂၀၂၁၂၂၂၃၂၄၂၅၂၆၂၇၂၈၂၉၃၀၃၁၃၂၃၃၃၄၃၅၃၆၃၇၃၈၃၉၄၀၄၁၄၂၄၃၄၄၄၅၄၆၄၇၄၈၄၉၅၀၅၁၅၂၅၃၅၄၅၅၅၆၅၇၅၈၅၉၆၀၆၁၆၂၆၃၆၄၆၅၆၆၆၇၆၈၆၉၇၀၇၁၇၂၇၃၇၄၇၅၇၆၇၇၇၈၇၉၈၀၈၁၈၂၈၃၈၄၈၅၈၆၈၇၈၈၈၉၉၀၉၁၉၂၉၃၉၄၉၅၉၆၉၇၉၈၉၉
 ၁၂၃၄၅၆၇၈၉၁၀၁၁၂၁၃၁၄၁၅၁၆၁၇၁၈၁၉၂၀၂၁၂၂၂၃၂၄၂၅၂၆၂၇၂၈၂၉၃၀၃၁၃၂၃၃၃၄၃၅၃၆၃၇၃၈၃၉၄၀၄၁၄၂၄၃၄၄၄၅၄၆၄၇၄၈၄၉၅၀၅၁၅၂၅၃၅၄၅၅၅၆၅၇၅၈၅၉၆၀၆၁၆၂၆၃၆၄၆၅၆၆၆၇၆၈၆၉၇၀၇၁၇၂၇၃၇၄၇၅၇၆၇၇၇၈၇၉၈၀၈၁၈၂၈၃၈၄၈၅၈၆၈၇၈၈၈၉၉၀၉၁၉၂၉၃၉၄၉၅၉၆၉၇၉၈၉၉

[illegible]

၁	၁၆၆
၂	၁၆၆
၃	၁၆၆
၄	၁၆၆
၅	၁၆၆
၆	၁၆၆
၇	၁၆၆
၈	၁၆၆
၉	၁၆၆
၁၀	၁၆၆
၁၁	၁၆၆
၁၂	၁၆၆
၁၃	၁၆၆
၁၄	၁၆၆
၁၅	၁၆၆
၁၆	၁၆၆
၁၇	၁၆၆
၁၈	၁၆၆
၁၉	၁၆၆
၂၀	၁၆၆
၂၁	၁၆၆
၂၂	၁၆၆
၂၃	၁၆၆
၂၄	၁၆၆
၂၅	၁၆၆
၂၆	၁၆၆
၂၇	၁၆၆
၂၈	၁၆၆
၂၉	၁၆၆
၃၀	၁၆၆
၃၁	၁၆၆
၃၂	၁၆၆
၃၃	၁၆၆
၃၄	၁၆၆
၃၅	၁၆၆
၃၆	၁၆၆
၃၇	၁၆၆
၃၈	၁၆၆
၃၉	၁၆၆
၄၀	၁၆၆
၄၁	၁၆၆
၄၂	၁၆၆
၄၃	၁၆၆
၄၄	၁၆၆
၄၅	၁၆၆
၄၆	၁၆၆
၄၇	၁၆၆
၄၈	၁၆၆
၄၉	၁၆၆
၅၀	၁၆၆
၅၁	၁၆၆
၅၂	၁၆၆
၅၃	၁၆၆
၅၄	၁၆၆
၅၅	၁၆၆
၅၆	၁၆၆
၅၇	၁၆၆
၅၈	၁၆၆
၅၉	၁၆၆
၆၀	၁၆၆
၆၁	၁၆၆
၆၂	၁၆၆
၆၃	၁၆၆
၆၄	၁၆၆
၆၅	၁၆၆
၆၆	၁၆၆
၆၇	၁၆၆
၆၈	၁၆၆
၆၉	၁၆၆
၇၀	၁၆၆
၇၁	၁၆၆
၇၂	၁၆၆
၇၃	၁၆၆
၇၄	၁၆၆
၇၅	၁၆၆
၇၆	၁၆၆
၇၇	၁၆၆
၇၈	၁၆၆
၇၉	၁၆၆
၈၀	၁၆၆
၈၁	၁၆၆
၈၂	၁၆၆
၈၃	၁၆၆
၈၄	၁၆၆
၈၅	၁၆၆
၈၆	၁၆၆
၈၇	၁၆၆
၈၈	၁၆၆
၈၉	၁၆၆
၉၀	၁၆၆
၉၁	၁၆၆
၉၂	၁၆၆
၉၃	၁၆၆
၉၄	၁၆၆
၉၅	၁၆၆
၉၆	၁၆၆
၉၇	၁၆၆
၉၈	၁၆၆
၉၉	၁၆၆
၁၀၀	၁၆၆

[illegible][illegible][illegible][illegible]

အလင်းရောင်	၁၂၂၀	၁၂၃၀	၁၂၄၀	၁၂၅၀	၁၂၆၀	၁၂၇၀	၁၂၈၀	၁၂၉၀
------------	------	------	------	------	------	------	------	------

[illegible]

$\downarrow$ promotor CMV 3128 3129 3130 3131 3132 3133 3134 3135 3136 3137 3138 3139	3140 3141 3142 3143 3144 3145 3146 3147 3148 3149 3150 3151	3152 3153 3154 3155 3156 3157 3158 3159 3160 3161 3162 3163	3164 3165 3166 3167 3168 3169 3170 3171 3172 3173 3174 3175	3176 3177 3178 3179 3180 3181 3182 3183 3184 3185 3186 3187	3188 3189 3190 3191 3192 3193 3194 3195 3196 3197 3198 3199	3200 3201 3202 3203 3204 3205 3206 3207 3208 3209 3210 3211	3212 3213 3214 3215 3216 3217 3218 3219 3220 3221 3222 3223	3224 3225 3226 3227 3228 3229 3230 3231 3232 3233 3234 3235	3236 3237 3238 3239 3240 3241 3242 3243 3244 3245 3246 3247	3248 3249 3250 3251 3252 3253 3254 3255 3256 3257 3258 3259	3260 3261 3262 3263 3264 3265 3266 3267 3268 3269 3270 3271	3272 3273 3274 3275 3276 3277 3278 3279 3280 3281 3282 3283	3284 3285 3286 3287 3288 3289 3290 3291 3292 3293 3294 3295	3296 3297 3298 3299 3300 3301 3302 3303 3304 3305 3306 3307	3308 3309 3310 3311 3312 3313 3314 3315 3316 3317 3318 3319	3320 3321 3322 3323 3324 3325 3326 3327 3328 3329 3330 3331	3332 3333 3334 3335 3336 3337 3338 3339 3340 3341 3342 3343	3344 3345 3346 3347 3348 3349 3350 3351 3352 3353 3354 3355	3356 3357 3358 3359 3360 3361 3362 3363 3364 3365 3366 3367	3368 3369 3370 3371 3372 3373 3374 3375 3376 3377 3378 3379	3380 3381 3382 3383 3384 3385 3386 3387 3388 3389 3390 3391	3392 3393 3394 3395 3396 3397 3398 3399 3400 3401 3402 3403	3404 3405 3406 3407 3408 3409 3410 3411 3412 3413 3414 3415	3416 3417 3418 3419 3420 3421 3422 3423 3424 3425 3426 3427	3428 3429 3430 3431 3432 3433 3434 3435 3436 3437 3438 3439	3440 3441 3442 3443 3444 3445 3446 3447 3448 3449 3450 3451	3452 3453 3454 3455 3456 3457 3458 3459 3460 3461 3462 3463	3464 3465 3466 3467 3468 3469 3470 3471 3472 3473 3474 3475	3476 3477 3478 3479 3480 3481 3482 3483 3484 3485 3486 3487	3488 3489 3490 3491 3492 3493 3494 3495 3496 3497 3498 3499	3500 3501 3502 3503 3504 3505 3506 3507 3508 3509 3510 3511	3512 3513 3514 3515 3516 3517 3518 3519 3520 3521 3522 3523	3524 3525 3526 3527 3528 3529 3530 3531 3532 3533 3534 3535	3536 3537 3538 3539 3540 3541 3542 3543 3544 3545 3546 3547	3548 3549 3550 3551 3552 3553 3554 3555 3556 3557 3558 3559	3560 3561 3562 3563 3564 3565 3566 3567 3568 3569 3570 3571	3572 3573 3574 3575 3576 3577 3578 3579 3580 3581 3582 3583	3584 3585 3586 3587 3588 3589 3590 3591 3592 3593 3594 3595	3596 3597 3598 3599 3600 3601 3602 3603 3604 3605 3606 3607	3608 3609 3610 3611 3612 3613 3614 3615 3616 3617 3618 3619	3620 3621 3622 3623 3624 3625 3626 3627 3628 3629 3630 3631	3632 3633 3634 3635 3636 3637 3638 3639 3640 3641 3642 3643	3644 3645 3646 3647 3648 3649 3650 3651 3652 3653 3654 3655	3656 3657 3658 3659 3660 3661 3662 3663 3664 3665 3666 3667	3668 3669 3670 3671 3672 3673 3674 3675 3676 3677 3678 3679	3680 3681 3682 3683 3684 3685 3686 3687 3688 3689 3690 3691	3692 3693 3694 3695 3696 3697 3698 3699 3700 3701 3702 3703	3704 3705 3706 3707 3708 3709 3710 3711 3712 3713 3714 3715	3716 3717 3718 3719 3720 3721 3722 3723 3724 3725 3726 3727	3728 3729 3730 3731 3732 3733 3734 3735 3736 3737 3738 3739	3740 3741 3742 3743 3744 3745 3746 3747 3748 3749 3750 3751	3752 3753 3754 3755 3756 3757 3758 3759 3760 37
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---

4710 4720 4730 4740 4750 4760 4770 4780 4790
 >LP
 4800
 4810 4820 4830 4840 4850 4860 4870 4880 4890
 4900
 4910 4920 4930 4940 4950 4960 4970 4980 4990
 >EspE1_Rbpl1a-1F-AZF6E_RnaI
 5000
 5010 5020 5030 5040 5050 5060 5070 5080 5090
 5100
 5110 5120 5130 5140 5150 5160 5170 5180 5190
 5200
 5210 5220 5230 5240 5250 5260 5270 5280 5290
 5300
 5310 5320 5330 5340 5350 5360 5370 5380 5390
 5400
 5410 5420 5430 5440 5450 5460 5470 5480 5490
 5500
 5510 5520 5530 5540 5550 5560 5570 5580 5590
 5600
 5610 5620 5630 5640 5650 5660 5670 5680 5690
 5700
 5710 5720 5730 5740 5750 5760 5770 5780 5790
 5800
 5810 5820 5830 5840 5850 5860 5870 5880 5890
 5900
 5910 5920 5930 5940 5950 5960 5970 5980 5990
 6000
 6010 6020 6030 6040 6050 6060 6070 6080 6090
 6100
 6110 6120 6130 6140 6150 6160 6170 6180 6190
 6200

[illegible]

agggacccgg < 7889
tccgtggcc

Características:

BspBI_XbaI-LF-SRRS_KpnI	: {4525 : 5706 ~ CW}
xbpI	: {3593 : 4720 ~ CW}
atf6	: {4885 : 5992 ~ CW}
KA	: {5893 : 6022 ~ CW}
LF	: {4721 : 4885 ~ CW}
T7	: {2587 : 2606 ~ CW}
T7	: {3532 : 3551 ~ CW}
SP6	: {259 : 242 ~ CCW}
codón de terminación	: {1719 : 2347 ~ CW}
AmpR	: {906 : 1567 ~ CW}
SV40 polIA tardío	: {6583 : 6392 ~ CCW}
prom. Amp	: {840 : 868 ~ CW}
promotor CMV	: {2979 : 3486 ~ CW}

Tabla III

Serial Close : 72.5 ~ 019-10-2018 19.57

None or restriction of sales. 44712-1000-0000

Enzimas de restricción que están como máximo 1 vez (uso de RElibrary como biblioteca de enzimas de restricción);

[illegible][illegible]

1255
 1256
 1257
 1258
 1259
 1260
 1261
 1262
 1263
 1264
 1265
 1266
 1267
 1268
 1269
 1270
 1271
 1272
 1273
 1274
 1275
 1276
 1277
 1278
 1279
 1280
 1281
 1282
 1283
 1284
 1285
 1286
 1287
 1288
 1289
 1290
 1291
 1292
 1293
 1294
 1295
 1296
 1297
 1298
 1299
 1300
 1301
 1302
 1303
 1304
 1305
 1306
 1307
 1308
 1309
 1310
 1311
 1312
 1313
 1314
 1315
 1316
 1317
 1318
 1319
 1320
 1321
 1322
 1323
 1324
 1325
 1326
 1327
 1328
 1329
 1330
 1331
 1332
 1333
 1334
 1335
 1336
 1337
 1338
 1339
 1340
 1341
 1342
 1343
 1344
 1345
 1346
 1347
 1348
 1349
 1350
 1351
 1352
 1353
 1354
 1355
 1356
 1357
 1358
 1359
 1360
 1361
 1362
 1363
 1364
 1365
 1366
 1367
 1368
 1369
 1370
 1371
 1372
 1373
 1374
 1375
 1376
 1377
 1378
 1379
 1380
 1381
 1382
 1383
 1384
 1385
 1386
 1387
 1388
 1389
 1390
 1391
 1392
 1393
 1394
 1395
 1396
 1397
 1398
 1399
 1400
 1401
 1402
 1403
 1404
 1405
 1406
 1407
 1408
 1409
 1410
 1411
 1412
 1413
 1414
 1415
 1416
 1417
 1418
 1419
 1420
 1421
 1422
 1423
 1424
 1425
 1426
 1427
 1428
 1429
 1430
 1431
 1432
 1433
 1434
 1435
 1436
 1437
 1438
 1439
 1440
 1441
 1442
 1443
 1444
 1445
 1446
 1447
 1448
 1449
 1450
 1451
 1452
 1453
 1454
 1455
 1456
 1457
 1458
 1459
 1460
 1461
 1462
 1463
 1464
 1465
 1466
 1467
 1468
 1469
 1470
 1471
 1472
 1473
 1474
 1475
 1476
 1477
 1478
 1479
 1480
 1481
 1482
 1483
 1484
 1485
 1486
 1487
 1488
 1489
 1490
 1491
 1492
 1493
 1494
 1495
 1496
 1497
 1498
 1499
 1500
 1501
 1502
 1503
 1504
 1505
 1506
 1507
 1508
 1509
 1510
 1511
 1512
 1513
 1514
 1515
 1516
 1517
 1518
 1519
 1520
 1521
 1522
 1523
 1524
 1525
 1526
 1527
 1528
 1529
 1530
 1531
 1532
 1533
 1534
 1535
 1536
 1537
 1538
 1539
 1540
 1541
 1542
 1543
 1544
 1545
 1546
 1547
 1548
 1549
 1550
 1551
 1552
 1553
 1554
 1555
 1556
 1557
 1558
 1559
 1560
 1561
 1562
 1563
 1564
 1565
 1566
 1567
 1568
 1569
 1570
 1571
 1572
 1573
 1574
 1575
 1576
 1577
 1578
 1579
 1580
 1581
 1582
 1583
 1584
 1585
 1586
 1587
 1588
 1589
 1590
 1591
 1592
 1593
 1594
 1595
 1596
 1597
 1598
 1599
 1600
 1601
 1602
 1603
 1604
 1605
 1606
 1607
 1608
 1609
 1610
 1611
 1612
 1613
 1614
 1615
 1616
 1617
 1618
 1619
 1620
 1621
 1622
 1623
 1624
 1625
 1626
 1627
 1628
 1629
 1630
 1631
 1632
 1633
 1634
 1635
 1636
 1637
 1638
 1639
 1640
 1641
 1642
 1643
 1644
 1645
 1646
 1647
 1648
 1649
 1650
 1651
 1652
 1653
 1654
 1655
 1656
 1657
 1658
 1659
 1660
 1661
 1662
 1663
 1664
 1665
 1666
 1667
 1668
 1669
 1670
 1671
 1672
 1673
 1674
 1675
 1676
 1677
 1678
 1679
 1680
 1681
 1682
 1683
 1684
 1685
 1686
 1687
 1688
 1689
 1690
 1691
 1692
 1693
 1694
 1695
 1696
 1697
 1698
 1699
 1700
 1701
 1702
 1703
 1704
 1705
 1706
 1707
 1708
 1709

[illegible]

5.10 5.20 5.30 5.40 5.50 5.60 5.70 5.80
 5.90 6.00 6.10 6.20 6.30 6.40 6.50 6.60 6.70 6.80 6.90 7.00 7.10 7.20 7.30 7.40 7.50 7.60 7.70 7.80 7.90 8.00 8.10 8.20 8.30 8.40 8.50 8.60 8.70 8.80 8.90 9.00 9.10 9.20 9.30 9.40 9.50 9.60 9.70 9.80 9.90

[illegible][illegible][illegible][illegible]

၁	၂	၃	၄	၅	၆	၇	၈	၉	၁၀	၁၁	၁၂	၁၃	၁၄	၁၅	၁၆	၁၇	၁၈	၁၉	၂၀	၂၁	၂၂	၂၃	၂၄	၂၅	၂၆	၂၇	၂၈	၂၉	၃၀	၃၁	၃၂	၃၃	၃၄	၃၅	၃၆	၃၇	၃၈	၃၉	၄၀	၄၁	၄၂	၄၃	၄၄	၄၅	၄၆	၄၇	၄၈	၄၉	၅၀	၅၁	၅၂	၅၃	၅၄	၅၅	၅၆	၅၇	၅၈	၅၉	၆၀	၆၁	၆၂	၆၃	၆၄	၆၅	၆၆	၆၇	၆၈	၆၉	၇၀	၇၁	၇၂	၇၃	၇၄	၇၅	၇၆	၇၇	၇၈	၇၉	၈၀	၈၁	၈၂	၈၃	၈၄	၈၅	၈၆	၈၇	၈၈	၈၉	၉၀	၉၁	၉၂	၉၃	၉၄	၉၅	၉၆	၉၇	၉၈	၉၉	၁၀၀
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----

၂၀၁၆ ခုနှစ်တွင် အောက်ဖော်ပြပါအတိုင်း အစီအစဉ်များကို အကောင်အထည်ဖော် ဆောင်ရွက်ခဲ့ပါသည်။

[illegible][illegible][illegible]

1800 1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890	1800 1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890
1860 1870 1880 1890 1900 1910 1920 1930 1940 1950	1860 1870 1880 1890 1900 1910 1920 1930 1940 1950
1890 1900 1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980	1890 1900 1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980
1900 1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990	1900 1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990
1950 1960 1970 1980 1990 2000 2010 2020 2030 2040	1950 1960 1970 1980 1990 2000 2010 2020 2030 2040
2000 2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080 2090	2000 2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080 2090
2050 2060 2070 2080 2090 2100 2110 2120 2130 2140	2050 2060 2070 2080 2090 2100 2110 2120 2130 2140
2100 2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170 2180 2190	2100 2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170 2180 2190
2150 2160 2170 2180 2190 2200 2210 2220 2230 2240	2150 2160 2170 2180 2190 2200 2210 2220 2230 2240
2200 2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280 2290	2200 2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280 2290
2250 2260 2270 2280 2290 2300 2310 2320 2330 2340	2250 2260 2270 2280 2290 2300 2310 2320 2330 2340
2300 2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390	2300 2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390
2350 2360 2370 2380 2390 2400 2410 2420 2430 2440	2350 2360 2370 2380 2390 2400 2410 2420 2430 2440
2400 2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480 2490	2400 2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480 2490
2450 2460 2470 2480 2490 2500 2510 2520 2530 2540	2450 2460 2470 2480 2490 2500 2510 2520 2530 2540
2500 2510 2520 2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590	2500 2510 2520 2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590
2550 2560 2570 2580 2590 2600 2610 2620 2630 2640	2550 2560 2570 2580 2590 2600 2610 2620 2630 2640
2600 2610 2620 2630 2640 2650 2660 2670 2680 2690	2600 2610 2620 2630 2640 2650 2660 2670 2680 2690
2650 2660 2670 2680 2690 2700 2710 2720 2730 2740	2650 2660 2670 2680 2690 2700 2710 2720 2730 2740
2700 2710 2720 2730 2740 2750 2760 2770 2780 2790	2700 2710 2720 2730 2740 2750 2760 2770 2780 2790
2750 2760 2770 2780 2790 2800 2810 2820 2830 2840	2750 2760 2770 2780 2790 2800 2810 2820 2830 2840
2800 2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870 2880 2890	2800 2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870 2880 2890
2850 2860 2870 2880 2890 2900 2910 2920 2930 2940	2850 2860 2870 2880 2890 2900 2910 2920 2930 2940
2900 2910 2920 2930 2940 2950 2960 2970 2980 2990	2900 2910 2920 2930 2940 2950 2960 2970 2980 2990

1. 3260
 3250 3220 3210 3240 3250 3260 3270 3280 3290
 > promoter CMV
 3270 3280 3290 3240 3250 3260 3270 3280 3290
 3300 3320 3330 3340 3350 3360 3370 3380 3390
 3400 3420 3430 3440 3450 3460 3470 3480 3490
 3500 3520 3530 3540 3550 3560 3570 3580 3590
 3600 3620 3630 3640 3650 3660 3670 3680 3690
 3700 3720 3730 3740 3750 3760 3770 3780 3790
 3800 3820 3830 3840 3850 3860 3870 3880 3890
 3900 3920 3930 3940 3950 3960 3970 3980 3990
 4000 4020 4030 4040 4050 4060 4070 4080 4090
 4100 4120 4130 4140 4150 4160 4170 4180 4190
 4200 4220 4230 4240 4250 4260 4270 4280 4290
 4300 4320 4330 4340 4350 4360 4370 4380 4390
 4400 4420 4430 4440 4450 4460 4470 4480 4490
 4500 4520 4530 4540 4550 4560 4570 4580 4590
 4600 4620 4630 4640 4650 4660 4670 4680 4690
 4700 4720 4730 4740 4750 4760 4770 4780 4790
 4800 4820 4830 4840 4850 4860 4870 4880 4890
 4900 4920 4930 4940 4950 4960 4970 4980 4990
 5000 5020 5030 5040 5050 5060 5070 5080 5090
 5100 5120 5130 5140 5150 5160 5170 5180 5190
 5200 5220 5230 5240 5250 5260 5270 5280 5290
 5300 5320 5330 5340 5350 5360 5370 5380 5390
 5400 5420 5430 5440 5450 5460 5470 5480 5490
 5500 5520 5530 5540 5550 5560 5570 5580 5590
 5600 5620 5630 5640 5650 5660 5670 5680 5690
 5700 5720 5730 5740 5750 5760 5770 5780 5790
 5800 5820 5830 5840 5850 5860 5870 5880 5890
 5900 5920 5930 5940 5950 5960 5970 5980 5990
 6000 6020 6030 6040 6050 6060 6070 6080 6090
 6100 6120 6130 6140 6150 6160 6170 6180 6190
 6200 6220 6230 6240 6250 6260 6270 6280 6290
 6300 6320 6330 6340 6350 6360 6370 6380 6390
 6400 6420 6430 6440 6450 6460 6470 6480 6490
 6500 6520 6530 6540 6550 6560 6570 6580 6590
 6600 6620 6630 6640 6650 6660 6670 6680 6690
 6700 6720 6730 6740 6750 6760 6770 6780 6790
 6800 6820 6830 6840 6850 6860 6870 6880 6890
 6900 6920 6930 6940 6950 6960 6970 6980 6990
 7000 7020 7030 7040 7050 7060 7070 7080 7090
 7100 7120 7130 7140 7150 7160 7170 7180 7190
 7200 7220 7230 7240 7250 7260 7270 7280 7290
 7300 7320 7330 7340 7350 7360 7370 7380 7390
 7400 7420 7430 7440 7450 7460 7470 7480 7490
 7500 7520 7530 7540 7550 7560 7570 7580 7590
 7600 7620 7630 7640 7650 7660 7670 7680 7690
 7700 7720 7730 7740 7750 7760 7770 7780 7790
 7800 7820 7830 7840 7850 7860 7870 7880 7890
 7900 7920 7930 7940 7950 7960 7970 7980 7990
 8000 8020 8030 8040 8050 8060 8070 8080 8090
 8100 8120 8130 8140 8150 8160 8170 8180 8190
 8200 8220 8230 8240 8250 8260 8270 8280 8290
 8300 8320 8330 8340 8350 8360 8370 8380 8390
 8400 8420 8430 8440 8450 8460 8470 8480 8490
 8500 8520 8530 8540 8550 8560 8570 8580 8590
 8600 8620 8630 8640 8650 8660 8670 8680 8690
 8700 8720 8730 8740 8750 8760 8770 8780 8790
 8800 8820 8830 8840 8850 8860 8870 8880 8890
 8900 8920 8930 8940 8950 8960 8970 8980 8990
 9000 9020 9030 9040 9050 9060 9070 9080 9090
 9100 9120 9130 9140 9150 9160 9170 9180 9190
 9200 9220 9230 9240 9250 9260 9270 9280 9290
 9300 9320 9330 9340 9350 9360 9370 9380 9390
 9400 9420 9430 9440 9450 9460 9470 9480 9490
 9500 9520 9530 9540 9550 9560 9570 9580 9590
 9600 9620 9630 9640 9650 9660 9670 9680 9690
 9700 9720 9730 9740 9750 9760 9770 9780 9790
 9800 9820 9830 9840 9850 9860 9870 9880 9890
 9900 9920 9930 9940 9950 9960 9970 9980 9990
 10000 10020 10030 10040 10050 10060 10070 10080 10090
 10100 10120 10130 10140 10150 10160 10170 10180 10190
 10200 10220 10230 10240 10250 10260 10270 10280 10290
 10300 10320 10330 10340 10350 10360 10370 10380 10390
 10400 10420 10430 10440 10450 10460 10470 10480 10490
 10500 10520 10530 10540 10550 10560 10570 10580 10590
 10600 10620 10630 10640 10650 10660 10670 10680 10690
 10700 10720 10730 10740 10750 10760 10770 10780 10790
 10800 10820 10830 10840 10850 10860 10870 10880 10890
 10900 10920 10930 10940 10950 10960 10970 10980 10990
 11000 11020 11030 11040 11050 11060 11070 11080 11090
 11100 11120 11130 11140 11150 11160 11170 11180 11

[illegible]

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80																				

Características:

BspEI_XbpI-L4X4-Actf6f_KpnI	: {4525 : 5616 - CW}
xbpI	: {3593 : 4720 - CW}
attf6	: {4796 : 5902 - CW}
HA	: {5903 : 5932 - CW}
L4X4	: {4721 : 4795 - CW}
T7	: {2507 : 2606 - CW}
T7	: {3532 : 3551 - CW}
SP6	: {259 : 282 - CCW}
origen ColE1	: {1719 : 2347 - CW}
Amp ^R	: {908 : 1567 - CW}
SV40 polIA tardío	: {6493 : 6302 - CCW}
prom. Amp	: {640 : 668 - CW}
promotor CMV	: {2979 : 3486 - CW}

Table IV

Respa de restricción de solav, 1992 - 2000 - 1992

Enzimas de restricción que cortan como máximo 1 vez (uso de RELibrary como biblioteca de enzimas de restricción)

444

[illegible]

၁၂၃၄၅၆၇၈၉၁၀၁၁၂၁၃၁၄၁၅၁၆၁၇၁၈၁၉၂၀၂၁၂၂၂၃၂၄၂၅၂၆၂၇၂၈၂၉၃၀၃၁၃၂၃၃၃၄၃၅၃၆၃၇၃၈၃၉၄၀၄၁၄၂၄၃၄၄၄၅၄၆၄၇၄၈၄၉၅၀၅၁၅၂၅၃၅၄၅၅၅၆၅၇၅၈၅၉၆၀၆၁၆၂၆၃၆၄၆၅၆၆၆၇၆၈၆၉၇၀၇၁၇၂၇၃၇၄၇၅၇၆၇၇၇၈၇၉၈၀၈၁၈၂၈၃၈၄၈၅၈၆၈၇၈၈၈၉၉၀၉၁၉၂၉၃၉၄၉၅၉၆၉၇၉၈၉၉၁၀၀၁၀၂၀၃၀၄၀၅၀၆၀၇၀၈၀၉၁၀၁၁၁၂၁၃၁၄၁၅၁၆၁၇၁၈၁၉၂၀၂၁၂၂၂၃၂၄၂၅၂၆၂၇၂၈၂၉၃၀၃၁၃၂၃၃၃၄၃၅၃၆၃၇၃၈၃၉၄၀၄၁၄၂၄၃၄၄၄၅၄၆၄၇၄၈၄၉၅၀၅၁၅၂၅၃၅၄၅၅၅၆၅၇၅၈၅၉၆၀၆၁၆၂၆၃၆၄၆၅၆၆၆၇၆၈၆၉၇၀၇၁၇၂၇၃၇၄၇၅၇၆၇၇၇၈၇၉၈၀၈၁၈၂၈၃၈၄၈၅၈၆၈၇၈၈၈၉၉၀၉၁၉၂၉၃၉၄၉၅၉၆၉၇၉၈၉၉၁၀၀၁၀၂၀၃၀၄၀၅၀၆၀၇၀၈၀၉၁၀၁၁၁၂၁၃၁၄၁၅၁၆၁၇၁၈၁၉၂၀၂၁၂၂၂၃၂၄၂၅၂၆၂၇၂၈၂၉၃၀၃၁၃၂၃၃၃၄၃၅၃၆၃၇၃၈၃၉၄၀၄၁၄၂၄၃၄၄၄၅၄၆၄၇၄၈၄၉၅၀၅၁၅၂၅၃၅၄၅၅၅၆၅၇၅၈၅၉၆၀၆၁၆၂၆၃၆၄၆၅၆၆၆၇၆၈၆၉၇၀၇၁၇၂၇၃၇၄၇၅၇၆၇၇၇၈၇၉၈၀၈၁၈၂၈၃၈၄၈၅၈၆၈၇၈၈၈၉၉၀၉၁၉၂၉၃၉၄၉၅၉၆၉၇၉၈၉၉

[illegible][illegible]

Գրքերի և պարբերականների արժեքը	418	429	439	440	450	466	478	489	490
--------------------------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

[illegible][illegible][illegible]

၁၁	၁၂	၁၃	၁၄	၁၅	၁၆	၁၇	၁၈	၁၉	၂၀	၂၁	၂၂	၂၃	၂၄	၂၅	၂၆	၂၇	၂၈	၂၉	၃၀	၃၁	၃၂	၃၃	၃၄	၃၅	၃၆	၃၇	၃၈	၃၉	၄၀	၄၁	၄၂	၄၃	၄၄	၄၅	၄၆	၄၇	၄၈	၄၉	၅၀	၅၁	၅၂	၅၃	၅၄	၅၅	၅၆	၅၇	၅၈	၅၉	၆၀	၆၁	၆၂	၆၃	၆၄	၆၅	၆၆	၆၇	၆၈	၆၉	၇၀	၇၁	၇၂	၇၃	၇၄	၇၅	၇၆	၇၇	၇၈	၇၉	၈၀	၈၁	၈၂	၈၃	၈၄	၈၅	၈၆	၈၇	၈၈	၈၉	၉၀	၉၁	၉၂	၉၃	၉၄	၉၅	၉၆	၉၇	၉၈	၉၉	၁၀၀
----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----

[illegible][illegible]

၁	၂	၃	၄	၅	၆	၇	၈	၉	၁၀	၁၁	၁၂	၁၃	၁၄	၁၅	၁၆	၁၇	၁၈	၁၉	၂၀	၂၁	၂၂	၂၃	၂၄	၂၅	၂၆	၂၇	၂၈	၂၉	၃၀	၃၁	၃၂	၃၃	၃၄	၃၅	၃၆	၃၇	၃၈	၃၉	၄၀	၄၁	၄၂	၄၃	၄၄	၄၅	၄၆	၄၇	၄၈	၄၉	၅၀	၅၁	၅၂	၅၃	၅၄	၅၅	၅၆	၅၇	၅၈	၅၉	၆၀	၆၁	၆၂	၆၃	၆၄	၆၅	၆၆	၆၇	၆၈	၆၉	၇၀	၇၁	၇၂	၇၃	၇၄	၇၅	၇၆	၇၇	၇၈	၇၉	၈၀	၈၁	၈၂	၈၃	၈၄	၈၅	၈၆	၈၇	၈၈	၈၉	၉၀	၉၁	၉၂	၉၃	၉၄	၉၅	၉၆	၉၇	၉၈	၉၉	၁၀၀
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----

[illegible][illegible][illegible]

1518 1519 1520 1521 1522 1523 1524 1525 1526 1527 1528 1529 1530 1531 1532 1533 1534 1535 1536 1537 1538 1539 1540 1541 1542 1543 1544 1545 1546 1547 1548 1549 1550 1551 1552 1553 1554 1555 1556 1557 1558 1559 1560 1561 1562 1563 1564 1565 1566 1567 1568 1569 1570 1571 1572 1573 1574 1575 1576 1577 1578 1579 1580 1581 1582 1583 1584 1585 1586 1587 1588 1589 1590 1591 1592 1593 1594 1595 1596 1597 1598 1599 1600 1601 1602 1603 1604 1605 1606 1607 1608 1609 1610 1611 1612 1613 1614 1615 1616 1617 1618 1619 1620 1621 1622 1623 1624 1625 1626 1627 1628 1629 1630 1631 1632 1633 1634 1635 1636 1637 1638 1639 1640 1641 1642 1643 1644 1645 1646 1647 1648 1649 1650 1651 1652 1653 1654 1655 1656 1657 1658 1659 1660 1661 1662 1663 1664 1665 1666 1667 1668 1669 1670 1671 1672 1673 1674 1675 1676 1677 1678 1679 1680 1681 1682 1683 1684 1685 1686 1687 1688 1689 1690 1691 1692 1693 1694 1695 1696 1697 1698 1699 1700 1701 1702 1703 1704 1705 1706 1707 1708 1709 1710 1711 1712 1713 1714 1715 1716 1717 1718 1719 1720 1721 1722 1723 1724 1725 1726 1727 1728 1729 1730 1731 1732 1733 1734 1735 1736 1737 1738 1739 1740 1741 1742 1743 1744 1745 1746 1747 1748 1749 1750 1751 1752 1753 1754 1755 1756 1757 1758 1759 1760 1761 1762 1763 1764 1765 1766 1767 1768 1769 1770 1771 1772 1773 1774 1775 1776 1777 1778 1779 1780 1781 1782 1783 1784 1785 1786 1787 1788 1789 1790 1791 1792 1793 1794 1795 1796 1797 1798 1799 1800 1801 1802 1803 1804 1805 1806 1807 1808 1809 1810 1811 1812 1813 1814 1815 1816 1817 1818 1819 1820 1821 1822 1823 1824 1825 1826 1827 1828 1829 1830 1831 1832 1833 1834 1835 1836 1837 1838 1839 1840 1841 1842 1843 1844 1845 1846 1847 1848 1849 1850 1851 1852 1853 1854 1855 1856 1857 1858 1859 1860 1861 1862 1863 1864 1865 1866 1867 1868 1869 1870 1871 1872 1873 1874 1875 1876 1877 1878 1879 1880 1881 1882 1883 1884 1885 1886 1887 1888 1889 1890 1891 1892 1893 1894 1895 1896 1897 1898 1899 1900 1901 1902 1903 1904 1905 1906 1907 1908 1909 1910 1911 1912 1913 1914 1915 1916 1917 1918 1919 1920 1921 1922 1923 1924 1925 1926 1927 1928 1929 1930 1931 1932 1933 1934 1935 1936 1937 1938 1939 1940 1941 1942 1943 1944 1945 1946 1947 1948 1949 1950 1951 1952 1953 1954 1955 1956 1957 1958 1959 1960 1961 1962 1963 1964 1965 1966 1967 1968 1969 1970 1971 1972 1973 1974 1975 1976 1977 1978 1979 1980 1981 1982 1983 1984 1985 1986 1987 1988 1989 1990 1991 1992 1993 1994 1995 1996 1997 1998 1999 2000 2001 2002 2003 2004 2005 2006 2007 2008 2009 2010 2011 2012 2013 2014 2015 2016 2017 2018 2019 2020 2021 2022 2023 2024 2025 2026 2027 2028 2029 2030 2031 2032 2033 2034 2035 2036 2037 2038 2039 2040 2041 2042 2043 2044 2045 2046 2047 2048 2049 2050 2051 2052 2053 2054 2055 2056 2057 2058 2059 2060 2061 2062 2063 2064 2065 2066 2067 2068 2069 2070 2071 2072 2073 2074 2075 2076 2077 2078 2079 2080 2081 2082 2083 2084 2085 2086 2087 2088 2089 2090 2091 2092 2093 2094 2095 2096 2097 2098 2099 2100 2101 2102 2103 2104 2105 2106 2107 2108 2109 2110 2111 2112 2113 2114 2115 2116 2117 2118 2119 2120 2121 2122 2123 2124 2125 2126 2127 2128 2129 2130 2131 2132 2133 2134 2135 2136 2137 2138 2139 2140 2141 2142 2143 2144 2145 2146 2147 2148 2149 2150 2151 2152 2153 2154 2155 2156 2157 2158 2159 2160 2161 2162 2163 2164 2165 2166 2167 2168 2169 2170 2171 2172 2173 2174 2175 2176 2177 2178 2179 2180 2181 2182 2183 2184 2185 2186 2187 2188 2189 2190 2191 2192 2193 2194 2195 2196 2197 21
--

3110 3120 3130 3140 3150 3160 3170 3180 3190
 > promotor CMV
 3210 3220 3230 3240 3250 3260 3270 3280 3290
 3310 3320 3330 3340 3350 3360 3370 3380 3390
 3410 3420 3430 3440 3450 3460 3470 3480 3490
 3510 3520 3530 3540 3550 3560 3570 3580 3590
 3610 3620 3630 3640 3650 3660 3670 3680 3690
 3710 3720 3730 3740 3750 3760 3770 3780 3790
 3810 3820 3830 3840 3850 3860 3870 3880 3890
 3910 3920 3930 3940 3950 3960 3970 3980 3990
 4010 4020 4030 4040 4050 4060 4070 4080 4090
 4110 4120 4130 4140 4150 4160 4170 4180 4190
 4210 4220 4230 4240 4250 4260 4270 4280 4290
 4310 4320 4330 4340 4350 4360 4370 4380 4390
 4410 4420 4430 4440 4450 4460 4470 4480 4490
 4510 4520 4530 4540 4550 4560 4570 4580 4590
 4610 4620 4630 4640 4650 4660 4670 4680 4690
 4710 4720 4730 4740 4750 4760 4770 4780 4790

>LGP 1 4800 4710 4720 4730 4740 4750 4760 4770 4780 4790								
4800 4810 4820 4830 4840 4850 4860 4870 4880 4890								
4900 4910 4920 4930 4940 4950 4960 4970 4980 4990								
5000 5010 5020 5030 5040 5050 5060 5070 5080 5090								
5100 5110 5120 5130 5140 5150 5160 5170 5180 5190								
5200 5210 5220 5230 5240 5250 5260 5270 5280 5290								
5300 5310 5320 5330 5340 5350 5360 5370 5380 5390								
5400 5410 5420 5430 5440 5450 5460 5470 5480 5490								
5500 5510 5520 5530 5540 5550 5560 5570 5580 5590								
5600 5610 5620 5630 5640 5650 5660 5670 5680 5690								
5700 5710 5720 5730 5740 5750 5760 5770 5780 5790								
5800 5810 5820 5830 5840 5850 5860 5870 5880 5890								
5900 5910 5920 5930 5940 5950 5960 5970 5980 5990								
6000 6010 6020 6030 6040 6050 6060 6070 6080 6090								
6100 6110 6120 6130 6140 6150 6160 6170 6180 6190								
6200 6210 6220 6230 6240 6250 6260 6270 6280 6290								

[illegible]

4 3793

Características:

ATF6\~\LFG\~XBP1s	: {3257 : 7081 ~ CW}
T7	: {2587 : 2606 ~ CW}
T7	: {3532 : 3551 ~ CW}
SP6	: {298 : 242 ~ CCW}
origen Col1E1	: {1719 : 2347 ~ CW}
AmpR	: {908 : 1567 ~ CW}
SV40 poliA tardio	: {6475 : 6284 ~ CCW}
prom. Amp	: {640 : 668 ~ CW}
etiqueta HA	: {5885 : 5911 ~ CW}
promotor CMV	: {2979 : 3486 ~ CW}
ATF6F	: {3593 : 4699 ~ CW}
LGF	: {4700 : 4756 ~ CW}
XBP1s	: {4757 : 5884 ~ CW}

Tabla V

Contract Name: 12-95-00-110-18-2015 20,000

Área de restitución de 2446 0000 ~ 2446 ~ 2446

Enzimas de restricción que costan como máximo 1 vez (uso de RELibrary como biblioteca de enzimas de restricción).

2000

[illegible]

1530 1535 1540 1545 1550 1555 1560 1565 1570 1575 1580 1585 1590	< 1500
1630 1635 1640 1645 1650 1655 1660 1665 1670 1675 1680 1685 1690	< 1700
1730 1735 1740 1745 1750 1755 1760 1765 1770 1775 1780 1785 1790	< 1800
1830 1835 1840 1845 1850 1855 1860 1865 1870 1875 1880 1885 1890	< 1900
1930 1935 1940 1945 1950 1955 1960 1965 1970 1975 1980 1985 1990	< 2000
2030 2035 2040 2045 2050 2055 2060 2065 2070 2075 2080 2085 2090	< 2100
2130 2135 2140 2145 2150 2155 2160 2165 2170 2175 2180 2185 2190	< 2200
2230 2235 2240 2245 2250 2255 2260 2265 2270 2275 2280 2285 2290	< 2300
2330 2335 2340 2345 2350 2355 2360 2365 2370 2375 2380 2385 2390	< 2400
2430 2435 2440 2445 2450 2455 2460 2465 2470 2475 2480 2485 2490	< 2500
2530 2535 2540 2545 2550 2555 2560 2565 2570 2575 2580 2585 2590	< 2600
2630 2635 2640 2645 2650 2655 2660 2665 2670 2675 2680 2685 2690	< 2700
2730 2735 2740 2745 2750 2755 2760 2765 2770 2775 2780 2785 2790	< 2800
2830 2835 2840 2845 2850 2855 2860 2865 2870 2875 2880 2885 2890	< 2900
2930 2935 2940 2945 2950 2955 2960 2965 2970 2975 2980 2985 2990	< 3000
3030 3035 3040 3045 3050 3055 3060 3065 3070 3075 3080 3085 3090	< 3100

3210 3220 3230 3240 3250 3260 3270 3280 3290 > promotor CMV 3210 3220 3230 3240 3250 3260 3270 3280 3290	< 3260
3310 3320 3330 3340 3350 3360 3370 3380 3390 3310 3320 3330 3340 3350 3360 3370 3380 3390	< 3380
3410 3420 3430 3440 3450 3460 3470 3480 3490 3410 3420 3430 3440 3450 3460 3470 3480 3490	< 3460
3510 3520 3530 3540 3550 3560 3570 3580 3590 3510 3520 3530 3540 3550 3560 3570 3580 3590	< 3580
3610 3620 3630 3640 3650 3660 3670 3680 3690 3610 3620 3630 3640 3650 3660 3670 3680 3690	< 3680
3710 3720 3730 3740 3750 3760 3770 3780 3790 3710 3720 3730 3740 3750 3760 3770 3780 3790	< 3780
3810 3820 3830 3840 3850 3860 3870 3880 3890 3810 3820 3830 3840 3850 3860 3870 3880 3890	< 3880
3910 3920 3930 3940 3950 3960 3970 3980 3990 3910 3920 3930 3940 3950 3960 3970 3980 3990	< 3980
4010 4020 4030 4040 4050 4060 4070 4080 4090 4010 4020 4030 4040 4050 4060 4070 4080 4090	< 4080
4110 4120 4130 4140 4150 4160 4170 4180 4190 4110 4120 4130 4140 4150 4160 4170 4180 4190	< 4180
4210 4220 4230 4240 4250 4260 4270 4280 4290 4210 4220 4230 4240 4250 4260 4270 4280 4290	< 4280
4310 4320 4330 4340 4350 4360 4370 4380 4390 4310 4320 4330 4340 4350 4360 4370 4380 4390	< 4380
4410 4420 4430 4440 4450 4460 4470 4480 4490 4410 4420 4430 4440 4450 4460 4470 4480 4490	< 4480
4510 4520 4530 4540 4550 4560 4570 4580 4590 4510 4520 4530 4540 4550 4560 4570 4580 4590	< 4580
4610 4620 4630 4640 4650 4660 4670 4680 4690 4610 4620 4630 4640 4650 4660 4670 4680 4690	< 4680

[illegible]

Características:

T7	: { 2587 : 2606 - CW }
T7	: { 3532 : 3551 - CW }
SP6	: { 259 : 242 - CCW }
origen Col1E1	: { 1719 : 2347 - CW }
AmpR	: { 908 : 1567 - CW }
SV40 polIA tardio	: { 6493 : 6302 - CCW }
prom. Amp	: { 640 : 668 - CW }
etiqueta HA	: { 5903 : 5929 - CW }
ATF6f	: { 3593 : 4699 - CW }
KBP1s	: { 4775 : 5902 - CW }
L-ITR	: { 82 : 183 - CW }
R-ITR	: { 2622 : 2723 - CW }
promotor CMV	: { 2979 : 3486 - CW }
L4H4	: { 4700 : 4774 - CW }

Tabla VI

* * * * *

XEROX COPY VZ-80 - 49-76-2813 JS(SG)

Mapa de restrição do polímero - 2º - 2001

Enzimas de restricción que cortan como máximo 3 vez (uso de NEELibrary como biblioteca de enzimas de restricción);

22

[illegible][illegible]

243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600 601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615 616 617 618 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645 646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660 661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690 691 692 693 694 695 696 697 698 699 700 701 702 703 704 705 706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720 721 722 723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 740 741 742 743 744 745 746 747 748 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 760 761 762 763 764 765 766 767 768 769 770 771 772 773 774 775 776 777 778 779 780 781 782 783 784 785 786 787 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 860 861 862 863 864 865 866 867 868 869 870 871 872 873 874 875 876 877 878 879 880 881 882 883 884 885 886 887 888 889 890 891 892 893 894 895 896 897 898 899 900 901 902 903 904 905 906 907 908 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 920 921 922 923 924 925 926 927 928 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 940 941 942 943 944 945 946 947 948 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 960 961 962 963 964 965 966 967 968 969 970 971 972 973 974 975 976 977 978 979 980 981 982 983 984 985 986 987 988 989 990 991 992 993 994 995 996 997 998 999 1000 1001 1002 1003 1004 1005 1006 1007 1008 1009 1010 1011 1012 1013 1014 1015 1016 1017 1018 1019 1020 1021 1022 1023 1024 1025 1026 1027 1028 1029 1030 1031 1032 1033 1034 1035 1036 1037 1038 1039 1040 1041 1042 1043 1044 1045 1046 1047 1048 1049 1050 1051 1052 1053 1054 1055 1056 1057 1058 1059 1060 1061 1062 1063 1064 1065 1066 1067 1068 1069 1070 1071 1072 1073 1074 1075 1076 1077 1078 1079 1080 1081 1082 1083 1084 1085 1086 1087 1088 1089 1090 1091 1092 1093 1094 1095 1096 1097 1098 1099 1100 1101 1102 1103 1104 1105 1106 1107 1108 1109 1110 1111 1112 1113 1114 1115 1116 1117 1118 1119 1120 1121 1122 1123 1124 1125 1126 1127 1128 1129 1130 1131 1132 1133 1134 1135 1136 1137 1138 1139 1140 1141 1142 1143 1144 1145 1146 1147 1148 1149 1150 1151 1152 1153 1154 1155 1156 1157 1158 1159 1160 1161 1162 1163 1164 1165 1166 1167 1168 1169 1170 1171 1172 1173 1174 1175 1176 1177 1178 1179 1180 1181 1182 1183 1184 1185 1186 1187 1188 1189 1190 1191 1192 1193 1194 1195 1196 1197 1198 1199 1200 1201 1202 1203 1204 1205 1206 1207 1208 1209 1210 1211 121

318 326 330 340 350 369 379 388 388

[illegible][illegible][illegible][illegible][illegible][illegible]

၁၆၂၅	၁၆၂၆	၁၆၂၈	၁၆၃၀	၁၆၃၂	၁၆၃၄	၁၆၃၆	၁၆၃၈	၁၆၄၀
------	------	------	------	------	------	------	------	------

၁	၂	၃	၄	၅	၆	၇	၈	၉	၁၀	၁၁	၁၂	၁၃	၁၄	၁၅	၁၆	၁၇	၁၈	၁၉	၂၀	၂၁	၂၂	၂၃	၂၄	၂၅	၂၆	၂၇	၂၈	၂၉	၃၀	၃၁	၃၂	၃၃	၃၄	၃၅	၃၆	၃၇	၃၈	၃၉	၄၀	၄၁	၄၂	၄၃	၄၄	၄၅	၄၆	၄၇	၄၈	၄၉	၅၀	၅၁	၅၂	၅၃	၅၄	၅၅	၅၆	၅၇	၅၈	၅၉	၆၀	၆၁	၆၂	၆၃	၆၄	၆၅	၆၆	၆၇	၆၈	၆၉	၇၀	၇၁	၇၂	၇၃	၇၄	၇၅	၇၆	၇၇	၇၈	၇၉	၈၀	၈၁	၈၂	၈၃	၈၄	၈၅	၈၆	၈၇	၈၈	၈၉	၉၀	၉၁	၉၂	၉၃	၉၄	၉၅	၉၆	၉၇	၉၈	၉၉	၁၀၀
၁	၂	၃	၄	၅	၆	၇	၈	၉	၁၀	၁၁	၁၂	၁၃	၁၄	၁၅	၁၆	၁၇	၁၈	၁၉	၂၀	၂၁	၂၂	၂၃	၂၄	၂၅	၂၆	၂၇	၂၈	၂၉	၃၀	၃၁	၃၂	၃၃	၃၄	၃၅	၃၆	၃၇	၃၈	၃၉	၄၀	၄၁	၄၂	၄၃	၄၄	၄၅	၄၆	၄၇	၄၈	၄၉	၅၀	၅၁	၅၂	၅၃	၅၄	၅၅	၅၆	၅၇	၅၈	၅၉	၆၀	၆၁	၆၂	၆၃	၆၄	၆၅	၆၆	၆၇	၆၈	၆၉	၇၀	၇၁	၇၂	၇၃	၇၄	၇၅	၇၆	၇၇	၇၈	၇၉	၈၀	၈၁	၈၂	၈၃	၈၄	၈၅	၈၆	၈၇	၈၈	၈၉	၉၀	၉၁	၉၂	၉၃	၉၄	၉၅	၉၆	၉၇	၉၈	၉၉	၁၀၀

[illegible]

အသက် ၁၈ နှစ်အောက်	၁၈ နှစ် - ၂၄ နှစ်	၂၅ နှစ် - ၃၄ နှစ်	၃၅ နှစ် - ၄၄ နှစ်	၄၅ နှစ် - ၅၄ နှစ်	၅၅ နှစ် - ၆၄ နှစ်	၆၅ နှစ် - ၇၄ နှစ်	၇၅ နှစ် - ၈၄ နှစ်	၈၅ နှစ် - ၉၄ နှစ်	၉၅ နှစ် - ၁၀၄ နှစ်
၁၃၂၈	၁၃၃၈	၁၃၄၈	၁၃၅၈	၁၃၆၈	၁၃၇၈	၁၃၈၈	၁၃၉၈	၁၄၀၈	၁၄၁၈

[illegible]

[illegible]

[illegible]

4718 4720 4725 4730 4735 4740 4745 4750
 4810 4820 4830 4840 4850 4860 4870 4880 4890
 4910 4920 4930 4940 4950 4960 4970 4980 4990
 5010 5020 5030 5040 5050 5060 5070 5080 5090
 5110 5120 5130 5140 5150 5160 5170 5180 5190
 5210 5220 5230 5240 5250 5260 5270 5280 5290
 5310 5320 5330 5340 5350 5360 5370 5380 5390
 5410 5420 5430 5440 5450 5460 5470 5480 5490
 5510 5520 5530 5540 5550 5560 5570 5580 5590
 5610 5620 5630 5640 5650 5660 5670 5680 5690
 5710 5720 5730 5740 5750 5760 5770 5780 5790
 5810 5820 5830 5840 5850 5860 5870 5880 5890
 5910 5920 5930 5940 5950 5960 5970 5980 5990
 6010 6020 6030 6040 6050 6060 6070 6080 6090
 6110 6120 6130 6140 6150 6160 6170 6180 6190
 6210 6220 6230 6240 6250 6260 6270 6280 6290

6312 6320 6330 6340 6350 6360 6370 6380 6390 < 6400 < SV40 polA tardio 6412 6420 6430 6440 6450 6460 6470 6480 6490 < 6500 6510 6520 6530 6540 6550 6560 6570 6580 6590 < 6600 6610 6620 6630 6640 6650 6660 6670 6680 6690 < 6700 6710 6720 6730 6740 6750 6760 6770 6780 6790 < 6800 6810 6820 6830 6840 6850 6860 6870 6880 6890 < 6900 6910 6920 6930 6940 6950 6960 6970 6980 6990 < 7000 7010 7020 7030 7040 7050 7060 7070 7080 7090 < 7100 7110 7120 7130 7140 7150 7160 7170 7180 7190 < 7200 7210 7220 7230 7240 7250 7260 7270 7280 7290 < 7300 7310 7320 7330 7340 7350 7360 7370 7380 7390 < 7400 7410 7420 7430 7440 7450 7460 7470 7480 7490 < 7500 7510 7520 7530 7540 7550 7560 7570 7580 7590 < 7600 7610 7620 7630 7640 7650 7660 7670 7680 7690 < 7700 7710 7720 7730 7740 7750 7760 7770 7780 7790 < 7800 7810 7820 7830 7840 7850 7860 7870 7880 7890 < 7900 7910 7920 7930 7940 7950 7960 7970 7980 7990 < 8000 8010 8020 8030 8040 8050 8060 8070 8080 8090 < 8100 8110 8120 8130 8140 8150 8160 8170 8180 8190 < 8200 8210 8220 8230 8240 8250 8260 8270 8280 8290 < 8300 8310 8320 8330 8340 8350 8360 8370 8380 8390 < 8400 8410 8420 8430 8440 8450 8460 8470 8480 8490 < 8500 8510 8520 8530 8540 8550 8560 8570 8580 8590 < 8600 8610 8620 8630 8640 8650 8660 8670 8680 8690 < 8700 8710 8720 8730 8740 8750 8760 8770 8780 8790 < 8800 8810 8820 8830 8840 8850 8860 8870 8880 8890 < 8900 8910 8920 8930 8940 8950 8960 8970 8980 8990 < 9000 9010 9020 9030 9040 9050 9060 9070 9080 9090 < 9100 9110 9120 9130 9140 9150 9160 9170 9180 9190 < 9200 9210 9220 9230 9240 9250 9260 9270 9280 9290 < 9300 9310 9320 9330 9340 9350 9360 9370 9380 9390 < 9400 9410 9420 9430 9440 9450 9460 9470 9480 9490 < 9500 9510 9520 9530 9540 9550 9560 9570 9580 9590 < 9600 9610 9620 9630 9640 9650 9660 9670 9680 9690 < 9700 9710 9720 9730 9740 9750 9760 9770 9780 9790 < 9800 9810 9820 9830 9840 9850 9860 9870 9880 9890 < 9900 9910 9920 9930 9940 9950 9960 9970 9980 9990 < 10000	
--	--

Características:

Rpni_Arr61-1LF1-XBp1s_Sf11	: {4408 : 4969 ~ CW}
X1	: {2587 : 2606 ~ CW}
T1	: {3533 : 3551 ~ CW}
SP6	: {259 : 242 ~ CCW}
origen de colE1	: {1719 : 2347 ~ CW}
AmpR	: {908 : 1567 ~ CW}
SV40 poliA tardío	: {6583 : 6392 ~ CCW}
prom. Amp	: {640 : 668 ~ CW}
etiqueta HA	: {5993 : 6019 ~ CW}
LF	: {4700 : 4864 ~ CW}
XBp1s	: {4865 : 5992 ~ CW}
Arr61	: {3593 : 4699 ~ CW}
promotor CMV	: {2979 : 3486 ~ CW}

Tabla VII

>gi|343168761:118-2130 Factor de transcripción activador 6 de Homo sapiens
(atf6), ARNm

atgggggagccggcgggggtgcccggcaccatggagtcaccttttagcccgggacitcttcacaggctggat
gaagattgggattctgctctcttgcgaactcgggtatttcacagacactgatgagctgcaattggaagcagcaa
atgagacgtatgaaaacaatttgataaacttgatttgatttgatttgatgcctgggagtcagacattgggacat
caacaacaaaactgtacagtaagataattaaggcagaacctcagccactttctccagccctcctcaagtattc
agtcctgctcctcgggtcagtggaactctattctcaactcagcatgttctgaggagtggtattgtctctagttctca
galgtctcccttctctatatgggtgaaaacttaatagtctctctcagcggagccactgaagggaagataagcct
gtcactgggtcctaggaacaagactgaaaatggactgactccaaagaaaaaaattcagggtgaattcaaaacct
tcaattcagcccaagcccttattgtctccagcagcaccgaagactcaacaaaactccagtggtccagcaaaaa
ccatcattattcagacagtaaccaacgcttatgccattggcaagcagcaaccaattatcagtttacaacctgca
cccactaaaggccagacgggtttgctgtctcagcctactgtggtacaactcaagcaccctggagttctgcoctctg
ctcagccagtccttctgtgtgtgtgggggagtcacacagctccctaatacgtggtgaatgtgtgaccagccctt
cagcgaatagcccagtgatggaaaacttccgtgactaaacctgtcctacaaagfaccatgagaaatgtcg
gttcagataattgtgtgctaaggagacagcaacgtatgataaaaaatcgagaatccgctgtcagttctcgcaag
aagaagaaagaataatgtctagggtagaggcgagatfaaaggctgcccctcagaaaaacgagcaactga
agaaagaaaatggaacactgaagcggcagctggatgaagtgtgtcagagaaccagagggctta

Tabla VIII

>gi|118640872.49-1179 Proteína de unión a x-box 1 de Homo sapiens (xbp1),
variante de transcripción 2, ARNm

atgggtgggtggcagccgcgcgaacccggccgacgggacccctaaagtctgcttcgtcggggcagccc
gctccgcgcgcggagccccggccggccaggccctgcccctcatgggtgccagcccagagagggggccagc
ccggagggcagcgagcggggggcctgccccaggccgcgcaagcgacagcgccctcagcaccttgagcccg
aggagaaggcgctgaggaggaaactgaaaaacagagtagcagctcagactgccagagatcgaaagaa
ggctcgaaatgagtgagctggaacagcaagtggtagaattagaagaagagaacaaaaactttgctagaaa
atcagctttacgagagaaaaactcatggcctttagttgagaaccaggagtaagacagcgcttggggatgga
tgccctgggttgctgaagaggaggcggaagccaaggggaatgaagtgaggccagtgccgggctgctgagt
ccgcagcaggctgcaggcccagttgtacccctccagaacatctcccatggattctggcggtattgactctca
gattcagagctgatatactgttgggcattctggacaactggaccagtcattgtcttcaaatgcccttcccaga
ggctgccagcctggaggagctcccagaggctacccagaaggaccagttccttaccagcctccctttctgt
cagtggggacgctcatcagccaagctggaagccatfaatgaactaattcgtttgaccacatatataccaagccc
ctagctcttagagataccctctgagacagagagccaagctaattgtgtagtgaataatgaggaagcacctctc
agccctcagagaatgatcacccgaattcattgtctcagtgaaaggaagaacctgtagaagatgacctggtcc
ggagctgggtatctcaaatctgctttcatccagccactgoccaaagccatcttccgctactggatgcttacagt
gactgtggatacgggggttcccttcccatcagtgacatgtctctctgcttgggtgaaaccattcttggggagga
cactttgccaatgaactcttccagctgattagtgtc

Tabla IX

enlazador LFG:

ctagggtgggtgggtcgggtgggtgggtcgggtgggtgggtcggcgggcg

enlazador L4H4:

ctagcggaagcggcgggcgaaagaagcggcgggcgaaagaagcggcgggcgaaagaagcggcgggcgaa
agcggcgggcg

enlazador LF:

ctatttaataaagaacaacaaaaatgcgttttatgaaatactacalctaccgaatctaaatgaagaacaacgtaa
tggttttatacaatcgctaaaagatgatccgtcgcaatcggcggaatctactagcggaagcgaaaaaactaaat
gatgcgcaagcggcgggcg

Tabla X

Virus adenoasociado 2, genoma completo

GenBank: AF043303.1

ORIGEN

1 TTGGGCACTG CCTCTCTGCG CGCTCCTCTG CTCAGTGAGG CCGGGGAGAC AAAGGTGCCC
 51 CGACGGCCCG GCTTTGCCCG GCGGGCTCA GTGAGCGAGC GAGCGGGCAG AGAGGGAGTG
 121 GCGAACTCCA TCACTAGGGG TTCTGGAGG GGTGAGTGG TGACGTGAAT TACGTCTAG
 181 GGTTAGGGAG GTCTGTATT AGAGGTCAGG TGAGTGTATT GCGACATTTT GCGACACCAT
 241 GTGGTCAGCG TGCGTATTTA AGCCCGAGTG AGCAGCGAGG GTCTCCATTT TGAAGCGGGA
 301 GGTTTGAACG CGCAGGCGCC ATGCCGCGGT TTTACGAGAT TGTGATTAAAG GTCCCCAGCG
 361 AGCTTGACGA GCATCTGCCG GGCATTTCTG ACAGCTTTGT GAACGGGTG GCGGAGAGGG
 421 AATGGGAGTT GCGCGCAGAT TGTGACATGG ATCTGAATCT GATTGAGCAG GCACCCCTGA
 481 CCGTGGCGGA GAAGCTGAG CGGACCTTC TGACGGAATG GCGCGGTGTG AGTAAGGCCG
 541 CGGAGGCCCT TTCTTTGTG CAATTTGAGA AGGAGAGAGG CTACTCCAC ATGCACGTGC
 601 TCCTGGAAAC CAGCGGGGTG AATCCATGG TTTTGGAGG TTTCTGAGT CAGATTCCGG
 661 AAAAAGTAT TCAGAGATT TACCGGGGA TCGAGCCGAC TTTGCCAAAC TGCTTGGCGG
 721 TCACAAAGAC CAGAAATGCG GCGGAGGCG GGAACAAGGT GGTGATGAG TGCTACATCC
 781 CCAATTACTT GCTGCCGAAA ACCAGGCTG AGCTCCAGTG GCGGTGGACT AATATGAAAC
 841 AGTATTTAAG GCGCTGTTG AATCTCAGG AGGTAAAGG GTTGGTGGCG CAGCATCTGA
 901 CGCAGGTGTC GCAGAGCGAG GAGCAGAACA AAGAGATCA GAATCCCAAT TGTATGCCG
 961 CGGTGATCAG ATCAAAAAT TCAGCCAGGT ACATGAGCT GTTCGGGTGG CTCGTGGACA
 1021 AGGGGATTAC CTCGAGAGG CAGTGATCC AGGAGGAGCA GCGCTCATAC ATCTCCTTCA
 1081 ATGCGGCCCG CAATCGCGG TCCCAATCA AGGCTGCCCT GGACAATGG GGAAGATTGA
 1141 TGAGCCTGAC TAAACCGCG CCGACTACC TGGTGGGCA GAGGCCGCG GAGGACATTT
 1201 CCAGCAATCG GATTATATAA ATTTGGAGC TAAAGGGA CGATCCCAA TATCGGCTT
 1261 CCGTCTTTCT GCGATGGGCG AGGAAAAAT TCGGCAAGAG GAACACCATC TGCTGTCTTG
 1321 GCGCTGCAAC TACCGGGAG ACCAATATCG GGGAGGCCAT AGCCACACT GTGCGCTTCT
 1381 AGGGGTGCGT AAAGTGGACC AATGAGAACT TTCCCTTCAA CCACTGTGTC GACAAGATGG
 1441 TGATCTGGTG GAGGAGGCG AAGATGACCG CCAAGGTGCT GGAGTGGGCG AAAGCCATTC
 1501 TCGGAGGAAG CAAGGTGCGC GTGACCCAGA AATGCAAGTC CTCGGCCGAG ATAGACCGGA
 1561 CTCCCGTGAT CGTCACCTCC AACACCAACA TGTGCGCGGT GATTGACGGG AACTCAACGA
 1621 CTTTGAACA CGAGCAGCCG TTGCAAGACC GATGTTCAA ATTTGAATC ACCCGCGCTC

1581 TGGATCATGA CTTTGGGAAG GTACCAAGC AGGAAGTCAA AGACTTTTTC CGGTGGGCAA
 1741 AGGATCACGT GGTGAGGTG GAGCATGAAT TGTACGTCAA AAAGGGTGA GDCAGAAAA
 1801 GAGCCGCCCC CAGTGAGGCA GATATAAGTG AGCCCAAGC GGTGGGGAG TCACTTCCG
 1861 AGCCATCGAC CTCAGACGGG GAAGCTTGA TCAACTACG ACACAGGTAC CAAAAAAT
 1921 GTTCTCGTCA CGTGGGCATG AATCTGATGC TGTTTCCGTG CAGACAATGC GAGAGAATGA
 1981 ATCAGAAATC AATATCTGC TTAATCAGC GACAGAAAGA CTGTTTAGAG TGCTTTCCG
 2041 TGTCAGAATC TCAACCCGT TCTGTGTCA AAAAGGCGTA TCAGAACTG TGCTACATC
 2101 ATCATATCAT GGGAAAGGTG CCAGACGCTT GCACTGCGTG CGATCTGGTC AATGTGGAT
 2161 TGGATGACTG CATCTTTGA CAATAATGA TTTAAATCAG GTATGGCTGC CGATGTTAT
 2221 CTTCAGATT GGTGGAGGA CACTCTGTCT GAAGGAATAA GACAGTGGTG GAAGCTCAA
 2281 CCTGGGCCAC CACCACCAA GCGCGCAGAG CGGCATAGG ACGACAGCAG GGTCTTGTG
 2341 CTTCCTGGCT ACAAGTACT CGGAGCCCTC AACGGACTCG ACAAGGGAGA GCGGTCAGC
 2401 GAGGGCAGAG CCGGGGCCCT CGAGCACGAC AAAGCCTACG ACCGGCAGCT CGACAGCGA
 2461 GACAACCCGT ACCTAAGTA CAACACGCG CACGGGAGT TTCAGGAGG CTTAAAGAA
 2521 GATACGTCTT TTGGGGCAA CCTCGAGCA CAGTCTTCC AGGGAAAAA GAGGTTCTT
 2581 GAACCTCTGG GCTGGTTGA GGAACCTTT AAGACGGCTC CGGGAAAAA GAGGCGGTA
 2641 GAGCACTCTC CTGTGAGGC AGACTCTTC TGGGAACCG GAAGGGGGG CCAGCAGCT
 2701 GCAAGAAAAA GATTGAATT TGTGAGACT GGAGAGCAG ACTCAGTACC TGACCCCGC
 2761 CCTCTCGAC AGCCACGAG AGCCCCCTCT GGTCTGGGA CTAATAGAT GGTACAGGC
 2821 AGTGGGCA CAGTGGCAGA CAATAACGAG GCGGGCAGG GAGTGGTAA TTCTCGGGA
 2881 AATTGGGATT GCGATTCCAC ATGATGGGC GAGAGATCA TCACCAGCAG CACCGAACC
 2941 TGGGGCCTGC CCACCTAGAA CAACCACTC TACAACAAA TTTCAGGCA ATCAGAGGC
 3001 TCGAACGACA ATCACTACTT TGCTACAGC ACCCTTGGG GGTATTTGA CTCAACGAA
 3061 TTGCACTGCC ACTTTTACC AGTGAAGTG CAAAGACTCA TCAACACAA CTGGGGATT
 3121 CAGCCCAAGA GACTCAACTT CAAGCTTTT AACATTCAAG TCAAGAGGT CAGGAGAA
 3181 GAGGGTACGA CGAGGATTGC CAATAACCTT ACCAGCACGG TTCAGGTGT TACTGACTCG
 3241 GAGTACCAGC TCCGTACGT CCTCGGCTG GCGCATCAAG GATGGCTGC GCGTTGCCA
 3301 GCAGAGCTCT TCATGTGTC ACAGTATGGA TACCTACCG TGAAGAACGG GAGTCAGCA
 3361 GTAGGAGCCT GTTCATTTA CTGCTGGAG TACTTTCTT CTCAGATGCT GGTACCGGA
 3421 AACAACCTTA CTTTCAGTA CACTTTTGA GAGTTTCTT TCCACAGCAG CTACGCTCAG
 3481 AGCCAGAGTC TGGACCGTCT CATGAATCT CTATCGACC AGTACCTGA TTAATTGAGC
 3541 AGAACAAACA CTCAAGTGG AACGACAGC CAGTCAAGG TTCAGTTTTT TCAGGCCGGA
 3601 GCGAGTGACA TTGGGGACCA GTCTAGGAAC TGCTTCTTG GACCTGTGA CCGGACAGC
 3661 CGAGTATCAA AGACATCTGC GATAAGAAC AACAGTGAAT ACTCGTGAC TGAGCTAGC
 3721 AAGTACCAGC TCAATGGAG AGACTCTCT GTGAATCCG GCGGGCCAT GGAAGGCCA
 3781 AAGGACGATG AAGAAAAAT TTTTCTCAG AGCGGGTTC TCATCTTTGG GAAGCAAGC
 3841 TCAGAGAAAA CAAATGTGA CATTGAAAAG GTCATGATTA CAGACGAGA GGAATCAGG
 3901 ACAACCAATC CCGTGGCTAC GGAGAGTAT GGTCTGTAT CTACCAACCT CCAGAGAGC

3951 AACAGADAAG CAGCTACCGC AGATGTCAAC ACACAAGGCG TTCTTCAGG CATGGTCTGG
 4021 CAGGACAGAG ATGTGTACCT TCAGGGGGCC ATCTGGGCAA AGATTCCACA CAGGGACGGA
 4081 CATTTCACG CCTCTCCCT CATGGGTGSA TTGGGACTTA AACACCTCC TCCACAGATT
 4141 CTCATCAAG ACACCCCGGT ACCTCGAAT CCTTCAGCA CCTTCAGTGC GGCAGGTTT
 4201 GCTTCCTTCA TCACACAGTA CTCACGGGA CAGTTCAGGG TGGAGATGSA GTGGGAGCTG
 4261 CAGAGGAAA ACAGCAAAG CTGGAATCC GAAATTCAGT AACTTCCAA CTACAACAAG
 4321 TCTGTTAATG TGGACTTTAG TGTGGACACT AATGGCGTGT ATTGAGAGGC TGGCCGATT
 4381 GGCACCAGAT ACCTGACTG TAACTCTGTA TTGCTTGTTA ATCAATAAAC CGTTTAATTG
 4441 GTTTCAGTTG AACTTTGGTG TCTGGGTATT TCTTTCTTAT CTAGTTTCCA TGGCTACGTA
 4501 GATAAGTAGC ATGGCGGGT AATCATTAA TACAAGGAAC CCTAGTGTAT GGAGTTGGC
 4561 ACTCCTCTG TGGCGCTGG CTCGCTEACT GAGCGCGGGC GACCAAGGT CGCCGACGC
 4621 CCGGCTTTG CCGGGCGGC CTCAGTGAGC GAGCGAGCG GCAGAGAGGG AGTGGCAA

Tabla XI

pAAV-XBP1s

ggoggatccaattgcctagggcccaagggcgaattgtcacgaccccccctccaggaacccctagtgaagg
 gttggccacccccctctcgcgctcgctcactgaggccgcccgggcaagcccgggcgicggggcgac
 ctttggctgcccggcctcagtgagcgagcgagcgcgagaggggagtgccagatcigatatcatcgatg
 aattcaagcttcagctgctcgagttctatagtgicacctaactgtagtgatgataaagggtatgtattatg
 tagccggctgtaacgacaatatgtccatatgggtgactctcagtaacatctgctctgagtcgcatagttaagcc
 agcccgacacccggccaacaccccgtagcgcgcccgacgggctgtctgctccggcatccgctacagac
 aagctgtgaccgctcggggagctgcatgtgtcagagggtttcacccgcatcacgaaaogcgagagcga
 agggccctgtgatacgccctattttataggttaattgtcatgataaataatgggttcttagacgtcagggtggcatttctg
 gggaaaatgtgcgaggaaacccctattgtttatctaaatacatccaataatglatccgctcatgagacaataac
 cctgataaattgttcaataaattgaaaaaggaagagatgagatattcaacatttccgtgtcccttatctccctttt
 tgcggcatttgccttccgtttttgtctacccagaaacgctggggaagtaaaagatgctgaagatcagttgggt
 gcacgagtggtgtacatcgaaclggatctcaacagcggtaagatccctgagagtttccgcccgaagaacggtt
 tccaatgatgagcaccttttaagttctgctatgtggcggtattatccglatfgacgcccgggcaagagcaactc
 ggtcgcgcatacactatctcagaatgacttggtgagtgactaccagtcacagaaaagcatcttacggatgg
 catgacaglaagagaattatgcagtgctgcatataaccatgagtgataacacigcggccaacttactctgaca
 acgatcgaggagccgaaggagctaaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactgccttgatcgltg
 ggaacccggagctgaatgaagccataaccaaacgagcggtgacaccaagatgcctgtagcaatggcaac
 aacgttgcgcaaaactattaaclggcgaaacttactcttagcttccggcaacaattaatagaciggtatggagg
 cggataaagltgcaggaccacttctcgctcgcccttccggctggctggtttatgtgataaactcgagccg
 gtgagcggtgggtctcggtatcattgcagcacctggggccagatggtaagccctccglatcgtagttatctaca
 cgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaataagacagatcgctgagatagggtcctcactgattaag

gccccattgacgcgaatgggcggtaggcgtgtacgttgagggtctatataagcagagctctctggctaacta
gagaacccactgcttactggcttatcgaaatfaatacgaactcactataggggagacccaagctggctagcgttta
aacctaagcttccctggctatgggtggggggcagccgcgcgcgaaccgcggccgacgggaccccataaagtcttgc
ttctgtcggggcagcccgcctcgcgcgcggagcccgcggccggccaggccctgcgcgtcatgggtccagcc
cagagagggggccagcccggaggcagcgcgcggggggctgcccaggcgcgcgaagcgacagcgcctca
cgcacctgagccccgaggagaaggcgcctgaggaggaaaactgaaaaacagagtagcagctcagactgcc
agagatcgaaagaaggctcgaatgagtgagctggaacagcaagtggttagattagaagaagagaaccaa
aaacttttgcagaaaaatcagctttacgagagaaaaactcatggcctgtagttgagaaccaggagttaagaca
ggcgttggggatggatgcccctgggtgctgaagaggaggcggaagccaagggggaatgaagtgaggccagtg
gcccgggtctgtgtagtcgcagcaggtgcaggcccagttgtcacccctccagaacatctccccatggattctg
gcggtatgactcttcagattcagagtcgatactcgttgggcattctggacaacttggaccagtcagtcttcca
aatgcccttccccagagccctgccagccctggaggagctcccagaggctacccagaaggacccagttccttac
cagccctcccttctctcagtggggacgctacagccaagctggaagccattaatgaactaattcgtttgacca
catatataccaagcccctagcttagagataccctctgagacagagagccaagctaattgtgtagtgaatac
gagggaagcaacctctcagccctcagagaatgatcaccttgaattcatgtctcagtgaagggaagaacctgtag
aagatgaacctcgtccggagctgggtatctcaaatctgcttcaaccagccactgcccagaagccatctccgcct
actggatgcttacagtgactgtggatacgggggttcccttcccccattcagtgacaigtctctctgtgtggtaaa
ccattcttgggaggacacttttccaatgaactcttcccagctgattagtgtctacccatacagatgtccagatta
cgcaatgtaagagccacataaacctgggccccttccctgaacctcacatgtccctagaggatagcataggcc
tgaaggggcgaattccagcacactggcggcggtactagaggggccggttaaacccgctgatcacctcgactgt
gccttctagtgtccagccatctgtgtgttgccttcccccgctgccccttgaacctgggaagggtgccactccactgt
ccttccctaataaaaatgaggaaattgcacgcattgtctgagtaggtgtcattctattctgggggggtggggggggg
caggacagcaagggggaggattgggaagacaatagcaggcatgcctgcagcgggtccgggtcgactctaga
ggatcgaaaaaacctccacacccctccccctgaacctgaaacataaaaatgaatgcaattgtgtgttaactgtt
ttattgcagctataatggttacaaaataagcaatagcatcacaaattcacaaaataagcattttttcactgcatt

ctagtgtggttgtccaaactcatcaatgtatcttatacatgtctggatccccgcggtggcgccgcactagtcocg
 ggtaattaagctagcagatcttgatcacctaggcgctacgatttggccgctttacaatgggtggcgaccggggatcc
 tctaglaccaagctaattcctcacgacacctgaaatggaagaaaaaacttgaaccactgtctgaggctga
 gaatgaaccaagatccaaactcaaaaagggcaattccaaggagaattacatcaagtccaagctggcct
 aactcagctcaccacactcagtggtggggaactccatgcataaaacccctcccccaacctaaagacga
 cgtactccaaaagctcgagaactaatcgaggctgctggacggcgcccggtactccgtggagtacatgaag
 cgacggctgaggacggaaaggccctttcttctgtgtgggtgactcaccgcgcgcctctcccgagcgccgcgt
 cctccattttgagctcctcgagcagggccgggaagcggccatcttccgctcacgcaactggtgcgacccg
 gccagccttgcgcgcagggcgggcgatatacggcgcgcgaggccaggcaccagagcagggccggc
 cagcttgagactaccccgctcgatctcgggtggccgcgctcgaggccccgcctcgcgaacatgtgcgctg
 ggacgcacggggcccgctcgccgcgcggcccaaaaaccgaaataccagtgtgcagatcttggcccgca
 ttataagactatcttgcagaaaaaaagcgctgcagcagggtcatcaaaaattttaatggctagagacttct
 gaaagcagcgagacaggcggaagggtgcaccagattgcacgcggcgggcccgagcgccagggccag
 gcccaactcaagcagaggcggaagggtctcttaagcgcaaggcctcgaactctccaccacacttccaac
 ccgaagctcgggatcaagaatcaogtactgcagccagggtggaagtaattcaaggcacgcaagggccataa
 ccgtaaaagaggccaggcccgcggaaccacacacgggcacttacctgtgtctggcggaaccccggtgcg
 aaaaagaacgttcaoggcgactactgcacttatatacgggttccccccacctcgggaaaaaggcgagcc
 agtacacgacatcacttccagttaccccgcgccaccttcttaggcacgg

Tabla XII

pAAV_ATF6f

ggcgatccaatgacctaggcccaagggcgaatgfcacgactccacccctccaggaacccctagtgaigga
 gtggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggctgggcgac
 ctttggtcgccggccctcagtgagcgagcgagcgcgagagaggagtgcccagatctgatacatcgaig
 aatcaagcttcagctgctcgagttctatagtgicacctaatactgtagtgatgatacataagggtatgtatattg
 tagccgcttctaacgacaatatgtccataatgggtgcactctcaglacaaatctgctctgaigccgcatagtaagcc
 agccccgacaccogccaacaccogctgacgogccctgacgggctgtctgctccggcaiccgcttacagac
 aagctgtgaccgtctcgggagctgcatgtgtcagagggtttaccgtcatcacgaaaacgcgcgagacgaa
 agggcctcgtgatacgcctattttataggtaaatgtcatgataataatgggttcttagacgtcagggtggcactttcg
 gggaaatgtgogcggaacccctattgtttatcttaataacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataac
 cctgataaatgctcaataatattgaaaaaggaagagtagtagtattcaacatttccgtgctgcccctatttccctttt
 tggggcattttgcttccgtttttgtcaccacagaaacgctgggaaagttaaagatgctgaagatcagttgggt
 gcacgagtggttacatgaactggatctcaacagcggttaagatccttgagagttttcgccccgaagaacgttt
 tccaatgatgagcacttttaaagttctgctatgtggcggtattatcccgatttgacgcccgggcaagagcaactc
 ggtcgccgcatacactattctcagaatgacttgggtgagtactaccagtcacagaaaagcatcttacggatgg
 catgacagtaagagaattatgcagtgctgccataacctatgagtgataaacactgcgccaacttactctgaca
 acgatcggaggaccgaaggagctaaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactgccttgatcgttg
 ggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgigacaccacgatgcctgtagcaatggcaac
 aacgttgcgcaaacatttaactggcgaactacttactctagcttccggcaacaattatagactggatggagg
 cggataaagttgcaggaccacttctcgctcggcccttcgggctgggtttatgtgataaatctggagccg

gtgagcggtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccagatggtaagccctccgtafcgtagttatctaca
 cgacgggggagtcaggcaactatggaigaacgaaatagacagatcgctgagatagggtgctcactgattaag
 catggtaacgtcagaccaagttactcatatatacttttagatgatttaaaacttcattttaatttaaaaggatcta
 ggtgaagatccttttgataatctcatgacaaaatcccttaacgtgagtttctgctcactgagcgtcagaccccg
 tagaaaagatcaaaggatcctctgagatcctttttctgcgcgtaactctgctgctgcaaacaaaaaaaccacc
 gctaccagcggtgggttgggtgacgagctaccaactcctttccgaaggtaactggcttcagcagagc
 gcagataccaaaactcgtcctctagtgtagccgtaggtaggccaccactcaagaactctgtagcaaccgctac
 ataccctcgctctgctaactctgtaccagtggtgctgcccagtggtgataaagtcgtgcttaccgggttgactca
 agacgatagttaccggataaggcgcagcgggtcgggtgaacgggggggttcgtgcacacagcccagcttgg
 agcgaacgacctacacgaactgagatacctacagcgtgagcatlgagaagcgccacgcttccgaagg
 gagaaaaggcggacaggatcctgtaagcggcaggggtcgggaacaggagagcgccagggggagcttcag
 ggggaaacgcctggtatctttagtctgctgggttcggccacctcgtactgagcgtcgtatcttctgctgctgc
 agggggggcgagcctatggaaaaacgccagcaacggcgcccttttacgggttcctggccttttctggtcctttgc
 tcacatgttcttccgctgctatccctgattctgtggataacogtattaccgctttgagtgagctgataccgctgc
 cgcagccgaacgaccgagcgcagcagtcagtgagcgaggaagcggaagagcgcccaatacgcgaac
 cgctctcccgcggttggccgattcaataatgcaggtaaacctggcttatcgaaatatacgaactcactatag
 ggagaccggcagatctgtccctctctgcgcgctcgtctcactgaggccgcccggggcaaaagcccggggcgt
 cgggagaccttggctgcggcctcagtgagcgagcgagcgcgagagggagtgggccaactccatca
 ctagggggtccttgtagttatgattaaacccgccatgctactatctacaattcgccttcggaacgctggcttga
 actaggcaattgcatgaagaatctgcttaggggtaggcgttttgcgctgcttcggaatgacgggcccagatatac
 gcttgacattgattatgactagttatgaatgaatcaattacgggggtcattagttcatagcccatataggagttc
 cgcgttacataacttacggtaaatggcccgctggcctgacccgccaacgaccccgccattgacgtcaata
 atgacgtatgttccatagtaacgccaatagggaacttccattgacgtcaatgggtggagtaattacggtaaacgt
 cccacttggcagtacatcaagtgtatcataigccaagtacgcccctattgacgtcaatgacggtaaatggccc
 gccctggcattatgccagtacatgacctatgggacttccacttggcagtaacatcactgattatgcatcgtatt

aaaatgaatgcaatgtgtgtgtaactgtttatgacagcttataatgggtacaaataaagcaatagcafcacaaat
 ticacaaataaagcatfttttcactgcattctagttgtgtgtgtgtccaaactcafcacaaatgtatctatcatgtctggatc
 ccgcggtgtggtggccgactagtcgggttaattaagctagcagatctgtatcacctaggcgtagcatttggc
 cgctttacatgtgtgtgacggggatctctagtagcaagctaattcctcacgacacctgaaatggaagaaaa
 aaacttgaaccactgtctgaggcttgagaatgaaccaagatccaaactcaaaaagggtcaaatccaagga
 gaattacatcaagtccaagctggcctaactcagltccaccactcagtggtgggaaactccatcgcataa
 aacccctcccccaacctaaagacgactctcaaaagctcgagaactaatcgagggtgcttggacggcg
 ccggtactccgtggagtacatgaagcgacggctgagggaaggaaaggcccttttcttgtgtgggtgactca
 ccgcccgtctcccgagcgccggtctctcatfttgagctccctgcagcagggcggggaagcggtcatctt
 ccgtcacgcaactgtgtcgacggggccagccttgcggccagggtggggcgatcacggcggtcgga
 ggccaggcaccagagcaggccggccagcttgagactaccccgctcgatctcggtggccgctcgag
 gcccgcctcgccgaacatgtgcgtgtggacgcacggggcccgctcgccggcccgggcccaaaaaccga
 aataccagtggtcagatcttggcccgcatftacaagactatcttgcagaaaaaaagcgctgcagcaggtcat
 caaaaatttaaatgtgtagagacttatcgaaagcagcgagacaggcggaagggtgccaccagattcgac
 gggcggtggcccgccagggccagggcccaactcaagcacgaggcggaagggtctcttaagcgcaag
 gccctgaactctccaccacttccaacctogaagctcggtatcaagaatcacgtactgcagccagggtggaa
 gtaattcaaggcacgcaagggtccataaccgtaaaagaggccaggcccggtgggaaccacacacggcactt
 accgtgtgtgtgtggcgaaccgggtgcgaaaaagaacgttcacggcgactactgcacttatatacggtctcc
 ccacccctgggaaaaaggcggtgagccagtagcacgacatcacttccagttaccccggtccacttcttag
 gcaccgg

REIVINDICACIONES

1. Un vector adenoasociado (AAV), que comprende un genoma viral recombinante donde dicho genoma comprende un casete de expresión que comprende una región reguladora de la transcripción específica para tejidos neuronales unida de forma operativa a un polinucleótido de interés que codifica una proteína de fusión, en el que la proteína de fusión comprende la forma activa de la proteína de unión a X-Box 1 (*XBP1s*), la forma activa del factor de transcripción activador 6 (*ATF6f*) y una secuencia puente o enlazadora.
2. Un vector adenoasociado, según la reivindicación 1, en el que el serotipo del AAV se selecciona de un grupo que comprende AAV2, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 y AAV pseudotipificados, preferiblemente en el que el serotipo del AAV es AAV2 o un vector pseudotipado de AAV 2/6.
3. Un vector adenoasociado, según las reivindicaciones 1 o 2, en el que la región reguladora de la transcripción incluye una región promotora seleccionada entre el grupo que comprende *CMV*, *PGK1*, *CAMKII*, *THY1* y *GAD34*, preferiblemente en el que la región promotora seleccionada del grupo es *CMV*.
4. Un vector adenoasociado, según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende una región codificadora de un sitio de respuesta inmunitaria seleccionada entre el grupo de *Ha*, *Flag*, *Gfp*, *His* y *Myc*, preferiblemente en el que la región codificadora de un sitio de respuesta inmunitaria es *Ha*.
5. Un vector adenoasociado, según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el casete de expresión comprende una región reguladora posterior a la transcripción, preferiblemente en el que la región reguladora posterior a la transcripción es el elemento regulador posterior a la transcripción del virus de la hepatitis de la marmota (WHP).
6. Un vector adenoasociado, según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que:
 - (i) la secuencia puente comprende la secuencia LFG, L4H4 o LF como se muestra en la tabla IX; y/o
 - (ii) la secuencia diana que se va a transcribir es la secuencia XBP1s-LFG-ATF6f como se muestra en la Tabla I, la secuencia XBP1s-LF-ATF6f como se muestra en la Tabla II, la secuencia XBP1s-L4H4-ATF6f como se muestra en la Tabla III, la secuencia ATF6-LFG-XBP1s como se muestra en la Tabla IV, la secuencia ATF6-L4H4-XBP1s como se muestra en la Tabla V o la secuencia ATF6-LF-XBP1s como se muestra en la Tabla VI.
7. Un vector adenoasociado, según las reivindicaciones 1 a 7, en el que el polinucleótido de interés codifica una proteína de fusión codificada por la secuencia XBP1s-LFG-ATF6f como se muestra en la Tabla I, la secuencia XBP1s-LF-ATF6f como se muestra en la Tabla II, la secuencia XBP1s-L4H4-ATF6f como se muestra en la Tabla III, la secuencia ATF6-LFG-XBP1s como se muestra en la Tabla IV, la secuencia ATF6-L4H4-XBP1s como se muestra en la Tabla V o la secuencia ATF6-LF-XBP1s como se muestra en la Tabla VI.
8. Una composición farmacéutica que comprende un vector adenoasociado como se describe en cualquier reivindicación anterior y los excipientes farmacéuticamente aceptables.
9. Una composición farmacéutica, según la reivindicación 8, que comprende una dosis del virus en un intervalo entre 10^9 y 10^{13} copias del genoma (GC) por ml de compuesto.
10. Una composición farmacéutica, según la reivindicación 9, para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson y/o de Huntington.
11. Una composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 10, en el tratamiento de un mamífero, más preferiblemente en el que el mamífero es un ser humano; preferiblemente en el que el vector adenoasociado o la composición farmacéutica se administra sistémica o localmente.
12. Un polinucleótido, que comprende un casete de expresión flanqueado por las ITR de un virus adenoasociado, donde dicho casete de expresión comprende un promotor, una región codificadora para la respuesta inmunitaria y un polinucleótido de interés que codifica una proteína de fusión; en el que la proteína de fusión comprende *XBP1s*, *ATF6f* y una secuencia puente o enlazadora.
13. Un polinucleótido según la reivindicación 12, en el que:
 - (i) la región promotora se selecciona entre el grupo que comprende *CMV*, *PGK1*, *CAMKII*, *THY1* y *GAD34*; preferiblemente en el que la región promotora seleccionada entre el grupo es *CMV*;
 - (ii) la región codificadora de un sitio de respuesta inmunitaria se selecciona entre el grupo *Ha*, *Flag*, *Gfp*, *His* y *Myc*, preferiblemente en el que la región codificadora de un sitio de respuesta inmunitaria es *Ha*;
 - (iii) el tipo de serotipo del vector adenoasociado es del vector pseudotipificado número 2 y/o 2/6;

- (iv) el casete de expresión también comprende una región reguladora posterior a la transcripción, más preferiblemente en el que la región reguladora posterior a la transcripción es el elemento regulador posterior a la transcripción del virus de la hepatitis de la marmota (WHP);
- 5 (v) la secuencia diana a transcribir está codificada por la secuencia XBP1s-LFG-ATF6f como se muestra en la Tabla I, la secuencia XBP1s-LF-ATF6f como se muestra en la Tabla II, la secuencia XBP1s-L4H4-ATF6f como se muestra en la Tabla III, la secuencia ATF6-LFG-XBP1s como se muestra en la Tabla IV, la secuencia ATF6-L4H4-XBP1s como se muestra en la Tabla V o la secuencia ATF6-LF-XBP1s como se muestra en la Tabla VI; y/o
- 10 (vi) el polinucleótido de interés codifica una proteína de fusión codificada por la secuencia XBP1s-LFG-ATF6f como se muestra en la Tabla I, la secuencia XBP1s-LF-ATF6f como se muestra en la Tabla II, la secuencia XBP1s-L4H4-ATF6f como se muestra en la Tabla III, la secuencia ATF6-LFG-XBP1s como se muestra en la Tabla IV, la secuencia ATF6-L4H4-XBP1s como se muestra en la Tabla V o la secuencia ATF6-LF-XBP1s como se muestra en la Tabla VI.
14. Un plásmido, que comprende las secuencias de un virus adenoasociado, y un casete de expresión flanqueado por las ITR del virus adenoasociado, donde dicho casete de expresión comprende un promotor, una región codificadora para la respuesta inmunitaria y un polinucleótido de interés, en el que el plásmido comprende la secuencia de un plásmido depositado en el organismo internacional de depósitos biológicos, Instituto de Investigaciones Agropecuarias de Chile, INIA, con los números de depósito: RGM 2231, RGM 2232, RGM 2233, RGM 2234, RGM 2235 o RGM 2236.
- 15 15. Un virus adenoasociado, que comprende un genoma viral que comprende el polinucleótido descrito en la reivindicación 12 o la reivindicación 13.

Figura 1/17

Mapa de restricción de pAAV_XSP1s-LFG-ATF6f - 7701 nt
<Serial Cloner V2.5> -- <17-09-2015 14:29>

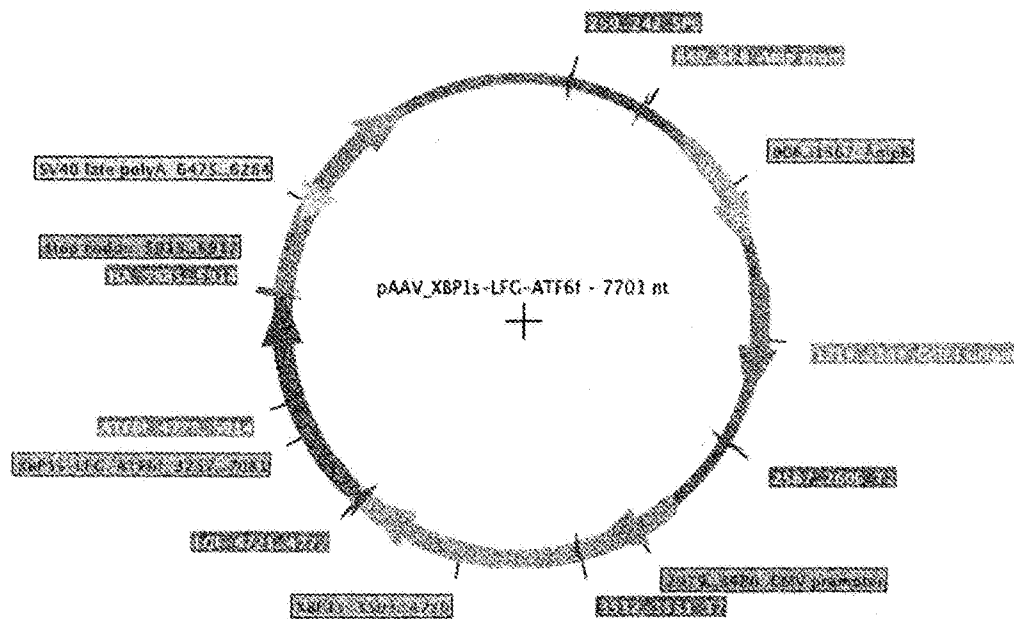


Figura 2/17

Mapa de restricción de pAAV_Xbpl1s-LF-ATF6f - 7809 nt
<Serial Cloner V2.5> -- <17-09-2015 14:28>

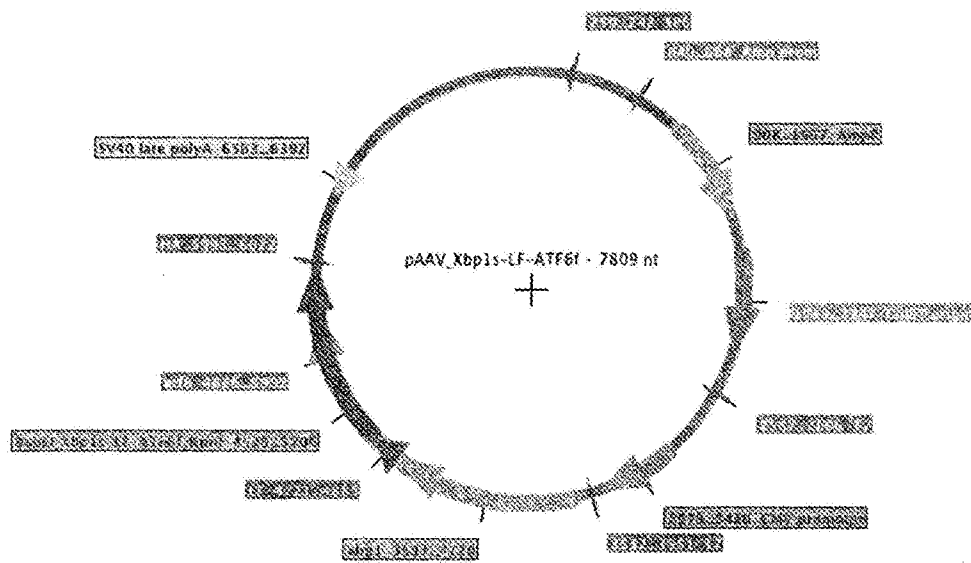


Figura 3/17

Mapa de restricción de pAAV_XbpI5-L4H4-Atf6f - 7719 nt
<Serial Cloner V2.5> -- <17-09-2015 14:24>

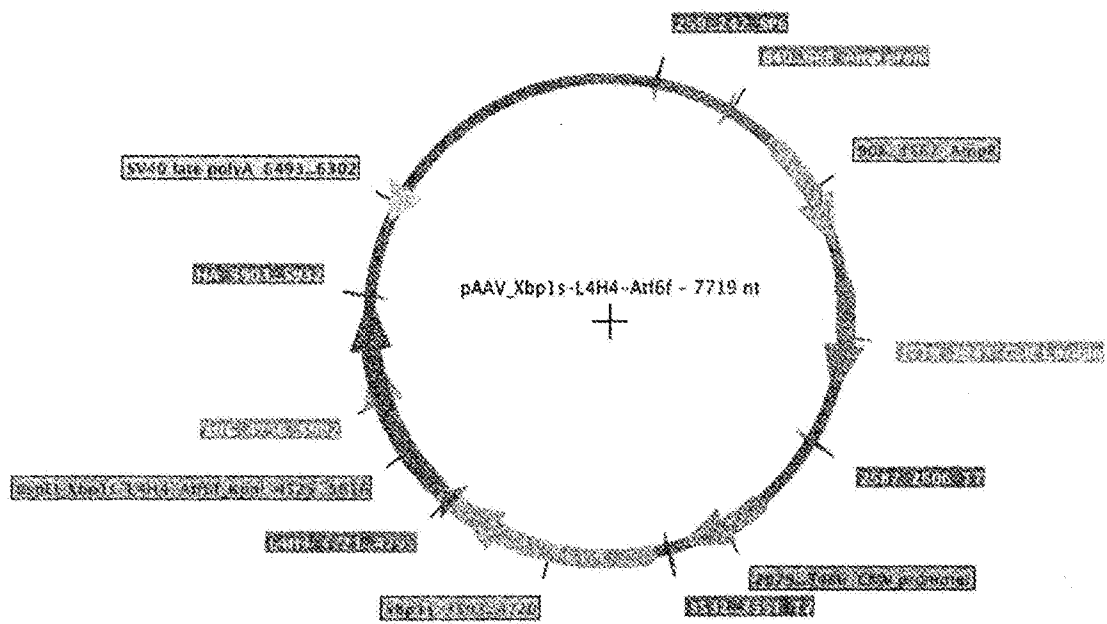


Figura 4/17

Mapa de restricción de pAAV_ATF6 - LFC - XBP1s - 7701 nt
<Serial Cloner V2.5> -- <17-09-2015 13:13>

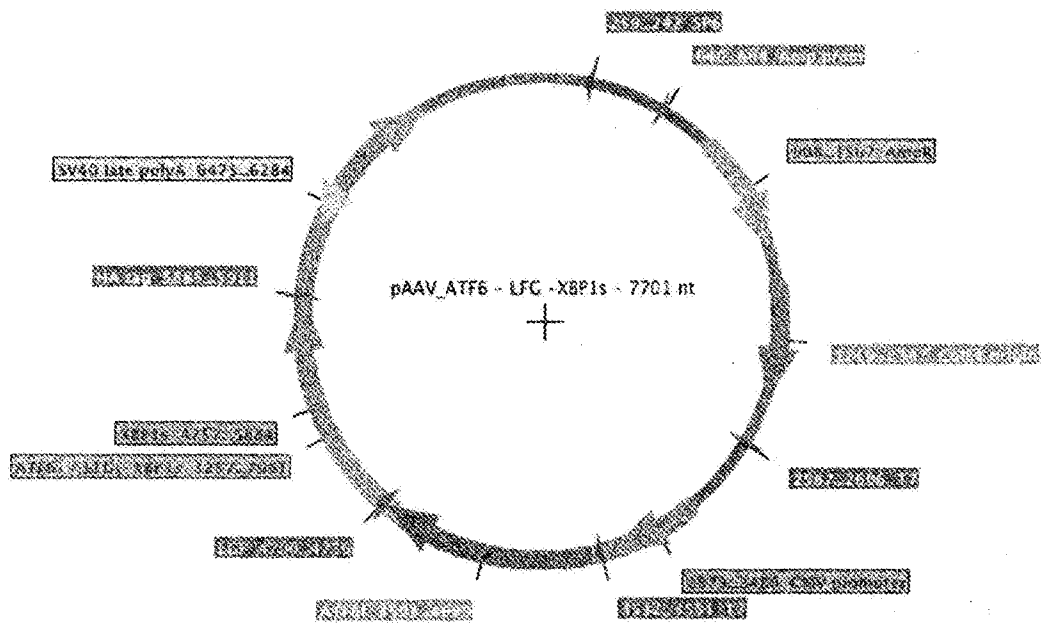


Figura 5/17

Mapa de restricción de pAAV_ATF6- L4H4 - XBP1s - 7719 nt
<Serial Cloner V2.5> -- <17-09-2015 13:15>

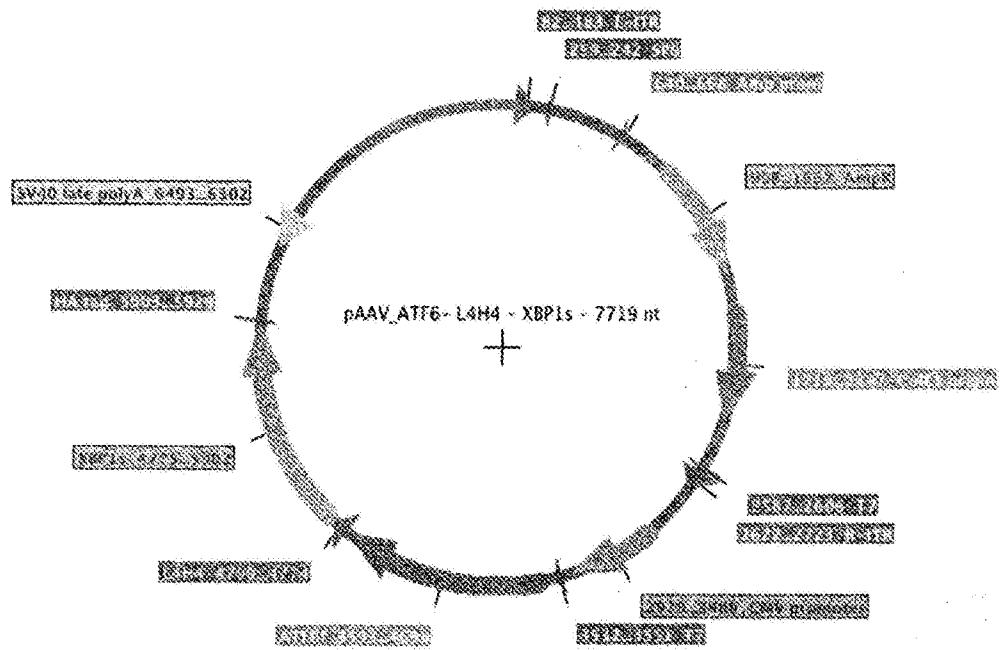


Figura 6/17

Mapa de restricción de pAAV_ATF6 - LF-XBPIs - 7809 nt
<Serial Cloner V2.5> -- <17-09-2015 13:05>

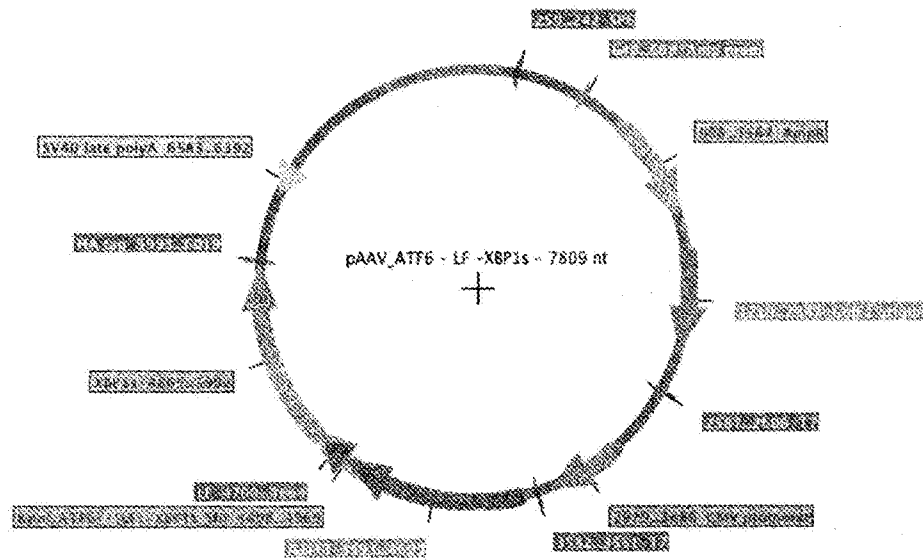


Figura 7/17

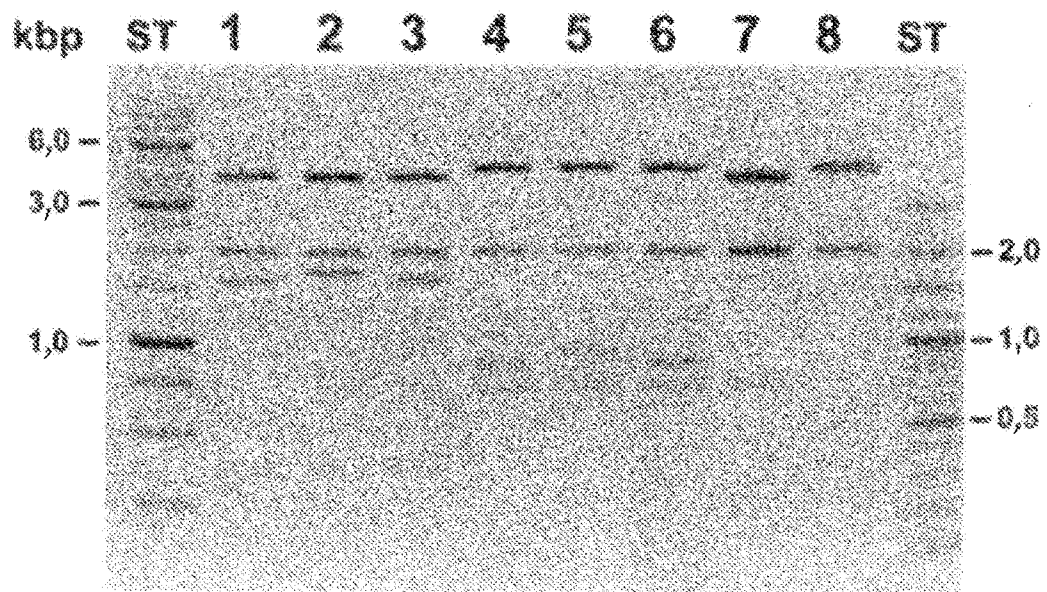


Figura 8/17

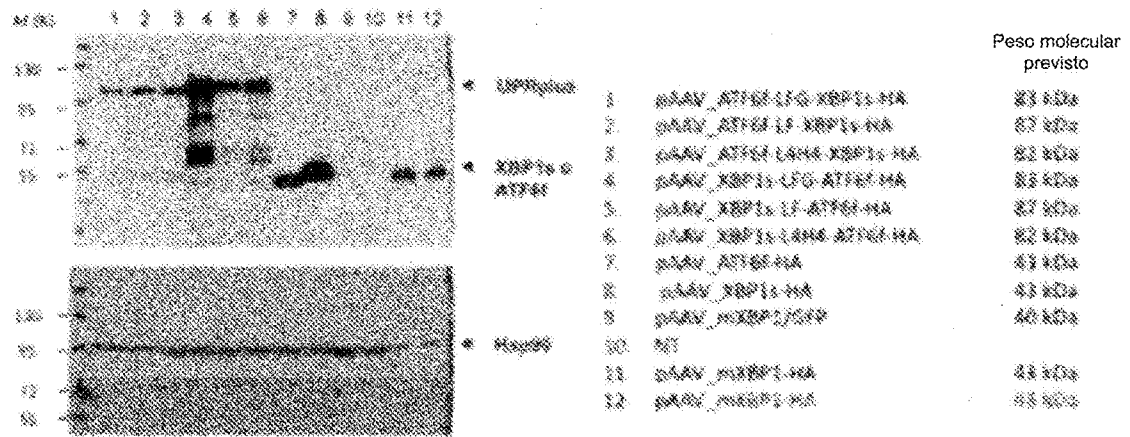


Figura 9/17

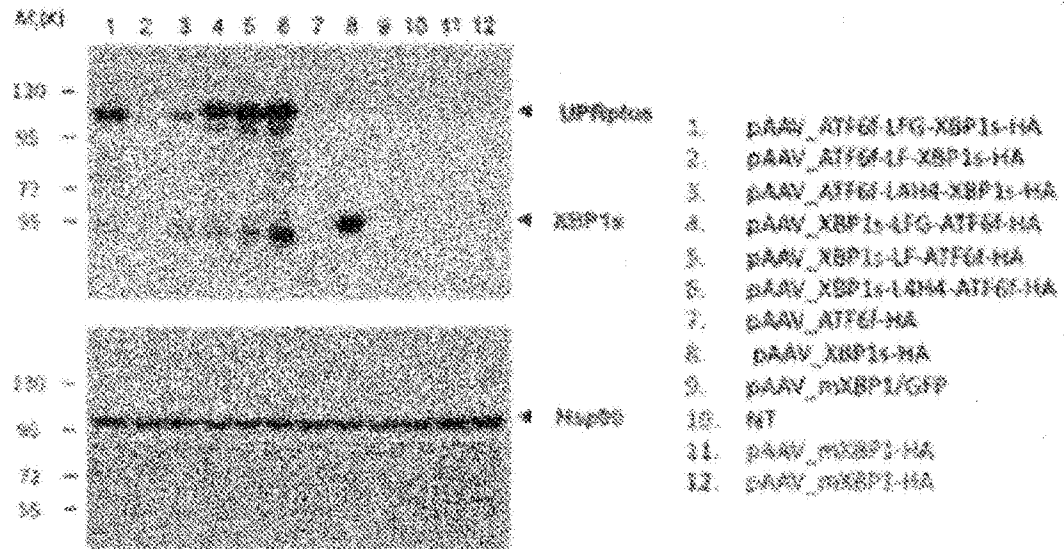


Figura 10/17

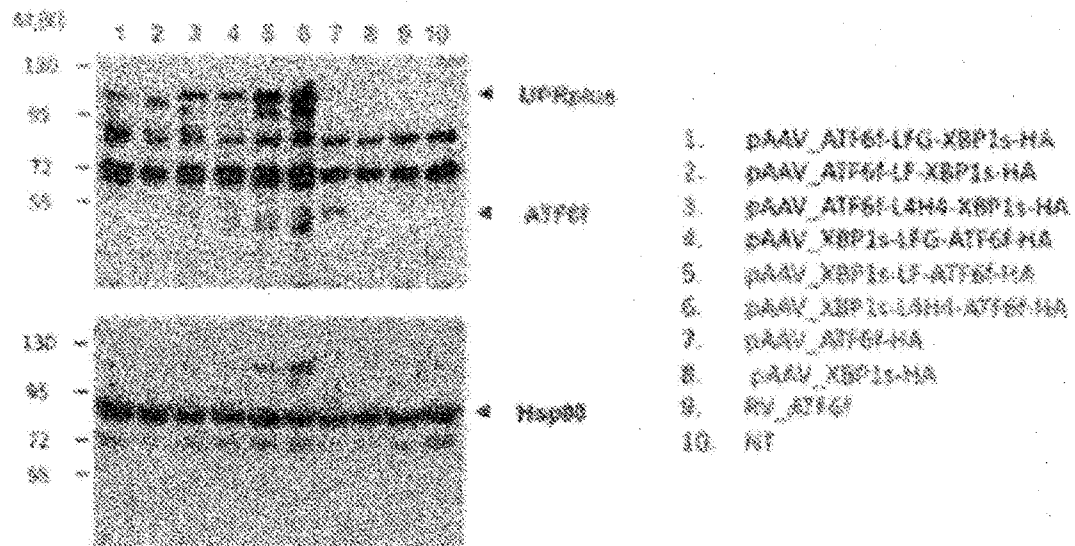


Figura 11/17

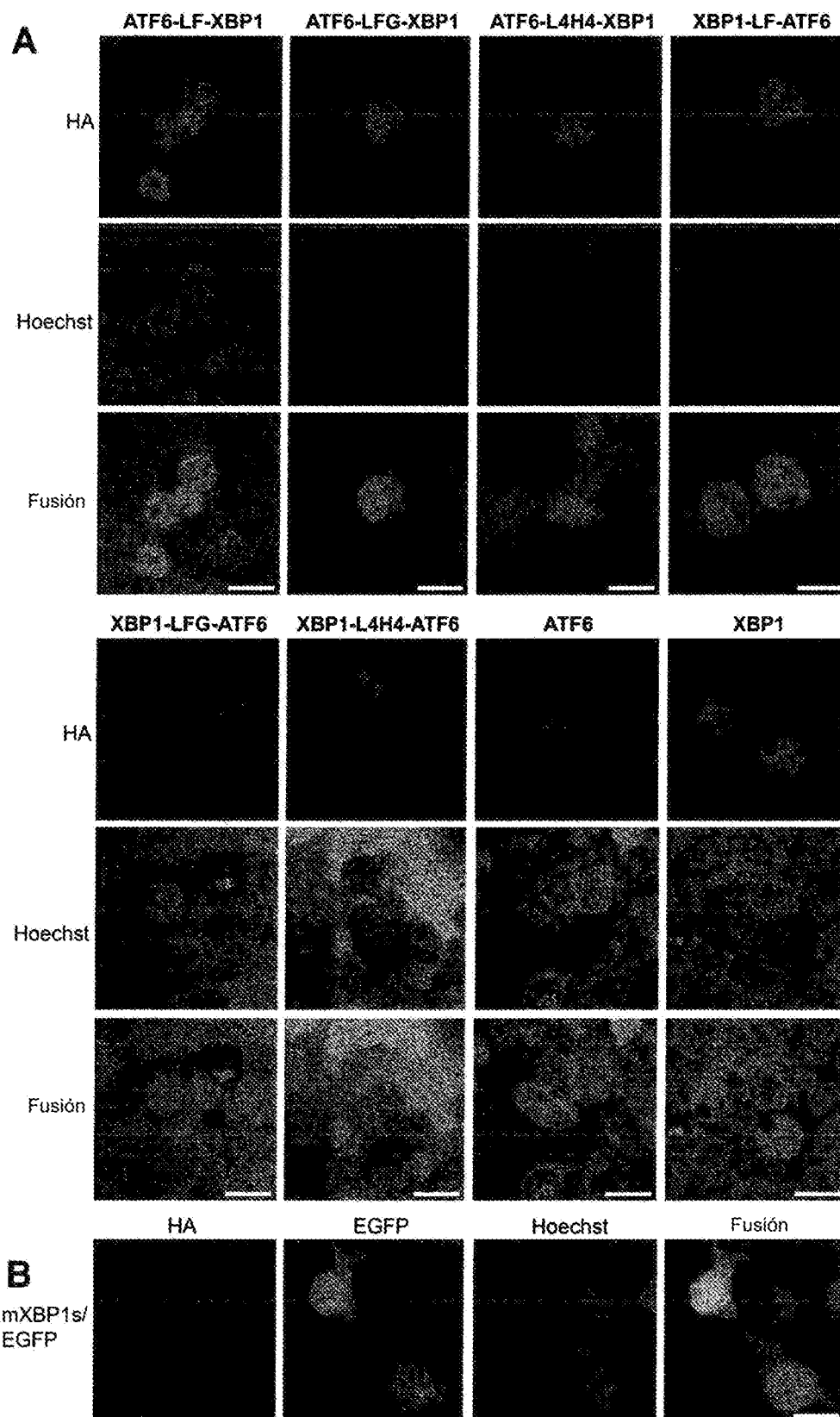


Figura 12/17

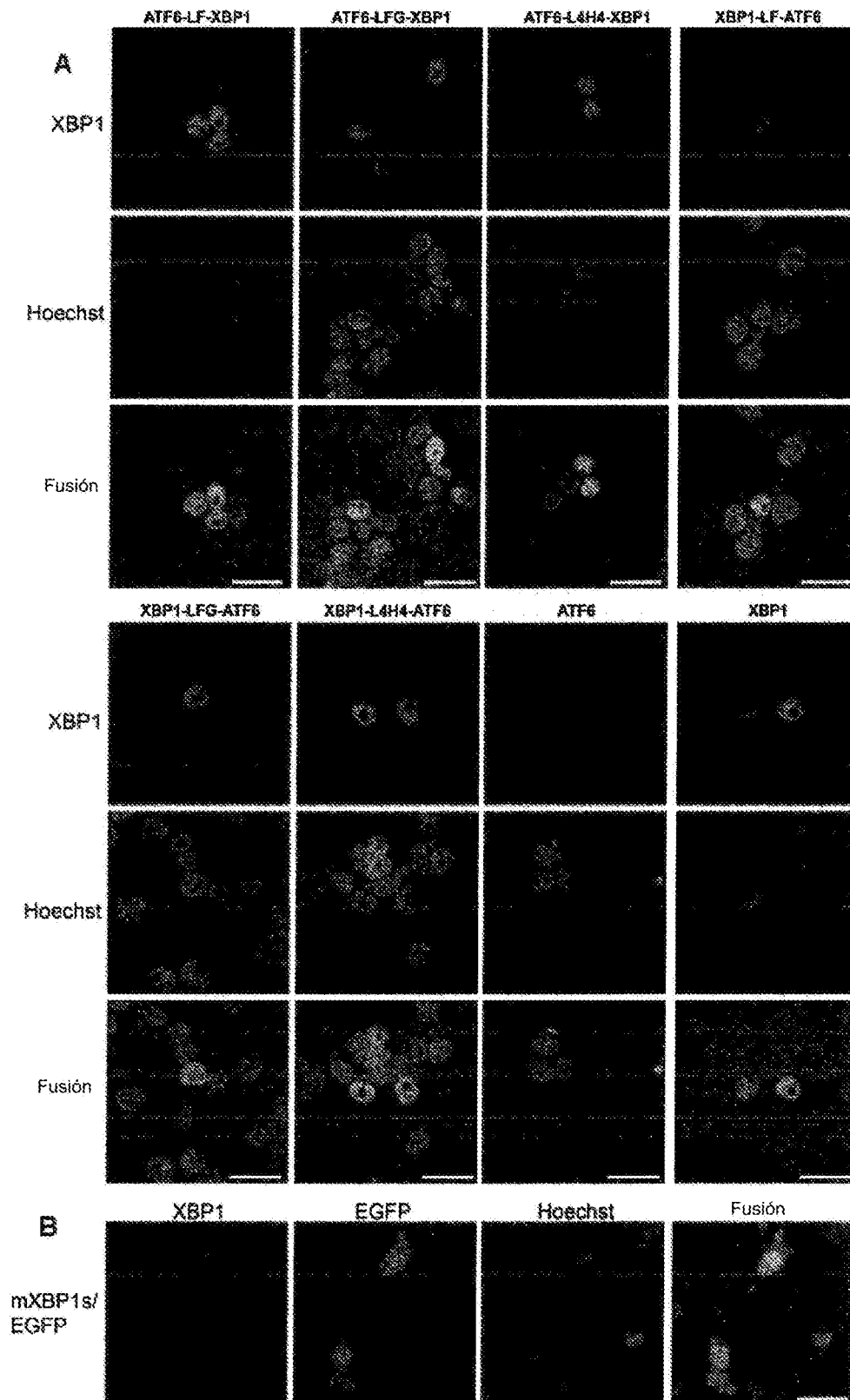


Figura 13/17

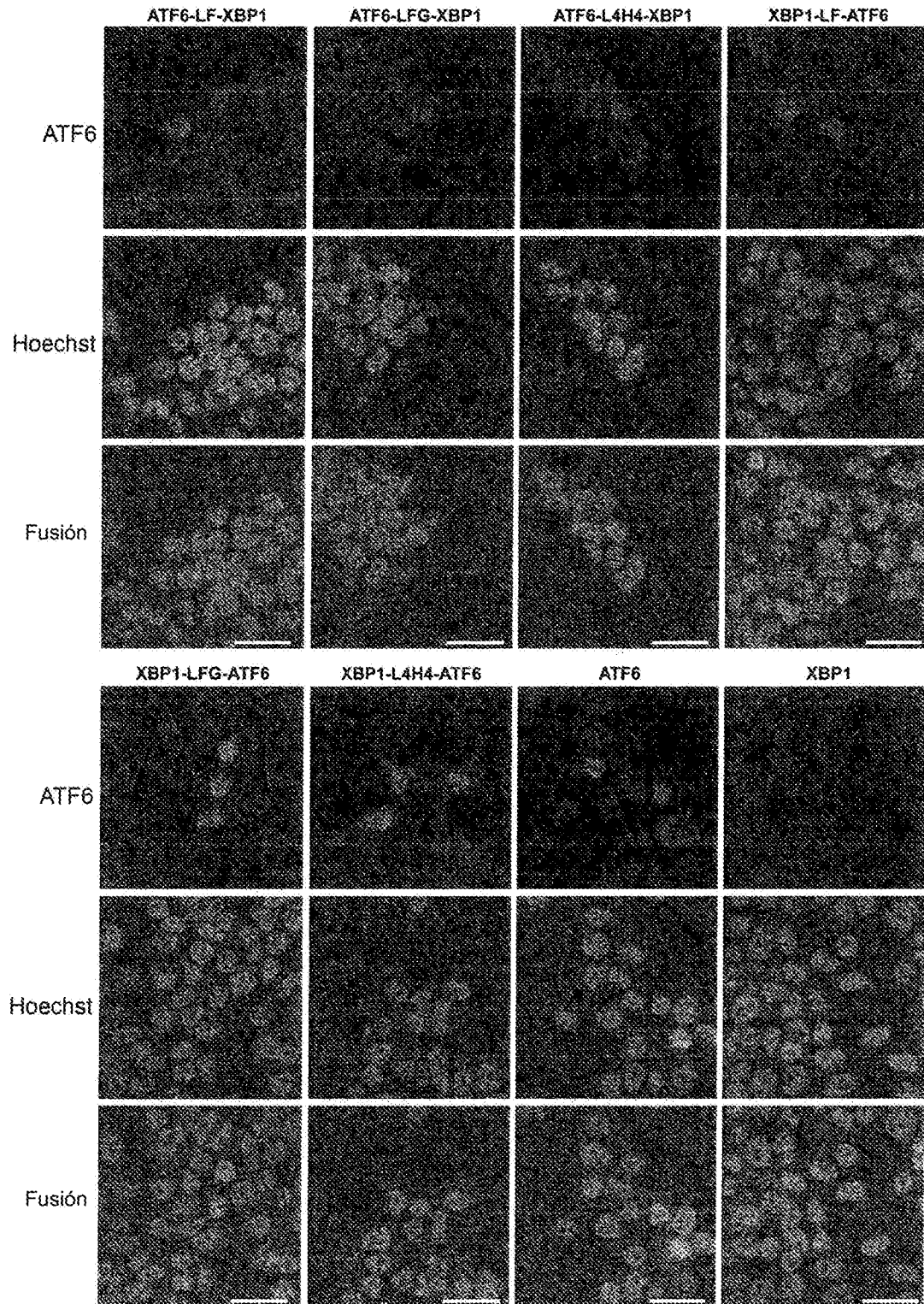
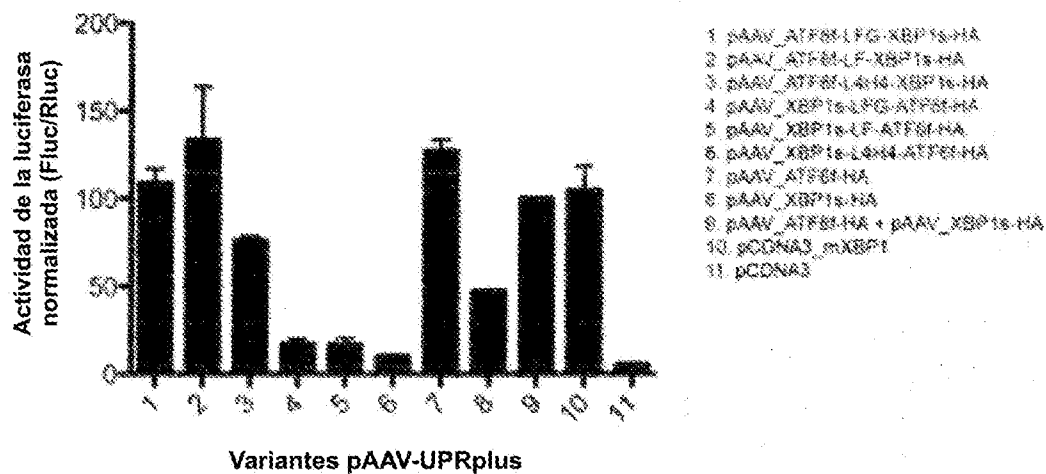


Figura 14/17



Plásmido	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Promedio	SEM
pAAV_ATF6L-LFG-XBP1s-HA	101.1517	99.87783	125.4241	108.73321	8.357701897
pAAV_ATF6L-LF-XBP1s-HA	88.52831	118.747	101.8752	139.8837032	20.62728224
pAAV_ATF6L-L4H4-XBP1s-HA	79.35353	77.77862	71.44303	98.17174	2.410717611
pAAV_XBP1s-LFG-ATF6L-HA	17.61719	12.53527	21.4305	17.26188587	2.965622301
pAAV_XBP1s-LF-ATF6L-HA	15.52832	11.9496	22.48204	16.88928607	3.528142303
pAAV_XBP1s-L4H4-ATF6L-HA	6.228268	11.24907	10.1266	16.24621367	0.553283501
pAAV_ATF6L-HA	130.788	120.7534	139.6209	137.5207667	3.178121671
pAAV_XBP1s-HA	47.8734	47.05723	40.00553	47.47737	0.408447887
pAAV_ATF6L-HA + pAAV_XBP1s-HA	100	100	100	100	0
pCDNA3_mXBP1	77.28919	120.1875	110.2253	164.8387787	13.73530346
pCDNA3	4.8743701	6.953101	4.288801	5.346415887	0.826282782

Figura 15/17

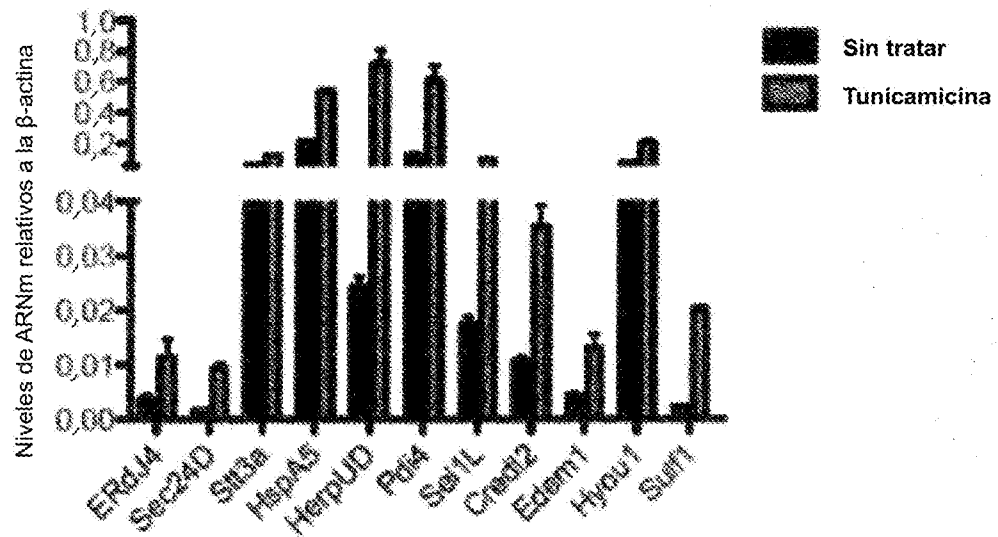


Figura 16/17

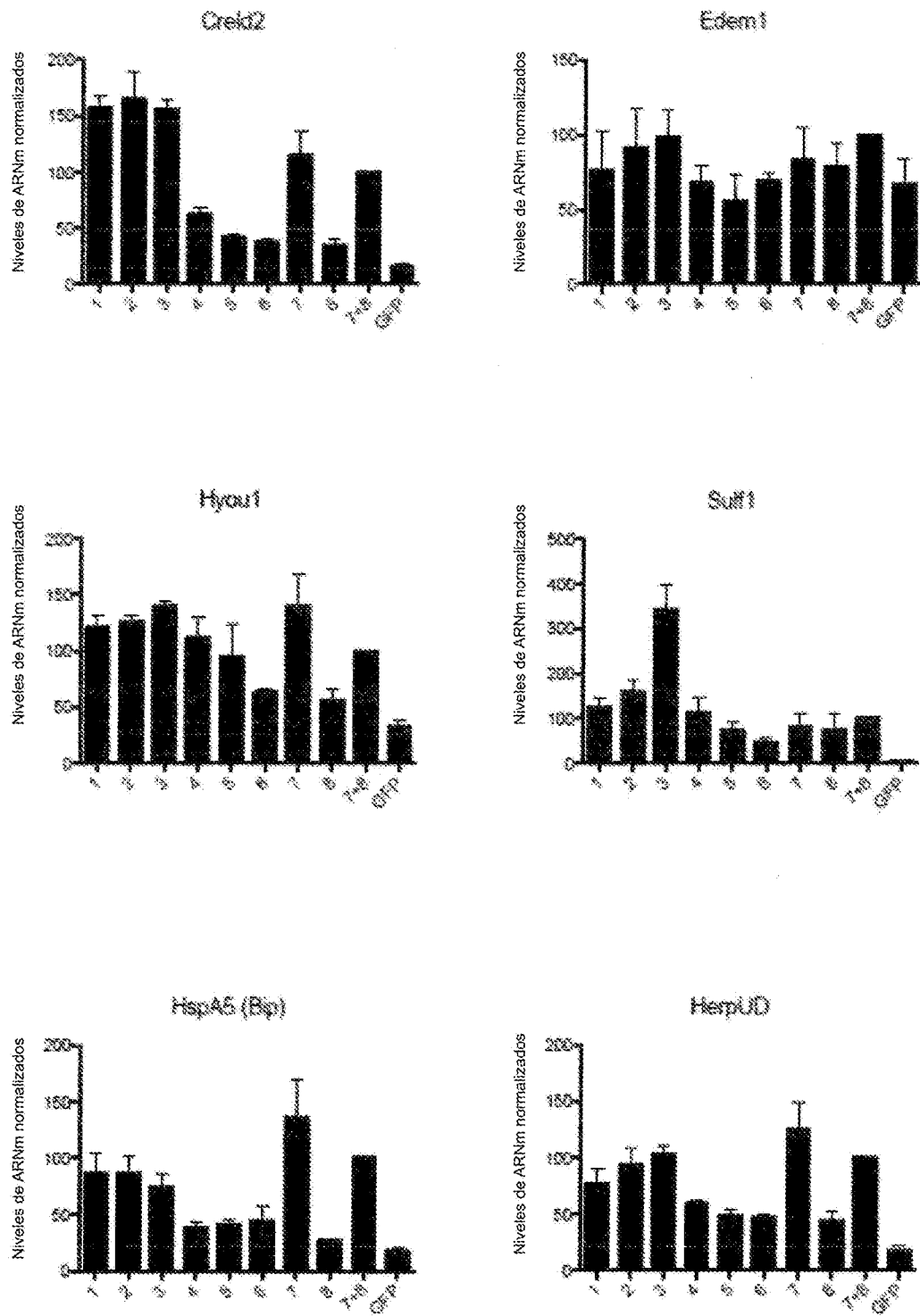


Figura 17/17

