

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 996 307**

51 Int. Cl.:

C12N 15/861 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C12N 15/34 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 7/01 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.07.2016** **PCT/CA2016/050811**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.01.2017** **WO17008154**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.07.2016** **E 16823589 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2024** **EP 3320100**

54 Título: **Sistema vector de adenovirus aviar 9 (fadv-9) y métodos asociados**

30 Prioridad:

10.07.2015 US 201562190913 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.02.2025

73 Titular/es:

UNIVERSITY OF GUELPH (100.00%)
50 Stone Road East
Guelph, Ontario N1G 2W1, CA

72 Inventor/es:

PEI, YANLONG;
ACKFORD, JAMES;
CORREDOR, JUAN CARLOS;
KRELL, PETER J. y
NAGY, ÉVA

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 996 307 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

Sistema vector de adenovirus aviar 9 (fadv-9) y métodos asociados

Solicitud relacionada

5 Esta solicitud reclama el beneficio de prioridad de la solicitud de patente provisional de EE. UU. No. 62/190,913, presentada el 10 de julio de 2015.

Campo de la invención

La presente invención se refiere al adenovirus aviar 9 (FAdV-9) y, más particularmente, a un sistema vector de FAdV-9 de suministro doble y métodos asociados, así como también al uso del mismo para la prevención de enfermedad.

10 Antecedentes de la invención

Los adenovirus aviares (FAdV) son patógenos aviares ubicuos y son miembros de la familia *Adenoviridae*.

Los adenovirus (AdV) del género *Mastadenovirus* han sido examinados como agentes anticancerosos (Huebner et al. (1956), Cody y Douglas (2009), Yamamoto y Curiel (2010)) y vectores de vacuna (Lasaro y Ertl (2009)).

15 El problema de la inmunidad preexistente contra HAdV-5, ejemplificado en el ensayo STEP de VIH que utilizó HAdV-5 recombinante (Buchbinder et al. (2008), McElrath et al. (2008)), ha generado interés en el desarrollo de serotipos de AdV menos comunes y AdV no humanos como vectores oncolíticos ((Cody y Douglas (2009), Gallo et al. (2005), Shashkova et al. (2005)), y como vectores de vacuna (Barouch (2008), Lasaro y Ertl, (2009), Sharma et al. (2009)). Se han desarrollado adenovirus aviares (FAdV) del género *Aviadenovirus*, que incluyen
20 las especies FAdV-A a FAdV-E (Adair, B. y Fitzgerald, S. (2008), Benkő et al. (2005)), como vectores de vacuna. La primera generación de vectores de vacuna basados en FAdV ha resultado eficaz para provocar una respuesta de anticuerpo contra un transgen suministrado (Corredor y Nagy (2010b), Ojkic y Nagy (2003)), y en pollos ha conferido inmunidad protectora contra el virus de la enfermedad infecciosa bursal (IBDV) (Francois et al. (2004), Sheppard et al. (1998)) y el virus de la bronquitis infecciosa (Johnson et al. (2003)). El análisis de los
25 genomas completos de FAdV-1, el virus huérfano mortal del embrión de pollo (CELO) (Chiocci et al. (1996)), y FAdV-9 (Ojkic y Nagy (2000)) (especies FAdV-A y FAdV-D, respectivamente), y las regiones genómicas terminales de FAdV-2, -4, -10 y -8 (Corredor et al. (2006), Corredor et al. (2008)) han mostrado que los FAdV comparten una organización genómica común.

30 Los vectores de vacuna basados en adenovirus han resultado herramientas prometedoras para el control de patógenos (Bangari y Mittal (2006), Ferreira et al. (2005)). La primera generación de vectores de vacuna basados en adenovirus aviar (FAdV) se han usado eficientemente para inducir una respuesta de anticuerpo contra un gen ajeno (transgen) insertado (Corredor, y Nagy (2010a), Ojkic y Nagy (2003)), y en pollos han conferido inmunidad protectora contra el virus de la enfermedad infecciosa bursal (Francois et al. (2004), Sheppard et al. (1998)) y el virus de la bronquitis infecciosa (Johnson et al. (2003)). El documento US 6,296,852 se relaciona con un vector recombinante que comprende un adenovirus aviar recombinante que incorpora al
35 menos una secuencia de nucleótidos heteróloga, a un método de producción de vectores recombinantes, a métodos de preparación de vacunas basadas en los vectores, a estrategias de administración y a métodos para proteger aves de enfermedades. El documento US 6,841,158 se relaciona con un adenovirus aviar recombinante CELO con una supresión en el extremo derecho del genoma viral que permite la inserción de porciones grandes de ADN exógeno.
40

Los vectores adenovirales del estado actual de la técnica, especialmente adenovirus aviares, han sido obstaculizados por el límite del tamaño del inserto de ADN ajeno en el ADN vector. Consecuentemente, no es posible clonar en insertos de ADN particularmente grandes que representan partes importantes de proteínas inmunogénicas en un virus de replicación independiente. Tampoco es posible clonar en más de un gen. El valor
45 de tener un vector capaz de expresar antígenos dobles o incluso multivalentes es que sólo se requeriría una vacuna para proteger contra dos o más enfermedades. Esto no es posible con los vectores adenovirales actuales del estado de la técnica debido a la falta de espacio de carga útil.

Por lo tanto, persiste la necesidad de vectores adenovirales novedosos y en particular de vectores adenovirales novedosos de suministro doble y usos de los mismos.

50 Breve descripción de la invención

Los inventores han desarrollado vectores adenovirales novedosos basados en adenovirus aviar 9 (FAdV-9) recombinante. Los vectores son particularmente útiles para el suministro o expresión de secuencias exógenas y como vectores adenovirales de suministro doble. Insertadas en el vector novedoso pueden estar una o más secuencias de nucleótidos exógenas. Opcionalmente, las secuencias de nucleótidos exógenas codifican uno o

más sitios antigénicos de una enfermedad de interés.

Por consiguiente, en un primer aspecto se provee un vector viral de adenovirus aviar 9 (FAdV-9) recombinante como se define en las reivindicaciones 1 a 10. En una modalidad, el vector viral FAdV-9 recombinante es un vector viral de suministro doble.

- 5 El vector viral FAdV-9 puede tener una supresión en el extremo izquierdo del genoma. En una modalidad, la supresión en el extremo izquierdo del genoma comprende una supresión de uno o más de ORF0, ORF1 y ORF2. El vector viral FAdV-9 tiene una supresión en el extremo derecho del genoma en donde la supresión en el extremo derecho del genoma comprende al menos una supresión seleccionada de ORF19 y ORF17. En una modalidad, el vector viral FAdV-9 tiene supresiones tanto en el extremo izquierdo como en el extremo derecho del genoma. En una modalidad, el vector viral FAdV-9 tiene además una supresión de ORF0, ORF1, ORF2, TR2, y ORF11. En una modalidad, el vector viral FAdV-9 tiene una supresión de ORF1, ORF2, TR2, ORF17 y ORF11. En otra modalidad, el vector viral FAdV-9 tiene una supresión ORF1, ORF2, y ORF19. En otra modalidad adicional, el vector viral FAdV9 tiene una supresión de ORF1, ORF2, y ORF19, TR2 u ORF11.

- 15 En una modalidad, el vector viral FAdV-9 tiene una supresión en el extremo izquierdo del genoma de aproximadamente 2291 pares de bases, opcionalmente entre aproximadamente 1900 y 2500 pares de bases. En una modalidad, el vector viral FAdV-9 tiene una supresión en el extremo derecho del genoma de aproximadamente 3591 pares de bases. En una modalidad, el vector viral FAdV-9 tiene una supresión en el extremo derecho del genoma de entre aproximadamente 3000 pares de bases y 4000 pares de bases.

- 20 En una modalidad, el vector viral comprende una secuencia de nucleótidos con por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98% o por lo menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia que tiene las dos supresiones mostradas en la Figura 10A. En una modalidad, el vector viral comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1, con una o más supresiones, opcionalmente una o más supresiones mostradas en la Figura 10A.

- 25 En una modalidad, el vector viral tiene una capacidad de inserción de más de 4000 bp, más de 5000 bp, más de 6000 bp u opcionalmente más de 7000 bp.

En una modalidad, el vector viral comprende por lo menos una de las siguientes:

- (a) una secuencia de nucleótidos con identidad de secuencia con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, en donde los nucleótidos 38,807 a 42,398 han sido suprimidos,
- 30 (b) una secuencia de nucleótidos con identidad de secuencia con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, en donde los nucleótidos 34,220 a 36,443 han sido suprimidos, y
- (c) una secuencia de nucleótidos con al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con las secuencias de nucleótidos descritas en (a) o (b).

- Por ejemplo, en una modalidad, el vector viral comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una secuencia de nucleótidos con identidad de secuencia con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, en donde una parte o todos los nucleótidos 38,807 a 42,398 han sido suprimidos. En una modalidad, el vector viral comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia de nucleótidos con una identidad de secuencia con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, en donde una parte o todos los nucleótidos 575 a 2753 y 38,807 a 42,398 han sido suprimidos. En una modalidad, el vector viral comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia de nucleótidos con identidad de secuencia con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, en donde una parte o todos los nucleótidos 847 a 2753 y 38,807 a 42,398 han sido suprimidos. En otra modalidad, el vector viral comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia de nucleótidos con identidad de secuencia con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, en donde una parte o todos los nucleótidos 847 a 2753 y 34,220 a 36,443 han sido suprimidos. En otra modalidad, el vector viral comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia de nucleótidos con identidad de secuencia con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, en donde una parte o todos los nucleótidos 847 a 2753, 34,220 a 36,443 y 38,807 a 40,561 o 41,461 a 42398 han sido suprimidos.

- En una modalidad el vector viral tiene insertada una o más secuencias de nucleótidos exógenas. En una modalidad, el vector viral comprende una o más secuencias de nucleótidos exógenas que codifican uno o más polipéptidos de interés, opcionalmente uno o más polipéptidos antigénicos o terapéuticos. En un aspecto, el vector viral es un vector de suministro doble capaz de expresar dos o más secuencias de nucleótidos exógenas. En una modalidad, el vector viral comprende secuencias de nucleótidos exógenas que codifican uno o más sitios antigénicos de una enfermedad de interés. En una modalidad, el vector viral comprende una secuencia que corresponde a por lo menos un gen indicado en el Cuadro 1 o un homólogo del mismo.

- En un segundo aspecto, la presente invención provee células hospedadoras transformadas con uno o más vectores virales que se describen en la presente.

Un tercer aspecto de la invención es un método para producir un vector viral como se define en las reivindicaciones, en donde el método comprende las etapas de: (a) proporcionar el vector viral FAdV-9 del primer aspecto; (b) amplificar opcionalmente la secuencia de nucleótidos exógena; (c) insertar la secuencia de nucleótidos exógena en el vector viral; y (d) introducir el clon infeccioso así producido en una línea celular adecuada. La secuencia de nucleótidos exógena puede ser una secuencia como la que se define en la reivindicación 13.

En una modalidad, el vector viral FAdV-9 comprende una o más secuencias de control recombinantes, tales como uno o más promotores. Opcionalmente, el vector viral comprende uno o más sitios de clonación para facilitar la inserción recombinante de secuencias de nucleótidos exógenas en el vector viral.

En un cuarto aspecto, se provee una composición inmunogénica que comprende un vector viral FAdV-9 que se describe en la presente, que tiene insertada en el mismo una secuencia de nucleótidos exógena que codifica por lo menos un sitio antigénico de una enfermedad de interés. En una modalidad, la composición inmunogénica también comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una modalidad, la composición inmunogénica también comprende un adyuvante. En una modalidad, la composición inmunogénica es una vacuna.

En un quinto aspecto se provee una composición inmunogénica del cuarto aspecto para usarse en un método para generar una respuesta inmunogénica en un sujeto. En una modalidad, el método comprende administrarle al sujeto un vector viral o composición inmunogénica descrita en la presente. En una modalidad, los métodos y usos descritos en la presente son para generar una respuesta inmunogénica contra un antígeno de enfermedad, opcionalmente una o más enfermedades indicadas en el Cuadro 1. En una modalidad, los métodos y usos descritos en la presente son para la prevención de enfermedad o vacunación de un sujeto contra una o más enfermedades.

Otras características y ventajas de la presente invención se harán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Sin embargo, se debe entender que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican modalidades preferidas de la invención, únicamente se dan a manera de ilustración puesto que varios cambios y modificaciones dentro del alcance de la invención se harán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción detallada.

Breve descripción de las figuras

Las características novedosas de la presente invención se establecen en las reivindicaciones anexas. Sin embargo, la propia invención junto con otros objetos y ventajas de la misma se entenderán mejor en la siguiente descripción detallada de una modalidad específica, al leerse junto con las figuras anexas, en las cuales:

La Figura 1 muestra un sistema vector de FAdV-9 (FAdmid). El FAdmid tiene las siguientes características: cepa no patógena de FAdV-9, regiones prescindibles en el extremo izquierdo y derecho, FAdV recombinantes crecen como FAdV-9 de tipo silvestre, liberación de virus disminuida y respuesta de anticuerpo al esqueleto viral y EGFP (gen reportero) es expresado usando este esqueleto cuando se usa el promotor exógeno (ajeno) (CMV) (Corredor, J. C. & Nagy, E. (2010b)).

La Figura 2 muestra la secuencia del extremo izquierdo de FAdV-9. Función de ORF1 y 1C: Modula la respuesta inmunitaria innata y adaptativa; función de ORF0, 1A, 1B y 2: desconocida. Cuando el ORF0 es suprimido, el promotor temprano nativo no funciona –no hay expresión de gen ajeno (por ejemplo, m-Cherry). Cuando sólo son suprimidos ORF 1 y 2, el promotor nativo funciona.

Las Figuras 3 muestra la supresión de los ORF 0, 1 y 2. (A) Diagrama de flujo de la generación de pFAdV9-Δ0-1-2-RED: Los ORF0, ORF1, 1A, 1B, 1C y 2 fueron reemplazados con el casete CAT flanqueado en ambos lados con sitios Swal para generar pFAdV9-Δ0-1-2CAT por recombinación homóloga. El casete CAT fue removido por digestión con Swal, seguido por religación para generar pFAdV9-Δ0-1-2Swal no marcado. La secuencia codificante de mCherry fue clonada entonces en el sitio Swal para generar pFAdV9-Δ0-1-2RED; MLP, promotor tardío mayor; ITR, repetición terminal invertida. (B) y (D) Digestiones con NotI y amplificación de ADN por PCR para verificar los FAdmid y los virus correspondientes. Carriles Δ0-2: pFAdV9-Δ0-1-2RED o virus de pase 3; carriles wt: pFAdV9-wt o virus; M: escalera de ADN 1kb. Digestión de ADN de pFAdV9-wt con NotI: los tamaños de fragmento son 26kb, 11.4 kb, 6kb, 4kb y 1.4 kb; digestión del carril Δ0-2 con NotI: los tamaños de fragmento son 26kb; 11.4kb, 5.9k y 4kb; carril Δ0-2: producto de PCR de 1619 bp y wt: producto de PCR de 3107 bp. (C) Efecto citopático (CPE) y expresión de mCherry por RecFAdV.

La Figura 4 muestra la supresión de los ORF 1 y 2. (A) Diagrama de flujo de la generación de pFAdV9-Δ1-2-RED: los ORF1, 1A, 1B, 1C y 2 fueron reemplazados con el casete CAT flanqueado en ambos lados con sitios Swal para generar pFAdV9-Δ1-2CAT por recombinación homóloga. El casete CAT fue removido por digestión con Swal, seguido por religación para generar pFAdV9-Δ1-2Swal no marcado. La secuencia codificante de mCherry fue clonada entonces en el sitio Swal para generar pFAdV9-Δ1-2RED; MLP, promotor tardío mayor; ITR, repetición terminal invertida. (B) y (D) Digestiones con NotI y amplificación de ADN por PCR para verificar los FAdmid y los virus correspondientes. Carriles Δ1-2: pFAdV9-Δ1-2RED o virus de pase 3; carriles wt:

pFAdV9-wt o virus; M: escalera de ADN 1kb. Digestión de ADN de pFAdV9-wt con NotI: los tamaños de fragmento son 26kb, 11.4 kb, 6kb, 4kb y 1.4 kb; digestión del carril Δ1-2 con NotI: los tamaños de fragmento son 26kb; 11.4kb, 6.2k y 4kb; carril Δ1-2 producto de PCR de 1912 bp, y wt: producto de PCR de 3107 bp; (C) Expresión de mCherry por RecFAdV.

- 5 La Figura 5 muestra la secuencia del extremo derecho de FAdV-9. La función de TR-2, ORF17 y ORF11 es desconocida; TR-2: la región de repetición más larga está compuesta de 13 repeticiones contiguas de 135 bp de longitud; ORF17 y 11 son, probablemente, glicoproteínas de membrana.

- La Figura 6 muestra la supresión del ORF17. (A) Diagrama de flujo de la generación de pFAdV9-Δ17. El ORF17 fue reemplazado con el casete CAT flanqueado en ambos lados con sitios Swal por recombinación homóloga para generar pFAdV9-Δ17. (B) y (C) Digestiones con NotI y amplificación de ADN por PCR para verificar los FAdimd y los virus correspondientes. Carriles Δ17: pFAdV9-Δ17 o virus de pase 3; carriles wt: pFAdV9-wt o virus; M: escalera de ADN 1kb. Digestión de ADN de pFAdV9-wt con NotI: los tamaños de fragmento son 26kb, 11.4 kb, 6kb, 4kb y 1.4 kb; digestión del carril Δ17 con NotI: los tamaños de fragmento son 26,381 bp; 11,485 bp, 6056 bp, 4078 bp y 1391 bp; carril Δ17: producto de PCR de 2822 bp, y wt: PCR sin producto.
- 10

- 15 La Figura 7 muestra la supresión de TR2, ORF 17 y 11. (A) diagrama de flujo de la generación de pFAdV9-ΔTR2-17-11EGFP: TR2, ORF17, ORF11 fueron reemplazados con el casete CAT flanqueado en ambos lados con sitios Swal para generar pFAdV9-ΔTR2-17-11CAT por recombinación homóloga. El casete CAT fue removido por digestión con Swal, seguido por religación para generar pFAdV9-ΔTR2-17-11Swal no marcado. Después, el casete EGFP se clonó en el sitio Swal para generar pFAdV9-ΔTR2-17-11EGFP; MLP, promotor tardío mayor; ITR, repetición terminal invertida; casete EGFP, CMV-EGFP. (B) y (D) Digestiones con NotI y amplificación de ADN por PCR para verificar los FAdimd y los virus correspondientes. Carriles ΔTR2: pFAdV9-ΔTR2-17-11EGFP o virus de pase 3; carriles wt: pFAdV9-wt o virus; M: escalera de ADN 1kb. Digestión de ADN de pFAdV9-wt con NotI: los tamaños de fragmento son 26kb, 11.4 kb, 6kb, 4kb y 1.4 kb; digestión del carril ΔTR2 con NotI: los tamaños de fragmento son 21kb; 11.4kb, 6kb, 4kb, 3kb y 1.4kb; carril ΔTR2: producto de PCR de 3014 bp, y wt: producto de PCR de 4966 bp; (C) Expresión de mCherry por RecFAdV.
- 20
- 25

- La Figura 8 muestra que el vector viral recombinante FAdV-9 es un vector de suministro doble capaz de expresar secuencias de nucleótidos exógenas en el extremo izquierdo y el extremo derecho. (A) Diagrama de flujo de la generación de pFAdV9-Δ1-2RED/TR2-17-11EGFP. TR2, ORF17 y ORF11 de pFAdV9-Δ1-2RED fueron reemplazados con el casete CAT flanqueado en ambos lados con sitios Swal para generar pFAdV9-Δ1-2REDΔTR2-17-11CAT por recombinación homóloga. El casete CAT fue reemplazado por el casete EGFP por digestión con Swal, seguido por ligación para generar pFAdV9-Δ1-2RED/TR2-17-11EGFP. MLP, promotor tardío mayor; ITR, repetición terminal invertida; casete EGFP, CMV-EGFP; (B) y (D) Digestiones con NotI y amplificación de ADN por PCR para verificar los FAdimd y los virus correspondientes. Carriles ΔDual: pFAdV9-Δ1-2RED/TR2-17-11EGFP o virus de pase 3. Carril M: escalera de ADN 1kb. Carriles wt: pFAdV9-wt o virus. Digestión de ADN de pFAdV9-wt con NotI: los tamaños de fragmento son 26kb; 11.4kb, 6kb, 4kb y 1.4Kb. Carriles Δdual, digestión con NotI: los tamaños de fragmento son 21kb, 11.4kb, 6.2kb 4kb y 3kb; Carril ΔDual izquierdo: producto de PCR de 1912 bp y wt: producto de PCR de 3017 bp; carril ΔDual derecho: producto de PCR de 3014 bp y wt: producto de PCR de 4966 bp.
- 30
- 35

La Figura 9 muestra virus recombinantes basados en FAdV-9 con genes reporteros.

- 40 La Figura 10(A) muestra la secuencia de nucleótidos de una modalidad de un vector viral FAdV-9 recombinante descrito en la presente en donde ORF1, ORF2, TR2, ORF17 y ORF11 han sido suprimidos; (B) secuencias de nucleótidos de genes insertados en virus recombinantes: proteína fluorescente verde potenciada (EGFP, SEQ ID NO: 2) y mCherry Red (SEQ ID NO: 3); (C) secuencias de nucleótidos de promotores insertados en genes recombinantes: promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano (CMV; SEQ ID NO: 4), potenciador de CMV/promotor de β-actina de pollo (CAG, SEQ ID NO: 5), promotor del factor de alargamiento 1 alfa humano (EF1α, SEQ ID NO: 6), promotor de L2R (SEQ ID NO: 7) y promotor de β-actina (SEQ ID NO: 8); y (D) secuencia de nucleótidos del potenciador/regulador usado en los virus recombinantes: elemento regulador postranscripción del virus de la hepatitis de marmota (WPER, SEQ ID NO: 9).
- 45

- 50 La Figura 11 muestra una representación esquemática de pCI-Neo. El plásmido pCI-Neo (Promega) fue elegido para crear construcciones de expresión doble debido a sus sitios únicos de enzima de restricción en y antes del sitio de clonación múltiple, y también el gen de resistencia de neomicina.

- La Figura 12 muestra la generación de virus FAdV-9Δ4 recombinantes. (A) El casete de expresión de EGFP se amplificó por PCR a partir de una construcción pHMR intermedia, o se extrajo de un gel después de doble digestión con BamHI y BglII. (B) El pFAdV-9Δ4 se linealizó y digirió con Swal. (C) Tanto el casete de EGFP como el pFAdV-9Δ4 linealizado se transformaron conjuntamente en células *E. coli* BJ5183 para experimentar recombinación homóloga. (D) El plásmido resultante se transformó en células *E. coli* DH5α, se propagó, se cribó por digestión con NotI y finalmente se linealizó con PacI para liberar el genoma viral del plásmido. El ADN viral recombinante lineal se usó para transfectar células CH-SAH. (E) El virus recombinante se recogió en el sobrenadante. Este procedimiento se efectuó para cada casete de expresión de EGFP, dando como resultado
- 55

los virus: FAdV-9Δ4-CMV-EGFP, FAdV-9Δ4-CMV-EGFP-WPRE, FAdV-9Δ4-CAG-EGFP, FAdV-9Δ4-CAG-EGFP-WPRE, FAdV-9Δ4-EF1α-EGFP y FAdV-9Δ4-EF1α-EGFP-WPRE.

La Figura 13A muestra una representación esquemática de los plásmidos de expresión doble de EGFP/luciferasa. (A) El EGFP se amplificó por PCR a partir de pEGFP-N1 y se clonó en el sitio de clonación múltiple de pCI-Neo. El gen de resistencia de neomicina (NeoR) de pCI-Neo se removió por digestión con enzima de restricción. La luciferasa de luciérnaga se amplificó por PCR a partir de pGL-4.17 y se clonó bajo el promotor SV40, dando como resultado un plásmido de expresión doble. (B) El plásmido pCMV-EGFP-Luc se digirió con SpeI y EcoRI para clonarlo en los promotores de interés, dando como resultado cinco vectores que controlan EGFP bajo diferentes promotores y luciferasa bajo el promotor SV40: pCMV-EGFP-Luc, pCAG-EGFP-Luc, pEF1α-EGFP-Luc, pβ-actin-EGFP-Luc y pL2R-EGFP-Luc. Se hicieron cinco plásmidos adicionales clonando no direccionalmente el elemento regulador postranscripción del virus de la hepatitis de marmota (WPRE) en cada plásmido de expresión doble en el sitio NotI, dando como resultado las construcciones: pCMV-EGFP-WPRE-Luc, pCAG-EGFP-WPRE-Luc, pEF1α-EGFP-WPRE-Luc, pβ-actin-EGFP-WPRE-Luc y pL2R-EGFP-WPRE-Luc.

La Figura 14 muestra una comparación de la expresión de EGFP con microscopía de fluorescencia. Las células CH-SAH se sembraron en placas de 35 mm (1.8×10^6 células/placa) y se transfectaron con 2 μg de ADN plasmídico. La fluorescencia de EGFP se midió por microscopía 12, 24, 36, 48, 60 y 72 horas después de la transfección. Se usó una transfección en falso como control negativo mientras que pEGFP-N1 fue el control positivo.

La Figura 15 muestra la expresión normalizada de EGFP con el tiempo. Células CH-SAH se sembraron en placas de 35 mm (1.8×10^6 células/placa) y se transfectaron con 2 μg de ADN plasmídico. En cada punto de tiempo, las células transfectadas se lavaron, se tripsinizaron y se resuspendieron en PBS. Después de tres ciclos de congelación-descongelación, las muestras se centrifugaron y la concentración de proteína del sobrenadante recogido se midió usando una nanogota. La fluorescencia de EGFP se midió en un lector de microplaca a 480 y 528 nm de longitudes de onda de excitación y emisión, respectivamente. La luminiscencia de luciferasa se midió usando un kit Pierce Firefly Luciferase Glow Assay (Thermo). La expresión doble (fluorescencia/luminiscencia) de cada construcción se normalizó con respecto al grado de expresión de pCMV-EGFP-Luc (normalizado a 1.0) en cada punto de tiempo. La prueba *t* se usó para determinar la significancia de la expresión en comparación con pCMV-EGFP-Luc, indicada por asteriscos (*), en donde $P < 0.05$.

La Figura 16 muestra una representación esquemática de construcciones intermedias usadas para generar recFAdV. (A) ADN de FAdV-9 que flanquea el sitio de supresión Δ4 (VF1 y VF2) se amplificó por PCR y se clonó direccionalmente en el plásmido de expresión doble pCMV-EGFP-Luc. La construcción resultante, pHMR-CMV-EGFP, se usó secuencia abajo para generar el virus recombinante FAdV-9Δ4-CMV-EGFP. (B) Se generaron cinco construcciones intermedias adicionales, dando como resultado los plásmidos: pHMR-CAG-EGFP, pHMR-EF1α-EGFP, pHMR-CMV-EGFP-WPRE, pHMR-CAG-EGFP-WPRE y pHMR-EF1α-EGFP-WPRE.

La Figura 17 muestra el cribado por electroforesis en gel de agarosa de FAdmid digeridos por NotI. Los FAdmid derivados de recombinación homóloga entre los plásmidos pFAdV-9Δ4 y pHMR se digirieron con NotI y los patrones de las bandas resultantes se cribaron sobre gel de agarosa. El pFAdV-9Δ4 digerido tuvo un patrón de bandas esperado de 4 kb, 5.1 kb, 13.7 kb y 23.8 kb. Los FAdmid recombinantes con un casete de expresión de EGFP contienen un sitio NotI adicional para cribado. Las bandas diagnósticas que corresponden a cada casete son como sigue: CMV-EGFP = 2.2 kb, CMV-EGFP-WPRE = 2.2 kb y 0.55 kb, CAG-EGFP = 2.9 kb, CAG-EGFP-WPRE = 0.55 kb, EF1α-EGFP = 2.7 kb y EF1α-EGFP-WPRE = 2.7 kb y 0.55 kb. Las flechas blancas apuntan a las bandas diagnósticas.

La Figura 18 muestra curvas de crecimiento viral. Curvas de crecimiento de un paso para cada adenovirus aviar recombinante se determinaron en células CH-SAH. Las células se sembraron en placas de 35 mm (1.8×10^6 células/placa) y se infectaron a una MOI de 5. Se recolectó virus tanto intracelular como extracelular entre 0 y 72 h.p.i. Se repitieron curvas de crecimiento de un paso por duplicado para cada muestra y todos los virus extracelulares se titularon por medio de ensayo en placa.

La Figura 19 muestra que el efecto citopático de FAdV recombinante coincide con el de FAdV-9Δ4. Células CH-SAH se sembraron en placas de 35 mm (1.8×10^6 células/placa) y se infectaron a una MOI de 5. El efecto citopático de virus recombinantes se comparó con el control FAdV-9Δ4 "de tipo silvestre". Se observó que todos los virus recombinantes (datos no mostrados) tienen CPE similar a FAdV-9Δ4, evidenciado por redondeo y separación de células usando un microscopio de campo brillante. Sin embargo, se observó fluorescencia de EGFP por recFAdV, por ejemplo FAdV-9Δ4-CAG-EGFP-WPRE, usando microscopía de fluorescencia.

La Figura 20 muestra el curso del tiempo en la expresión de EGFP en células CH-SAH. Las células CH-SAH se sembraron en placas de 35 mm (1.8×10^6 células/placa) y se infectaron con recFAdV-9 a una MOI de 5. En cada punto de tiempo, las células infectadas se recolectaron, se lavaron y se resuspendieron en PBS. Después de tres ciclos de congelación-descongelación, las muestras se centrifugaron y la concentración de proteína del

sobrenadante recolectado se midió con una nanogota. La fluorescencia absoluta de EGFP de 50 µg del lisado celular completo se midió con una lectora de microplaca a longitudes de onda de excitación y emisión de 480 y 528 nm, respectivamente. Las células no infectadas (falso) o infectadas con FAdV-9Δ4 no mostraron ninguna fluorescencia de EGFP.

- 5 La Figura 21 muestra una inmunotransferencia Western de la producción de EGFP con el tiempo. La expresión de EGFP por recFAdV-9 en células CH-SAH se comparó por 48 h.p.i., junto con células CH-SAH transfectadas con FAdV-9Δ4 (control negativo), no infectadas falsas (control negativo) y transfectadas con pEGFP-N1 (control positivo). Las células CH-SAH se sembraron en placas de 35 mm (1.8×10^6 células/placa) y se infectaron con recFAdV-9 a una MOI de 5. En cada punto de tiempo, los lisados celulares completos se recolectaron y las
- 10 concentraciones de proteína se determinaron por medio de un ensayo Bradford. Se cargaron 6 µg de cada muestra en dos geles, uno para ser sondeado con anticuerpo anti-EGFP (1: 1,000), seguido por un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con HRP (1: 5,000), el otro gel para ser sondeado con anticuerpo anti-actina (1: 200), seguido por un anticuerpo secundario anti-cabra conjugado con HRP (1: 20,000). Todas las bandas aparecieron al tamaño esperado (EGFP = 27 kDa y actina = 42 kDa) determinado a partir de un marcador de
- 15 peso molecular (no mostrado).

La Figura 22 muestra FAdV-9 polivalente recombinante con H5, H7 y HN.

Descripción detallada de la invención

Los inventores han determinado que el FAdV-9 recombinante con una supresión en el lado derecho del genoma, es decir, con una supresión seleccionada de ORF19 y ORF17, es útil como vector viral.

- 20 En una modalidad de la invención, el vector viral recombinante FAdV-9 tiene además una supresión en el extremo izquierdo del genoma. En una modalidad, la supresión en el extremo izquierdo del genoma comprende una supresión de uno o más de ORF0, ORF1 y ORF2. En una modalidad, la supresión en el extremo derecho del genoma comprende una supresión de ORF19, TR2, ORF17 y ORF11.

- 25 En una modalidad adicional, el vector viral recombinante FAdV-9 tiene supresiones tanto en el extremo izquierdo como en el extremo derecho del genoma. En una modalidad, el vector viral FAdV-9 tiene una supresión de ORF0, ORF1, ORF2, TR2, ORF17 y ORF11. En una modalidad, el vector viral recombinante FAdV-9 tiene una supresión de ORF1, ORF2, TR2, ORF17 y ORF11.

En una modalidad, el vector viral FAdV-9 tiene una supresión de ORF1, ORF2 y ORF 19. En una modalidad, el vector viral recombinante FAdV9 tiene una supresión de ORF1, ORF2 y ORF19, TR2 u ORF11.

- 30 Como se muestra en los ejemplos, los vectores virales FAdV-9 recombinantes con supresiones en el lado izquierdo y lado derecho, que incluyen la supresión de TR2, son estables y se pueden usar para manejar la expresión de transgen.

- Los vectores virales FAdV descritos en la presente proveen varias ventajas. Por ejemplo, en algunas modalidades, los vectores virales FAdV permiten la producción de vacunas monovalentes y polivalentes. El
- 35 valor de tener un vector capaz de expresar antígenos dobles o incluso multivalentes es que se requeriría sólo una vacuna para proteger contra más enfermedades. En una modalidad, los vectores son capaces de incorporar segmentos grandes de ADN ajeno, opcionalmente hasta 7.7 kb de ADN ajeno. En una modalidad, los vectores son estables y seguros para usarse en animales tales como pollos. En una modalidad, los vectores virales son fáciles de producir y producen altos títulos virales. En una modalidad, hay una variedad de serotipos de FAdV. En una modalidad, los vectores virales no tienen inmunidad preexistente en humanos y se pueden
- 40 usar en terapia génica humana.

En una modalidad, los vectores virales FAdV-9 descritos en la presente pueden incluir una o más secuencias de nucleótidos exógenas (también referidas aquí como transgenes).

- 45 En una modalidad de la invención, la secuencia de nucleótidos exógena se selecciona de secuencias antigénicas contra la influenza, laringotraqueítis infecciosa, bronquitis infecciosa, infección de la bolsa de Fabricio (Gumboro), hepatitis, rinotraqueítis viral, coriza infecciosa, *Mycoplasma hyopneumoniae*, pasteurelosis, síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS), circovirus, bordetelosis, parainfluenza, o cualquier otro antígeno cuyo tamaño permita su inserción en el vector viral correspondiente.

- 50 En otra modalidad, la secuencia de nucleótidos exógena se selecciona de secuencias antigénicas contra la influenza aviar, laringotraqueítis (LT), enfermedad de Newcastle (NDV), anemia infecciosa, cuerpos de inclusión, bronquitis infecciosa (IB), Metapneumovirus (MPV) o Gumboro.

- En una modalidad preferida de la invención, la secuencia de nucleótidos exógena comprende, consiste o
- 55 consiste esencialmente en una secuencia que corresponde a por lo menos un gen indicado en el Cuadro 1 o un homólogo del mismo. Como se usa aquí, el término "homólogo" de un gen tiene la intención de denotar un gen con por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 98% o por lo menos 99% de identidad de secuencia

con el gen, y que tiene una actividad biológica de la misma naturaleza. En una modalidad, el vector descrito en la presente comprende 2, 3 o 4 secuencias que corresponden a los genes indicados en el Cuadro 1, o un homólogo del mismo. Opcionalmente, las secuencias exógenas se pueden insertar en el vector en un solo sitio de inserción o en múltiples sitios de inserción diferentes.

5 Cuadro 1

ENFERMEDAD	GEN	ACCESO GEN BANK
Influenza aviar	Hemaglutinina de la influenza aviar mexicana H5N2, cepa 435	FJ864690.1 (SEQ ID NO: 10)
	Hemaglutinina de la influenza aviar H7N3, Jalisco 2012	JX397993.1 (SEQ ID NO: 11)
	Hemaglutinina de la influenza aviar H7N3, Guanajuato 2015	KR821169 (SEQ ID NO: 12)
Laringotraqueitis (LT)	Glicoproteína B de laringotraqueitis, cepa USDA	EU104965.1 (SEQ ID NO: 13)
	Glicoproteína D de laringotraqueitis, cepa USDA	JN542534.1 :132317-133621 (SEQ ID NO: 14)
Newcastle (NDV)	Gen HN, cepa LaSota	KC844235.1 :6412-8145 (SEQ ID NO: 15)
	Gen HN, cepa del aislado del virus de la enfermedad de Newcastle Pollo/M08-3313/México/2008	KF910962.1 (SEQ ID NO: 16)
Anemia infecciosa	Gen VP1 de la cepa del aislado del virus de la anemia del pollo CAV-10	KJ872513.1 :832-2181 (SEQ ID NO: 17)
	Gen VP2 de la cepa del aislado del virus de la anemia del pollo CAV-10	AIV09094.1 (SEQ ID NO: 18)
Cuerpos de inclusión	Gen de fibra corta de adenovirus aviar 4	AY340863.1 (SEQ ID NO: 19)
Bronquitis infecciosa (IB)	Gen de glicoproteína de picos de la vacuna comercial D derivada del virus de bronquitis infecciosa cepa ArkDPI	EU359651.1 (SEQ ID NO: 20)
Metapneumovirus (MPV)	Gen F de metapneumovirus aviar, aislado IT/Ty/A/259-01/03	JF424833.1 :2943-45599 (SEQ ID NO: 21)
Gumboro	VP2 de Gumboro	

Los vectores virales FadV-9 descritos en la presente se pueden preparar usando técnicas recombinantes tales como amplificación de PCR de una secuencia de nucleótidos de interés, identificando los sitios antigénicos de un aislado del patógeno de origen, para ser insertado ulteriormente, amplificado en el vector viral. La inserción se puede hacer usando técnicas estándares de biología molecular, tales como enzimas de restricción y ligasas de ADN, entre otras. El clon infeccioso así producido se introduce en una línea celular adecuada para la producción del virus recombinante. Por ejemplo, en una modalidad, la metodología requerida para la construcción de los vectores virales FAdV-9 se describe en los presentes ejemplos y los procedimientos descritos para la construcción del clon infeccioso FAdV-9 (FAdmid) (Ojkic, D. & Nagy, E. (2001), "The long repeat region is dispensable for fowl adenovirus replication in vitro", *Virology* 283, 197-206). Este procedimiento utiliza recombinación homóloga entre el ADN genómico viral y el plásmido linealizado que contiene ambos extremos del genoma que flanquean un vector de esqueleto (pWE-Amp con sitios PacI introducidos). Enseguida, un gen ajeno de interés con un promotor para manejar su expresión se inserta en regiones genómicas adecuadas del clon infeccioso que son prescindibles o no esenciales (Corredor y Nagy, 2010a y 2010b) y se introduce en una línea celular adecuada.

El vector viral de la presente invención se puede usar, por ejemplo, para la preparación y administración de composiciones inmunogénicas que comprenden por lo menos el vector viral descrito en la presente y una secuencia de nucleótidos exógena que codifica por lo menos un sitio antigénico de una enfermedad de interés insertado en la misma. Opcionalmente, el vector viral de la presente invención es un vector de suministro doble que se puede usar para manejar la expresión de dos o más secuencias de nucleótidos exógenas. En una modalidad, las dos o más secuencias de nucleótidos exógenas están bajo el control de diferentes promotores. En una modalidad, los promotores se seleccionan del grupo que consiste en CMV, CAG, EF1 α , β -actina y L2R.

- En una modalidad, el adenovirus aviar descrito en la presente comprende una secuencia de nucleótidos con identidad de secuencia con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, en donde ORF0, ORF1, ORF2, TR2, ORF17 y ORF11 han sido suprimidos. SEQ ID NO: 1 corresponde a la secuencia genómica completa del adenovirus aviar D (No. Acceso Genbank AC_000013.1). En una modalidad, el vector viral FAdV-9 descrito en la presente comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos con al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, en donde todos o parte de ORF0, ORF1, ORF2, TR2, ORF17 y ORF11 han sido suprimidos. En una modalidad preferida, el adenovirus aviar descrito en la presente comprende una secuencia de nucleótidos con identidad de secuencia con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, en donde todos o parte de ORF1, ORF2, TR2, ORF17 y ORF11 han sido suprimidos.
- En otra modalidad, el adenovirus aviar descrito en la presente comprende una secuencia de nucleótidos con identidad de secuencia con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, en donde todos o parte de ORF1, ORF2 y ORF19 han sido suprimidos. En una modalidad, el vector viral FAdV-9 descrito en la presente comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos con al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, en donde todos o parte de ORF1, ORF2 y ORF19 han sido suprimidos.
- En otra modalidad, el adenovirus aviar descrito en la presente comprende una secuencia de nucleótidos con identidad de secuencia con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, en donde todos o parte de ORF1, ORF2 y ORF19, TR2 u ORF11 han sido suprimidos. En una modalidad, el vector viral FAdV-9 descrito en la presente comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos con al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, en donde todos o parte de ORF1, ORF2 y ORF19, TR2 u ORF11 han sido suprimidos.
- En otra modalidad, el adenovirus aviar descrito en la presente comprende una secuencia de nucleótidos con identidad de secuencia con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, en donde todos o parte de los nucleótidos 38,807 a 42,398 han sido suprimidos. Esta secuencia de nucleótidos (nucleótidos 38,807 a 42,398) incluye TR-2, ORF17 y ORF11. En otra modalidad, el vector viral FAdV-9 descrito en la presente comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos con al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, en donde todos o parte de los nucleótidos 38,807 a 42,398 han sido suprimidos.
- En una modalidad, el vector viral comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos con identidad de secuencia con una secuencia que comprende o consiste en SEQ ID NO: 1, en donde por lo menos 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500 o 5000 nucleótidos que corresponden a todos o parte de los nucleótidos 575 a 2753 y 38,807 a 42,398 de SEQ ID NO: 1, han sido suprimidos.
- En una modalidad, el vector viral comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos con identidad de secuencia con una secuencia que comprende o consiste en SEQ ID NO: 1, en donde por lo menos 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500 o 5000 nucleótidos que corresponden a todos o parte de los nucleótidos 847 a 2753 y 38,807 a 42,398 de SEQ ID NO: 1, han sido suprimidos.
- En otra modalidad, el vector viral comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos con identidad de secuencia con una secuencia que comprende o consiste en SEQ ID NO: 1, en donde por lo menos 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500 o 5000 nucleótidos que corresponden a todos o parte de los nucleótidos 847 a 2753 y 34,220 a 36,443, han sido suprimidos.
- En otra modalidad, el vector viral comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos con identidad de secuencia con una secuencia que comprende o consiste en SEQ ID NO: 1, en donde por lo menos 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500 o 5000 nucleótidos que corresponden a todos o parte de los nucleótidos 847 a 2753, 34,220 a 36,443, y 38,807 a 40,561 o 41,461 a 42,398, han sido suprimidos.
- Por lo menos una secuencia de nucleótidos exógena se inserta opcionalmente en el vector viral FAdV-9 descrito en la presente. Por consiguiente, en una modalidad, la secuencia de nucleótidos de FAdV-9 con las supresiones aquí descritas no está presente en el vector como una secuencia contigua, sino que más bien incluye secciones de secuencias contiguas interrumpidas por al menos una, opcionalmente por lo menos dos, tres o cuatro secuencias de nucleótidos exógenas. Por lo tanto, en una modalidad, el adenovirus aviar descrito en la presente comprende una o más secuencias de nucleótidos con identidad de secuencia con una o más secuencias mostradas en SEQ ID NO: 1, en donde por lo menos ORF17 ha sido suprimido y la secuencia de nucleótidos comprende por lo menos dos, tres, cuatro o cinco secuencias contiguas.

El número de nucleótidos suprimidos del FAdV-9 varía. En una modalidad, se suprimen de 1000 a 7000 nucleótidos, divididos opcionalmente entre el extremo izquierdo y derecho del genoma. En otras modalidades,

se suprimen de 1500 a 6000 nucleótidos. En una modalidad, se suprimen por lo menos 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000 o 6000 nucleótidos.

El tamaño de las secuencias de nucleótidos exógenas insertadas en el vector viral descrito en la presente también varía. En una modalidad, basándose en la regla de estabilidad de adenovirus de 105%, la capacidad del vector es de hasta 7751 bp. En otras modalidades, se insertan de 1000 a 7000 nucleótidos, divididos opcionalmente entre el extremo izquierdo y derecho del genoma. Por ejemplo, un gen ajeno se puede insertar en el extremo izquierdo y un segundo gen ajeno se puede insertar en el otro extremo. En otras modalidades, se insertan de 1500 a 6000 nucleótidos. En una modalidad se insertan por lo menos 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 o 6000 nucleótidos exógenos.

En una modalidad, el vector viral FAdV-9 tiene además una supresión en el extremo izquierdo del genoma de aproximadamente 2291 pares de bases, opcionalmente entre aproximadamente 1900 y 2500 pares de bases. En una modalidad, el vector viral FAdV-9 tiene una supresión en el extremo derecho del genoma de aproximadamente 3591 pares de bases. En una modalidad, el vector viral FAdV-9 tiene una supresión en el extremo derecho del genoma de entre aproximadamente 3000 pares de bases y 4000 pares de bases.

Típicamente, la identidad de secuencia se evalúa por medio del programa de búsqueda avanzada BLAST, versión 2.1 (parámetros normales por omisión; Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. y Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool", *J. Mol. Biol.* 215: 403-410). BLAST es una serie de programas que están disponibles en línea a través del U.S. National Center for Biotechnology Information (National Library of Medicine Building 38^a Bethesda, MD 20894). La búsqueda Blast avanzada se establece con parámetros por omisión. Las referencias para los programas Blast incluyen: Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. y Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool", *J. Mol. Biol.* 215: 403-410; Gish, W. y States, D.J. (1993) "Identification of protein coding regions by database similarity search", *Nature Genet.* 3: 266-272; Madden, T.L., Tatusov, R.L. y Zhang, J. (1996) "Applications of network BLAST server", *Meth. Enzymol.* 266: 131-141; Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D.J. (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402; Zhang, J. y Madden, T.L. (1997) "PowerBLAST: A new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation", *Genome Res.* 7: 649-656).

Como se usa aquí, "vector viral" se refiere a un adenovirus recombinante que es capaz de suministrar una secuencia de nucleótidos exógena a una célula hospedadora. Por ejemplo, en una modalidad, el vector viral comprende sitios de restricción que son adecuados para insertar una secuencia de nucleótidos exógena en el vector. En una modalidad, una o más secuencias de nucleótidos que no son requeridas para la replicación o transmisión del FAdV-9 descrito en la presente son suprimidas de la secuencia de nucleótidos del vector viral. Por ejemplo, en una modalidad, secuencias de nucleótidos del extremo izquierdo o derecho del genoma de FAdV-9 son suprimidas en el vector viral FAdV-9 recombinante. En una modalidad, además de la secuencia de nucleótidos de ORF17 y/o ORF19, las secuencias de nucleótidos que corresponden a uno o más de los ORF 0-2, TR2, y ORF11 son suprimidas en el vector viral FAdV-9 recombinante. En una modalidad, el vector viral incluye una o más secuencias de control exógenas, tales como promotores o sitios de clonación útiles para manejar la expresión de transgenes. En una modalidad, los promotores se seleccionan del grupo que consiste en CMV (SEQ ID NO: 4), CAG (SEQ ID NO: 5), EF1 α (SEQ ID NO: 6), β -actina (SEQ ID NO: 8) y L2R (SEQ ID NO: 7).

En una modalidad, el vector viral comprende una secuencia de nucleótidos exógena que codifica un polipéptido de interés. En una modalidad, el polipéptido de interés es un antígeno de una enfermedad de interés. Por ejemplo, en una modalidad, el vector viral comprende una secuencia de nucleótidos exógena que codifica por lo menos un sitio antigénico de una enfermedad de interés. Las secuencias de nucleótidos exógenas que codifican un polipéptido de interés pueden ser obtenidas fácilmente mediante los métodos conocidos en la técnica, tales como síntesis química, cribado de colecciones apropiadas o recuperación de una secuencia de genes por reacción en cadena de polimerasa (PCR).

Con respecto a la presente divulgación, las enfermedades de interés incluyen, sin limitación, influenza, laringotraqueítis infecciosa (ILT), bronquitis infecciosa (IB), enfermedad infecciosa bursal (Gumboro), hepatitis, rinotraqueítis viral, coriza infecciosa, *Mycoplasma hyopneumoniae*, pasteurelosis, síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS), circovirus, bordetelosis, parainfluenza, influenza aviar, enfermedad de Newcastle (NDV), anemia infecciosa, hepatitis de cuerpos de inclusión (IBH) y Metapneumovirus (MPV).

En una modalidad, el vector viral se adapta para expresar una secuencia de nucleótidos exógena en una célula hospedadora. Por ejemplo, en una modalidad, el vector viral comprende secuencias de control capaces de afectar la expresión de una secuencia de nucleótidos exógena en un hospedador. Por ejemplo, los vectores virales descritos en la presente pueden incluir una o más secuencias de control, tales como un promotor de transcripción, un potenciador, una secuencia operadora opcional para controlar la transcripción, una secuencia que codifica sitios de unión adecuados de ARNm ribosomal, sitios de empalme alternativo, secuencias de traducción o secuencias que controlan la terminación de transcripción y traducción. Opcionalmente, el vector viral comprende diferentes secuencias de control en el extremo izquierdo y extremo derecho de los vectores.

En una modalidad, los promotores se seleccionan del grupo que consiste en CMV (SEQ ID NO: 4), CAG (SEQ ID NO: 5), EF1 α (SEQ ID NO: 6), β -actina (SEQ ID NO: 8) y L2R (SEQ ID NO: 7) y el potenciador puede ser WPRE (SEQ ID NO: 9).

En una modalidad, el vector viral comprende una o más secuencias de nucleótidos exógenas enlazadas operativamente a una o más secuencias de control. En una modalidad, el vector viral comprende un sitio de inserción adyacente a una o más secuencias de control, de tal manera que cuando se inserta en el vector una secuencia de nucleótidos exógena, la secuencia de nucleótidos exógena se enlaza operativamente a las secuencias de control. Como se usa aquí, las secuencias de nucleótidos se “enlazan operativamente” cuando están funcionalmente relacionadas entre sí. Por ejemplo, un promotor se enlaza operativamente a una secuencia codificante si controla la transcripción de la secuencia; un sitio de unión de ribosoma se enlaza operativamente a una secuencia codificante si está colocado a fin de permitir la traducción. Opcionalmente, las secuencias que se enlazan operativamente son secuencias contiguas en el vector viral.

En una modalidad, el vector viral descrito en la presente incluye una secuencia adecuada para la selección biológica de hospedadores que contienen el vector viral, tal como un gen de selección positiva o negativa.

Para preparar las secuencias de nucleótidos y vectores virales descritos en la presente también son adecuados otros métodos conocidos en la técnica, como las técnicas recombinantes que incluyen sin limitación las que son divulgadas por Sambrook et al (Sambrook J., et al. 2000, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual” (tercera edición), Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Opcionalmente, los vectores virales y métodos descritos en la presente se pueden usar para terapia génica en sujetos animales que lo requieran. Por ejemplo, en una modalidad, los vectores virales aquí descritos se pueden usar para el suministro y expresión de una secuencia de nucleótidos terapéutica o nucleótido que codifica una proteína terapéutica. En una modalidad se provee un vector viral o composición como se describe en la presente para usarse en un método de terapia génica que comprende administrarle a un sujeto que lo requiera el vector viral o composición, en donde el vector viral comprende una secuencia de nucleótidos exógena que codifica una secuencia de nucleótidos o proteína terapéutica.

Otro aspecto de la presente divulgación incluye una composición inmunogénica que comprende un vector viral FAdV-9 recombinante descrito en la presente. En una modalidad, las composiciones inmunogénicas se pueden preparar mediante métodos conocidos para la preparación de composiciones para su administración a animales, que incluyen sin limitación humanos, ganado, aves o peces. En una modalidad, una cantidad eficaz del vector viral descrito en la presente se combina en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos adecuados se describen por ejemplo en “Remington's Pharmaceutical Sciences” (“Remington's Pharmaceutical Sciences”, Mack Publishing Company, Easton, P., USA) o “Handbook of Pharmaceutical Additives” (recopilado por Michael e Irene Ash, Gower Publishing Limited, Aldershot, Inglaterra (1995)). Sobre esta base, las composiciones incluyen, aunque no exclusivamente, soluciones de los vectores virales descritos en la presente, en asociación con uno o más vehículos o diluentes farmacéuticamente aceptables, y pueden estar contenidas en soluciones amortiguadoras con el pH adecuado o pueden ser isoosmóticas con los fluidos fisiológicos. En una modalidad, la composición inmunogénica comprende un adyuvante.

Los vectores virales FAdV-9 novedosos y los métodos y usos asociados se ilustrarán más claramente por medio de la siguiente descripción de ejemplos específicos.

Ejemplo 1

Materiales y métodos

1.1 Cultivos celulares y virus

Células de hepatoma de pollos (línea celular CH-SAH) se mantuvieron en medio Eagle modificado de Dulbecco /mezcla de nutrientes F-12 de Ham (DMEM-F12) (Sigma) más L-glutamina 200 mM y 100 U/ml de penicilina-estreptomycin (PenStrep, Sigma) con suero bovino fetal al 10% no desactivado por calor (FBS), como se describe (Alexander, H.S., Huber, P., Cao, J., Krell, P.J., Nagy, É. 1998, “Growth Characteristics of Fowl Adenovirus Type 8 in a Chicken Hepatoma Cell Line”, *J. Virol. Methods*. 74, 9-14.). Los FAdV recombinantes se generaron usando como base el virus con la supresión FAdV-9 Δ 4 descrita por Corredor y Nagy (2010b). La propagación de todos los virus se efectuó en las células CH-SAH como lo describen Alexander *et al.* (1998).

1.2 Manipulación general del ADN

1.2.1 Cultivos bacterianos y aislamiento del plásmido

Las células *Escherichia coli* DH5 α fueron el hospedador bacteriano para todos los plásmidos descritos, mientras que las células *E. coli* BJ5183 se usaron para recombinación homóloga, para generar FAdmid recombinantes. Los cultivos bacterianos se desarrollaron a 37 °C sobre medio de crecimiento Luria-Bertani (LB) selectivo,

líquido o agar (16 mg/ml), que contenía ampicilina (100 µg/ml). Se escogieron colonias de *E. coli* solas, se inocularon en 5 ml de medio LB suplementado con ampicilina al 0.1% para seleccionar el crecimiento de bacterias que contienen un plásmido transformado resistente a la ampicilina. La incubación y el crecimiento fue durante aproximadamente 16 horas. Se prepararon *E. coli* DH5α químicamente competentes (CaCl₂) y se transformaron con 10 µl del producto de ligación o con 1 µl de ADN plasmídico purificado (Sambrook, J., Russel, D.W., 2001, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", volumen 1, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring, Nueva York, EE. UU.). Todos los plásmidos se aislaron usando el kit EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Mini-prep (Bio Basic), o el kit PureLink HiPure Plasmid Midiprep (Invitrogen) (para los plásmidos de tamaño mayor de 40 kb, o cuando se requería una concentración alta de ADN), de acuerdo con el protocolo del fabricante.

1.2.2 PCR y digestión con enzima de restricción

El ADN se amplificó por reacción en cadena de polimerasa (PCR) durante la clonación de todas las construcciones de expresión doble y los virus recombinantes. Para toda clonación, la amplificación de PCR se realizó usando un kit *Kod* Hot Start Polymerase (Novagen). Sin embargo, se usó polimerasa *Taq* cuando se cribó algún plásmido por PCR. A menos que se indique de otra manera, las condiciones de PCR para ambas polimerasas, *Kod* y *Taq*, se resumen en el Cuadro 2. Todas las reacciones de PCR se efectuaron con un Mastercycler Pro (Eppendorf).

Las digestiones con enzima de restricción (RE) se efectuaron con enzimas Fast Digest (Fermentas) y con enzimas de New England BioLabs (NEB). Todas las reacciones fueron realizadas de acuerdo con el protocolo del fabricante (por enzima). Las reacciones de digestión siempre se hicieron a 37°C y las muestras se inactivaron con calor en un termociclador Mastercycler Pro (Eppendorf).

A menos que se indique de otra manera, todas las muestras de ADN se sometieron a electroforesis a 100V en geles de agarosa al 0.8% que contenían RedSafe™ 1x (iNtRON Biotechnology). Para la electroforesis de las muestras de ADN se usó amortiguador de carga de ADN 6X [azul de bromofenol al 0.25% (p/v), sacarosa al 40% (p/v) en agua] y amortiguador tris-acetato-EDTA (TAE) 1X.

1.2.3 Construcción del plásmido y transformación

Después de digestión con RE y purificación en gel, el ADN amplificado por PCR y el plásmido se ligaron con ADN-ligasa T4 (Invitrogen). A menos que se indique de otra manera, las ligaciones se hicieron durante la noche a 16 °C a una relación molar de 1:1 de inserto a vector. Se mezclaron 50 µl de *E. coli* DH5α CaCl₂- competentes con 10 µl de producto de ligación o 1 µl de ADN plasmídico purificado. Las células competentes y el ADN se incubaron sobre hielo por 30 min y luego se sometieron a choque de calor a 42 °C por 1 min. Las células se recuperaron durante 3 min sobre hielo y a cada tubo de microcentrifuga se le agregaron 500 µl de caldo Super Optimal con medio de represión de catabolito (SOC). Las células se incubaron a 37 °C por 1 h con agitación y luego se centrifugaron y resuspendieron en 100 µl de caldo LB. Todo el volumen se extendió sobre una placa de agar LB que contenía ampicilina.

Ocurrió recombinación homóloga en las células de *E. coli* BJ5183. Se mezclaron 2 µg tanto de casetes de promotor como de ADN FAdV-9Δ4 lineal en 100 µl de células BJ5183 químicamente competentes. Las mezclas se dejaron sobre hielo por 15 min, seguido por un choque de calor a 42 °C por 1 min. Las células se recuperaron durante 20 min sobre hielo y a cada tubo de microcentrifuga se le agregó 1 ml de medio SOC y se transfirieron a un tubo de cultivo de vidrio de 5 ml. Las células se incubaron por 2 h a 37 °C con agitación y luego se centrifugaron y resuspendieron en 100 µl de caldo LB. Todo el volumen de las células se extendió sobre una placa de agar LB que contenía ampicilina.

1.2.4 Secuenciación

Todos los productos de PCR y plásmidos se purificaron y se secuenciaron con el secuenciador de ADN ABI 3730 (Laboratory Services Division, Guelph, ON). Los datos de secuencia se analizaron usando SnapGene Viewer (GSL Biotech).

1.3 Análisis de la expresión del promotor

1.3.1 Generación de construcciones de plásmido de expresión doble

La actividad de cinco promotores (CMV, CAG, EF1α, β-actina y L2R) y un elemento potenciador (WPRE) se compararon midiendo la expresión de EGFP en comparación con luciferasa de luciérnaga, bajo el promotor SV40, en células CH-SAH transfectadas. Los plásmidos, pCI-Neo (Promega), pCAG-Puro y pEF1α-Puro, fueron provistos por la Dra. Sarah Wootton (University of Guelph). Se generaron plásmidos de expresión doble usando el plásmido pCI-neo como esqueleto (Figura 11), que contenía el promotor CMV junto con muchos sitios únicos de RE. Tanto el promotor CAG como EF1α fueron subclonados en pCI-Neo a partir de pCAG-Puro y pEF1α-Puro, respectivamente, usando *SpeI* y *EcoRI*. La presencia de cada promotor se confirmó por secuenciación usando el cebador pCI-Neo-F (Cuadro 3). El EGFP se amplificó por PCR a partir de pEGFP-N1

(Clontech Laboratories, Inc) con los cebadores EGFP-F y EGFP-R (Cuadro 3), a una temperatura de apareamiento de 60 °C. El producto de PCR resultante se extrajo del gel usando el kit de purificación de ADN Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification (Promega). Tanto el producto de PCR de EGFP como los plásmidos basados en pCI-Neo (que contenían el promotor CMV, CAG o EF1 α) se sometieron a digestión doble con EcoRI y NotI durante 1 h a 37 °C. Tanto el plásmido digerido como el producto de PCR se separaron entonces en un gel y se extrajeron usando el kit de purificación de ADN Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification (Promega), y se ligaron durante la noche a 4 °C. Después de transformación en células de *E. coli* DH5 α y crecimiento sobre placas LB-amp, las colonias se cribaron por PCR con los cebadores EGFP-F y EGFP-R para la presencia del fragmento EGFP. Todas las colonias positivas se confirmaron secuenciando con el cebador EGFP-I-F (Cuadro 3), dando como resultado los plásmidos pCMV-EGFP, pCAG-EGFP y pEF1 α -EGFP.

El promotor de β -actina se amplificó por PCR a partir de pCAG-Puro usando los cebadores β actin-F y β actin-R (Cuadro 3) con una temperatura de apareamiento de 60°C. El producto de PCR resultante se extrajo del gel con el kit de purificación de ADN Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification (Promega). Tanto el producto de PCR de β -actina como pCAG-EGFP se sometieron a digestión doble con EcoRI y NotI durante 1 h a 37 °C. El plásmido digerido y el producto de PCR se separaron entonces en un gel y se extrajeron usando el kit de purificación de ADN Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification (Promega), y se ligaron durante la noche a 4°C. Después de transformación en células de *E. coli* DH5 α y crecimiento sobre placas LB-amp, las colonias se cribaron con RE para la presencia de β -actina. Todas las colonias positivas se confirmaron por secuenciación usando los dos cebadores, pCI-Neo-F y EGFP-I-F (Cuadro 3), dando como resultado el plásmido p β actin-EGFP.

El promotor L2R del virus de la viruela aviar se amplificó por PCR a partir de pE68 (Zantinge, J.L., Krell, P.J., Derbyshire, J.B., Nagy, É., 1996, "Partial transcriptional mapping of the fowlpox virus genome and analysis of the EcoRI L fragment", *J. Gen. Virol.* 77(4), 603-614) con los cebadores L2R-F y L2R-R (Cuadro 3), a una temperatura de apareamiento de 60 °C. El producto de PCR resultante se extrajo del gel usando el kit de purificación de ADN Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification (Promega). Tanto el producto de PCR de L2R como pCMV-EGFP se sometieron a digestión doble con EcoRI y NotI durante 1 h a 37 °C. Tanto el plásmido digerido como el producto de PCR se separaron entonces en un gel y se extrajeron usando el kit de purificación de ADN Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification (Promega), y se ligaron durante la noche a 4 °C. Después de transformación en células de *E. coli* DH5 α y crecimiento sobre placas LB-amp, las colonias se cribaron con RE para la presencia de L2R. Todas las colonias positivas se confirmaron por secuenciación con los dos cebadores, pCI-Neo-F y EGFP-I-F (Cuadro 3), dando como resultado la recuperación del plásmido pL2R-EGFP.

La luciferasa de luciérnaga se amplificó por PCR a partir de pGL4.17 (Promega) con los cebadores Luc-F y Luc-R (Cuadro 3), a una temperatura de apareamiento de 55 °C. El producto de PCR resultante (1.6 kb) se extrajo del gel usando el kit de purificación de ADN Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification (Promega). Tanto el producto de PCR de luciferasa como los plásmidos promotores se sometieron a digestión doble con AvrII y BstBI durante 1 h a 37 °C. El plásmido digerido y el producto de PCR se separaron entonces en un gel, quitando el casete de resistencia de neomicina (NeoR) de cada plásmido, y se extrajeron usando el kit de purificación de ADN Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification (Promega), y se ligaron durante la noche a 4 °C. Después de transformación en células de *E. coli* DH5 α y crecimiento sobre placas LB-amp, las colonias se cribaron por PCR para la presencia de luciferasa. Todas las colonias positivas se confirmaron por secuenciación usando el cebador SV40-F (Cuadro 3).

Se generaron cinco plásmidos de expresión doble adicionales para incluir el elemento potenciador WPRE. El elemento WPRE se amplificó por PCR a partir de pWPRE (Dra. Sarah Wootton, University of Guelph) usando los cebadores WPRE-F y WPRE-R (Cuadro 2.2) con una temperatura de apareamiento de 55 °C. El producto de PCR se extrajo del gel usando el kit de purificación de ADN Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification (Promega). Tanto el producto de PCR de WPRE como el promotor se sometieron a digestión con NotI durante 1 h a 37 °C. Después de la digestión, los plásmidos se trataron con fosfatasa alcalina (intestinal de becerro, New England BioLabs) de acuerdo con el protocolo del fabricante para impedir la religación. Tanto el plásmido digerido/desfosforilado como el producto de PCR se separaron entonces en un gel y el ADN se extrajo usando el kit de purificación de ADN Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification (Promega), y se ligaron durante la noche a 4 °C. Después de transformación en células de *E. coli* DH5 α y crecimiento sobre placas LB-amp, las colonias se cribaron por PCR para la presencia de WPRE. Todas las colonias positivas se confirmaron por secuenciación usando EGFP-I-F (Cuadro 3). En el Cuadro 4 se da una lista de todos los plásmidos generados en este estudio y su propósito.

1.3.2 Transfección de células de hepatoma de pollo

La expresión de EGFP se midió transfectando células CH-SA-H con los plásmidos de expresión doble. Las células se sembraron en placas de 35 mm a una densidad de 1.2×10^6 células/placa y se incubaron a 37 °C con 5% de CO₂. Se usó Lipofectamine 2000 (Invitrogen) de acuerdo con la recomendación del fabricante para transfectar todas las construcciones. Brevemente, se incubaron 2 μ g de plásmido de expresión doble y 5 μ l de Lipofectamine en alícuotas separadas de 50 μ l de medio Opti-Mem (Gibco) por 5 minutos, luego se mezclaron

y se incubaron juntos por 20 minutos. Durante este periodo el medio se removió de cada placa y las monocapas de células se lavaron dos veces con solución salina amortiguadora de fosfato (PBS). A cada placa se le agregaron 2 ml de DMEM-F12 (FBS 5%) sin antibióticos. Después de 20 minutos, las mezclas plásmido-lipofectamina se agregaron a las placas de 35 mm y se incubaron por 6 h a 37 °C en presencia de 5% de CO₂. Esto se repitió para los diez plásmidos de expresión doble. Después de 6 h, el medio se removió y se agregó DMEM-F12 (FBS 5%) nuevo. Cada 12 horas después de la transfección ('h.p.t.', horas postransfección), la expresión de EGFP se confirmó por microscopía de fluorescencia y todo el lisado celular se recolectó. Las monocapas se lavaron con PBS, se les agregó tripsina y las células se resuspendieron en DMEM-F12 (FBS 5%). Después, las células se centrifugaron en tubos cónicos de 15 ml (Nunc®), el sobrenadante se removió y la pella celular se resuspendió en 500 µl de PBS y se congeló a -80 °C. Muestras de células transfectadas congeladas a -80 °C se congelaron-descongelaron tres veces. Los desechos celulares se centrifugaron a 12,000 rpm en una microcentrífuga durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un tubo de microcentrífuga nuevo y la concentración de proteína se determinó a 280 nm usando un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Todas las muestras se ajustaron a una concentración de proteína de 1 µg/µL.

1.3.3 Microscopía de fluorescencia

Las células CH-SAH tanto transfectadas como infectadas se monitorearon por microscopía de fluorescencia con un microscopio de fluorescencia Zeiss (Carl Zeiss) con óptica FITC.

1.3.4 Medición de la expresión del gen reportero

La expresión de EGFP se cuantificó por espectrofluorometría usando una lectora de microplaca GloMax®-Multi (Promega). Brevemente, se agregaron 50 µg de lisado de proteína a una placa negra de fondo plano de 96 pocillos (Corning) por triplicado. La fluorescencia de EGFP se midió en una lectora de microplaca GloMax®-Multi (Promega) a longitudes de onda de 480 nm de excitación y 528 nm de emisión. Las tres lecturas se promediaron para dar un valor de fluorescencia por muestra.

La expresión de luciferasa se determinó usando un kit Pierce Firefly Luciferase Glow Assay (Thermo Fisher Scientific) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Brevemente, se agregaron 25 µg de lisado de proteína a una placa negra de fondo plano de 96 pocillos (Corning) por triplicado. A cada réplica se le agregaron manualmente 50 µl de sustrato del ensayo Luciferase, se mezclaron bien y se incubaron por 15 minutos protegidos de la luz antes de medir la luminiscencia en una lectora de microplaca GloMax®-Multi (Promega). Las lecturas se promediaron para dar un valor de luminiscencia por muestra.

1.3.5 Normalización de la expresión del promotor

Las construcciones de expresión doble se normalizaron para eliminar la variabilidad de la eficiencia de transfección de muestra a muestra (Schagat, T., Paguio, A., Kopish, K., 2007, "Normalizing Genetic Reporter Assays: Approaches and Considerations for Increasing Consistency and Statistical Significance", *Cell Notes*, 17, 9-12). Se determinaron las veces de cambio de actividad entre las construcciones de promotor y pCMV-EGFP-Luc. Para empezar, para cada punto de tiempo específico y repetición se determinó la fluorescencia promedio y el valor de luminiscencia de cada construcción de plásmido, en donde se calculó la relación de fluorescencia sobre luminiscencia (F/R). El cantidad de actividad se comparó con el promotor CMV, usado actualmente en recFAdV; por lo tanto, a la relación F/R de CMV se le asignó un valor de 1.0 (dividido entre su propia relación F/R). Cada valor F/R de las construcciones restantes también se dividió entre el valor F/R de CMV, dando como resultado un valor que representa las veces de cambio de actividad (Δ veces) normalizadas. Las veces de cambio promedio entre las repeticiones se compararon entre todas las construcciones en cada punto de tiempo.

1.4 Generación y caracterización de virus recombinantes

1.4.1 Construcción de construcciones intermedias

Se hizo un análisis adicional de la expresión de EGFP *in vitro* con recFAdV que contenían los casetes de expresión basados en CMV, CAG y Ef1 α . En estudios previos, los recFAdV se recuperaron por recombinación homóloga entre pFAdV-9 Δ 4 y el casete de expresión amplificado por PCR, que contenía regiones de flaqueo virales, aislado de una construcción intermedia. El plásmido pleft Δ 491-2,782 (p Δ 2.4) contiene el sitio de supresión Δ 4 del extremo izquierdo (Δ 491-2,782 nt) de FAdV-9 con un sitio de RE SwaI para clonación de extremo rasurado de un transgen (Corredor y Nagy, 2010b). En este estudio, se desarrolló un sistema nuevo de construcción intermedia clonando regiones de flaqueo virales directamente en los plásmidos de expresión doble, creando así plásmidos listos para recombinación (pHMR). Regiones genómicas virales que flanquean el sitio de supresión Δ 4 de FAdV-9 se amplificaron por PCR a partir de la construcción intermedia p Δ 2.4. La región izquierda del sitio de supresión (VF1) se amplificó por PCR usando 100 ng de p Δ 2.4 y los cebadores VF1-F y VF1-R (Cuadro 3), a una temperatura de apareamiento de 52 °C. El producto de PCR resultante se extrajo del gel usando el kit EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Mini-prep (Bio Basic). Tanto el producto de PCR de VF1 como todos los vectores de expresión doble se digirieron con SpeI durante 1 h, seguido por digestión con BglII. Tanto el plásmido digerido como el producto de PCR se separaron entonces en un gel y se extrajeron

usando el kit QIAEX II Gel Extraction (Qiagen), y se ligaron durante la noche a 16 °C. Después de transformación en células de *E. coli* DH5α y crecimiento sobre placas LB-amp, las colonias se cribaron por PCR para la presencia del fragmento VF1 con los cebadores VF1-F y VF1-R. Todas las colonias positivas se confirmaron por secuenciación. Después, la región derecha del sitio de supresión (VF2) se amplificó por PCR usando 100 ng de pΔ2.4 y los cebadores VF2-F y VF2-R (Cuadro 3), a una temperatura de apareamiento de 52 °C. El producto de PCR resultante se extrajo del gel con el kit EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Mini-prep (Bio Basic). Tanto el producto de PCR de VF2 como todos los vectores de expresión doble positivos para el fragmento VF1 se digirieron con KpnI durante 1 h, seguido por digestión con MfeI. Tanto el plásmido digerido como el producto de PCR se separaron entonces en un gel y se extrajeron usando el kit QIAEX II Gel Extraction (Qiagen), y se ligaron durante la noche a 16 °C. Después de transformación en células de *E. coli* DH5α y crecimiento sobre placas LB-amp, las colonias se cribaron por PCR para la presencia del fragmento VF2 usando los cebadores VF1-F y VF2-R (Cuadro 3), a una temperatura de apareamiento de 52°C, con un tamaño esperado de 2 kb más el tamaño de cada casete de expresión de EGFP. En el Cuadro 4 se da una lista de los seis plásmidos intermedios de pHMR.

1.4.2 Generación de adenovirus aviares recombinantes

Se generaron FAdV recombinantes para incluir los casetes de expresión de CMV, CMV-WPRE, CAG, CAG-WPRE, EF1α y EF1α-WPRE usando un método modificado de Corredor y Nagy (2010b) (Figura 12). Los casetes de expresión flanqueados por ADN viral en los plásmidos pHMR se recombinaron con pFAdV-9Δ4 para crear FAdmid recombinantes nuevos que contienen un promotor de interés y EGFP. Para obtener casetes e EGFP promotores flanqueados por secuencias de ADN virales, construcciones de pHMR intermedias se sometieron a PCR o digestión de RE con BglII/BamHI. Los casetes que contenían el promotor CMV (pHMR-CMV-EGFP y pHMR-CMV-EGFP-WPRE) y el promotor EF1α (pHMR-EF1α-EGFP y pHMR-EF1α-EGFP-WPRE) se amplificaron por PCR. La PCR se efectuó con 200 ng del plásmido y los cebadores E1-F y E1-R (Cuadro 3) a una temperatura de apareamiento de 52 °C, y el producto de PCR resultante se extrajo de un gel usando el kit QIAEX II Gel Extraction (Qiagen). Los casetes que contenían el promotor CAG (pHMR-CAG-EGFP y pHMR-CAG-EGFP-WPRE) se digirieron doblemente usando BglII/BamHI. Brevemente, 5 µg del plásmido se digirieron con las dos enzimas por 1 h a 37 °C. Las muestras se separaron por electroforesis en gel y las bandas que corresponden al casete CAG (4.5 kb) o el casete CAG-WPRE (5 kb) se extrajeron del gel usando el kit de extracción EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction (Bio Basic). Después, 5 µg de pFAdV-9Δ4 se linealizaron con SmaI y se precipitaron con etanol. La concentración de todo el ADN obtenido por PCR y el producto de digestión de RE se midió con un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Para cada construcción, 2 µg del casete de promotor de EGFP y 2 µg de pFAdV-9Δ4 digerido con SmaI fueron transformados conjuntamente en células de *E. coli* BJ5183. Todas las construcciones resultantes se cribaron para recombinación por medio de digestión con NotI, seguida por transformación en *E. coli* DH5α. Estas construcciones se desarrollaron en medio LB, se aislaron usando el kit PureLink HiPure Plasmid Midiprep (Invitrogen), se digirieron con PacI y se extrajeron por precipitación con etanol. Células CH-SAH se sembraron en matraces de 25 cm a una densidad de 4.3×10^6 células/matraz. Las células CH-SAH se transfectaron con 5 µg del ADN digerido con PacI usando 25 µl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Después de 6 h, la mezcla de transfección se separó y se le agregó DMEM-F12 (FBS 5%) nuevo, las células se incubaron a 37 °C con 5% de CO₂. Durante la siguiente semana se monitorizó la aparición del efecto citopático (CPE) en las células. En este punto los cultivos celulares se congelaron y se descongelaron, tres veces, luego se centrifugaron y el sobrenadante clarificado que contenía el FAdV-9Δ4 recombinante se guardó como la solución de reserva P0 a -80 °C. Subsiguientemente el virus se pasó tres veces para obtener una solución de reserva P4 de título alto. En el Cuadro 4 se da una lista de los recFAdV.

1.4.3 Curvas de crecimiento viral

Se obtuvieron curvas de crecimiento de un paso para todos los virus como lo describen Alexander *et al.* (1998). Brevemente, un total de 1.8×10^6 células CH-SAH se sembraron en placas de 35 mm y se incubaron a 37 °C con 5% de CO₂. Las células se infectaron con recFAdV a una multiplicidad de infección (MOI) de 5. Después de adsorción por 1 hora a temperatura ambiente, las células se lavaron tres veces con PBS y se les agregó DMEM-F12 (FBS 5%) nuevo. El medio del cultivo celular y las células se cosecharon 0, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 60 y 72 horas después de la infección ('h.p.i.', horas postinfección). El medio se separó y se congeló a -80 °C como virus extracelular, mientras que las células se lavaron tres veces con PBS, se puso en la monocapa 1 ml de medio y la placa se congeló a -80 °C como virus intracelular. El virus extracelular se tituló en cada punto de tiempo. Las células CH-SAH se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 1.8×10^6 células/pocillo y se incubaron durante la noche. El virus extracelular de cada punto de tiempo se diluyó en serie (10^{-1} - 10^{-7}), y 100 µl de cada alícuota se inocularon por duplicado y se dejaron adsorber durante 1 h a temperatura ambiente. El inóculo se removió y la monocapa se lavó en PBS. A cada pocillo se le agregaron 3 ml de capa de agar que consiste en agarosa SeaKem LE al 0.6% (Lonza), DMEM-F12 (FBS 5%, L-glutamina y PenStrep), y las placas se incubaron a 37°C con 5% de CO₂. Después de cinco días, a cada pocillo se le agregaron 1.5 ml de rojo neutro (0.015%) y después de 24 h se hizo el conteo en las placas.

1.4.4 Detección de la expresión de EGFP

Un total de 1.8×10^6 células CH-SAH se sembraron en placas de 35 mm y se incubaron a 37 °C con 5% de CO₂. Las células se infectaron con recFAdV a una MOI de 5. Células no infectadas y células infectadas con FAdV-9Δ4 fueron los controles negativos, mientras que células transfectadas con 6 µg de pEGFP-N1 fueron el control positivo. Las células se recolectaron 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36 y 48 h.p.i. y se centrifugaron a 5,000 rpm por 5 minutos. Cada muestra se resuspendió en 500 µl de PBS y se dividió en dos alícuotas de 250 µl. La primera alícuota se guardó congelada a -80 °C para ser leída después por espectrofluorometría. La segunda alícuota se centrifugó de nuevo para quitar el FBS. El sobrenadante se removió y la pella celular se resuspendió en 200 µl de amortiguador de lisis RIPA (Tris HCl 50 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, Triton X-100 al 1%, SDS al 0.1%, EDTA 10 mM y desoxicolato de sodio al 1%). Las muestras se incubaron sobre hielo por 20 minutos y se volvieron a centrifugar a 12,000 rpm a 4 °C por 20 minutos. El sobrenadante se recogió y se guardó a -80 °C.

La expresión de EGFP se midió por espectrofluorometría en cada punto de tiempo. Muestras de células infectadas congeladas a -80 °C se congelaron - descongelaron tres veces. Los desechos celulares se centrifugaron a 12,000 rpm por 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un tubo de microcentrifuga nuevo y la concentración de proteína se determinó a 280 nm usando un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Todas las muestras se ajustaron a una concentración de proteína de 1 µg/µL. Para cada muestra, se agregaron 50 µg del extracto de proteína a una placa negra de fondo plano de 96 pocillos (Corning) por triplicado, y se analizó usando una lectora de microplaca GloMax®-Multi (Promega) para detectar la fluorescencia de EGFP usando longitudes de onda de 480 nm y 528 nm de excitación y emisión, respectivamente.

1.4.5 Ensayo de Bradford y SDS-PAGE

La concentración de proteína se determinó con el kit BioRad Protein Assay de acuerdo con el protocolo del fabricante. Brevemente, se hizo una dilución 1:5 en H₂O del reactivo colorante concentrado. Se pipetearon 10 µL de los estándares de proteína BSA, variando las concentraciones de 100 µg/ml a 1 mg/ml, junto con muestras de lisado celular completo (diluido 1:10), a una placa de 96 pocillos, por triplicado. A cada muestra se le agregaron 200 µL del reactivo colorante diluido y se mezclaron. Después de una incubación de 5 minutos, la absorbancia se midió a 595 nm en una lectora de microplaca (BioTek Powerwave XS2). Se generó una curva patrón usando los valores de absorbancia de los estándares de BSA, y se usó la ecuación de regresión lineal para extrapolar las concentraciones de los lisados celulares desconocidos. Los valores de cada muestra se promediaron para generar una concentración promedio del total de proteína y el factor de dilución fue contabilizado. Todas las muestras se diluyeron hasta una concentración final de 0.67 µg/ µL en H₂O destilada.

Las proteínas se separaron por medio de electroforesis en gel de policarilamida –SDS (SDS-PAGE). Se prepararon geles de acrilamida al 10% de acuerdo con las recetas obtenidas de “Roche Lab FAQs Handbook” (4ª ed). Para todos los experimentos se mezclaron 15 µL de cada lisado celular (0.67 µg/µL) con 4 µL de amortiguador de carga SDS-PAGE 4x (suplementado con 2-mercaptoetanol). Las muestras se incubaron a 95 °C por 10 minutos antes de ser cargadas en los geles. Se cargaron un total de 10 µg por muestra en carriles individuales, y también 5 µL de escalera de proteínas (Precision Plus Protein Dual Colour, BioRad). Una vez cargadas todas las muestras, los geles se corrieron a 100 V durante aproximadamente 1.5 horas en amortiguador de corrida (Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS al 0.1%, pH 8.3).

1.4.6 Inmunotransferencia Western

Después de la SDS-PAGE, las proteínas se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) en un Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (BioRad) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las muestras se corrieron a 100 V por 1 hora en amortiguador de transferencia (Tris 25 mM, glicina 190 mM, metanol al 20%, pH 8.3). Después de la transferencia, las membranas se enjuagaron con solución salina amortiguadora de Tris suplementada con Tween 20 al 0.1% (TBS-T) y se bloquearon con leche descremada al 5% (en TBS-T) durante 1 h a temperatura ambiente, con agitación. A la solución bloqueadora se le agregó anticuerpo primario y las membranas se incubaron durante la noche a 4 °C. Para sondear la EGFP se usó anticuerpo monoclonal primario anti-GFP de ratón (Molecular Probes) a una dilución 1:1,000. Para sondear la actina se usó anticuerpo policlonal primario anti-actina de cabra (Santa Cruz Biotechnology) a una dilución de 1:1,000. Al día siguiente todos los blots se lavaron tres veces con TBS-T por 10 minutos cada vez con agitación. Después, los blots se incubaron por 1 hora con agitación en anticuerpo secundario diluido en solución bloqueadora. Se usaron los siguientes anticuerpos policlonales secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (HRP): anti-ratón de cabra (Invitrogen, a una dilución 1:5,000) y anti-cabra de asno (Jackson, a una dilución 1:20,000). Después, los blots se lavaron tres veces más en TBS-T y se incubaron en reactivo Western Lightning Plus-ECL (Perkin Elmer Inc) durante cinco minutos, antes de ser revelados usando ChemiDoc XRS (BioRad).

Cuadro 2

Condiciones de pcr usando polimerasa Kod o Taq de acuerdo con el protocolo del fabricante

Polimerasa *Kod*

Paso	Tamaño objetivo			
	<500 bp	500-1000 bp	1000-3000 bp	>3000 bp
Activación	95 °C durante 2 min			
Desnaturalización	95 °C durante 20 s			
Apareamiento	Tm°C más baja del cebador durante 10 s			
Extensión	70 °C durante 10s/kb	70 °C durante 15s/kb	70 °C durante 20s/kb	70 °C durante 25s/kb
Repetición de los pasos 2-4	25 ciclos			

Polimerasa *Taq*

Paso	
Activación	95 °C durante 5 min
Desnaturalización	95 °C durante 1 min
Apareamiento	Tm°C más baja del cebador durante 30 s
Extensión	70 °C durante 1 min/kb
Repetición de los pasos 2-4	25 ciclos

Cuadro 3

Cebadores diseñados para la generación de construcciones de expresión doble y refadv. Las enzimas de restricción incorporadas en cada cebador están subrayadas

Cebador	Secuencia (5' a 3')	Tm	Enzima de restricción
pCI-Neo-F	GGCTCATGTCCAATATGACCGCCAT (SEQ ID NO: 22)	61 °C	-
EGFP-F	AAAAAAGAATT <u>C</u> ACCATGGTGAGCAAGGGCGAG (SEQ ID NO: 23)	58 °C	EcoRI
EGFP-R	AAAAAAGCGGCGCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC (SEQ ID NO: 24)	59 °C	NotI
EGFP-I-F	GAGAAGCGCGATCACATGGT (SEQ ID NO: 25)	58 °C	-
βactin-F	AAAAAA <u>A</u> CTAGTTGGTCGAGGTGAGCCCCACGTT (SEQ ID NO: 26)	65 °C	SpeI
βactin-R	AAAAAAGAATT <u>C</u> GCCCGCCGCGCGCTTCGCTT (SEQ ID NO: 27)	71 °C	EcoRI
L2R-F	AAAAAA <u>A</u> CTAGTCATAGTAAATATGGGTAAGTTCTTAATAGCCA (SEQ ID NO: 28)	55 °C	SpeI
L2R-R	AAAAAAGAATT <u>C</u> ATGGTTTGTATTGGCAAATTTAAATTAATGTT (SEQ ID NO: 29)	55 °C	EcoRI
Luc-F	AAAAA <u>C</u> CTAGGTTGGCAATCCGGTACTGTTGGT (SEQ ID NO: 30)	59 °C	AvrII
Luc-R	AAAAA <u>T</u> TCGAAGCCGCCCGACTCTAG (SEQ ID NO: 31)	58 °C	BstBI
SV40-F	GGCCTCTGAGCTATTCCAGA (SEQ ID NO: 32)	56 °C	-
WPRE-F	AAAAAAGCGGCGCTCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAA (SEQ ID NO: 33)	56 °C	NotI

WPRE-R	AAAAAAGCGGCCGCGCCCAAAGGGAGATCCGAC (SEQ ID NO: 34)	58 °C	NotI
VF1-F	AAAAAAAGATCTTACATGAATGACGCTGCTG (SEQ ID NO: 35)	53 °C	BglII
VF1-R	AAAAAAACTAGTAAATACACCGAGAAATACCACG (SEQ ID NO: 36)	53 °C	SpeI
VF2-F	AAAAAACCAATTGAAATAAAGACTCAGAACGCATTTTCC (SEQ ID NO: 37)	54 °C	MfeI
VF2-R	AAAAAAGGTACCCCCCGCAGAGAATTAAAA (SEQ ID NO: 38)	53 °C	KpnI
E1-F	ACATGAATGACGCTGCTG (SEQ ID NO: 39)	53 °C	-
E1-R	CCCCCGCAGAGAATTAAAA (SEQ ID NO: 40)	52 °C	-

Cuadro 4

Vectores y virus de este estudio y sus características clave

Nombre	Tamaño (bp)	Descripción
pHMR-CAG-EGFP-WPRE	9,484	Construcción intermedia para recombinación homóloga con pFAdV-9Δ4
pHMR- EF1α-EGFP	8,766	Construcción intermedia para recombinación homóloga con pFAdV-9Δ4
pHMR- EF1α-EGFP-WPRE	9,29	Construcción intermedia para recombinación homóloga con pFAdV-9Δ4
pFAdV-9Δ4	44,971	Esqueleto de FAdmid Δ491-2,782
pFAdV-9Δ4-CMV-EGFP	46,826	FAdmid que contiene CMV-EGFP en el sitio Δ4
pFAdV-9Δ4-CMV-EGFP-WPRE	47,35	FAdmid que contiene CMV-EGFP-WPRE en el sitio Δ4
pFAdV-9Δ4-CAG-EGFP	47,583	FAdmid que contiene CAG-EGFP en el sitio Δ4
pFAdV-9Δ4-CAG-EGFP-WPRE	48,107	FAdmid que contiene CAG-EGFP-WPRE en el sitio Δ4
pFAdV-9Δ4-EF1α-EGFP	47,389	FAdmid que contiene EF1α -EGFP en el sitio Δ4
pFAdV-9Δ4-EF1α-EGFP-WPRE	47,913	FAdmid que contiene EF1α -EGFP-WPRE en el sitio Δ4
Virus		
Nombre	Tamaño (bp)	Descripción
FAdV-9Δ4	42,772	Virus de supresión FAdV-9 (Δ491-2,782)
FAdV-9Δ4-CMV-EGFP	44,627	Virus CMV-EGFP recombinante

FAdV-9Δ4-CMV-EGFP-WPRE	45,151	Virus CMV-EGFP-WPRE recombinante
FAdV-9Δ4-CAG-EGFP	45,384	Virus CAG-EGFP recombinante
FAdV-9Δ4-CAG-EGFP-WPRE	45,908	Virus CAG-EGFP-WPRE recombinante
FAdV-9Δ4-EF1α-EGFP	45,19	Virus EF1α-EGFP recombinante
FAdV-9Δ4-EF1α-EGFP-WPRE	45,714	Virus EF1α-EGFP-WPRE recombinante

Ejemplo 2

Generación y caracterización de vectores virales fadv-9

Como se muestra en las Figuras 1 a 8D, los inventores hicieron experimentos para generar y caracterizar vectores virales FAdV-9 que incluyen virus de ORF0-ORF1-ORF2 suprimido con una secuencia codificante de mCherry y usando el promotor temprano nativo, virus de TR2-ORF17-ORF11 suprimido con un casete de EGFP insertado y un virus de expresión doble útil como un vector polivalente.

En el extremo izquierdo del genoma: del nucleótido 847 al 2753, se suprimieron 1906 nucleótidos. Esta supresión incluye ORF1A, ORF1B, ORF1C y ORF2. En el extremo derecho del genoma: del nucleótido 38,807 al 42,398, se suprimieron 3591 nucleótidos. Esta supresión incluye TR-2, ORF17 y ORF11. La supresión total es de 5497 bp; el tamaño del vector de supresión doble es de 39,567 bp. El gen ajeno insertado en el extremo izquierdo fue mCherry (SEQ ID NO: 3, 711 bp). El gen ajeno insertado en el extremo derecho fue EGFP (SEQ ID NO: 2, 1602 bp). Basándose en la regla de estabilidad de adenovirus de 105%, la capacidad del vector doble es de hasta 7751 bp, este podría estar en diferentes configuraciones, por ejemplo, en el extremo izquierdo es hasta 4160 bp y en el extremo derecho es hasta 5844 bp.

Como se muestra en las Figuras 2 y 3A, en el extremo izquierdo del genoma: del nucleótido 847 al 2753, se suprimieron 1906 nucleótidos. Esta supresión incluye ORF1A, ORF1B, ORF1C y ORF2. En el extremo derecho del genoma: del nucleótido 38,807 al 42,398, se suprimieron 3591 nucleótidos. Esta supresión incluye TR-2, ORF17 y ORF11. La supresión total es de 5497 bp; el tamaño del vector de supresión doble es de 39,567 bp. El gen ajeno insertado en el extremo izquierdo fue mCherry (SEQ ID NO: 3, 711 bp). El gen ajeno insertado en el extremo derecho fue EGFP (SEQ ID NO: 2, 1602 bp). Se realizó la verificación del FAdmid y los virus correspondientes (Figuras 3B y 3D) lo que mostró que la construcción era correcta. Por otra parte, se observó CPE de los virus recombinantes en las células CH-SAH; sin embargo, las células infectadas no muestran ninguna fluorescencia de mCherry lo que indica que el gen ajeno, en este caso mCherry, no está siendo expresado (Figura 3C).

Como se muestra en las Figuras 2 y 4A, en el extremo izquierdo del genoma: del nucleótido 847 al 2753, se suprimieron 1906 nucleótidos. Esta supresión incluye ORF1A, ORF1B, ORF1C y ORF2. El gen ajeno insertado en el extremo izquierdo fue mCherry (SEQ ID NO: 3, 711 bp). Se realizó la verificación del FAdmid y los virus correspondientes (Figuras 4B y 4D) lo que mostró que la construcción era correcta. Las células CH-SAH infectadas con los virus recombinantes mostraron fluorescencia de mCherry lo que indica que el gen ajeno, en este caso mCherry, está siendo expresado (Figura 4C).

Como se muestra en las Figuras 5 y 7A, en el extremo derecho del genoma: del nucleótido 38,807 al 42,398, se suprimieron 3591 nucleótidos. Esta supresión incluye TR-2, ORF17 y ORF11. El gen ajeno insertado en el extremo izquierdo fue EGFP (SEQ ID NO: 2, 1602 bp). Se realizó la verificación del FAdmid y los virus correspondientes (Figuras 7B y 7D) lo que mostró que la construcción era correcta. Las células CH-SAH infectadas con los virus recombinantes mostraron fluorescencia de EGFP lo que indica que el gen ajeno, en este caso EGFP, está siendo expresado (Figura 7C).

Como se muestra en la Figura 8A, en el extremo izquierdo del genoma: del nucleótido 847 al 2753, se suprimieron 1906 nucleótidos. Esta supresión incluye ORF1A, ORF1B, ORF1C y ORF2. En el extremo derecho del genoma: del nucleótido 38,807 al 42,398, se suprimieron 3591 nucleótidos. Esta supresión incluye TR-2, ORF17 y ORF11. El gen ajeno insertado en el extremo izquierdo fue mCherry (SEQ ID NO: 3, 711 bp). El gen ajeno insertado en el extremo derecho fue EGFP (SEQ ID NO: 2, 1602 bp). Se realizó la verificación del FAdmid y los virus correspondientes (Figuras 8B y 8D) lo que mostró que la construcción era correcta. Las células CH-

SAH infectadas con los virus recombinantes mostraron fluorescencia de mCherry y EGFP, lo que indica que los genes ajenos son expresados (Figura 8C).

La Figura 6A muestra un vector adicional basado en la supresión de ORF17 localizado en el extremo derecho del genoma de FAdV-9, como parte del desarrollo lógico y sistemático del sistema vector.

- 5 De lo anterior se puede observar que cuando es suprimido ORF0, el promotor temprano nativo no funciona puesto que no se observa la expresión del gen ajeno (por ejemplo, m-Cherry). Sin embargo, la expresión de genes reporteros ocurre cuando se usa un promotor exógeno (ajeno) (CMV) (Corredor y Nagy, 2010b). Cuando solo son suprimidos ORF1 y ORF2, el promotor nativo funciona y se observa la expresión del gen reportero ajeno.
- 10 La Figura 9 muestra los virus recombinantes basados en FAdV-9 con genes reporteros. Específicamente, esta figura es un resumen y representación lineal de las Figuras 4A, 6A, 7A y 8A, en donde la línea pFAdV-9RED representa la Figura 4A, la línea pFAdV-9-Δ17 representa la Figura 6A, la línea pFAdV-9-EGFP representa la Figura 7A, la línea pFAdV-9-Dual representa la Figura 8A.
- 15 Por consiguiente, los inventores han reemplazado exitosamente los ORF 0-2, ORF 1-2 y TR2-ORF 17-11 de FAdV-9 con genes reporteros. Se observó que el promotor nativo temprano del extremo izquierdo de FAdV puede manejar la expresión del gen ajeno. Además, se demostró que una supresión grande en el extremo derecho de TR2 es estable, contrario a los estudios previos. Por lo tanto, el FAdV-9 con supresiones en el extremo izquierdo y el extremo derecho de FAdV-9 se puede usar como virus FAdV-9 recombinante polivalente, y puede tener aplicaciones para crear virus de expresión doble adecuados como vectores de vacuna.
- 20 Los cebadores usados en este estudio se indican en el Cuadro 5.

Cuadro 5

Nombre	Secuencia (5'-3')	Localización	Propósito
ORF1-2Ver-F	gcacagtccaatggctt (SEQ ID NO: 42)	Pei et al.,2015	
ORF1-2Ver-R	aaattctggtccgttaccga (SEQ ID NO: 43)	Pei et al.,2015	
TR2-17-11VerF	GCCTACTCCTCAGCCTATCAC (SEQ ID NO: 44)	38163-38184	verificación
TR2-17-11VerR	CAGTCCTCTAACGAGCACGC (SEQ ID NO: 45)	43113-43133	Verificación
CAT-F	GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC (SEQ ID NO: 46)		verificación
ORF1CATSwal-F	ggacgtgcttaggtaattctctcg (SEQ ID NO: 47)	796-846	suprimidos
	Ttcttttccggttaggtgaggag (SEQ ID NO: 48)		ORF1, 1A,
	ATTTAAAT gtgtaggctggagctgcttc (SEQ ID NO: 49)		1B, 1C, RF20, introd. Swal
ORF2CATSwal-R	gcgttctgagctttattggtaa- (SEQ ID NO: 50)	Pei et al.,2015	
	actcgaaacacgcgtcacacgcgc- (SEQ ID NO: 51)		
	ATTTAAATcatatgaatatcctccttagttc (SEQ ID NO: 52)		
TR2-17-11CAT-F	ccccctggcgccggttgccgccactg (SEQ ID NO: 53)	38757-38806	suprimidos
	Caccgcgcgcggacttagtctct (SEQ ID NO: 54)		TR2,
	TTTAAAT gtgtaggctggagctgcttc (SEQ ID NO: 55)		ORF17, ORF11
			introd. Swal
TR2-17-11CAT-R	agtagagattataggaagcggggatta (SEQ ID NO: 56)	42399-42448	
	Tagtggtttttattaaacgaga (SEQ ID NO: 57)		
	ATTTAAAT catatgaatatcctccttagttc (SEQ ID NO: 58)		
ORF17CATSwal-F	tccccctggcgccgagggccgcca (SEQ ID NO: 59)	40511-40561	suprimido
	Ctgcaccgcgcgcggacttagtctct (SEQ ID NO: 60)		ORF17
	ATTTAAAT gtgtaggctggagctgcttc (SEQ ID NO: 61)		
ORF17CATSwal-R	gatacgaagaaggataggagcagaat (SEQ ID NO: 62)	41461-41502	
	Cgaggatacggtagtgactcc (SEQ ID NO: 63)		
	ATATTTAAAT catatgaatatcctccttagttc (SEQ ID NO: 64)		
EGFPcaSwal-F	<i>agctgc</i> ATTTAAATgtattaccgccatgcattag (SEQ ID NO: 65)	Pei et al., 2015	
EGFPcaSwal-R	<i>agctgc</i> ATTTAAATccacaactagaatgcagt (SEQ ID NO: 66)	Pei et al., 2015	
mCherry-F	<i>agctgc</i> ATTTAAATATGGTGAGCAAGGGCGAGGA GG (SEQ ID NO: 67)	???	amplificar mCherry

mCherry-R	<i>agctgcATTAAATCTACTTGTACAGCTCGTCCAT</i>	???	secuencia
	GCCG		codificante
	(SEQ ID NO: 68)		

Los sitios Swal están en mayúscula

Las secuencias en negrita son específicas del casete de cloranfenicol

Las secuencias subrayadas son específicas de pN1-EGFP, la localización se basa en pEGFP-N1

Las secuencias en cursiva son nucleótidos extra para digestión con Swal

5 Ejemplo 3

Resultados

3.1 Expresión de EGFP en células CH-SAH transfectadas

3.1.1 Clonación de construcciones de expresión doble

Se creó un sistema de expresión doble usando EGFP y luciferasa de luciérnaga (expresada bajo el promotor SV40) para comparar la fuerza de diferentes elementos promotores y potenciadores sobre la expresión de EGFP *in vitro*. El plásmido comercial pCI-Neo (Promega), que contiene el promotor CMV, fue el esqueleto para el sistema de expresión doble. Subsiguientemente se removió el promotor CMV (944 bp) usando digestión de RE con SpeI y EcoRI. Después de purificación del gel, fueron subclonados direccionalmente tanto el promotor CAG (1,701 bp) como EF1 α (1,507 bp) en el esqueleto pCI-Neo usando SpeI y EcoRI. El producto ligado se transformó en células bacterianas competentes y las colonias se seleccionaron y se cribaron por digestión de RE (resultados no mostrados) y se confirmaron por secuenciación. Este proceso se repitió con los promotores β -actina (285 bp) y L2R (120 bp). Los sitios RE para SpeI y EcoRI se insertaron en los cebadores y ambos promotores se amplificaron por PCR a partir del ADN plasmídico.

Una banda de 730 bp que corresponde a EGFP se amplificó por PCR con cebadores que contienen sitios EcoRI y NotI. El producto de PCR se clonó direccionalmente en cada plásmido promotor, se transformó en células bacterianas competentes y se confirmó por PCR (datos no mostrados) y por secuenciación. Finalmente, la luciferasa de luciérnaga (1,712 bp) se amplificó por PCR con cebadores que contienen los sitios de RE AvrII y BstBI. El ADN plasmídico, que contiene EGFP bajo el control de cada promotor, se digirió entonces con AvrII y BstBI para remover el gen de resistencia de neomicina, y la luciferasa se clonó direccionalmente en este lugar. La presencia de luciferasa en cada plásmido se confirmó por PCR (resultados no mostrados) y por secuenciación. Esto resultó en los plásmidos de expresión doble: pCMV-EGFP-Luc, pCAG-EGFP-Luc, pEF1 α -EGFP-Luc, p β actin-EGFP-Luc y pL2R-EGFP-Luc (Figura 11). Se generaron cinco plásmidos adicionales para incluir el elemento potenciador WPRE. Una banda de 543 bp que corresponde a WPRE se amplificó por PCR con cebadores que contienen un sitio NotI. Cada plásmido de expresión doble se linealizó con NotI y el elemento WPRE se clonó no direccionalmente en cada uno. La orientación apropiada se cribó por PCR (datos no mostrados) y los plásmidos se confirmaron por secuenciación, dando como resultado los plásmidos de expresión doble: pCMV-EGFP-WPRE-Luc, pCAG-EGFP-WPRE-Luc, pEF1 α -EGFP-WPRE-Luc, p β actin-EGFP-WPRE-Luc y pL2R-EGFP-WPRE-Luc (Figura 13).

3.1.2 Patrones de expresión de promotores, observados por microscopía de fluorescencia

Células CH-SAH se transfectaron con las construcciones de expresión doble para seguir los patrones de expresión de EGFP por 72 h.p.t. por microscopía de fluorescencia (Figura 14). La expresión temprana de EGFP se observó 12 h.p.t. con los plásmidos de CMV, CMV-WPRE, CAG y CAG-WPRE, aumentando con el tiempo los grados de expresión. Tanto la construcción EF1 α como EF1 α -WPRE empezaron la expresión de EGFP entre 24 y 36 h.p.t. y la expresión permaneció estable con el tiempo. Las construcciones que contenían los promotores de β -actina o L2R expresaron EGFP más débilmente en las células CH-SAH, empezando la expresión 36 y 60 h.p.t., respectivamente. Todas las construcciones se compararon con células transfectadas en falso (control negativo) y un control positivo de células transfectadas con pEGFP-N1 (datos no mostrados).

3.1.3 Expresión normalizada de construcciones de promotor

Células CH-SAH se transfectaron con construcciones de expresión doble y la expresión del transgen se midió durante 72 h.p.t. La fluorescencia de EGFP se midió por fluorometría en cada punto de tiempo, mientras que la luminiscencia de la luciferasa se midió usando un kit Pierce Firefly Luciferase Glow Assay (Thermo Fisher Scientific). Para analizar mejor la expresión de EGFP manejada por cada elemento promotor / potenciador y para minimizar la variación de muestra a muestra, se usó la expresión de luciferasa de cada muestra para normalizar los resultados (Schagat *et al.*, 2007). Los datos se analizaron calculando las veces de cambio de cada construcción, en cada tiempo específico después de la transfección, con respecto al promotor CMV (Cuadro 6). En la Figura 15 se muestra la expresión normalizada de cada construcción de 12 a 72 h.p.t. Doce horas después de la transfección se observó una disminución significativa de la expresión con las

construcciones EF1 α , EF1 α -WPRE, β -actin-WPRE y L2R-WPRE, en comparación con CMV. Las construcciones CMV-WPRE y CAG tuvieron una expresión más alta 12 h.p.t., sin embargo esto no fue significativo. Se observaron diferencias mayores en los patrones de expresión entre 24 y 72 h.p.t. En general, todas las construcciones mostraron disminución de la actividad con el tiempo en comparación con el control de CMV. Tanto 12 como 24 h.p.t., la construcción CMV-WPRE mostró un aumento de 1.047 en las veces de cambio sobre CMV solamente, aunque las diferencias no fueron significativas. Entre 36 y 60 h.p.t., el CMV-WPRE mostró veces de cambio ligeramente reducidas que varían de 0.851 a 0.922. Se detectó una disminución significativa de la expresión 72 h.p.t., cuando el CMV-WPRE mostró una cantidad de actividad de 64%, menor en comparación con el control de CMV, y esta diferencia fue significativa. Para cada construcción restante, la expresión fue significativamente menor que la de CMV en todos los puntos de tiempo, en donde $P < 0.05$. Las construcciones que contenían los casetes CAG y CAG-WPRE se expresaron consistentemente a una escala de aproximadamente 50% y 40%, respectivamente, en comparación con CMV, desde 24 h.p.t. Similarmente, se encontró que las construcciones que contenían los casetes EF1 α y EF1 α -WPRE tienen una menor cantidad de actividad en comparación con CMV, con una expresión en una escala de aproximadamente 20%. Las construcciones restantes, que contenían los promotores de β -actina y L2R, tuvieron una actividad menor de 10% la de CMV.

3.2 Generación de FAdV-9 Δ 4s recombinante

3.2.1 Clonación de construcciones de pHMR

Para analizar más la actividad de promotor y la actividad de WPRE en el contexto de la replicación de FAdV, se generaron FAdV recombinantes que contenían los casetes de expresión de EGFP más eficientes, siguiendo un método modificado de Corredor y Nagy (2010b). Un fragmento de 477 bp (VF1) a la izquierda del sitio de supresión FAdV-9 Δ 4 se amplificó por PCR y se clonó direccionalmente en pCMV-EGFP-Luc, pCMV-EGFP-WPRE-Luc, pCAG-EGFP-Luc, pCAG-EGFP-WPRE-Luc, pEF1 α -EGFP-Luc y pEF1 α -EGFP-WPRE-Luc. Subsiguientemente, un fragmento de 1609 bp (VF2) a la derecha del sitio de supresión FAdV-9 Δ 4 se amplificó por PCR y se clonó en cada plásmido, dando como resultado los plásmidos intermedios: pHMR-CMV-EGFP, pHMR-CMV-EGFP-WPRE, pHMR-CAG-EGFP, pHMR-CAG-EGFP-WPRE, pHMR-EF1 α -EGFP y pHMR-EF1 α -EGFP-WPRE (Figuras 16A y 16B). Por cribado de PCR y secuenciación se determinó que la clonación fue exitosa.

Las construcciones intermedias se sometieron a PCR o digestión de RE con BglII/BamHI para aislar los casetes de EGFP promotores flanqueados por fragmentos de ADN viral para usarse en recombinación homóloga con pFAdV-9 Δ 4 (FAdmid). Los FAdmid resultantes se generaron tras la recombinación homóloga: pFAdV-9 Δ 4-CMV-EGFP, pFAdV-9 Δ 4-CMV-EGFP-WPRE, pFAdV-9 Δ 4-CAG-EGFP, pFAdV-9 Δ 4-CAG-EGFP-WPRE, pFAdV-9 Δ 4-EF1 α -EGFP y pFAdV-9 Δ 4-EF1 α -EGFP-WPRE. Por secuenciación y cribado por digestión con NotI se determinó que la recombinación fue exitosa (Figura 17). El pFAdV-9 Δ 4 digerido resultó en una banda de 4 kb, 5.1 kb, 13.7 kb y 23.8 kb. Los FAdmid que contenían los casetes de CMV se identificaron por una banda diagnóstica de 2.2 kb que corresponde al promotor CMV más el gen EGFP y la cola poli-A de SV40. Los FAdmid que contenían los casetes de CAG se identificaron por una banda diagnóstica de 2.9 kb, y EF1 α por una banda diagnóstica de 2.7 kb. Estuvieron presentes bandas adicionales de 550 bp en FAdmid que contenían el elemento WPRE. Células CH-SAH fueron transfectadas con estos FAdmid para generar los virus correspondientes.

3.2.2 Cinética del crecimiento viral

Se comparó la cinética del crecimiento viral entre los seis virus recombinantes y la referencia FAdV-9 Δ 4 para determinar si la adición de algún casete de EGFP promotor afecta la replicación y crecimiento del virus. El título y crecimiento del virus de todos los recFAdV parecieron seguir un patrón similar a FAdV-9 Δ 4, excepto que FAdV-9 Δ 4-CAG-EGFP y FAdV-9 Δ 4-EF1 α -EGFP crecieron hasta un título medio logaritmo más bajo que la referencia, empezando 24 h.p.i. (Figura 18). Los virus crecieron hasta los siguientes títulos: FAdV-9 Δ 4 = 2.4×10^8 pfu/ml, FAdV-9 Δ 4-CMV-EGFP = 4.8×10^8 pfu/ml, FAdV-9 Δ 4-CAG-EGFP = 8.3×10^7 pfu/ml, FAdV-9 Δ 4-EF1 α -EGFP = 8.2×10^7 pfu/ml, FAdV-9 Δ 4-CMV-EGFP-WPRE = 3.1×10^8 pfu/ml, FAdV-9 Δ 4-CAG-EGFP-WPRE = 3.0×10^8 pfu/ml, y FAdV-9 Δ 4-EF1 α -EGFP = 3.7×10^8 pfu/ml. La aparición de CPE (Figura 19) y la morfología de la placa (no mostrada) de los recFAdV fueron similares a FAdV-9 Δ 4, ya que las células se redondearon y se separaron 5 a 7 d.p.i. Todos los recFAdV expresaron EGFP, como se observa por microscopía de fluorescencia.

3.3 Actividad de promotor durante la infección

3.3.1 Medición de EGFP por espectrofluorometría

La expresión de EGFP por recFAdV se midió entre 0 y 48 h.p.i. en células CH-SAH. Basándose tanto en espectrofluorometría como en microscopía de fluorescencia, la expresión de EGFP de todos los virus recombinantes fue baja hasta 12 h.p.i. Se observó expresión fuerte de EGFP entre 12 y 30 h.p.i. pero declinó después de 36-48 h.p.i. Las lecturas máximas de fluorescencia se midieron 30 h.p.i. para todos los recFAdV

(Figura 20). Las células infectadas con FAdV-9Δ4-CAG-EGFP mostraron el mayor aumento en la expresión de EGFP en comparación con FAdV-9Δ4-CMV-EGFP en todos los puntos de tiempo, variando de 12 veces (48 h.p.i.) a 29 veces (24 h.p.i.) de aumento de expresión. Las células infectadas con FAdV-9Δ4-EF1α-EGFP también tuvieron una mayor expresión en comparación con FAdV-9Δ4-CMV-EGFP en todos los puntos de tiempo, con una escala ligeramente menor de aumento de expresión de 2 veces (12 h.p.i.) a 20 veces (24 h.p.i.). Los virus que contenían un elemento WPRE expresaron EGFP en una cantidad más baja en comparación con sus contrapartes de promotor. FAdV-9Δ4-CMV-EGFP-WPRE fue el virus "de peor rendimiento", con una disminución de 2.4 veces (48 h.p.i.) a 17 veces (36 h.p.i.) de expresión en comparación con FAdV-9Δ4-CMV-EGFP. Aunque tanto FAdV-9Δ4-CAG-EGFP-WPRE como FAdV-9Δ4-EF1α-EGFP-WPRE tuvieron un rendimiento peor que sus contrapartes de promotor, en promedio ambos virus expresaron EGFP en una cantidad más alta que FAdV-9Δ4-CMV-EGFP. FAdV-9Δ4-CAG-EGFP-WPRE mostró un aumento de expresión que varía de 1.3 veces (48 h.p.i.) a 4.3 veces (24 h.p.i.), mientras que la expresión de FAdV-9Δ4-EF1α-EGFP-WPRE varió de una disminución de 2.5 veces (12 h.p.i.) a un aumento de 3.6 veces (24 h.p.i.).

3.3.2 Expresión de EGFP medida por transferencia Western

Además de la espectrofluorometría, la expresión de EGFP viral también se examinó por inmunotransferencia Western. Se recolectó lisado celular completo de células infectadas 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36 y 48 h.p.i. En cada punto de tiempo se separaron 10 µg de proteína total de cada lisado por medio de SDS-PAGE, se transfirieron al blot y el blot se sondeó usando el anticuerpo anti-EGFP (Figura 21). Se esperaba que la masa molecular de EGFP fuera de 27 kDa (Takebe, N., Xu, L., MacKenzie, K. L., Bertino, J. R., Moore, M. A. S., 2002, "Methotrexate selection of long-term culture initiating cells following transduction of CD34+ cells with a retrovirus containing a mutated human dihydrofolate reductase gene", *Cancer Gene Ther.* 9(3):308-320). En puntos de tiempo tempranos de 0 y 6 h.p.i., no se detectó señal de EGFP de ninguno de los recFAdV. Doce horas después de la infección se detectó una banda que corresponde a EGFP en el lisado recolectado de células infectadas con FAdV-9Δ4-CAG-EGFP, que se detectó hasta 48 h.p.i. Los lisados celulares recolectados de FAdV-9Δ4-EF1α-EGFP, FAdV-9Δ4-CAG-EGFP-WPRE y FAdV-9Δ4-EF1α-EGFP-WPRE también produjeron una banda detectable de EGFP 18-36 h.p.i. En contraste, no se observaron bandas de EGFP en los lisados infectados con FAdV-9Δ4-CMV-EGFP y FAdV-9Δ4-CMV-EGFP-WPRE en ningún punto de tiempo. Los controles negativos, el lisado infectado con FAdV-9Δ4 y el lisado infectado en falso no mostraron señal de EGFP durante todo el tiempo. Células CH-SAH transfectadas que contenían el plásmido EGFP positivo bajo el promotor CMV, pEGFP-N1, dieron una señal positiva de 12 h.p.t. en adelante. En cada punto de tiempo los blots se sondearon con un anticuerpo anti-actina para mostrar las cantidades relativas de cargas iguales de todas las muestras. La cantidad de actina pareció similar en cada punto de tiempo, sugiriendo cargas iguales; sin embargo, 48 h.p.i. no fue detectada actina en lisados infectados con virus.

Cuadro 6

Veces de cambio de la actividad de promotor en células ch-sah transfectadas, varias horas después de la transfección, con respecto al promotor cmv. Se determinó actividad significativa con un valor $p < 0.05$

Punto de tiempo (h.p.t.)	Promotor	Δ veces	SD	valor P
12	CMV	1.0	-	-
	CMV-WPRE	1.047	0.245	0.7526
	CAG	1.483	1.735	0.5506
	CAG-WPRE	0.479	0.370	0.0717
	EF1α	0.610	0.184	0.0015
	EF1α-WPRE	0.313	0.117	0.0005
	β-actin	0.772	0.418	0.2587
	β-actin-WPRE	0.357	0.097	0.0003
	L2R	0.566	0.528	0.1654
	L2R-WPRE	0.134	0.095	0.0001
	CMV	1.0	-	-
	CMV-WPRE	1.047	0.116	0.5177

Punto de tiempo (h.p.t.)	Promotor	Δ veces	SD	valor <i>P</i>
24	CAG	0.409	0.116	0.0001
	CAG-WPRE	0.294	0.039	0.0001
	EF1 α	0.156	0.076	0.0001
	EF1 α -WPRE	0.087	0.018	0.0001
	β -actin	0.074	0.042	0.0001
	β -actin-WPRE	0.042	0.043	0.0001
	L2R	0.028	0.016	0.0001
	L2R-WPRE	0.010	0.002	0.0001
36	CMV	1.0	-	-
	CMV-WPRE	0.894	0.156	0.3078
	CAG	0.560	0.331	0.0180
	CAG-WPRE	0.387	0.139	0.0016
	EF1 α	0.196	0.057	0.0001
	EF1 α -WPRE	0.124	0.063	0.0001
	β -actin	0.056	0.037	0.0001
	β -actin-WPRE	0.015	0.007	0.0001
48	L2R	0.014	0.013	0.0001
	L2R-WPRE	0.002	0.001	0.0001
	CMV	1.0	-	-
	CMV-WPRE	0.922	0.135	0.3758
	CAG	0.431	0.036	0.0001
	CAG-WPRE	0.303	0.050	0.0001
	EF1 α	0.187	0.063	0.0001
	EF1 α -WPRE	0.085	0.022	0.0001
60	β -actin	0.032	0.017	0.0001
	β -actin-WPRE	0.013	0.005	0.0001
	L2R	0.015	0.014	0.0001
	L2R-WPRE	0.001	0.001	0.0001
	CMV	1.0	-	-
	CMV-WPRE	0.851	0.123	0.1039
	CAG	0.572	0.257	0.1423
	CAG-WPRE	0.392	0.191	0.0053
60	EF1 α	0.254	0.054	0.0026
	EF1 α -WPRE	0.124	0.021	0.0001
	β -actin	0.033	0.007	0.0001

Punto de tiempo (h.p.t.)	Promotor	Δ veces	SD	valor P
72	β-actin-WPRE	0.015	0.004	0.0001
	L2R	0.002	0.001	0.0001
	L2R-WPRE	0.001	0.001	0.0001
	CMV	1.0	-	-
	CMV-WPRE	0.643	0.056	0.0004
	CAG	0.591	0.137	0.0521
	CAG-WPRE	0.434	0.164	0.0040
	EF1α	0.296	0.082	0.0067
	EF1α-WPRE	0.234	0.119	0.0004
	β-actin	0.030	0.002	0.0001
	β-actin-WPRE	0.028	0.018	0.0001
	L2R	0.002	0.001	0.0001
	L2R-WPRE	0.003	0.003	0.0001

Ejemplo 4

Otras modalidades de FAdV-9 recombinante

- 5 La Figura 22 muestra otras modalidades de FAdV-9 recombinante en donde los ORF1 y 2 están suprimidos en el extremo izquierdo del genoma y son reemplazados con HA de secuencias codificantes de H7, y en donde ORF19, ORF11 o TR2 están suprimidos en el extremo derecho del genoma y son reemplazados con un casete de HN, HN-IRES-HA del casete H5 o HA del casete H5, en donde un IRES (sitio de entrada de ribosoma interno) permite el inicio de la traducción a la mitad de una secuencia de ARN mensajero (ARNm) como parte del proceso mayor de síntesis de proteína. El IRES usado (SEQ ID NO: 41) es de un aislado canadiense de virus de encefalomiелitis aviar (AEV-IRES).

Aunque la presente divulgación se ha descrito haciendo referencia a lo que actualmente se consideran los ejemplos preferidos, se entiende que la divulgación no está limitada a los ejemplos divulgados. Por el contrario, se considera que la divulgación cubre varias modificaciones y disposiciones equivalentes incluidas dentro del espíritu y alcance de las reivindicaciones anexas.

15 Referencias:

- Huebner, R.J., Rower W.P., Schatten, W.E., Smith, R.R., & Thomas, L.B. (1956). *Studies on the use of viruses in the treatment of carcinoma of the cervix*. Cancer 9(6), 1211-1218;
- Cody, J. J. & Douglas, J. T. (2009). *Armed replicating adenoviruses for cancer virotherapy*. Cancer Gene Ther 16, 473-488;
- 20 Yamamoto, M. & Curiel, D. T. (2010). *Current issues and future directions of oncolytic adenoviruses*. Mol Ther 18, 243-250;
- Lasaro, M. O. & Ertl, H. C. J. (2009). *New Insights on Adenovirus as Vaccine Vectors*. Molecular Therapy 17, 1333-1339;
- 25 Buchbinder, S. P., Mehrotra, D. V., Duerr, A., Fitzgerald, D. W., Mogg, R., Li, D., Gilbert, P. B., Lama, J. R., Marmor, M. & other authors. (2008). *Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial*. Lancet 372, 1881-1893;
- McElrath, M. J., De Rosa, S. C., Moodie, Z., Dubey, S., Kierstead, L., Janes, H., Defawe, O. D., Carter, D. K., Hural, J. & other authors. (2008). *HIV-1 vaccine-induced immunity in the test-of-concept Step Study: a case-cohort analysis*. Lancet 372, 1894-1905;

- Cody & Douglas, 2009; Gallo, P., Dharmapuri, S., Cipriani, B. & Monaci, P. (2005). *Adenovirus as vehicle for anticancer genetic immunotherapy*. *Gene Ther* 12, S84-S91;
- Shashkova, E. V., Cherenova, L. V., Kazansky, D. B. & Doronin, K. (2005). *Avian adenovirus vector CELO-TK displays anticancer activity in human cancer cells and suppresses established murine melanoma tumors*. *Cancer Gene Ther* 12, 617-626;
- Barouch, D. H. (2008). *Challenges in the development of an HIV-1 vaccine*. *Nature* 455, 613-619;
- Sharma, A., Tandon, M., Ahi, Y. S., Bangari, D. S., Vemulapalli, R. & Mittal, S. K. (2009). *Evaluation of Cross-Reactive Humoral and Cell-Mediated Immune Responses among Human, Bovine and Porcine Adenoviruses*. *Molecular Therapy* 17, 113;
- Adair, B. & Fitzgerald, S. (2008). *Group I Adenovirus Infections*. In *Diseases of Poultry*, 12th ed, pp. 252–266. Edited by Y. Saif, A. Fadly, J. Glisson, L. McDougald, L. Nolan & D. Swayne. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell;
- Benkö, M., Harrach, B., Both, G., Russell, W., Adair, B., Ádam, É., de Jong, J., Hess, M., Johnson, M. & other authors. (2005). *Family Adenoviridae*. In *Virus taxonomy Eighth report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*, pp. 213-228. Edited by C. Fauquet, M. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger & L. Ball. San Diego, CA: Elsevier Academic Press;
- Corredor, J. C. & Nagy, E. (2010b). *The non-essential left end region of the fowl adenovirus 9 genome is suitable for foreign gene insertion/replacement*. *Virus Res* 149, 167-174;
- Ojkic, D. & Nagy, E. (2003). *Antibody response and virus tissue distribution in chickens inoculated with wild-type and recombinant fowl adenoviruses*. *Vaccine* 22, 42-48;
- Francois, A., Chevalier, C., Delmas, B., Eterradosi, N., Toquin, D., Rivallan, G. H. & Langlois, P. (2004). *Avian adenovirus CELO recombinants expressing VP2 of infectious bursal disease virus induce protection against bursal disease in chickens*. *Vaccine* 22, 2351-2360;
- Sheppard, M., Werner, W., Tsatas, E., McCoy, R., Prowse, S. & Johnson, M. (1998). *Fowl adenovirus recombinant expressing VP2 of infectious bursal disease virus induces protective immunity against bursal disease*. *Arch Virol* 143, 915-930;
- Johnson, M. A., Pooley, C., Ignjatovic, J. & Tyack, S. G. (2003). *A recombinant fowl adenovirus expressing the S1 gene of infectious bronchitis virus protects against challenge with infectious bronchitis virus*. *Vaccine* 21, 2730-2736;
- Chiocca, S., Kurzbauer, R., Schaffner, G., Baker, A., Mautner, V. & Cotten, M. (1996). *The complete DNA sequence and genomic organization of the avian adenovirus CELO*. *J Virol* 70, 2939-2949;
- Ojkic, D. & Nagy, E. (2000). *The complete nucleotide sequence of fowl adenovirus type 8*. *J Gen Virol* 81, 1833-1837;
- Corredor, J. C., Garceac, A., Krell, P. J. & Nagy, E. (2008). *Sequence comparison of the right end of fowl adenovirus genomes*. *Virus genes* 36, 331-344;
- Corredor, J. C., Krell, P. J. & Nagy, E. (2006). *Sequence analysis of the left end of fowl adenovirus genomes*. *Virus genes* 33, 95-106;
- Bangari, D. S. & Mittal, S. K. (2006). *Development of nonhuman adenoviruses as vaccine vectors*. *Vaccine* 24, 849-862;
- Ferreira, T. B., Alves, P. M., Aunins, J. G. & Carrondo, M. J. T. (2005). *Use of adenoviral vectors as veterinary vaccines*. *Gene Ther* 12, S73-S83;
- Corredor, J. C. & Nagy, E. (2010a) *A region at the left end of the fowl adenovirus 9 genome that is non-essential in vitro has consequences in vivo*. *J Gen Virol* 91(1), 51-58;

REIVINDICACIONES

1. Un vector viral de adenovirus aviar 9 (FAdV-9) recombinante que comprende una supresión de una región no esencial seleccionada de ORF19 y ORF17.
- 5 2. El vector FAdV-9 de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el vector comprende una supresión de ORF17.
3. El vector FAdV-9 de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el vector comprende una supresión de ORF19.
4. El vector viral FAdV-9 de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el vector comprende además una supresión de uno o más de las siguientes regiones no esenciales: ORF0, ORF1 y ORF2.
- 10 5. El vector FAdV-9 de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado porque el vector comprende:
 - i) una secuencia de nucleótidos con al menos 70% de identidad de secuencia con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, en donde los nucleótidos 575 a 2753 y 38,807 a 42,398 han sido suprimidos,
 - 15 ii) una secuencia de nucleótidos con por lo menos 70% de identidad de secuencia con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, en donde los nucleótidos 847 a 2753 y 38,807 a 42,398 han sido suprimidos,
 - iii) una secuencia de nucleótidos con por lo menos 70% de identidad de secuencia con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, en donde los nucleótidos 847 a 2753 y 34,220 a 36,443 han sido suprimidos, o
 - 20 iv) una secuencia de nucleótidos con por lo menos 70% de identidad de secuencia con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, en donde los nucleótidos 847 a 2753, 34,220 a 36,443, y 38,807 a 40,561, han sido suprimidos, o en donde los nucleótidos 847 a 2753, 34,220 a 36,443, y 41,461 a 42,398 han sido suprimidos.
6. El vector viral FAdV-9 de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado además porque comprende una o más secuencias de nucleótidos exógenas que codifican uno o más polipéptidos de interés, en donde la una o más secuencias de nucleótidos exógenas se insertan dentro de una región no esencial del vector viral FAdV-9.
- 25 7. El vector viral FAdV-9 de conformidad con la reivindicación 6, caracterizado además porque el vector es un vector doble que comprende dos secuencias de nucleótidos exógenas que codifican dos polipéptidos de interés.
8. El vector viral FAdV-9 de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado además porque comprende una secuencia de nucleótidos exógena que codifica por lo menos un sitio antigénico de una enfermedad de interés, en donde la secuencia de nucleótidos exógena se inserta dentro de una región no esencial del vector viral FAdV-9.
- 30 9. El vector viral FAdV-9 de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado además porque la secuencia de nucleótidos exógena:
 - 35 i) se selecciona de secuencias antigénicas contra influenza, laringotraqueítis infecciosa, bronquitis infecciosa, enfermedad infecciosa bursal (Gumboro), hepatitis, rinotraqueítis viral, coriza infecciosa, Mycoplasma hyopneumoniae, pasteurellosis, síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS), circovirus, bordetelosis, parainfluenza y cualquier otro antígeno cuyo tamaño permita su inserción en el vector viral correspondiente,
 - 40 ii) se selecciona de secuencias antigénicas contra influenza aviar, laringotraqueítis (LT), enfermedad de Newcastle (NDV), anemia infecciosa, hepatitis de cuerpos de inclusión, bronquitis infecciosa (IB), Metapneumovirus (MPV) y Gumboro, o
 - iii) comprende por lo menos una secuencia seleccionada de SEQ ID NOs: 10 a 21 o un homólogo de las mismas que tiene por lo menos 85% de identidad de secuencia a las mismas.
10. El vector viral de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, caracterizado además porque la secuencia de nucleótidos exógena está enlazada operativamente a una secuencia de control, opcionalmente a una secuencia de promotor.
- 45 11. Una célula hospedadora que comprende el vector viral de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
12. Un método para producir el vector viral de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, que comprende los pasos de:
 - a) proporcionar el vector viral FAdV-9 de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5;

- b) amplificar opcionalmente la secuencia de nucleótidos exógena;
- c) insertar la secuencia de nucleótidos exógena en el vector viral; y
- d) introducir el clon infeccioso así producido en una línea celular adecuada.

13. El método de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado además porque la secuencia de nucleótidos exógena:

i) se selecciona de secuencias de sitios antigénicos contra la influenza, laringotraqueítis infecciosa, bronquitis infecciosa, infección de la bolsa de Fabricio (Gumboro), hepatitis, rinotraqueítis viral, coriza infecciosa, *Mycoplasma hyopneumoniae*, pasteurellosis, síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS), circovirus, bordetelosis, parainfluenza y cualquier otro antígeno cuyo tamaño permita su inserción en el vector viral correspondiente, opcionalmente donde la secuencia de nucleótidos exógena se selecciona de secuencias de sitios antigénicos contra la influenza aviar, laringotraqueítis (LT), enfermedad de Newcastle (NDV), anemia infecciosa, cuerpos de inclusión, bronquitis infecciosa (IB), Metapneumovirus (MPV) y Gumboro, o

ii) comprende una secuencia que corresponde a por lo menos una secuencia seleccionada de SEQ ID NOs: 10 a 21, o un homólogo de las mismas.

14. Una composición inmunogénica que comprende por lo menos el vector viral FAdV-9 de la reivindicación 8 o 9 con una secuencia de nucleótidos exógena que codifica por lo menos un sitio antigénico de una enfermedad de interés insertado en la misma, que opcionalmente comprende de manera adicional un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o un adyuvante.

15. Una composición inmunogénica de conformidad con la reivindicación 14, para usarse en la generación de una respuesta inmunogénica en un sujeto.

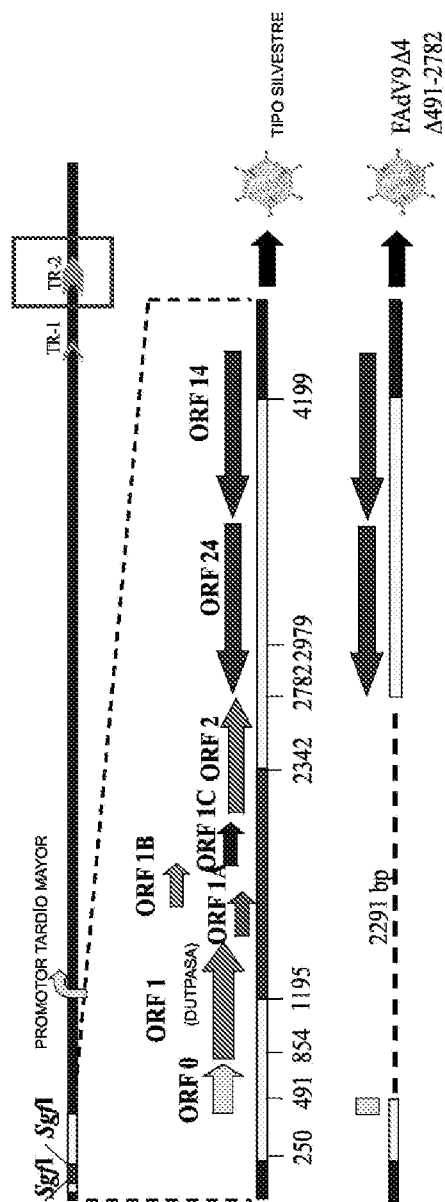


FIG. 1

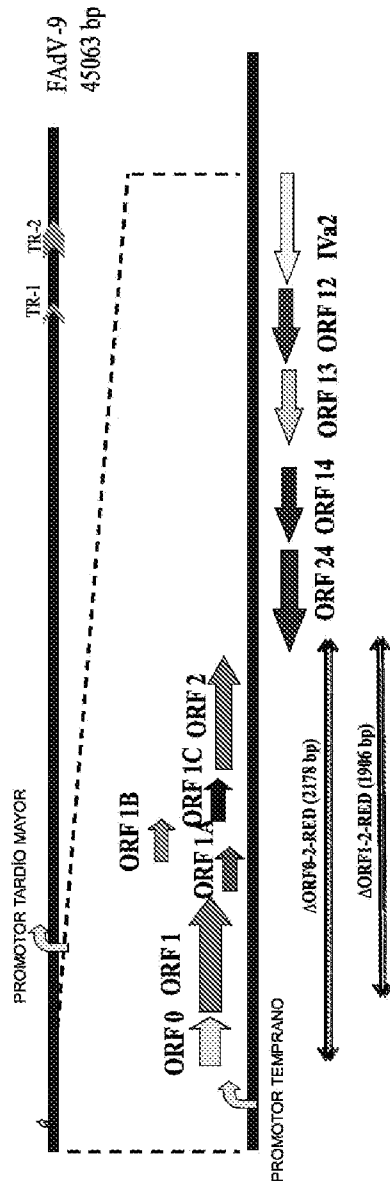


FIG. 2

FIG. 3A

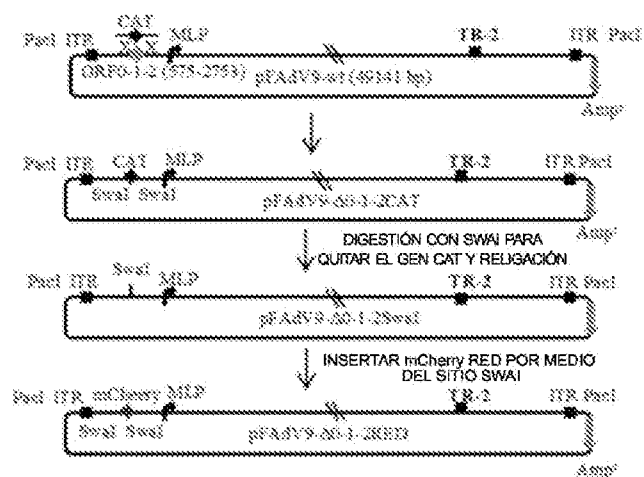


FIG. 3B

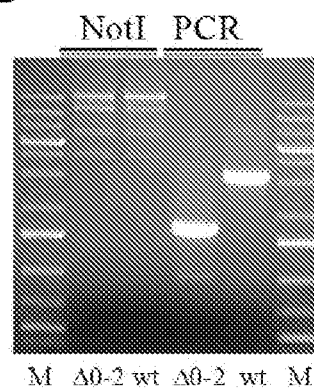


FIG. 3C



FIG. 3D

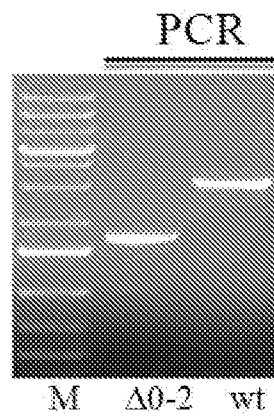


FIG. 4A

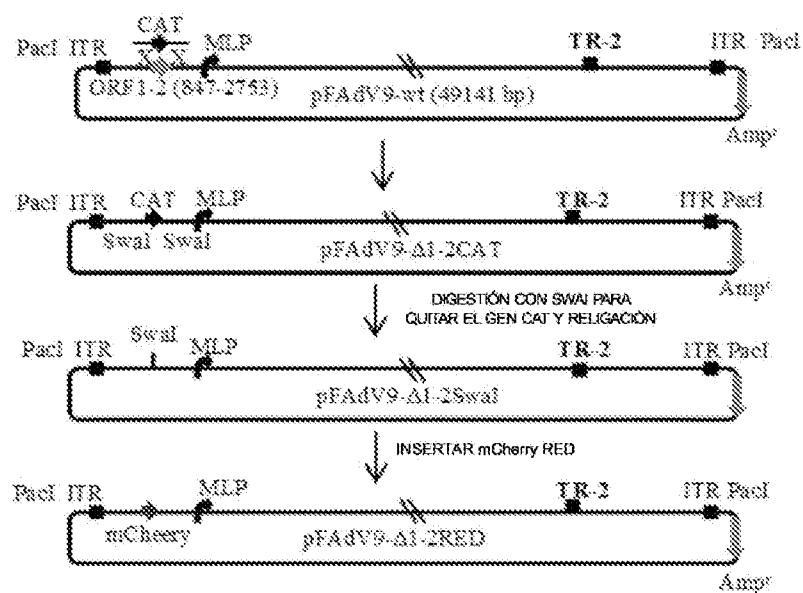


FIG. 4B

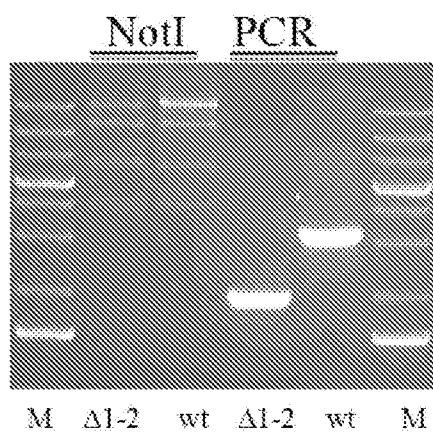


FIG. 4C

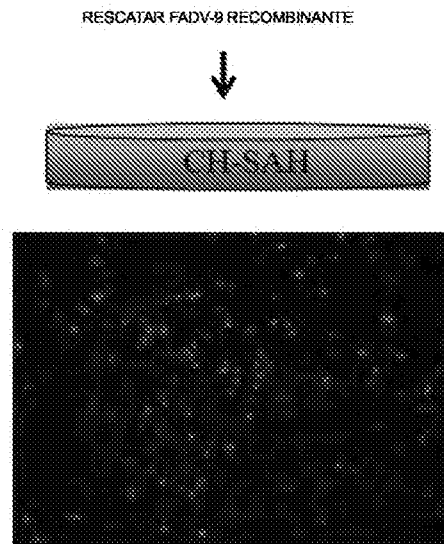
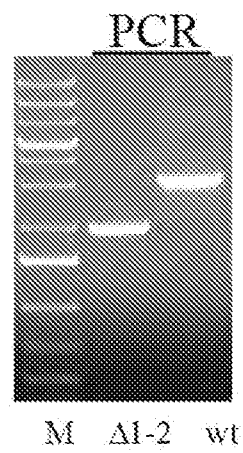


FIG. 4D



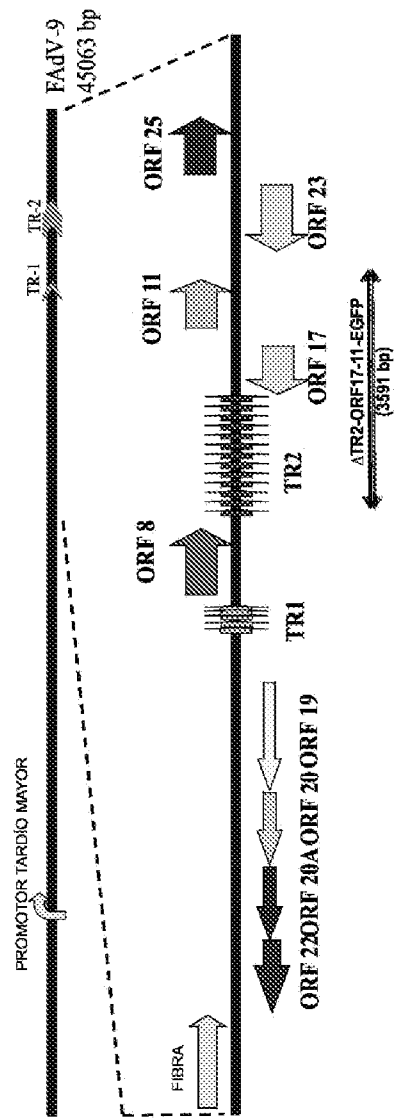


FIG. 5

FIG. 6A

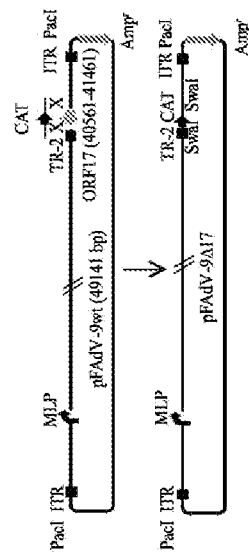


FIG. 6B

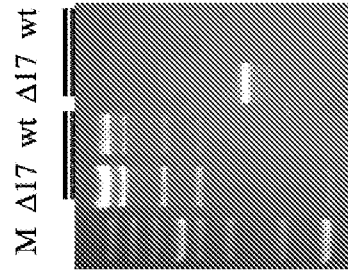


FIG. 6C

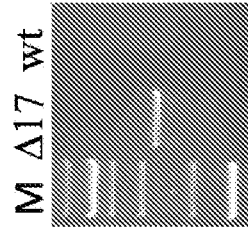


FIG. 7A

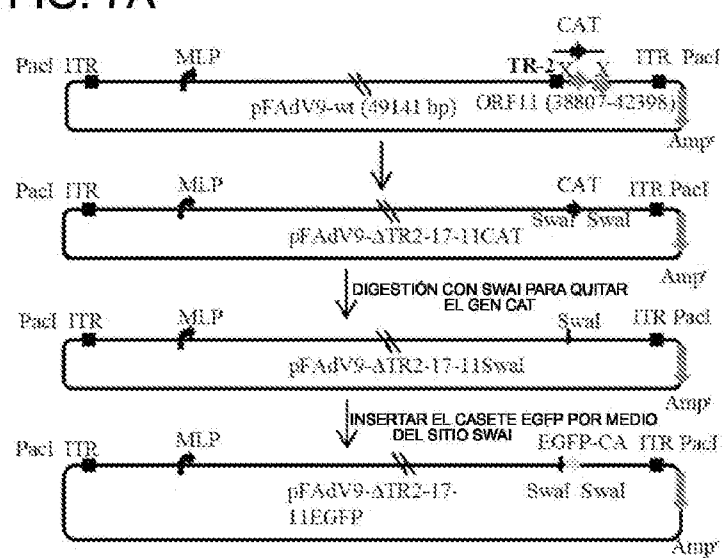


FIG. 7B

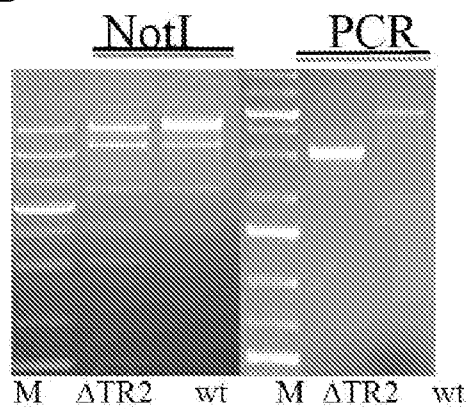


FIG. 7C

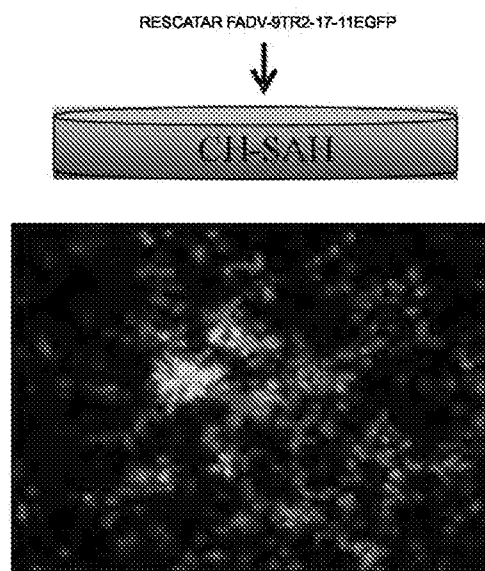


FIG. 7D

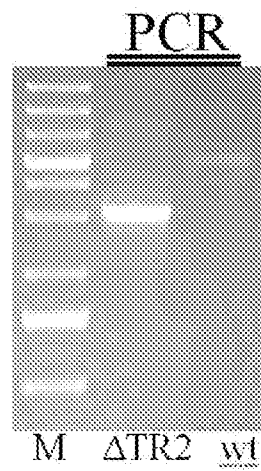


FIG. 8A

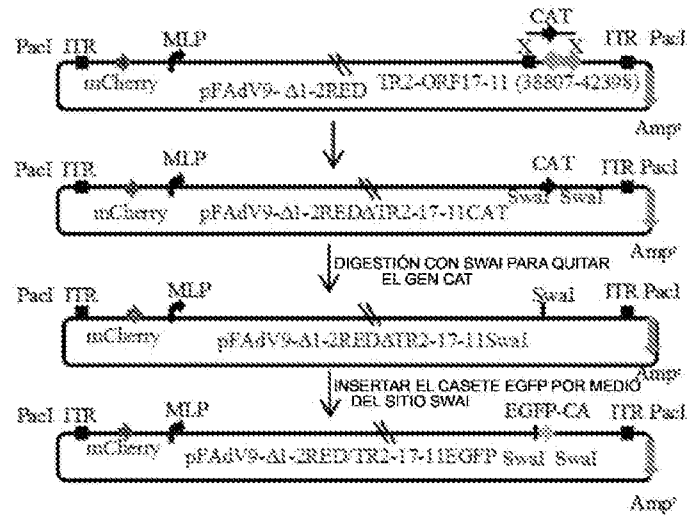


FIG. 8B

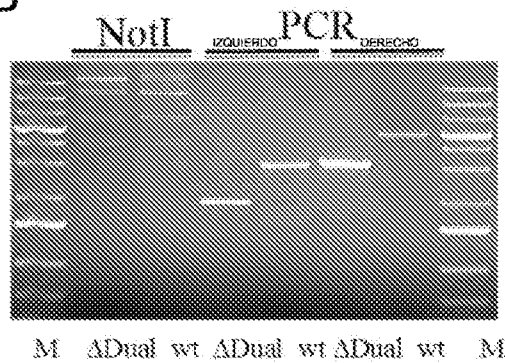


FIG. 8C

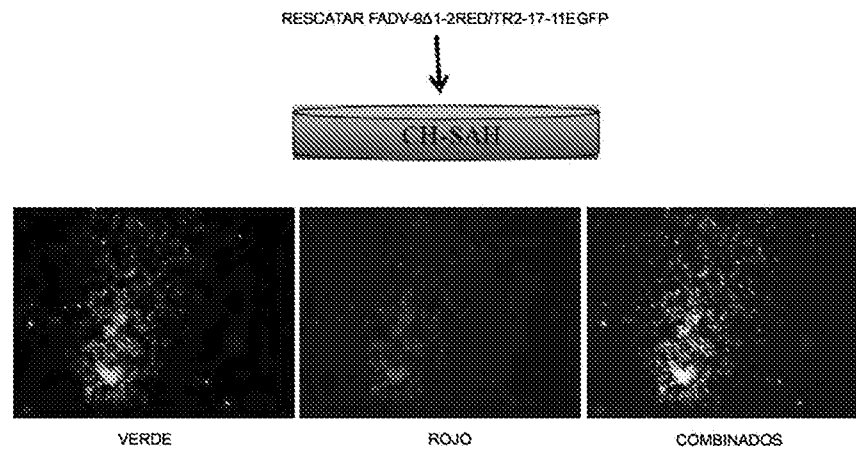
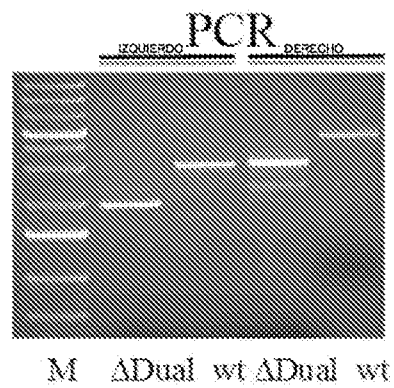
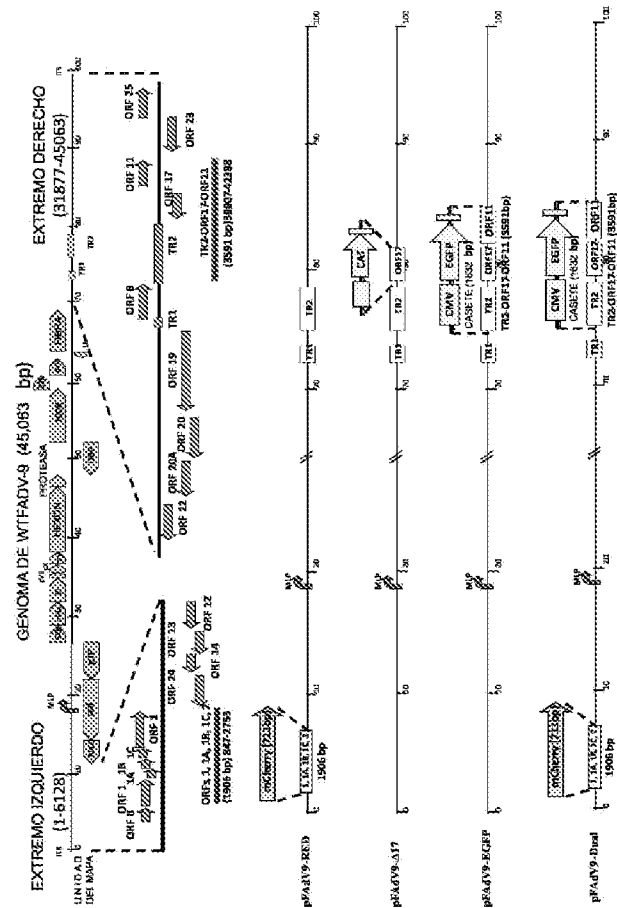


FIG. 8D





9
G.
L

FIG. 10A

FAdV-9 Genbank #: AC_000013.1

FAdV-9 FASTA (LAS REGIONES SUBRAYADAS PUEDEN SER SUPRIMIDAS: EXTREMOS 1200 ERDO: ORF1-ORF2, EXTREMOS
DERECHO: 172, ORF17 Y ORF18)

CATCATCTATATATACCTACATGAATGACGCTGCTGTCACTCGCACTACCGCTCCCGCCCGCTAGATGG
 CAAAAATTGCTCCACCAAGTATTTCCGTGATACAAAGTCGGACTGGGCGCGGGAATACGTGCCGGGGCG
 AGGCACGGAGCGGACTTTCTGGCACCAGATAGCAATAAATGGGCGTTCCCTTGGGTGCGGAATGCGCCGG
 CACAGTCCCAATGGCTTGGGAGCGGTCCAGAAAGCGATTAGTTTTTGGGTACGCACGCGAAAGCTATTTT
 TGCAGCACTTACTTCTTATTTGTTTACAACCGCTCCGCTGTGTGTAATTTAAAAATTGTACATACCG
 TTCCGATCGCGGTACTTGGGCTTGGAAACGGGACTTCGAGTCCCTAAAATGATTTATGGTGTCTTAAATCA
 GCCTTTTGTGCCACCTTGTCCGTTCCTCCGTGACCTTTGAAAAGGCGCTGCTATTTCTCGGTGTGT
 TTTCCGGCGGATTACGCGTTACGTGATCGTTTTATGGCGGGCTCCGGGCGTATAACAGTGGAGCGGCTGA
 TCCTCAGAGCACGGATGAGCGAGCAGCCGGACTCACCGCCGAGCTCTATCCGTCTCTCTGTGTCTCGCG
 GGTGAACCGGTTCCCGCTACTCCGTTCGTTTGGACATCAGCCGTTTGGCCGTGGTGGCGGAGCGCAT
 TTGCTGCACGACTTCCGAACGGACCCGTGGTCCGAAACGATTPGGTACGGGAAGATCACTCAGCGGAGC
 TGAAACAGGCGCTAGAGTCTATCGTGGACGTGCTTTAGGTAATTTCTCCGTCTCTTTTCCCGTTTAGGT
 GAGGAGATCTCTTTGATTCGGGTTGCCCCCGACTCCACCGGTAAGCTGGCTTCAAGAAAGCATTCCT
 CGTTTGCCTGACGCCCCAGCGTCTTACCTCCGGGCTGGCGGTTACGACTTGTGCGCTCCGGCGACCT
 GGTGGTCCCGCAAGAGCCGGTCTCTCATTCGAGCGGACTTTCTTTTCAATTCGCCCCAGCCGGTGA
 GGGCGCATAGCCCTCTCTTGGGCTTGGCGGTAAAGTTTTTATCGATGDEGAGCGGCTTATATCGATA
 CGATTACCGCGCATCTTACCGTCTCTCTTTTCAATTTTCGAGCAAGAAATTCACCTCTCTGTCGGG
 CGATCGATAGCTACGTAATTTGGAGCTCATTTGACGCGCGACTTGAAGAGCGATCGGGCTTAGAC
 GAGACGCCAGCGGTCAGTCCGTTTCGGTTCGCGCGCGCTTTCGATACAGGCTCTGCTCCCTCTCT
 TTTCTTAGAATTTACCGAGAGCGAGCGCGGAGCAAGTGGATTTCCGCTTCAACTGCGCGCGCTCT
 CGCGCGCATTAACGAGCGTACTCGCGGTTGCTTCCGAAACCGCACTCCGCGAAAGACCTCTTCTCG
 TCTCTTGGAACTGATGATCTTTAGGTAATATATTTCTCTTTCGACCGCTGGTGGTACGCTCTCTAA
 CCGCTGGGATCGTTTGTGTGCTCGCGGCTTACCGCTATTACCGGATCGCGAGCTCTGTGGCAAGTG
 CAGCAGATTTCCGCTCCGCTTTCGAGAAACAGCTCCGCTTCGGAAGAGGCTTCCCGCATCGCGAGC
 GTGAAGACCGTATTTGGGAGGAGCGCGGAGGCTTTGCGACAAATTCAGGACATCTCGATCGAAGATT
 GGTTCCTCGTTTTCGAGTCTTTTCGCTATTCTGTCTTTATCTGGCGGATGTCTTGGGATGCTTTG
 CGGCGCAGCGGATTTGATTTTCGGGGTTACTGGGACTGGTATTTCTCTGTTCGTAACCGGAGGCTCTCT
 TAATAAATGCTTTTCGTAACCTTAATTCGCGTTTGGCTTTTCTCTTTTCGACAGCGGATCTCTGGCTC
 GAGGATCTCTATCTCTCTCTCTGGAATCTCTGATAAATAGAGGATCTTGAOCTTCAGCAGTCTAT
 TTCACGACCGCTTCGAGTACGGGATTAACGAAACCGCTACAGAGGCGGATGAATTTGTCAACTTCT
 TCCGCGACCTGCTCTCTCATCTCTTCGACAAATGCTTGGCGGACTACATCTTACCCCGGAACTCGA
 CTCTCTCAATCAGGAGAACTCCGTTTATTCGGTGTTCGAAAAACGGCTACGATCCCGCTCTCTG
 GCTTCGATCTCTCTCTTCGCGCGCGCGCGCACTCCGAGCGCAATACCTTTCATTCAGCGGAGCGCGG
 TCAGCGGAGCTCTTACTTTCGCGGAGGAGATGCTTACTGCTGCGCGTGTATGACGCTCTCTGATTCGCG
 CAACAGCGAACTCTTTGAGAAGGGTTGAGCTCTTCTCTGTTTCTGTCGAGCGCGCGGAGCTCTCTG
 CAGCGCTGCTGCGCTTCTCTGCGAGCTCTTACGCGCGGAAAGCTCATGTTTCTCGGAGAGCGGCT
 AAATGACCGAATTCGTCTGCTACCGCGCT
 CTGGGCGCT
 CCGATTCAGCGCT
 SCATCGATTTGACT
 ATTTCTCCTCTGACCGATGCTTTTATTTGTTAAATTTCAACGCGAAAGCTTSCAAAACGATAGCATATG
 ACGACTAGCCTAAAGGGGAAGGTTTCGAGGTTGTCTTGGACGCGACGACACAGCGCATTAAGCTGTGTG
 TACCGTAGGAGGAGTGAATATCTCTGTAACCGCTCTCTATGCGGGATAAGCGTAATTTATTCGGGAC
 GCGCGGTTGGGTGAGCAAGTCTGTGAGAGGGGCGAGAGGGTTCAGGATGATGTCGAGTCTGTCCTGATTCG
 TCTCTCGGCGCGGCTGAGATGAGTAAGAGGTTCAAATTCGTAATTTAACGAGAGGATAGCGGTTCTCTG
 CGCGCTCTCTCTCAAGTACTCTACTTTATCAACCGATATGTCACACGACTTTGCTCGCTGCTT

ACACATGAGGCTGTAGGGATTGGTGCAGETGCAATCGTATCGGATTTCAGGCAAGGGGGATTGGCTGCTCG
 AGGTCTTCGGTAACGGACCGAATTTATTGTACAGACGACAGCGCCCTGCAATTCGGGCATGCTGTATT
 CGGGCAGTATTTCTTGAAGGTGACGGTGTCTTCTGGGGAACGGAAACATGCGTTCTCCGTGAAGAAA
 CTCTAAGAAAAAGATCTCAAGAGCGAGGTGACCGGGTCTTCCAGCTGGGCTTCTTTGCATTCTAGCGTG
 AGAGAGTGCACGCTGTCTCGCGAAAGAGAGAAAAATTACAGGAACACGGTGATGACGGGTACGGGAAC
 TTTGCATGAGTCTCAGGAAGCACGGTATGAGTGTSTAATCCCTGTGCGACCGCGTAACCGGATCGCAAT
 GTGTCCGTGACCACTTCTATCTTGGCGAAGGGTTTGGAGGAATACACGAATAGGTTGATGACCGCTCG
 ATGATTTTCGATGGGAGCTCTGCCGTGACATCGGAAGCGAGTCCGTGCAACGTTTTCGGACGTATTTGGTGA
 AATGGATGGGAACGGGTTTTCGGGATGGGGTACCGGGTGAGTTTGGCGTGGCACTCCATGGTGAGTGT
 GCGCGCTAGGGACTGACAAAAGAGCGAGAGCGGCTCTCGCACTCGCATACGTAGCTCGCGACCCATTCT
 CCCATCCATTTCGACCTCCGCTCTCTACGTCCGCTAATAGGTTGCTAATTTTAAAGAGGACTGGAAACG
 GCTCAGCTGAAACGGCAGGGATTTCGGGGTAAAGTAGGGCTCTGACCGATAGGGATACATGGATCTTCC
 CCATAGGAACCGCAGTAGATCCGATCGAAAGGGCCAGGCCGACACGACCCGCGAGGGGCGAGGGGAAT
 TTTACGGAGTAGACGTGTTCCGAGGTGTCACCGAGGTTGTCGCTGTCCTCATCTTATGTGAAAGTGGACG
 AATAACGAGAGGGAGACGAGATCTGCAAGAAAGAAAGTTTATTTGGGGGATAACTTTTTCAGTATTTCG
 GGAGAGTAGCCCGCGCAGTCTGACAAAGCCTGTTTTCGCGCTTGCAAGTGATGACCGCTGGCGAAGGTA
 CGGTTCTGGAGGTGACCGCGACAAAGTCTTTAATTCTCTCGGGGGTTGTGGCAGACGGGGTGAGCTC
 TTGGGGAGCCGTGAGGAACAGGATGGTCGAGTTTCTGCACAGGAACGAACAGGCGATAGAGAGCTGGTG
 CAATGGATGAGCATTTGGGGCGCTCTGACGAAGACGGGGCGACCGCGATGTAGCAGGTGCCCGAATTGC
 CCTCATAAAGTGTAGCCGCGAGCTGACCGGGCTCTGTGCGAGGAAGGACGCAAGTAGAGCAGCTGTG
 TTGGCGCAGCTTGGCTATCCGCTCTATGTCTGTGAGATCGCTATCTGAGATGGCCATTGGGAGCAGGAG
 GCGAGGAGCTGTGACAGCAGCTTGGCGTTGGCGAGGCGTCTCCGACAGGATGAGGCTATTGATCTCTC
 CGTTGAGCCACCGTTTGTATGTTGAGGGGCGACAGAGCCGCTGTATCCCTCTTTTTCGAGAGCTGTG
 GAAACAGTTCTCTTCGGGATTGTAGAAAGCGAGTCTGAGGGACTCGGGTTCTCTGAGGAGCTTGGGG
 TAGAGAGATCTGGAGTTTCCGAATCTTCTCGGAGGGCCCTAGGACGATTTCCGCTCTGCTCGCTCTGA
 GGGTGTACTGCTGTAGGCGGGCATCTGGTCCCAGTGTAGATCGGTGAGGATGCCGTCTCGGAAAGCCG
 TTCGATGAGCGCTCCATCTCGCAGCGCGACCTGTTGGTCTCTGAGAGTAGCGGAAGGAGCTCTTTTG
 TTCGATCGGGTGTGGGGGAGTTTCTGGGACGTAAGGAAGCGGAGAACTGCTCTCTGCTCTCTCCG
 TGCGCTCTTCTGCGACGGGGCGCGGAGGAGGAGAGGAGTACGATGTTCCGCTTTCGCTTACTCTG
 GAGAGAGAGGATATGATCAAACTTCTGCTTGCAAGGATTAACCGGGGGATCGATCCAGGCGGTGGAGCA
 GAGACTCCGAATCCTTTTCAGTCAAAATCGCGTTCCCTTCTGCTGCTCGCTATCTGCGCTAGGAT
 TGCAAGAGCTCGCTGGTGGAGGAAGGAGATTCCGTCGCTGTTGGCGGTTTCSAACTGGATGATGAGTGTG
 ACTTTGGCTTGTGCGTAGTTGCTCTGGCGCGGCGAGCTTGTGAGTGCACGACGCACTTCACTTCTCTC
 GATTTCCGAGCTTTCGCTGATGCGAGAGCTTGAAGCCCTGCCCCGAGCATTTTCGTTGACGAGTGGG
 TTTTAAAGGGCTACTCGTGTGAGGGGCGGGAGTAGATGAGTTAGTGACCTCTCGCAGCGGAGACCT
 ACTGGTCCGAATCGAAGTTGTTGACGTGCGCGGTGAGGACCGAGTGGAACTGCGCAAGATAGAGTTGGT
 AAAGGTCTCTGCGCAGGTGGAGGAGTGGCCACAATGTAGAGAACCTTGAGAGTGTGCTGCAAGCGCGAA
 AGCGTGTAGTCCGTGAGCCAGCGCGAGCATGTAGCTTAGGGTGACGAGATTGAACCCCTTCCCTTTCG
 CGAATCTTGGAGATGCTGCTGCTTCTATGTTGAAAGGGCGCGTAGGGCTATTGAGTAGGGTTTCTGA
 GAGGCTAAAGTTGCACTAGATTTTCTGGCTTCTGTGAGAGAGTATTTCCTCCACACCTACTCCGAT
 CGAGCGAATTGCTCCGATCCCTGAGACGCCATTCTCCTTCGGTGAANAATGAGCCTCTTTTGGAGCTGGT
 AGGCGACTTCCCGCGATTTTCGGGGCGCTTCGACCGCTTATTGCAACCCGTTTTCCTCCGACTCGEACT
 CTGGAGGGGAAGACAGGGGTTCGAAGACGGTTAGTTTAGGGCGCTTGGCGAGCATGTTTTCGCGAGCTC
 TGCGAATCGTATGATGAGCTTGGAGGCTCTGAAGAAATTTTCTCCACGTTGATGTTAAGGGCGAGGATC
 GGTACCGCTGATCGAGCACGACCGGAAACGAGTCCGAGACGGGCTCGGGGGAGTAAGTGAGCCAGC
 TGAATTTTGGTCTGCTGGAGAAAAGCGAAGTAGGCTTTGAGTAACACGACAGTCTTCTGCTGATGTT
 GTGGGCTAAGAGTAGAGAAAGCGGAGAACTGAAATTCGGGGATGTGGCAAGAGAGGATGTGTATTTTG
 GCGTGTACCTTAAGGCTCGGCACTTCTCTATGGCGGTGCGCGGCGCGAGATTGTGGAGAACCAGGAAA
 CGTAGAAAGCGGTACAGTTAGCGGAACGAGCGAAGAGCTTAGAGGGGAGAGCGTGAAGAGACGAGAGAC
 CCTAGACCCCGAGCAGTTTATCCATGCACTCGTCCATGACGATGGCCAGCGCTCCCTGCGCGGACCGC
 TTGACGTATACGTTGTCCGGGTGTCGATGTTGAGGTTTTCGGGCGAGGTTGCTTCTCTGATGCTATT
 CTACGAACCTCCGTCGGAAGGTGCAAGGTTCTGGCGCGAAGGTTCCGCTCTCTCTGAGTCTGATTTGGA
 TTCCAGAAAGTTGTAGGTTCCAGCGGTTTGTTCACCGGCGGGATCAATTTCTTCTCCGGCTTCACAAAG
 ATAACCGTTTCCGGGATCGGTTGCGAGCATATCGCAGGAGATCAACGCTCTGAGCAGATGGCTCTTGGCCG
 ATCCCGTCGGGCGTAGATGACCGCGATGACGGGCTGTGCGGCCATGTTGAGGACGGTAGTGTGCTCGTC
 GACGAGGTACCCACTGCTTCTGTTCTTGGCGTTCCACGGCTAGCTGATTTCTAGGAACCTTGTGCTCC
 ACTCCCGGAGACTGTAAAGTCTGCGAGCTGGGAATTTCTGTTGCGGAAGAGATGTGGGGCTAGST
 CGCGCGCTCTTCTGACAGCCCTTACCGGTTTGTAGAACTCGCTGCCGTAGATACTCTTCTCTCG

FIG. 10A (CONTINUACIÓN)

GTATGCGCCATGTTTCCCTCTTTTATTAGCGACGCGCCCGGCTCCGCTCCGCTCATGGTCTCCGAGAA
GATCCAAATTTTCCTACAGCTCTCGATAGACAGGCGCCGCTGGAGCGTCCGAAGTCTCCGAGCTCTCT
TCGCTGCTCTCGCGGACGATCTCGTCGCGCGCGCGCGCGGACGCTGACGGGGGCTAGAGTGTCT
TCGTCGCGCCACCGGGGCGACTCTCTCCGAGCTCTGCTCGCGCGCTCTCTCGCGGTTGGGATGTTCCGCTCTCTAGC
GTTAAGAAAGAAAGTCCCCGTTGGCATACTGCTGTAGGTCCTTCCAGGGTCTTAGGACTCTGGTGAAGCTGTGCT
GCTTAGCGATGCTGAACGGATCTGTATCCGCTACCTTCTGTAGGACCTGTTTGTAAAGTATGCTGCTGGC
CTGTGAAGCTCTCGGGAATPGCCGCTGACCGCGCGCTACGACTGGTCTTCTCGCTCTCGCCAGCGAGTCTTCCA
GCGTGTGCTATATAAGCTCCCGCTGTCTGTCTGCCCTTGGAGCSTATTTTTCCGCTTCCCAACGTGACCGCA
CTCGGGGTGAGACACACGCGGCTTGTGAGTCCGCTAGAGCTTGGGGCGCAGGAAATGCGTTCGAGAGCTG
TACGTGTCTCGCCCGCGACACGCGTGTCACTGTGATGTGCGATGCGAGGCCAGTGAAGCGCGGGTGTCTCGCG
GGCTGMACTGTGAGCGGCTGTGTGGGGGGCCCTGATGCGGTGCGCGGCTCTTCTTCATCGACGCGSATACCG
CGACTCGGTGACGAAGAGGCTGTCTGGTGTCCCGTAGAGGCTCTGSGGGTCCCTTGGAGTAGGTGTGTGT
CCCCATTCGGGTCCGTTGCGAGGATTTCCGACGCTCTCECTGAAGAAGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
AAGGATTTTGGCTGGGATATCTCTATTATTTGACCATTTTGTCTAAATTTTCTAGATGTAGAACGCTGAAG
CGCTTCTCGCGCGGAGCGTGCAGCAACCCCTGCGTGTGAAGAACGCTCTCTGTTGGGCGTGGCTATATGGCG
TGGTCTATCTCCGCTTAATAAGGCGGCGCTCGAGCGCTTCTCTGAGTGTGGTGTATGACTCTCCSCACGGG
ACGCTTCTCGAGCGGCTAACTGGCTTTTCGAGCTCTGAGTACTTGGCTTGGCTCTCTCTCGCTTCTCGTPTCTC
CTCTCTCTGCTCTCTGCTTTCTCTCTCTCTGCTGCTCGCGCTCGGGGGTTTCCGCTCAAACTACTGACGCACT
TGAATGATCTCTAAGCGGCTCGGGGTGCTTTGCGGGCAGACGACCGTCCCGCTACGAGTCTGTGTTGA
GCAATTCACGTCAGCCACGATTTGACTGCTTCTGATAGTGCGCCGCTGCTCTCTCGTGAAGTCTCTGT
TTCGAAGAGAGATGCGCGTGTGTCTCATGTTGCTGGGCGAGCGCGCGCTAGAGGGGATGTTGCTTAGCATTTT
GAGATGAGACCGCATTAACCTCGTTTTCTCTCATGCTGCTTCTCTTCCGCGGATGATTTTTTCTGACTGT
ATTGAGCGCGACGCGTTTTCGAAGCGCGGAACACGATGTTTCATGTGCTGCTGGAGGCGCGCTGACCGCGCA
CTGTCGCTTCTCTCAACGCTGAGGATGTCTATACCGGTGATGACTCTCTGCTCTGACGCGCTCTGCTTGTCTCA
ACGAGGCGCGCCCTCTCGCTTGAAGCAAAATGGAGCGAGCGGTGTCTAAGTGTCTCGCGCGGAGGATAAG
CCTCGACTTTTAGGATGCAACGCTTTCATTCTGCTGTGCAAGTACTGATCGGCTGCTTCTCGCAACTCATGAC
CTGCTGTGAGCTCTGCTCACTGTTTGGCATGTAATTTGGGCTCCAAAGGCGATCGCTCGGGGCACTCGGTCG
GTAGSGGCGGAGGCGCTACATACCGCATTTCTCGAAACGATATCGGATGCTCTGACGGCGTAGGACGCG
TGGGATTAACACCGCCCCCTCTGCAACGCTTGGCCGTATGATTTGAACAATGGGACGCTGCGGGGCGTATAT
TCTCGCGAGCTACTCGGGGAGGGAAGGCTCTTTTCTCTTTTGTGGTGTTTTGTGTGCGCTTCTGCGC
TCCAGCTCTGTGTACGTCTGCGCTCTGAGGGTTCGCCCTTGAATGCTGTTTCTTGAAGCGGACTTATCTTT
TGATCTTGAAGAGGGGCGCTCTGACGCTGCTGCGCGCTTCTGCTCTTGAAGCTACGCGGTGAAGGTAA
TGTCTTCCAAAGGCTGTGGGTGTGCTGCGAATCTCCCACTGTCTCGCGAGGAGATTTAAAGTCTCGCTGCAT
CCSAGTTCTGCTTTTGAAGTACTTGTCTTAACGTGCTGTACAAGGTGAGAGCTTAATTTCTGCTGACGCTTA
CGTCTGTGATGTGACTACTCGAGGACGCGCTCGACGATGCTGTATGAGGACGCGCGGTTGCTCTGCTGCGCA
TAGCGGCTTCTGTCTCGCGATGACGAAAGGATCTTCCCACTGTCTCGCGAGGAGAACCGGTGCGAGTCT
TGTTCTGTAAGCTGCTGCTGACTGTCTGCTGGCTGCGACGACTGCTGCCAGGATCCCTGCGGAGTGT
GGSCATACCGCGCGCGGCTTTTGGAGATTTTGGCTCTGCGCTGTGAATCTGCAAGCTCTCGCGTACCTGAA
TCCACGAAGAAGCGCTCGGGAGTCTGCGCGCGGACGACTCTCGGCCCACTCTGGAAGCGGCTGTGGGG
TCTTTTATTATCTGAGTTGGGGTTTGGGACGCTGGAGAGGAGCTGTTTAAAGAGGAGCGGCGCTTACCGCG
GCAATGAAGAGGCGCTGCAACGACGCGCTCGGGAAGACGCTGCGCGCTTCCACAGGTTCSGTGGCGAG
CAAGAGCTCTGCTGAACCTTGCAGATTTGTGTGCGAGCACGACGATGTGAAGCTTGTAAAGTCTGCTCGGG
AGTTTGAAGAGGCTGCTGAGGTTTGTGCAACAGTTGCTGAGGGGATGCTGATGAGGAGAAAGGATATTTGCTT
CGCTGTGAGCTTGTGCTGACTGTCTGCTGGCTGCGACGACTGCTGCCAGGATCCCTGCGGAGATG
TTGTTCGCAACCGGACCGGTAGGCTCGGGAACCGCGCGGCAACGAAGCGGCGCGCTGCTGAGCCAGTAG
AAGCGGCTTGTGAAGCTTTTATCTCCGGCTCAACGACGCGCGAGCTCGGCGCGCGCGCGCGCGCTGCGG
GATCGCCCTGTGAGCATGAACACAACATAAAGGGGTCGATACGTTTCTTTATTTCGAAGACGATATA
CGTCTCGATGTCGTAGGTGAGAAGAGTTCCTTACAGTGTGGGTTGCTGAGCGGGGCACTGCAACACGACG
TGTGTGCCACAGGTCGCGGCTTTTGGACCGTGTGGTGAAGAAAGCGGAGCGGCTTCTGTGTACAG
TGTGATTCGCGACCGAGTGGCTCTCGCAGCGCGGACAGGTTGACACGCGCTCGCGCTGAGTATCCAAAC
CCAGTCTCGCGCTCTGCTGTCTTGGGTGACCAAGCATGGGGGGAAGACACCGGATCTCTCGCGCTTCCGCGAC
TTGAGCTCTCGCGACGCGCTCTCGAAGCGGACGACCGCGAGCTAAGCGGCTTTGAAGACGCGGACGCTCT
CCGGGGGTTTCTTGGTAGTACCGTAGTCTATTCTATCTGTAATCGCGGACCTTCGCGCTCGCGCTGCT
AGSAGATTTGTGTATGCTACAGATTTTTCATGCGCTTTGTGAACACGCGCGCTGTCGACAGCGAAGCGTAT
CGCGCTCGATGTAGTAGACTGTGCGCGGACGAGGATCTCCCTTGGCGCGCTTGAGTGGGTCTTGCAAT
GTTTTGCGCTGAGCGCTTAACCAACGCGGCTGCTCTCTCGGTTCCGAGCAGAGTGTTTTCTAGCGAGGCGGG
GAGTACBCGCGACGCGGAAGAAGGAGGAGGTCAGACGACGAGGAGCTCATGCATGTCGAGGCGGCTGCGG
AGGACGACGAGGAGTTCCTGCTCTGCTGCTCTGACGACGCGGACGAGTGTTCCTGTGAGTGGGCTCTGTG
GCTGCTGATGTCGTAGGTGAGAAGAGTTCCTTACAGTGTGGGTTGCTGAGCGGGGCACTGCAACACGACG

FIG. 10A (CONTINUACIÓN)

CTGATGCCACGATGCCCGGAATTTCATGCCAAACCTGATGTGCATGGAGTCGATGAACTCTTCGCTGA
GATTTAGTTTGGTTTGGAGCACTCTTCGATGTCACCGCAACCGCTCTCTGTTTGAATATCGGAGAGANAATAA
GTGTTGGCTGGCTTCGTCGCATGCCCTTCGAATCGCCCGTCGGCTCTATCATCATAGAAAATCGCCGAGG
ATCCGCTTCCACACGGTTTCGAAAAATCGTCGCGGCTTAGATTGTTTCGCTCCAGATGCGTTTGAANAATAG
CGCTTCGCTTGGATCGCTCCCAACCCACGATCAGTACTTCAGGGTGGTAGCCTCTAGCTACCCGCGAACTCT
SCGCTTCGCGACGAAGTCGGATTAAGATATATACAGCTGGAGCGACAGCTGTTTCGCGAGAAAATGATG
AGCAACCACTTTCTAGAAAACGATTCCGTCAGCAGCGCCACGCTCGGCGCTTCGCGTTTCTAGGAGCACTCT
GTAAAAAGCTATCCGTGAATCGGAACAGCTGCTCTCTCGGGCGGGCCGAGAGCTTCGTTTCGACGGC
GTCAATGGCTTCAGACAGCGTCGGATGACTTCCTCGAGACAGCTTTCTCTTTCCTCTTCGCGGSGG
ATTTCTTCTCTCTCTCTCTCTCGGAAGAGCTCTCTCTCTCGGAGGGCGGGGGCGGAGCAACCGCTCTCTC
GTCTGATCTTTCGCGAAGACGCTGACGAAATTCGCTGACGGCTCTCCGCTGATGCCCTGACTTTCGCA
GGCGCTGATGGCTTCGCTTTCTCTCTCTCTGGTCTGATCCCGGCTCTCTCGGAGCGCTCTCTTCGCG
AGGACAGTGGCGCGCTCCGAGAGGGATCGCTCTCTCCCGCACCGCGCGCGCGCTCCGCTCACTCTCTCT
TCGCGGAGGCGAGTGGTACGAAACATCTCGCCATGGTCTCCGAGTCTCTCGGCTCTCTCTCTCTCTCT
ATCGAGTGGCGCTTGTTCGATCAAACTCTCGCTGTCTAGATCGCGGAACCGCGCTTCGAAGAGCGTGAGC
CAGTTTCTCTTCGCGACACATCTCGGATCCAGGTAAAGAACTATACCTGTTTTCGCTATTAAGATCTTCG
CGCGTACACAGATAAATAGTTGGCAGACAGCTCGCAACCGCTATCGCTTCAATAAGCTCGCTCT
GTCTCTCGACGCGCGACGATGATATGTCTGTTTTCGAAACCTCCCGCGCGCTACCGAGAGAGTGGCTCT
CGCGCAGCAGCGAGCGCGCTCCCTCTCTCCCGACCGCCAGCTCTCCCGAGCGCGGACGCTCGA
ACCTCTGCTCGCATGCAAGCTGCGCATCTCGCGAGGCGATTCGTCATACAGACGCGCTTGTGTCAT
CTCTCTGAAAGCTCTCTGCTAAAGTTTTCGAGTCTCCAGAACTCATGTACCGCGCTACGTTGACGACATG
GAGCATCGCTGAGCAGCTTCGAGAAAGCTTCTGCTGGCTCGCTCGCGCGGAGCTTCTCTGACGAGTT
GCTATGAAGACGCGATTTCGAAAAAGTAATCGTTGAGCGCGCGCTGCATCTACTGTTAGCAGGACGAGG
TCGCGCGAGGAGCGATCTGCTATCGGGTATCCCGCGACGCTGGCTGGCTTCGGCTTGAGCTGAGCTCTGAGT
TGCATCAATCTTTAGCTCTAGATCGGCTGACGAGAAACGCTGTTCGGGTGTACGAGCGCGCTGAGT
TCTTGACCATGSGAAAGTCGAGCGGATACGGGTTGACAAAAATCGAACGCTGTTTAAAGCTTTGACCGGT
GAGCTCCGCGAGCACTCTCTAAGCTCTGAAATGAGCGCTGACGCTTATAGAGAGGGCTCTTCCCAACG
GAGAGACGATGACGCTCGCTATCCAAACGCTTCSGAACGGAGCGCGGGCGCGCGGAGGACCA
CACCTCTACAGCATCAGCAGCAACACGCTGCACACGCCACACCAACAGCAACGCGACCGACGACGCG
TTCCGCAAGCGCGCGCGAGCGAAACGCGCTCCGCGCTCCCAACCGCTCCGSCAGTACCGCGCGACGACG
GCTGCGCTCTGCTCGCTTCGCGCGAGGCTCTCGCTCGCGAGCGCGGAGGAGCTAGTGTCTCCGTTTCG
GGCTCGCGCGCGGAGCGGACGATGACAGAGATTGGAATTGCAAAACGGGAAAGCTGCTGCGCGAGCGA
TTCGCGAGCGAATTTGTTTAAAGCGAGCAGTACGAACTCGGAGTCCGCAAAACGATTAAGCATAGGCGAGG
GTACCGGCTCGGSGACGGGATACAGCGTTAACCGGGGTCCGCTGCTGACGCGGACGACTTCGCGTACGAT
GAGGAGCAGGAGCGGCTTCTACGCGGGGTGGGAATCACTTTCGCGCGCGCGGAGCTTGAAACCGCGCGCG
GACGAGACCGGTTTCGGAAGCACTGCGCAACGACTGCCAACACGCTTCGCTACGCGCTTGACCGCTTGACCG
TCCGAGCTGCGCGCGGGGATCTACTACCTGTACGACTTCGTCAGACGCTAGCTGATCATCCGACGGG
CGAGTTAAGTTTAAACCGCGAGCTGTTTTCGTTAGTGGCAGACGCGCGGCGATACCTGCTCTGCCAACGAT
TCTGCTCGATGCGGAGGATTAAGACGCGCTGCTGCTGCTACCTGATCAGATGCGCTAGCATGCTGAT
CGATCTCTACTTGAGCACCGGAGCAGCAATTTGTCGCGGATATGCAACGCGCTGTGCTGGATTGAGCATGAAT
TACGCTAAGATCGCGCGCGACGAGCTTATCCGTCAGTGGCGAGATGGCTAAGGCGCAAGATTTCTTT
ACCGGCTGATGAGAGAGCTTTTACGCTTTGGAAGTTTCAGTTTGGGCTGTACCAACACCGCTCGGTCGCGTT
CCGTGAGAAACGCGCATCGCGAGATCCCTCAGATGTCTGACCGCGCATACATGTTCTGGTTTGACCCAGGCG
CTCGAGAACAGGCTCTCTCAGGGGCAATTTTCCCTCGGACGAGGAGCATTCGAGCGCGCGCGGAGCGG
AGGAGGACCGCTACGATGAGCACTACGAGTCTGTTTATGCTTTTGGCCGCTCTGSGTTCGAGAGGAATGG
CGGACGCTTTAAGCTCTGCGCGGAGCGGCGGAGCGGCTTCGCTTTCCGCACTGCTCTGCTCTGCAACGCT
TTTCTTTAAGTTTGAACAGCGATGCTTCGCGCGAGATGACGAGTACTTCGAGAGCTCTGCGCGAGTGG
GTTAGCGGTTTGGCCGAGCAGGGCGCCATTTATCCGACACGATCGGGGCCATACATTTCCGATCTGCTAA
ACCGCGCTACGCTGGAGATTCGATGGGATGCAAGAGAGATACCGGCTTGGTGAAGACCTGATTTACA
CGGCGAGAAACAGGCGCTCGAAGACGAGCTTTCCGCTACCCGCGATCGGACAGCGCTGCTCTGTACCC
CAATTTCTGATAGCATTTACAAAACGCTGGACGAGGCGGCTGACTAATTTGAGGGATTTAAAAGCTGCT
TCGGCTTTTCTGTTAAACCTCCCTAACCGCGGAGTCTACGCTCTCGGSGGTTCTGTTCACTGCTGCAAT
CAACCTCGGAGGACGAGCGAGCGCACTCAATTTGACTACCGCTTCGAAACATTAAGGACATATGGGGA
CGCGCTTTGGGAGCGGCTTAAACATCCCGGATAGGAGCGCTGCTGCTACCGCCCAACACCGCGGCTTACTGT
TTTCTGTCAGCGCTCTTCTACGATTACGSGGCTATGAGCGCGGAGTCTACCTGGATACCTGAGATT
GTACAAGAGGGCATTAGGCGGATACAGCGCGGAGGAGGAGCGGCTGATGAGTTTGGGCGAAGCGGGA
GCCACCTCAATCTGCAATTTCAACGATACAGAGATACCTGTAATCACTCTGCTTACGCTACGATACGCT
TTCGCGATACCGGCGCGCTGATATTGAGCGAGAGCAGGAAATGCTTTTCCGCTATCTCATGATGCTCACT

FIG. 10A (CONTINUACIÓN)

AAGGCAAGCGCTGAAGGACAGGATTCCCTTCGACGCTTTCGTTGAGCACGATGGCCCAACAGTGGACCGC
CGCCCTTTATCAGACCAATAGGCTTTTATCGAAAGCTTCAAAACCTACGTTTGGCCGCTACACCGCCCA
ATCCCAATCTTATAGATCGATTGGTATGGAATCGAGACTGCGGCTCCTCCGCGCGGCTTCACACGGGTAA
CTACGCTCATACCGGAACGCTGCCGTTTCGATTATTACGACGGCGACAGCSTAGTTCGAGGCGCCGTCGCCGA
GACGAGTACTTTCGASGAGTATCCCTACGCGAGTAAACCGTACAAAAGATGACGCGTCCGGAGAGGGCCG
ACTACACGAGSACGCTTGATTAATCTAACCCACGAGATAGATACGGCTTTGGCGCTGCATCCGAGCGGCG
ATGGCTTAGCCGATACCCGCTTGCCTCCCAACGCTTCGATGGTGCTTTTGAATCTACGCGATTCGGCGCGATC
CCGTTTACCCGCCAGTCCCTCCGATCAATCGATGGCTTCGAGCGCGGCTAGCTCCCTGTCGAGCGTAGGCG
ACATGATGTTCCGCGCTGAACTTATCGGGCGAGGGGAGCGGGATTTTTCGAGGCTCAGACCGACCTT
AGGAAGCCCTAGACCTTTCTAGACGCGCACACTTACGGAATAGGCTTTGGCGCTAGAGGGCAAGGCGCTG
GGCGCGGCTTACAGAACGCTTCGGCTCGCGCGGATTCGTCAAGCTCCGATTTCGGTACAGAGGGCTTTGGCG
CGCGGCTCTATCGCGCACGGGAAAGGCTGCCGTTTTACTAGCCTAGATTCGTAAGAAACGGAACGCAAC
AGGAAGATCGCGGAGGTGTACAGGAGCACTTACCGCAATTCCTTACAGACGATGCTTGGTACACGACT
TTTGCTTTCCGCGAGCGGCTTGAACCGGGTTTCCTTTCCTCTTCGCGACTGATCGTCCGGCGCTT
TCCTCTTTCGCCCTGTGTTCCGGCGCTGCCCTCCGACATGGCTCTCAACGCTTACCGCGGACGCTGCACGGA
TACCCCTCCGGTGATTCGCCCATAGACTCCGCGCGGACGACAGCTCCGAATGTTTCGTTTCGGTTCGAGA
GGGTGATCGCGCTACCGGCTGGAAGGAACAGATAAAGTACCGGATACCGCGCTGTCAAACCATATC
CAAAATGCTTCTACCTGGACAATAAATGAGGACATCGACACGTTCAACCCCGAGCGGATACACAGCAAT
TTCGGAACCCACCTGATCCATAATCAGGATCTTGATCGCGCTACCGCGCGGACCGGACCATCCAGCTGG
ACAATCGATCCTGCTGGCGCGGGAAATGTAAAAACCGCGCTGAAACCAATTCGCCGAGCTCAAGTTCGTT
TTTCCAAAGAAATACCGTGGCAGTAAGTGTATGATGATACCGGATCCGGTGGCTCCAGCGACGCGAGCT
CCCAAGCGCCCGACGATCTACGCTCCAGCCGCTCTCACTAAAGTGATGACATCTTACAGATTCCCGAAG
GCAATTACGCGCTTACACGAGATCATCGACCTGCTGAACGAGGGAGTCGTGCAAAATTTATTTAAAGAGGG
ACGGCAAAACACAGCTGCTCGGCTCCGACATCGGCTAAAATTCGATACGCGTACTTTTAACTGCTTCAG
GACCGGCTGACGGGCTTGCTGCTCAGCCGGGACGTTAGCTGTATAAGGCTTACCTCCGAGCTGTGTAAGT
TCCCGGATGCGCGCTAGACTTTACTTACAGTTCGACTAAGTTTAAATGTTAGCGATAGCGAAACGCGAAC
GATTTCCGAAGGGTTTTCATCTACTTACGAGATCTTCGAGGGGGTAAAGTTCGCCCATCTGCTAGACGTG
GAATTCGCGCAGATGACCGGCTGCATACAGCTGATCGAGTTCGGCGACGCGAAGSACCTTTGTAAAG
ACTCGAAGGGCGTGTCTATAAGCTCATTTAGCACTCTAACAAACCTTCGGCTACGCGCTTATCGGTCTTG
GCTTATTCGCTACAAACCAATCGGTTCTACGGCAACGAAACGCACTTATTGACGTTTCCGAGTGGGG
GGAGGACATAGGAGCTATPACATCTATTCGCCGATACGTTTTCGGCGCTTACCGGCTTACAGGAAGATA
ACAGCGACBAACCTTCCGCCGCTGTGGTGGGACATGAACCTTTCGCGCGCTCAATTAAGTTTATTAACAGG
CGGCTCCACTTACGTCGACACATCGGAAATCTCTGTCAGTCGGGACGCGCGCTTAAACGGTTTCCAC
GAGAACGAAATTTCTTAAGCAAGTCTCCCTATTAACTGTGAGCGCTGTGTGATAACCAACCGCGCTCG
TTCAGAGGGGGTGTCCTCGTTGAAGATCTTTTCGGCGCTTGCACCTGTGCTCATATACGAGCAGCA
ACGTCGACCTTATACCTACGTAATAAGTCCCTGGCTACGCTTCAACCTCGGTTGTAGACGATCCACT
TTACAATAAACACACTCAAAATCCAAATCGTCCGCGATTCGTGAACCAATGTCCATTTCTGATCTCTCC
CAACGCAACAGAGGTTTGGGCACTGCTGTCGCCCTCTGCTTATCGCTGGGCTCGGATTCGCTGTCGCGG
TGACGCTGCTACCTGCTCGGCTGGGTACAGCAGCGACGGAAGAGCGCGGCTCGGTCGACGACAG
CGGCTTCCCGCGCCCTTCTTACCACTACTCGGCTAATCGTGGTACGTAACGCCCAAGAGGACACTT
AACCGCTCGAGGTGCAGTGGAAACGCAATCGGAAGCGAGGATGAAAAATGAAAGGAGAGGAGGAG
AGGACCGCGGCTTCATTTTCTTACGCTGTGTTTAAACATCTGTAATCGGCTGTACCGGACAGCGCTGT
AAATAAATGAGAGAAATTTGCGCAACGGAATGAAAGACACTGATTAATTCGCTTACCGTTCGCTGTA
CTACGACGAGGCTGCCCAACTCATCGCGGAGTACTGCTTACGGCGGCGCAACAGCTAGACTAT
CGGAGGGCGTCAACCGCTTCCCGCGCAAGACTCCCTGCTTCAAAGTACGGGCGACCGCTGACAGCGCG
GCTCATGTCACGCTGATAGAAAGAGCTTCGCCGCAAGCTGGCTGTGGCGGATAGCGCTGCCCATCTACGCG
CTCGCTTCCGCGGACGCGCGCTGCAGACTTATGCTACGCGTTACAGCGAGGCGAGTTTATACGCTTGG
CGTTTCGCGCAACTACCGCGCCCTTCGCGCTCCGAGGCGCGCTTGGCGCTGCTCAAGCGCGCGACCCG
CTACGGGCAAGGACATGACGACGGGAACGCGCTACGGGCTTCGCTTTCAGGTTCCGGGATCGGCTGT
TTCACGAGAGAGAGAGAAACGCTGTACGCGGCTGAAACGCTGCGCGGAAACACGATGAAGGCG
GGAATTTTACCGCTCTCATACCATCTTCGCGGCGCTTACGGGCGATTCCCGGAATTCGCGCGGACGCG
CTCTCGGCACTTGCAGTTTGAAGAAACACACGACAGACTTCATAAGATGTACAATCAGAATAGAGAG
AGAAAGAGAAAAACCGCGGCTTGGCGGTGTCTTAAAGCGCGTTTCAATAAAAATTTTATAGAACG
GCTGTCGCGCGCTGCTTTCGCGTTTTCCTGCTGCTGCTGCTGCGAGAGTGTGCTATGATTAACCGCGCG
TTTCTCGCGACGCTGTGTGTGGCGCTGCGAGACGGAATCTCGGAGCTCTPAGCTTCGAGGGGGTGTG
TATCAATTTGGTTCGAAGCTGGGCTCTCTGCTTCGAGGCTTCGGCACGGCGGGCGGCTGCATGTTTAA
CGGGAATCCGCTTTCTCAATTCCTCAACAGCTTCGGCGAGTCAAGCAGGCTTAAAGGACGCGAGATGA
TCCGTAACCTTCGGAACCTTGGCGCGGAAACCTTAGGGCTCTTACGCGATAGGCTTCGTTGAAATATG

FIG. 10A (CONTINUACIÓN)

ACAAGATCTAGGAAGCTTCGCCGTAAGGCCCTGGGAGAGGACGGACCCGCCACTCAAGCCGAGTTACAG
 GCATTGATCCAGGCGTTGCAAGCCCAAGTCGCCGCGGGGGAATCCGTTCCCACTACCGCTCCTACGGTAG
 GGCGTTCCGGCTCCCGCCGGAAGTGGCTCCGACCGACAACACGCCCATCCCGAGATGGTCACGGAGGTAG
 GCCTCGCCGTGACGTCTCGGCTCCCGCGGTGCCGAAACGGACCGCGGACGCCCTCGAAATGCGTCT
 CCGCCCCGGAAGAGGAGGAGAAAGAGGCCAGCCCCGGATCGTGGCGTACTCGCTAAACAGCCTTTCGG
 GAAACGGGGTCCGAGTTAGCCGCGCTCCGATGTGTTATTGACCTCTCGATAAAAAAGCGTGGAGATGAAA
 AAGGCATTAAATCGTATCTATCGGATTACCAAAATTTAGCATGTGCGCGTTTTTTTAGGTGATCCGCC
 CTCGGCTCGCGCTATGGCCCGCTTACACCCGACCTGACCACCGGACCCCGCGGTGCACTACTTTCAC
 ATCGCCGCTCCGAGCACCCCGGAATACCTGTCCGAGGACCTTCAGCAGTTTATCCCGGCGACTGGAAGCT
 ACTTTGAATGAAAAACAAGTTCAGGCAGACGGTAGTCGCCGCCACTCGCAATGTCAACCCGAAAAAGGC
 TCAGAGGCTTCAGATCAGGTTTTACCCGACGACGACCGACGACACGCCCAACAGTTACCGCGTGGGTAC
 AGTTTAAACGTGGCGACAGTTGGCTTCTGGACATGGGAGCCACTACTTCGACATCAAGGGCGTCTAG
 ACAGAGGACCTTCTTTTAAACCATACGGAGGAACCGCATACAATCCCTCGCGCCCGCGAAGCCTTTT
 CAACAATTGGCTTGAATCAGACGCCGAACAAGACCGTCATTACGGGCTTAATGACCAACCCCTTACCGAAAC
 GACCAAGGGAACAAGACCAATACTGCTGACGTAGTTAATAGCGTGTGCGGAGTTTATCCGAAACCCCAATC
 TCGGACCTGTCATCAGCGAGATGGGAGCACTGATGATCAACTGCTGACCTTGTGCGCTTTCGCGGACG
 GTTTGCGAAAGTTTACAACGAGAATACGCGTTTGGCATACGGAGCGTATGTGAAACCGTTGAAAAACGAT
 GGTTCGCGAGTCATTAAACCCCACTCTTACTGGGTAAATGGACAAGACTGACGCCAAGTATCTCGCGGTGA
 TGGCGGTGGAAGAATTACGACCCAGTCTCACCTATCCGGACAGCTTGTAAATCCCTCGCCCTCGGACFA
 CTCAACCGTTAACACGGGCGCAATGAAAGCAACCGTCCCTAACTACATCGTTTCAGAGATAACTTCAT
 AATTTGCTATATCATGATACGGGCGTGTGCTCAGGTACTCTCAATTCGGAACGCTCCGGAATGAAGSTG
 TCGTAGAATCTCAGGACAGAAATACCGAGCTAAGCTATCAATACATGTTAGCTGACATGATGTCGCGGCA
 TCCTACTACGCTCTGTGGAACCGGCGGTAGATCAGTACGACCCAGACGTTAGGGTGTCAATAACGAT
 GGCTACGAGAGAGGAGTACCAACGTACCGCTTCTCTCCGAGGCGACGGGATATGGCGCTAATCTCAAT
 CTAACTGCTGTTTTGCTGACGTGAAAGTGCATCAAAACGGGCGGCGACAAAGGAACAGAGATTAACAC
 GGGAGGTGCAACTTACTCTACATACTTAACCGTGGGAAGTGTGCCATCTTATGAAATCGATCTGTCTGCT
 TCTCAGCGGCGAAACTTCATAGTGTCCAATATTGCCGATTACCTGCCCGATAAGTACAAGTACAAATATTG
 ATGGTTTTAAATCCCGAGACGGGTAAAGTACGCTAGACCTACTACATACGAATACATGAACCGCAGGGTTCCACT
 TACCAATGTAGTAGATCTATTACAACTATCGCGCCAGATGGTCTATAGACCAAGTGGACAACGTTGAAC
 GCATTCATACCATAGAACTGGGGCTCTGAAGTATAGGTCCGCAATTGCTCGGTAAACAGTAGATATTGCA
 ATTCACCATTCAGGTTCCACGAAATATTTGCTATTAAGAACCTGTTGCTTCTCCCGGAACTTACAC
 CTATGAATGGGTGCTGAGAAAGGACCCCAATATGATTTCTACAGTCCAGCTTGGGGAAACGATCTGAGAGCC
 GACCGAGCTCTATTGTATATCTGAGGTGAACCTAATGGCGAATTTATGCGCTATGSGATCACAATACTA
 GTAACCGAGTTGGAATTGATGATGAGAAACGCTACCAACGATCAACGTTCCGAGACTACCTGGGAGCTAA
 GAATCCGCTTTTACAGGTTCCAGCGCGCTCCACTGCCTTACTATTAAATATTCCAGCGCTACATGGGAG
 GGGATGAGGGGTTGCTTTTTACACGTTTCAAGGCTTGTGAGACACCTCAATCGGTGCTCAATATGATA
 TCAACTTCAAGTACTCCGTTCTATTCCGTACTCGGATGTAACCTTTTATCTCAGGCACACGTTCCAGGA
 CATGAGTGATTTGTCATACGTCTATCAACTGGCCCGGCAATGATCGGCTTCTGGACCCCAATCTATTTC
 GAAATCAACGTAACGTCAGGATAAATGCCGAAGGATTCACCATGTCCAGTGCAATATCAAGGACT
 GGTATCTTATCCAGATGGCGACCAACTACAATTATCTATTAAACGGCTACAGGTTCTGGCGGACAGGCA
 ATATTTCCACTACGATTTTCTGGGAACTTTGACCCCATGACCTGTGAGGACCTAACTTCCAAGATCAA
 ACTTTATTTGATCTCATGAGTTACGATCCAGTGCAGACTCCCGGAGCGTTCCAGACCAACCAAGACCTA
 TCCGTAACAATTCGGTTACACGGCTCCTCGCAGCTGGCGGTATACGGAGCAACAGGGAGAAATCGTG
 GCCCGCAATTCGCGGTATCCGCTTATCGGTGACAGCTCACTCAATCCTACCCAGATAGTAAATTACAAA
 AAGTTTTGTGTGATAATTACCTGTGGACGTTCCGTTCCAGTCCGACTTCATGTACATGGGTGAATTTGA
 CCGACTTAGGGCAAAATCCCATGTATACTAACAACTCTCAGCATGGTTCATAAATTTCSAACTGGATCC
 TATGGACGAAATACTTATGTATATATGCTTTATGGTGTGTTGATATGGTAAGAGTTAATCAACCCGAA
 CGGAACGTTGCTCGCAATGGCTTACTTCCGTACGCCCTTTCGCTACAGGCAACCGCGGTGTAACAAACCTGAT
 TAAAAAATGTCCGGACACCGGAAGCCAGCTGAATCAACTAGTCGGGGCCATGCACCTCCGCCATCGAT
 TCCCGGGGCTTTCGACAAAACCTTTCCCGGCTTCTCGATCCCAACCGCCCTGCTCGGCCATCGTGAA
 TACCGGCTCTAGAGCGACCGGAGGTATGCACTGGATAGCTTTCGCGTTGATCCGATCGCGGCAAAATGC
 TACTATGTCGATCCCTTCGGTGGTCCGATCGGGAACCTGTGGAAATTTGTACAAAGTGAAATATGACGCTT
 TTCTCAGAGAAGTGGATTAAGACAACCTGATAAATGTTTTGAACTCGTACGTTCCGTCGAAGCGGTTC
 ATGTCCGTGTTCCGCGCGGTGCGGACTTTTAGCGCTCTTTTATTGCTTCGTTGATCGCTACCAACCC
 CGTCCGATGATGTAATCCCATCATGATACGGTCTGTCGGCGTAAACACTCCGACATGTACAAACCCG
 AATTCAGAGCATTTTCACCGGAACCGAGGCGAATGATTTCTGGTTTATGAAAAACAACCTTTTTF
 TCGCGCACCAATCGGAACGAAACCGCAACCGCCATCAACAGCGTTCCCGAAACCATTAAGACATT
 ACACCTCTGTAAATTTCTATATCTGTATTTTTTATTTCGCAATTCGGACAATAAACTACATTTATTTTC

FIG. 10A (CONTINUACIÓN)

48

GCGGCTTACTTCCTCATGAATCAGCGCGGATACCTATGGGAACCCCTCCGAGAGCGATCCGGAATCTCCGC
 AATTTAGAGCTTACTGTCCCTGCAATCTGTGCAGCCCTCATCGAATGTTAGCAGACAACTGGCTCTGCA
 CAACGAAGTCTCTGCGCATCGGTACCTTTGAGATCAGAAGCGCGGATGTTAAACTTTTAACTTACCCCG
 GAACTATGGGCAAAATGCTTACCTAGATAAATTCCTGGCCGATGACTTCCACCCGTTTACCGTTTTCCT
 ATTCCGAAAACCGCTCATCTTTTGGCAAAACATATACCGCTTGGCTCAUGGAGAGCCCCGAAATCTTATC
 GCTGATTGCGCCAGATACAGGCTCCAGGCGAGGACTTCTGCTCACCCGGGGCAAAGGAGCTACAAAGAC
 CCACAAACCGGGAAACGCTAGCCACTTCGGCGCGGAGCGTCCGCGAGGCTCGACCTCGAGCTGCCAGGG
 GGTGCGTCTTTACCGTCCGCTCCACCGGTGCGAGCGGAGGAACTCCAGCGCGGCAAAAGCCTCCCTAGGG
 CTATACGGGCTGCCGATCAGATCATCTCCGGAAGACTCGGACATACCAAGCGCGACTACGGGGAACCGCTC
 TTTATCAATTCATCCGACTGGCGATATGGCTCAGAGAATGCTCGACGGAAGACCCAGAGTAACCGGAAGA
 GCCACCCCGCGCTCCGAAGAGACCGAGCTCCCTTCCATACAGACCGGCTGTACCGCGCACGGGAAGCG
 ATCGAGTCCGACGGCGAACTCTAGGAAGCCAGGATACGAGGAGGACCTGAGTACCATCTCCGAGGAGG
 AGGAAGAGGAGACTTACGAGGAAGCGGAGAAGGAGAATATACCTCCGTCGAGGGGGCATCTCGAAAACG
 CCGCTCCGCTCTCCCTAGAGAAGACTCTCCCGAGACCTCCGCTGAGAAAGAAATCCGCAATTAACCT
 GACGACGCTAATGCCAAGGGCTTAGAAAACGTCGCGCTAGAGCTAACCTATCGCAGCTGGGTGAGACAC
 CGGTGGCTATCTCTCAAGCTCTACCGGATCGGCTATTCCAGCCGCAAAATGGCTGCTGAAATCTCAAAAG
 ACTCCACCGGTCTCTGCTGCTCTACTCTCTTAGGCTATTACGCTCGAAAACCTTTAGATCTTACCGAC
 GAAGACTCTGATCGTGGCTCTCCCTTTTTATGTTCTTAGTGTCGACGATGCCGTAACTGACGGAAGAGC
 CGGTCCACCGCTCTACCTCGTAAACGCGCGCTAGGGCGAATAAGGAGGAACCGAACCGCTCTGAAAC
 ACAGCTTCCGGAACCGCTATCCCGCAGCAGTATCTGATTGAAAAGCCGAAATATTGAATCTGCTCGTTGAA
 ATCGAAAGTTTCTGCTCGTAAAAACCGCTCGCGCGCGCTCTCGATTGCAACCGTACCGCGAGAGCAFTA
 CGCGCCAGCTGCACTCATGAAAGCTGAACAAACCTACCAACGCTTAAGACAGATCGCGAAAATTCCT
 ACAGCTGTGGAGATCCCTTTTCATAATCCCGCTCTCTTTATAGCCCTCCGCTGCGCTTCAACATCATGAAC
 CTGCTCSACCCACCGCTACCGAGTACCTGTGGAATACAAACCGCTCTCAGCAATTCGCCCGCGCGCGC
 AACAGATTACGGAGCGACATAACTGGGTGGTGCCCGGAGGCAATAGTTTCCGCTACGACCGGATGA
 GATAGGCGAAACACCTGAGCCCGCGCTCACCGGAGCGATAACCGCGCGCTTGAAGCTGAATCAGAC
 CAGCAACCTTCGCAACCCCGGGAACCGCTACATCACCGCTAACGTAAGTGGACTCTGGCTTTCCAA
 AGTCCGCGTTTATCCCGTAGATCTTCCGGAGTACAAAAGTTACGCTCGCTGGAGGCGCGAGGGGCG
 TATGCACTCTCAGCGCGCTCTACTGAAGTCAAGTGCAACTTCCGGTGGTCTATTAGGACACCTGCTCT
 CGCGCGAGTCCGCGAGGCGCGCAGACCTCTCGATGGTSCGGAACAGCCCTCCGCGGGAACCGGACTACGAG
 AAGACGCGGAATGGTTTCCGACACCTACAGTATTTCTCCGCACTCAAGGACCCAGCCAGTGGTCTC
 AGAAGCGGGCTATACCTCTCAACCGGCTTTATGACAACTTTTACCGCTCTGTGTCACACATCCCTTT
 GACAGTCTAATCTTAACGATTTTCTGCTCAATATAGTGCCATCTACAAGGGCACAAACCGCTTATGAGG
 ATGTATTTTGGGACTGGTAAGCGGCTCTTCACTTACCGCTCTGTGCTAGTCTGCTTCCAAATAA
 GTTCTCTCAATTCAGCTTCTGTTAAACGGTTCGCTCTCTGCTATTATACCGCTTCCGCGCGCTGCTCGC
 TATTCGCGCTCTAAACGCTCTTTGAGGCAAAAGACGTAACCGGGTTCAGGGGTTGCGTAAATCTAACG
 ATCGCCCTGATCGTTGATTTTCAACCAATATTTTATAGGAGCATCCACTGCGCTCCGACATCGCGAAT
 CGACTCTCTTCCGCTTCTTCAATGGGCGAGCACTCCAGCGGAAAACGTCGCGGACAGCGAAAACCGCA
 AATGCAATCAAAAGTCCGCAAAACCGGAGCTTCTGCGACGCGCGCGGTGTCGACGGAATGACGACCTA
 AACCTGGTGTACCCCTTTTGGCTCCAAAACAGCACTTCCGGGGCGGAGGAGGAGGAGGCGCGGGAAC
 CCTCCTTAACCCCGCTTTTATCGACCTAACGGACCCCTCTATGTTCAAAACAGTCTCCTTTATGTCAA
 AACTACTGCACTATCGAGGTGAAAACAGCTCACTCGCCCTAGCTTATGACTCCTCACTGGCTTGGAC
 GCTCAAAATCAGCTGCAAGTGAAGGTAGATACCGAGGTCCTATCAGGATTCCCGAGATGGACTCGATA
 TTGCTGTGCGCCATCGACGTTGGAGGTGATGACGAATGGGAATGGCAGTTAAATAGATCCAAACGG
 ACCCTTACCGCTTCACTAGCGGGAATCAATATAAACGTAGACCATACCTTCTTATAGAAGATCAGGAT
 GCTAATCAAGCAAGGAGTTAGGCGTTCACTCTCAATCTAACGGGCTTACTGCGGACCGGAGACGGAT
 TAGACTTAGAATTTGATTCACAAACCATGGTGTCTAAGGACAGCGGAACGTCGCGCGGCTACTCGGTGT
 ATTATTAACCGAGTGGAGACTGCAGTCAAGCATCAAGGTATCGAGTACCGGTAGCTGATACGTTA
 ACCATCAGGATTAACCGGTAGAGGTAAAAACGACCGCAATGGGTCAATAAGCTACTCTGCTAACGGCA
 TTGCGGTAAACCGGATCCCTCAGGACCGCTCACTTCTCTGTTACCGGACTATCTGTGGTTACAGCAGC
 CGAGGTTCAATCCAACTCTTCCAAATGCGGTTTACGCGTTAAACCGGATCCAAAGGAGGAGGATACCGC
 GGTTCGAATGGCTTAAACCTCTCATATAATGCATCAGATTTTACTGTGTACAAAGGAGTGTAAACATTA
 TTAGAAATCCGAGCACCTCCCGGATGCTTATCTGGAGTCCGCAACCACTATTGAAATATTTACGGC
 ACAAGCGGAGAAATCTAGTGTATTCAAATTTAACTGTGCTTATTTCTACAGTCATGTTATTCAAATGGC
 CTGTAACCTCTCTCTCTATTTAAAGATAGACAGAGCTCAGTTTCAAAATATGCCAGAGGTCAGTCCG
 CGGAAAACCGGAGATATTTACCTTCTGGGTACCTACCTATGACTCTCTCAACCTCTACCGGCTTTCCAC
 CCGACGATCACCGCTAACACGTTCACTGGGGCGCATTTTCGCGGCGCAAACTGCTCAGGTAATTCG
 CCTTTTCACTAATCTCACCAACCGGCAAGCATCTATTTGAGCCCAATCGGCTTCGTCGAACTT

FIG. 10A (CONTINUACIÓN)

TCCAAACCCGCTATTGACAGGAGCTTGGAAATACCGACACCTACAAOCCAGGAACCCCTTCAAGTCTCCATACT
 GCCTCAAAACCGCTTGTGGGAGGCCAGTCCGACCTTGTGTAACATGACATGTTATAACTTCCGGTGTCAAAAT
 CCTGGAATATTCAAGSTGGCTGCTAGTAACGCCACATTCACATATCGGACCCATTTTCTACTCCTGCCCAA
 CCAATGAATTAAACGACCCACATAAATAACTTACACGTGTAAATCAATAAAAAAGAAATCGATGTAAAATC
 TTTATTGATTAAATGATTCATTGTGCGCTCCCATTCGGGCACATTCGCCAGTAATACAGACAAATGACAGCC
 TCCAGGAACGACCCCTCACTAATTAATATGACGCTTCTGTTACAGGAATAATCCACTGCACTTCTTCGGGAGT
 AGTGACAAAGGAGTGCCCCCATTTGTCCGAGCGTTGCTATGGCTTCCACGAAAATATIAACTTTATTGGG
 GGGAACTAAATTACCAATCCCAGAACTGCACCAAGAGCCGCTCAAGGACAAAACACCCGGATAAAATCA
 GTAAACATGGCTGCAGCCCAAGCCGCCACAAAATAAACTCCCTCAAGCGTGGGATCACTCTTCTAAGCGGC
 TCCACAAATAAACTCCAGACCTCTCCCGTCCGGCTGACAAACACACCCCATGGGAACCTTTTTCATATC
 GAAATCCGTGACAAATCACATTTCTCAGTAATCAACTCAAAATCTTCTAAACACAAAGAACTGATAGGCAATGT
 GCCCGGGGAACAAATCCACCTTTGTTTACGGCGCGGGAAACATCTTGTGCTCTTCAGCACCATCAGCAT
 CTGCTAGCGCTCTCTCGGCCATCTGTGACACTTGAACGTCTCTGATTTCCGGCTAGCGGGTACTGTCTCTC
 GCTTAAACCCCTCGCTAAAAACGACCAATGGAAACGGGAACCGGAGGAGTAGGATCGGATGGTAGCCGATAC
 AACCGGAGCCCAATCCCGCTTCCCTGAATACAGGGGTTACTGCTAACTGTCCAGGTAGGAGATCTTC
 GTGGAAAGCTCGACAGTCTAGCGAGCCAGCAATCTCTTCGAGATGGTGTCTATTGACCCAGTACGCTG
 CCTTCGGTCCCGCTTCCCTAGCACACCAAAAATCAGCAATAAACTCAGCGTAGTTGCTCTCAAAAAG
 GTGCAACATCCAAACAGGTAAACAAAGGTGAGTTGGGATATACGGTGACTCAGGAACAGATAGGTGA
 CAACCAACGGGAAGCGAGTAAGAACATACTACTGCTGAAATGCAATACAGGATACATAGTCTTCTGATCCG
 AGCGTCCCTCCGTACCTAACAAATAAAGCAAGGCGATTTCTATCACCTTCTACTCTAGCACGCTCTTTT
 GACTGCAATTCGCTAAGTAACTGAGTTGTGCAATATAAGCTAGTGGCAACGGTTGCTTGAGGGGACAC
 CCGGGCATGCGCTCTCAGGATGATGATCGCAATAAGTACCATGCACATGCAATACCCATTCCTCCAGCTC
 TCTATAGGTAGCCCTCTAAAGGCGGGAAATGTAAACAAACCCCTTAGAAACAATAGGCCAAACAGAAAGG
 TCGGCCATCTCCCTCAACATTGATCGGTCTATTAACGGTTGAGTACGGGACTACCACTGCCGCTCGTTT
 TTAATAAACAGTAGCTACAACTTGGTACGGCATCGGCCAGAAAAAGGACAGGATAGGGCAGAGACGG
 TAACTCCCTTGGCACCTTTGTGCTAGACACCTCGTAACATACACTTTGTAAACCGCAACTTAAAGGCTAAA
 CTGTTACTTAACAGAAATCCCTGATCGCAAAATACAAAATCGGACTTGTGCTCTCTGATAATCCACTTGC
 GATGCTATCTACCAACTCGGTCTTGGGAGCAAAAAGCTTCTCGAAAGAACCCGTAAAAACTCCTCCTT
 CTGATCGGGATCCAGTTGCAATCTTGTGTAACCTTACAAATCACGTTCAAGATGATCTCTCGGCCCGAC
 TTTACCCCTCAGATACTTTGCACTCTACAACTG&CTACGGAATACAGGGACTCGTCCCAAGATATATGTT
 GTGGCTTTTGAAGAGGTCATGCTCATGATTGTCCGATTGCTGTGAAATTCATCATCCGTTCTAGGGA
 CTGCTGACTCGCACCTGTCTCATCAGTAGACTAAACCATATCACTCCGCACTCATTTTGAATCCCGAG
 CCCCCTGGTAAGGGCTACCACTCTCTGTAGAAAT&CAAGGATGCAAGATGAATCAGAAATATAGAGAGAA
 TCAGCGAGCGCATGCAGCACATGCATAGCACTTCCATGAAACTCACCGACTCAGTACACAGAGGCATGA
 TCCGACACTCATGATTTTATTGATCAAGTAAGTCCACCTGAAACATATTAACAAACATCATATAATAA
 TATCGCGGTAAACATTTACAACGGTGATGGCAGAAATATATACATCAGCACACATCCCGTGAACACCGCAGC
 GGTACACCCGCCCTCACAAACCGGATACCGCTAACTCTATCTTCCCAAAATTCACGCATCAGAGGTAA
 AACTCTCTCCGAGATGAGCAATGGTGGGCTGCCCTCCGTTTCTGCTCCGAGTACGTAACAGGCTCAC
 CATCATGGCTACAAATGCAAGTCTTACGCAATTAATAAAGAGCTTCGCTCGAAACACCCGTCGAACCT
 TCTTCCCATGCAATCTGCACTGGTGGTCAAGTCCCTCCATCCGAGCAAGGCTTCCGATGCCCTTAGAG
 TTATCATATTCGGCTCTGCGTTCTAGCGCTCTGTTCCAAACCATATTGGGAAGTCGGAGTAGGATCTGA
 TGACTCCCAACCGAGGTAGCGTTACCGGAAGTATAGTTCCGCAATAGGCTCCGCTGTCGTAACTTCTCG
 ACAACACGGTTTACCGGTGATGAAACCGTTACTTTCAATTTTATAACTCGAATGGAAGGAAGAATCCA
 CATCATAAACATCTTACGCAAAAGAAAGTACGTTAAACTCTTTCTTCACTTCGATTCAGATGGAAACACA
 CTGAGAACTCGTTACACAGCTATCCCAATAACTCACTAGTCTATGAGTCCCCACCTCTCAGTCAGATGA
 ACATCTCATCAACAAAACGGTGACCTACTCAAAATCIATCTGAACTTGTGTCCGACCGGTACATTCATAT
 CAGGTAATTTACTGACAAATCTACCGCGGGTTGTATTCTTATCGACCAAGCATCTCTGCCGTCCGGGGAAC
 GTTATATATGGGACCTCCATTGGGCTTTAAACATTTGACGGTATTGCAATAATGGGAAAATGCTCCTTAGTA
 TACATACAAATAGTGAGACGGCGCTCCGAGAGGATCCGGTGTGCGGTGACAAATACATAGTGCAGAACAGAAC
 CCCCCTGATATAATTTGCTATTGCTAAGGGAGCAACAGAAATCCGATACCTGGTAAATCCCTGAGGCGT
 AATGAGCTGAACATAATATACGGGCATTCGGATTTAAGTGATGGATCCACAGAGAACCTTCCGCCAAC
 TCGGTATACCTATCTCGGTGGTTACATCGTATTTCCCATATCTTAAAGTCTGCACACTATAGCCTCCCA
 TATATAACGCTGCTATCATGTGAAGCAACTACTATATCATAAATAGAGAAACAACTCCTTCTTAAATTT
 TCGGCAATACGACATTTCCGTATATATCTTATGCTGTAATGCTTGAAGTAAGTCTCATATCTATAATCA
 CGACTAAGTGATATACCATTCGAAGTACTCTTACCGGTCTACCCCTCGACCCCTTCCGTAAATACAGGGA
 ACACAGGCAAACTCTCTTACATCCAGGCTTTTCAAAAACCTTGGAAACAAATCATTCGATGATACCATCC
 ACTTAAACTAAACGTATTAACCCAGGAAATTCCTCACATACTGTGCTTCCCAACATTTTCTCCGCAT
 ACTCTTCCGAGACCAATCCAGGTGTATACACAGCTTCTACCGCCCTTATCTTCCAGCATTAATCTCCG

FIG. 10A (CONTINUACIÓN)

AAGCCGTGTACCCACAGTGTATCCAGCAATCTGAGTCTTTAGAACGACCACATAATCCGCATCCAACTT
 ATCTAATCCACCGCTTACAAATGTCGGTTCTAGCCGACTATTCTGATACACCGATGGCCCTTGCTCATT
 TGTGAATACTGTCTACATATCGTCGAGCAAGCATGAGCTCCTGCCGAGTGACCTATACAGTGCAATTTTT
 TAGCGTCGGGGATATCTACAGAACTTCTTAAATCCGCATGTAAACCATCCGTATCATAGTACACCG
 ATAGTCCACCAACACACACCTACGGGCGGAGTCACTTCTGATGAATCGCAACACCTTCTTAAATCG
 TCATATCCAGATACCATCCTGGTATAAGCAGCACTATGTCTGATTCCCGGCGAAGGCATTGTGCATTT
 TATGGTATACACCATCTCGTATCTCGCATCGTGGAACTTCGGTACACCATCCGATCCATACACAGT
 GATTCTCGAAGGAAGTCTGTTCCGATTTCGGGCGCTTTTCGGAGCTTCCAGTTTAGTAGCCCGAGGCATT
 GCCACACAGGACCGATTGACCAATCATGGCAACCTTCTGATTTCGTACCCGAAAATGCGGAGGCCCCGA
 GGAGCACCCCSAATAACTGAAACAGAACGCAAAATTTAGACCGGTACCCCTCCCATACGATTATCAGSTCC
 CAAAGCCAAATATCACGTACTCACCGCGCAAAATCTTCATGAAGATCTGGGGCAAGAGCCGCACAAC
 AGTCCACCTGAATCTGAGACAGCTTACCGGCGACTGTACCAAAACCGGTGTGCCACCCCGAATTTATTCT
 CTCATCTATTAAATGTTTAACTAAACAACTTGTGTACACTTGATAAATATTACTGACCTAGACAAATTC
 CGAAGACTTCCCTTATTACCGTGACTATGCAGTATCAAGATAAACCCCTTCCAAAGTTCGACTCAGTACAG
 GTGTACTTCCGTATATAAATATCACTTCTAAATATAGTCTAGGTAGAACTATAAATGGTAAGAGACA
 ACACACTGATTCTTAGAAAAACCTCACAGAACAGATGAACCTCACATTATCTGACTCTTCTTACGAA
 CTGAAAATAACCGGTAAAGTCATAAAATGATTTCCTTTTGACATTGCGTACGCGGAAGCAAACTAGAAAA
 ATCGAACTTGGAAATTTCCAACTCGAGTTAACTATTAACCTGATGACCTCAATTGGATTAACTTAATCT
 CCAATTAGTTAAATGATTAACTAGATCTGGTTAATGATTAACTAGTGACGTCACTAGTTAATCATTAAAGCT
 TTCATGATATGATGAGAGATTTCATGCATATGAATGAGAGTCTCATCCATATTATAAATCTTCCAT
 TATTCATGAGGCTCTCATGCATATGCACTGTTTTACATGCATATGCATGGACCTCATTTCATATTCATCA
 TTCTTAATGATAAACCTATGACTCACTGTATATGTTTACGTTGCCTAGCAACGTTAATGATTATACCTG
 CTGACGTGGCAGCTCCGCTCCCGGTAAATCACTTACCTGGACTTTGTTCTTTATGTTTATTCACCATGG
 CAACGCTACCATATATGGACATCCGACTCCGCTCCCGAGTTATACATTAAAGATGGCTGATAGCGCGA
 GCTCTCTCCCATTTGGCTCTTAATGACGTAGTCCGGGTTAACCATAAGCCAGAACCGCTTATATAGGTAGA
 GCAGGTAGACCCGGAACCCATTCCCATACGACCTCCATAGAGTGCGGACCTCTACGGGCTCTCCATAC
 CGGTAAATATTTTATTCATTTAATCCAAATCAAAATCAATCAATCAATCAATCAATCAATCAATCAATCA
 CAATTCATGGTGAATTTCTTTAATAAAAGCCACCCCTTGGCACCCCTCTGACACCCCTCTGTA
 CAGGCGACCCACCCCTATGGACACCCCTCTGTACAGGCGACCCCTTATGGACACCCCTCTGTACAGG
 CGACACCCCTATGGACACCCCTCTGTACAGGCGACCCCTTATGGACACCCCTCTGTACAGGCGAC
 CACCCCTTATGGACACCCCTCTGTACACCCCTCTGTACATTTCTCCCATAGGCTTACATGGAACCTCG
 CCCCCTAGTGTCTCCGCTCCATGGGACCCCTATGAGGTGGGACCATCTCATTTCGCGCAATGGAGCTCA
 TCCACGAGGGGCGCCATTGAAGCTAGGGGACCCCATAGAGAGCTGGGCCAATGGGCTGTTTGGATCC
 GGATATCCCGGCCAATCTTCAACTGCATTTCTATTGGCTCATGGGATCACATGGGAAGCGCGTCATA
 TTCAAAGGCCACACCCACCGATGTTCCACCCCGAGCTTAGGATCCGTAGCACCCCGCTTACTAGGA
 AACAGGCCGGAAGCCTACTCTCAGCCTATCACAGAGGCTCCGTGTGTTTCCCGCCGCTATAAATACCCA
 CCCCCTCGTGATGCAATTGGGGTGGAGTCTAATGCCATGGGACTTCTTATATATTTCCAGAGGGCCCTC
 GAGATGGCGCTCAAGAGCATGCGGCTGGGCTATGGGCTTACAGGCAACAGGTGGCGGCACTGAAATAG
 GAAAGACTGTACGGTGAAGCCCTCAAAGAAGTGGAGACCCCTCCAGCAGGGGCTCTTCAGTACCCACCA
 TCTAAAAGAGCACTTCCAGAAATGCACTTTCCGCGACTTTTAAAGAAATTCCTTATATTTGTGGCTCG
 AAGATTGGCACTGCTCCAAAGGGCGGAGAAATGGATGGTTACGCTCCACCCGAATCCAGAGCCCGGCC
 ACCGAAGGACGGAAGGACCCCGCCACTCTCCAAGACCTCGCCCGGCTGGGCGTGGTTCGAAAATGCTCA
 AGATGAGGAGGCGGGCATAAGCCCTAGGCACCCACCTTCTTCAATAAACCAATCAGAACAGAGCACT
 TGACTCTCTCTATTTGTGGCGGGGCTATGGTACGGTATAGAGCGCCCTTGGCGCCCTTGGCGGCCA
 CTGCACCCGCGCGGACTTAGTCTCTTGGCGGGGCTGGTCAATCAATTAADGGGGGCGGAGGACGGGGG
 CCCCCTGGCGGGGAGACACACTTGGCTCTTGGGAGCTCCCCCTGGCGGGGAGGGCCCGCACTGCA
 CCCCCTGGGACTTACTCTTGGCGGGGCGGCTCAATCAATTAACCGGGGCGGAGGACGGGGGCGGCT
 GCGGGCGGGGAGACACACTTGGCTCTTGGGAGCTCCCCCTGGCGGGGAGGGGCGGCACTGCAACCCG
 CCCCCTTACTCTTGGCGGGGCGGCTCAATCAATTAACCGGGGCGGAGGACGGGGGCGGCTGCGG
 CCGGAGACAGACACTTGGCTCTTGGCGGGGCGGCTCAATCAATTAACCGGGGCGGAGGACGGGGGCGG
 ACTTAGTCTTGGCGGGGCGGCTCAATCAATTAACCGGGGCGGAGGACGGGGGCGGCTTGGCGGGGCG
 GACAGCACTGCTGCTTGGCGGGGCTGGCTTGGCGGGGCGGAGGACGGGGGCGGCTTGGCGGGGCGG
 GCTCTTGGCGGGGCGGCTCAATCAATTAACCGGGGCGGAGGACGGGGGCGGCTTGGCGGGGCGG
 ACCTTGGCTCTTGGCGGGGCGGCTCAATCAATTAACCGGGGCGGAGGACGGGGGCGGCTTGGCTCT
 TGGCGGGGCGGCTCAATCAATTAACCGGGGCGGAGGACGGGGGCGGCTTGGCGGGGCGGAGGACG
 CCGTCTTGGCGGGGCGGCTTGGCGGGGCGGAGGACGGGGGCGGCTTGGCGGGGCGGAGGACGCTT
 CCGGCGGCTCAATCAATTAACCGGGGCGGAGGACGGGGGCGGCTTGGCGGGGCGGAGGACGCTT
 TCTGGGAGCTTCCCCGCGGGGAGGGGCGGCTTGGCGGGGCGGAGGACGCTTCTCTGGCGGGG

FIG. 10A (CONTINUACIÓN)

CDETCATTCATTAAACCCGGCCGACACGGCCCGCCCTGCGCGGCGGACAGACAGTGGCTGTCTGC
 GGAGCTCCGCTTGGCGGCGGAGGCGCCGCACTGCAACCGGCGCGGAGCTTACTCTCTGGCGCGGCGCGGTC
 AATGATTAAACCGCGCGCCAGCAACGGCGCGCCCTGCGCGCGGAGACAGACACTGGCTGTCTGCGGAGG
 TCCCGCTGCGCGCGGAGGCGCGGCACTGCAACCGCGCGGAGCTTACTCTCTGGCGCGGCGCGCTCANTCA
 TTAACCGCGCGCGGAGGCGGCGGCGGCTGCGGCGGAGACAGACACTGGCTGTCTGCGGAGGCTGCGG
 CTGGCGCGGCGGAGGCGGCGCACTGCAACCGCGCGGAGCTTACTCTCTGGCGCGGCGCGCTCAATCATTAAC
 CGCGCGGCGGAGGCGGCGGCGGCTGCGGCGGAGACAGACACTGGCTGTCTGCGGAGGCTCCGCTGTGG
 GCGCGGAGGCGGCGGCACTGCAACCGCGCGGAGCTTACTCTCTGGCGCGGCGGCGCTCAATCATTAACCGG
 GCGCGGAGGCGGCGGCGGCTGCGGCGGAGACAGACACTGGCTGTCTGCGGAGGCTCCGCTGTGGCGGAGG
 ACACCGGAAATCTGCTGCTGTAAACCTTGTCCCAAAGCTCAGTCCGCTACATGGAACCATCCACATAT
 ATCTCGGACAGCTCGAGTCTTAAAGATATTCCTTACGGATAATTAGGATCTTACAGACCATTAATTA
 AATACATCCGGAACCACTGTCCGCTTGAACCTTGGCTTCTGTAGAACTCTTCAACGAAAGTACGCTTCA
 TTGCTCTAGAACCTTATACAAATCTTATCTCTCAGTCCGAACATCCGAGGCAATCAACAGGCTCA
 ATGACCAACCAAGAAACCGCGGCGCTGAAGCGGACGACAGTAAACATAGGATCTCCGACACCGGATTA
 GCTCTTACTGCTACGGAACAGGCTCTTGAAGTCTTCAACTAGCTTCCAAAGATCCGATCTGTGA
 TACACCGGAGGTAACGCAACCAACACGCTACAAAGGCTTCCGCACTCTGCAATTAACAG
 TAGCATCAGAAATACATCCAGCGCTATTTCAAAAACAGACAGGATCTCAGCCCAAAAGCAAAATACCT
 TACCGGAAACCAAGCAAAATCCGCTTACGCTAATCCGATCTCCCTGAGCTCAAGAAAGCGCGG
 TTAATACCGCTCTTATCTCTCTTGGATTAACCTACGCTTACGCGCATTTCTTATCAGCTAAGATACCGG
 GTAGATACCGCTTCCACATCAGCAGGGAATGCTGACCGAGCTTACCGCGGCTTTTATATATCCGCT
 TAATTAAGTAACTGATGATCAACCAACCACTGCGCGGATATATCTACACCTTGATACCGCGGCTCAT
 CATTAAGCTGAGCGCGGAGTCAACTACCGTATCCCTGATCTGCTGCTATCCCTTCTGATATG
 TTCCATCGAATCCATATCCGCTTCTCCATAACTTCAAGCGGCTCAAGGAGTCCGCTTACTCTTCCCTAC
 AAGGAGATACGCGGCTTAAATTCGAATGCGGCTGACAGATCAGACCAAGTAGGCAATCTCCGATC
 CTAGACCGGCTCAACTACCGCTCGGCTCCACTCAAGGAGGAGTACATCTCAACCGGCGGCGGCTCAT
 CGTTACATCCCTACGAGTACTGACGCGGCTACCTATAGAACTCTCTCAGAGGACCAACAGGAGTGA
 ATCGGATACCTCTTATACGCTGGAATCAGAGCTATAGAACTTCCGCTCTTTTCTACATGATATCCG
 TTTCTCTTTTCTTACCGCTAGCTTATCTCTCTAGAACGATGCAAGCTTCCGCGCTCTATACGAT
 CGGTACAACTCACTCATCTGCGATACCGCTCAGATGCGAAGCTTCCAACTATCTCCAGCTAATTAACAT
 ACCACTGCAAAACAGATTAATACAGGCAACTACTGCACTGATCTATCACTTAAACATCGAAGACTR
 TATATCCGCTTACCTGCACTGATGAGTCACTGAGTCACTCAAAAGGAGGATCAGGATTAAGTTGAG
 GGTAGATCTGCTTTCGCTTATCTCTCTATAGTAACTATGCGGCGGCTTTAAACCGGATCTTTA
 CAGGATCCCTTCTCCAGCTAGGCTTACGCTTTCGATCCCACTATCACTTCTGCTGCTCTCTGCT
 GATCTCTATCAACCAATTAACCTCTACTTTGTGAAGAGCATTCCTGCGGATAGGCAATATAAATAACT
 TGCATTAACCTTACCGGAGATGCTTGGCTGCGGCGGCTCTGCTTAACTCTCTTTAAATAAAACCACT
 ATAATCCCGCTTCTCTAATCTCTACTTCTATGATTAATGGGTAATTAATGATGGGTAAATTAAGTG
 GTGCAATGATCAATATGATTCCGAAACGATTTCCGGAAATGATTTAGGAATCAATGATCATTAT
 CAAAATAAATGATTATTTATAAGAGCTGTTTGTGATGATTGATACGATTAATCAATGATTAGA
 AACACATGATTAGAAACACAGTTTAAATCAATCAAAATCAACCGGCAAGATATGGACAGTCACTGCT
 CCTCTGATGCTCTATCCATAGATTGCTGCTCCGTAGAAATCAGAGGCGGAGGATCCGCGGAAACAGAA
 AGTTATCGCTACCATCAGCAATAACAACATTAATTAACCGGATCCGCGGCAACACTGGAACCTCCGCGG
 TGATTGGATACCACTCTCCGCGGCTTATAAGTGGTCTCTCGATCTTCTGATCTCTCTGAGTCAAAAC
 CAGGAATTAACCACTACGTAATAACCGGCTTGAATCCTGTGTAAGTCTAGCGTATTAGTATACAGTCC
 CGAATCGGCAAGTGTACGCTCTTAATAGTAAACGCAATTGGATGTTGGCAATGTAATGCGTGGGCTCTTA
 TAGTTAGCATACACTATGGGTTACCCAGAGCTTTATAAGCTGTAATACGAACAGGCTAGACGCGTCT
 CGTTAGAGGAGTGAACCTCCCACTCCGTTATAGAAGCGGAGTAGCATCTTCCACACATGCGTAACTC
 TCCGCTTCCAAAACATAATACGGCTCATGTTATGACCTCAACCGTGGCATTTGCCGTAATATGCTTC
 ACGGTACTGTATGGCATACGGTTTCCDACCAGCAAGGAACCGTAAGTCAACAGGACCGGTTATTAG
 CCTTCAGCTTACTCAGGTAATAGTATGCAACCACTATCTACCTCGTTCTACCATGTACCCGCTTTC
 AAGTCCAGGTTCTTTAACCTTCGGAATGACAAATGCGGCGCTCTCCATCTTATTGCAATTGGGGGACGG
 GAATGATACCAAGCATCATAGTATGGTCCCTGCACTCTCTGTCCTGAGGCGGAGCTCCGGGTCCCGGG
 GAGCGCAAAAGCAGAGTCCGAGGACAGGAGGAGGAGGCGGCAACGAGCTTATGATGAATGCGGSAAC
 CAGCCAGCAGCAGGATGAAGGTGCGAGTACTCGAGGCGGCGGGAATAACACCGGACCGCTTTCCACCC
 CCGCTTAAATACACAACCCACCGGTCATGGTCAACATTAACCTAGCCTACTCAGCAGGGAAGTACT
 CACCTTAAACACAGTTCGACTTATCAGGTACACACCGTAACCTTCCGACCCAAAGGCGACAGTCAGCA

FIG. 10A (CONTINUACIÓN)

CCATAAGGAAGTCGTAAAGTTACCCCTTTGATTGCATTGTCATCATAAAAAACGCTGAGCAAAACGGAAACG
 CCCCAGTACAAATCTCTCTCCGCCACGCCCTCGTTAATCAATAACTAGTCGCCGATACATATATATACCC
 CCTCCGTTCCATCACACCTACACTACCTTCTCTCCGCACAGGCAACATCTCAATCCTTACTCTTCCGAAT
 CCACCTCGCCGCTTCGACATGAATCCGGTAAGTATCAACTTTTTTCTAAGCTTATGCTTCTGACACCTC
 TGATCTTAATACCGCACCCCTTTTTTCTCAAAAAAGGTTTCGTGCTTAACGCTTCTTCTATGCGTCATCA
 TCCCGAGAGCCGATCCGCTTCCAATCACCCCGCCTCTAAACCCGCTACCGACTCCGCCCCGACCGCGC
 CTCCGTCATCAGACCCACTTACCCGCATCTCCGAGCGCCACCCGTCGCGAGAAATCTTGAGCGAGGAC
 TGTTCGTTCCGAAATGCCAGCGGTGATTACCAACCCCTACCTGGGAACCGAAAGAGGAAACGGTTTCAG
 ATCAAAACCTCTCACCCGAACCGACCCCATCCGTGACCGAATCCCGCTATCATCCAGTCCAGTCCCG
 CGCTTCTAACCGTCCGACCCAGTAAGSAACACACTTCTACTATCGCATCCATCTCGACCGTAGTCGGCATC
 GCGGTCCCTCGTCATCTGACCCCTCGTAGCCTACTTTACCAAGTACCCCAACCGAGACCGCCCGATCCA
 TCTACATAGGAGTAGCTCCACCCGATATGGAATCAAGGAAATATAATTCCAGCCCCACCCCTTACCCCTA
 CCTTCCATGAGTCAGTATTTTCAATAAGTTATATTGAGTATTAATTCCGTTGTTTCCGCGTTCTTTC
 TCTCGCGCGACAAAGTCCSTTCGACCCAGGAAGTCCGGTATACGTCATTCCGCGGTGTCATGATGACGG
 CATAACTCAGCACTGCCATCTGCCGACAAACCGCGTACTACACTTAACACATAAACACCCGCTTTTTTT
 CGATTCCACCATATCAGGCTTTGGTAAAAATTCCGAGATTCTAAAAATCCGATTCCTGCGCCCGCGAT
 AATAGATCACGCCACGACACGCCCTAGCGCTCTTATCACACGGTCTCTGCTGCCATCTAGCGGCGGGA
 GCGGTAGTCGAGGTGACAGCAGCGTCATTCAITGAGGTATATATAGATGATG

FIG. 10A (CONTINUACIÓN)

FIG. 10C (CONTINUACIÓN)

PROMOTOR DEL FACTOR DE ALARGAMIENTO 1 ALFA HUMANO (EF1A)

EAST:

[illegible]

SECUENCIA DE PROMOTOR PARA L2R (PROMOTOR DEL VIRUS DE LA VIRUELA AVIAR)

SECUENCIA DEL PROMOTOR DE LA LEV (PROMOTOR DEL VIRUS DE LA GRIPE PATIVA);
CATATGTAATATGGGTAACTCTCTTAATAGCCCTAATTAAXATGAAAAAATATCATTTATAAAACGTAAACGACAAAAACATTAA
TTTAAATTTGGCAATATCAACAAACCAT

SECUENCIA DE PROMOTOR PARA EL PROMOTOR DE β -ACTINA (MÍNIMO)[illegible]

FIG. 10D

POTENCIADOR / REGULADOR QUE SE PUEDE USAR EN VIRUS RECOMBINANTES:

ELEMENTO REGULADOR POSTRANSSCRIPCIÓN DEL VIRUS DE LA HEPATITIS DE MARMOTA (WPRES):

FASTA:

[illegible]

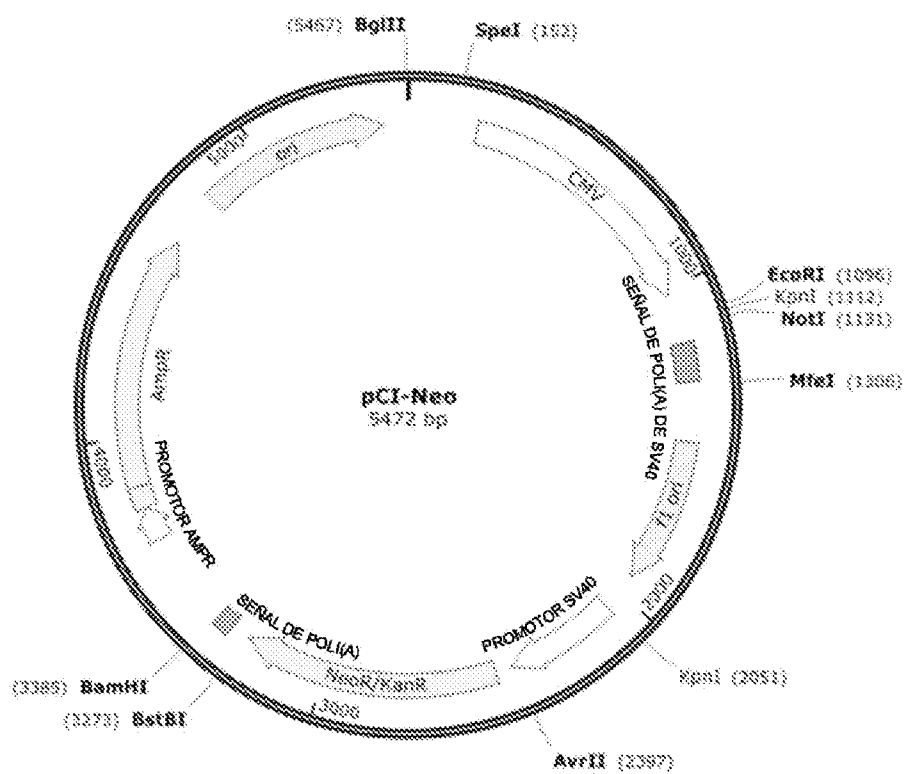


FIG. 11

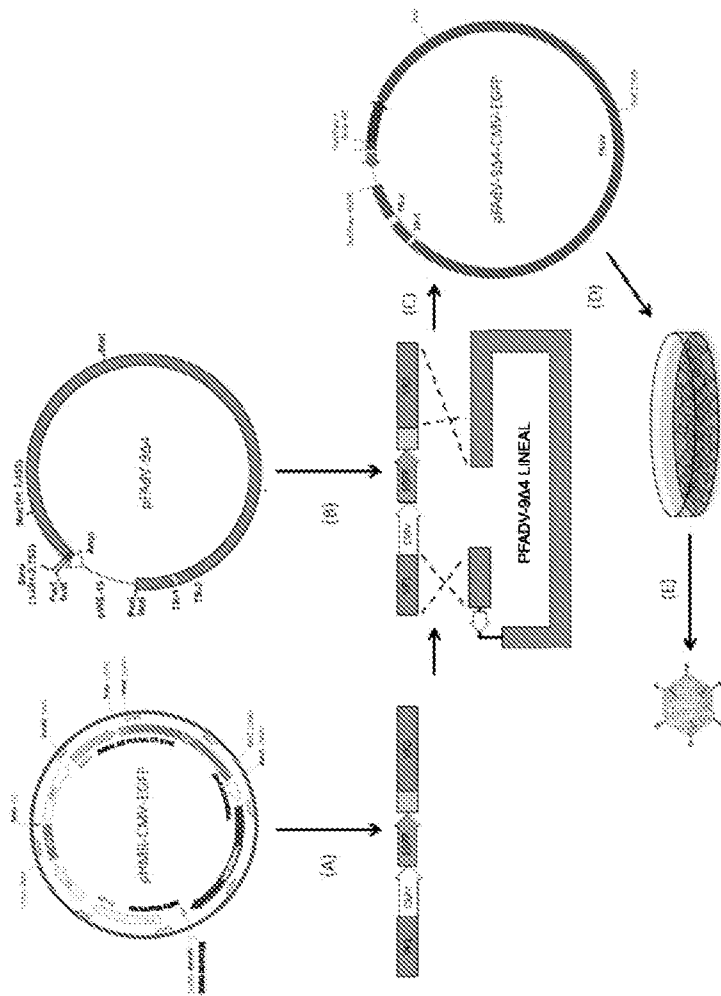


FIG. 12

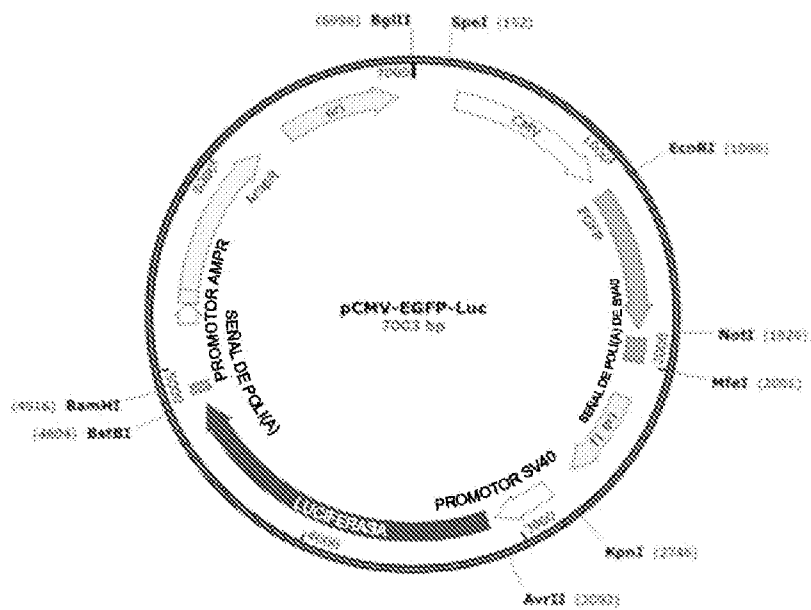


FIG. 13A

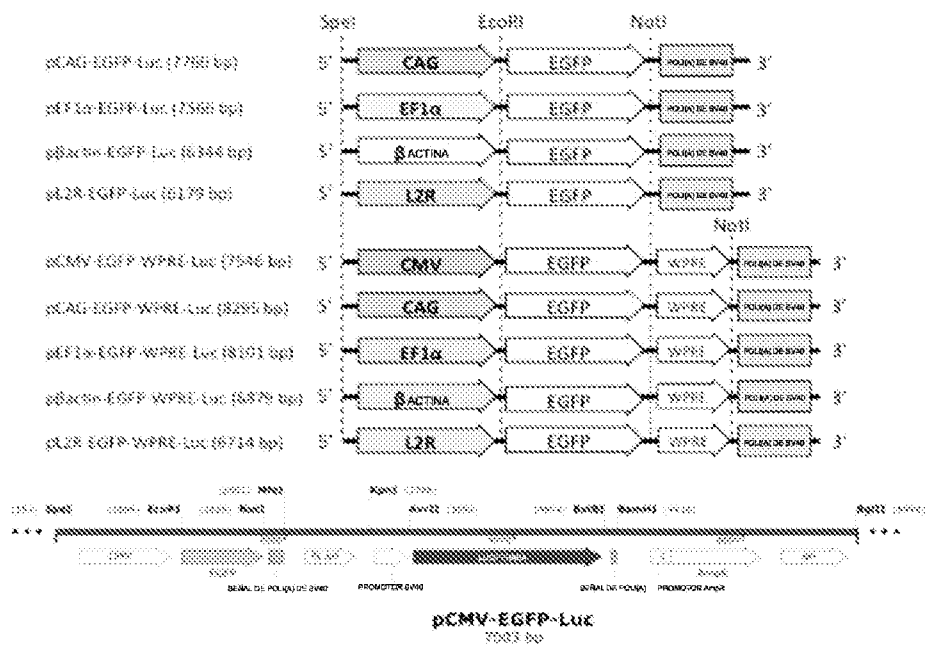


FIG. 13B

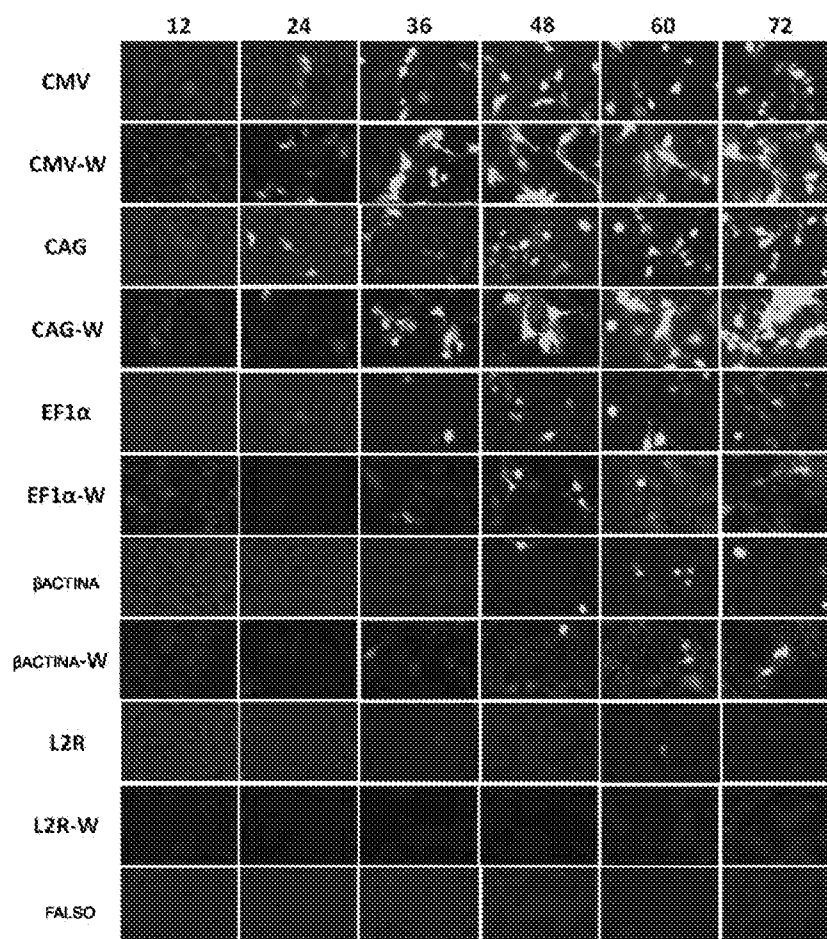


FIG. 14

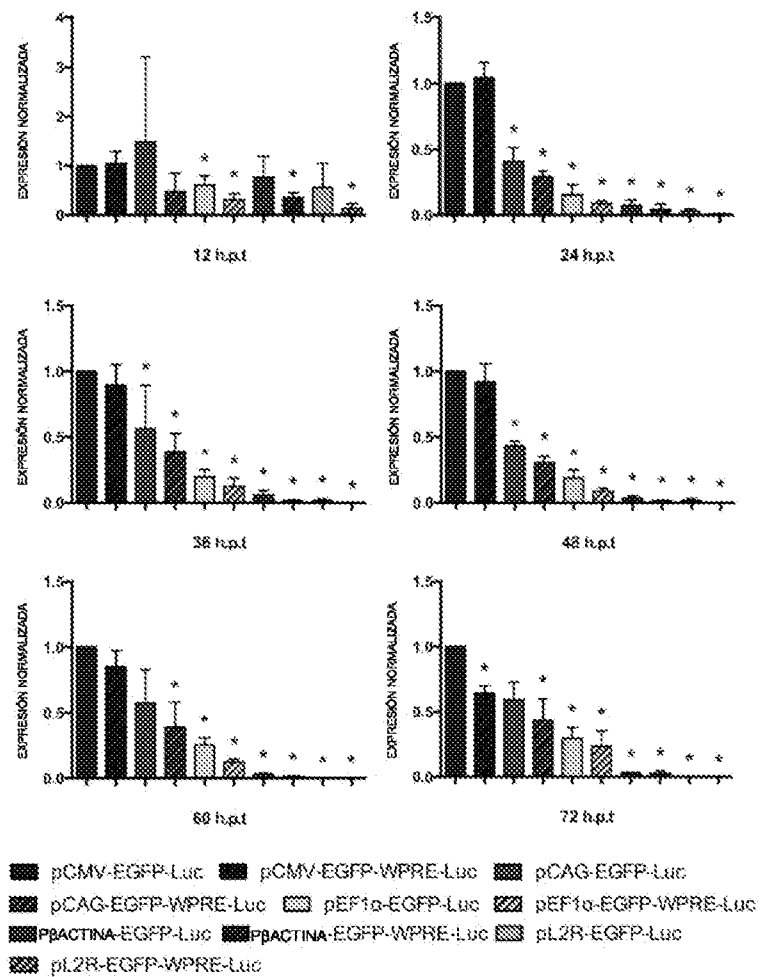


FIG. 15

FIG. 16A

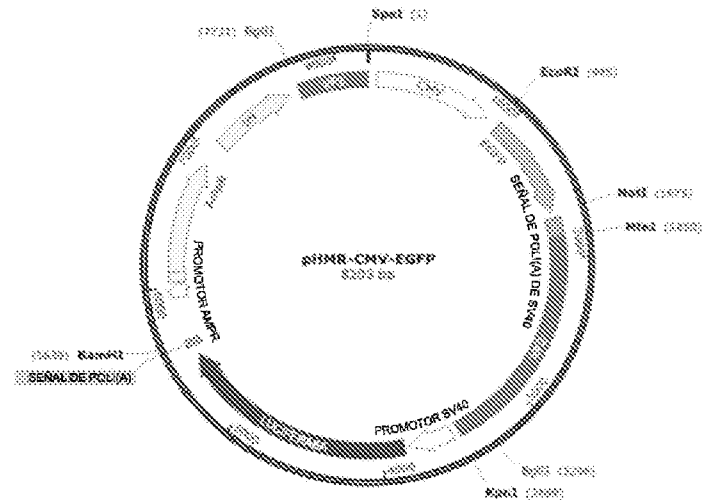
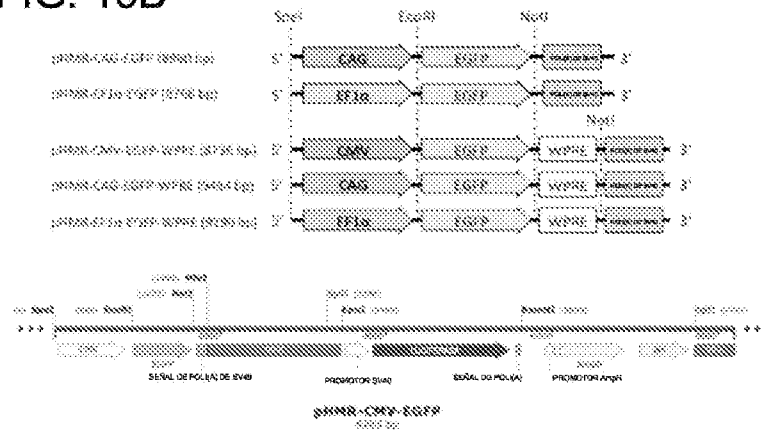


FIG. 16B



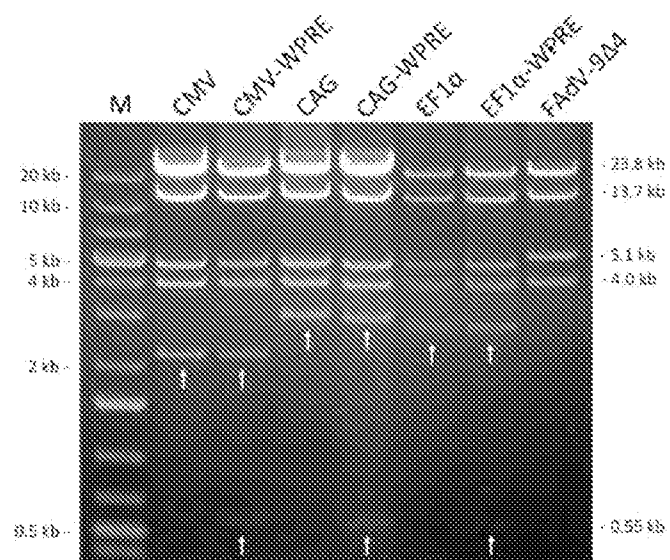


FIG. 17

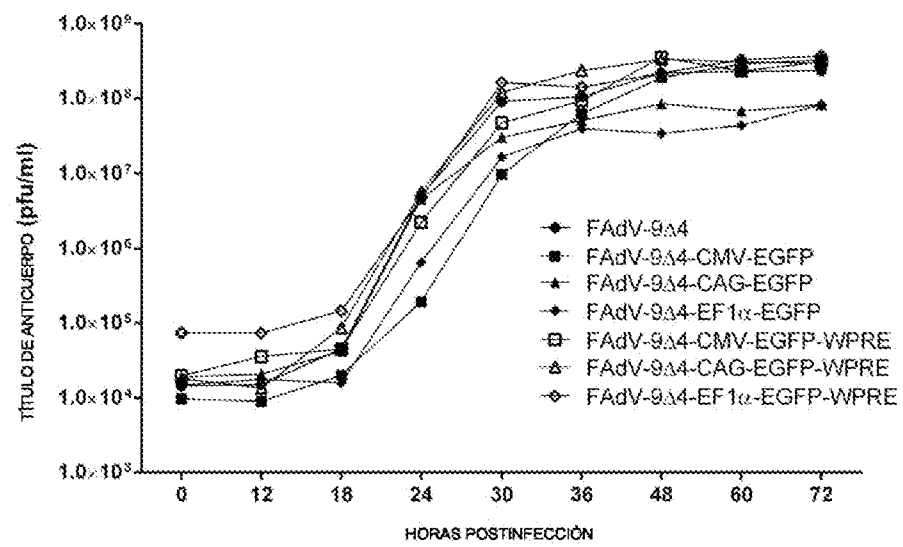


FIG. 18

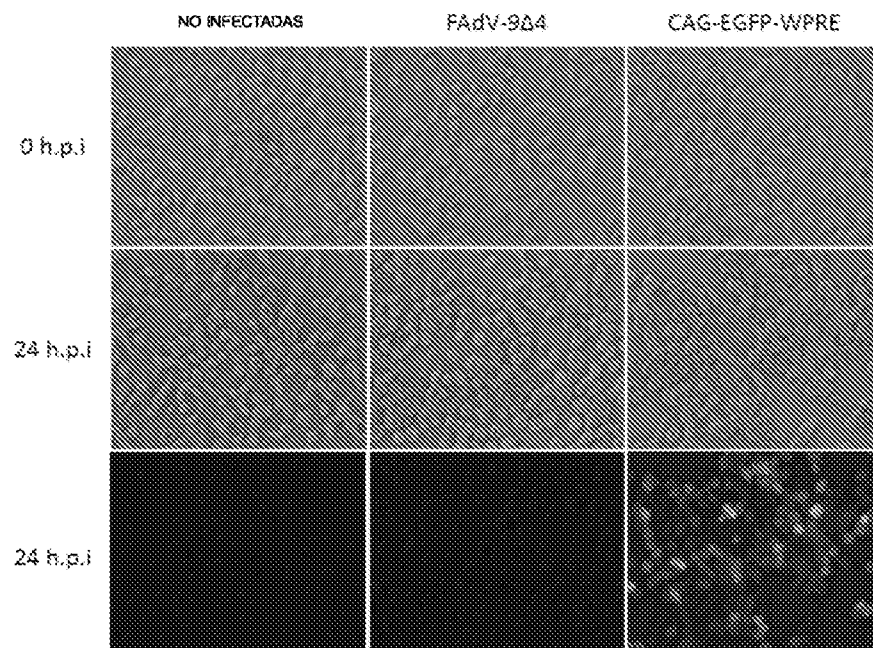


FIG. 19

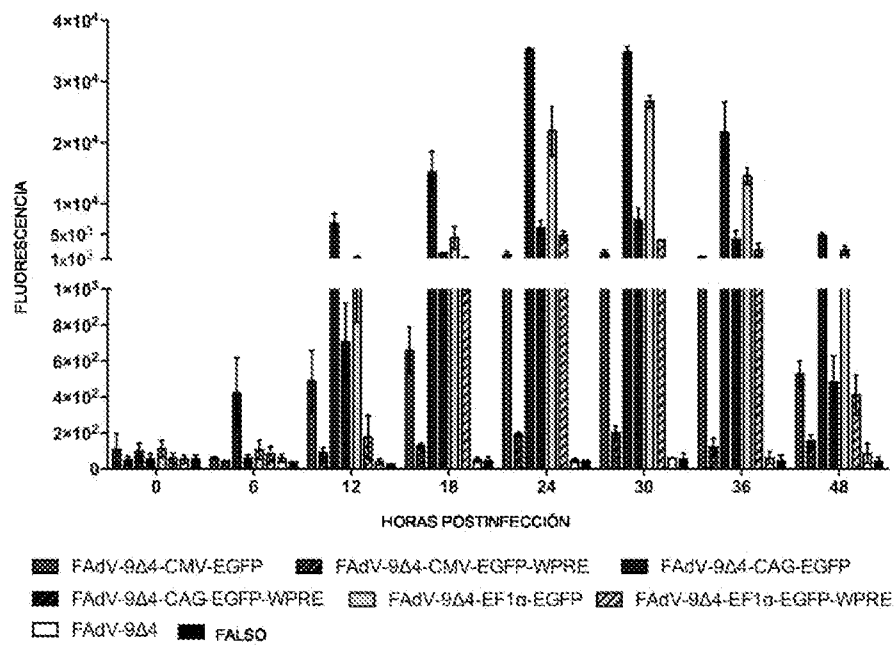


FIG. 20

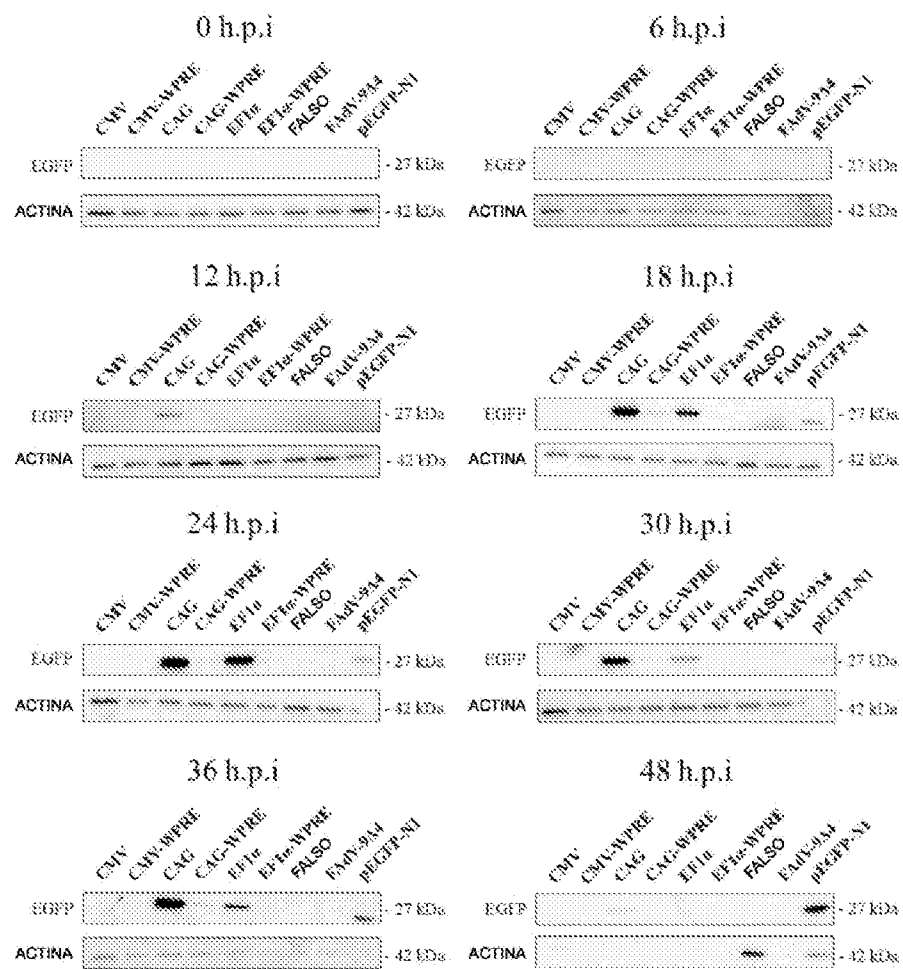


FIG. 21

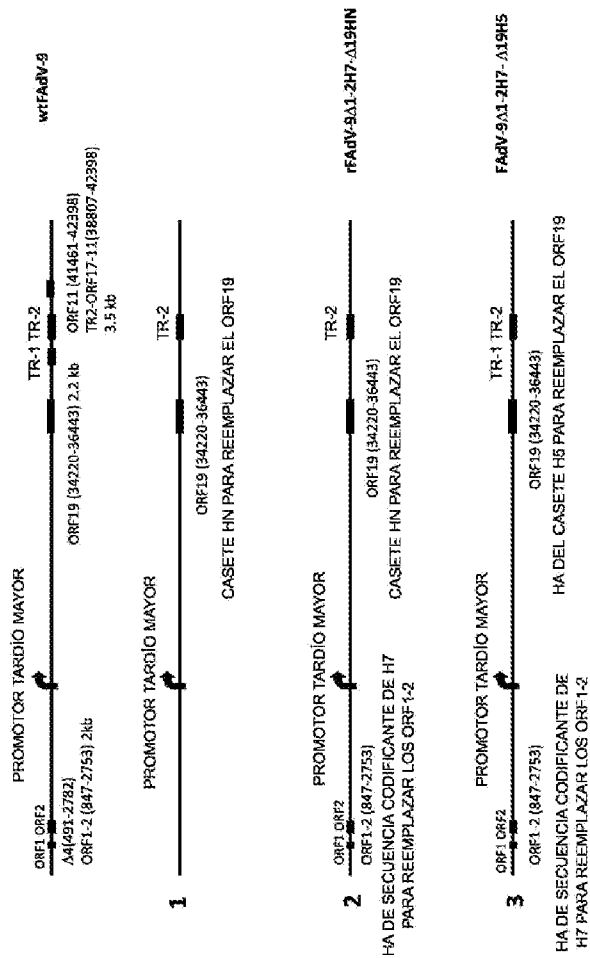


FIG. 22

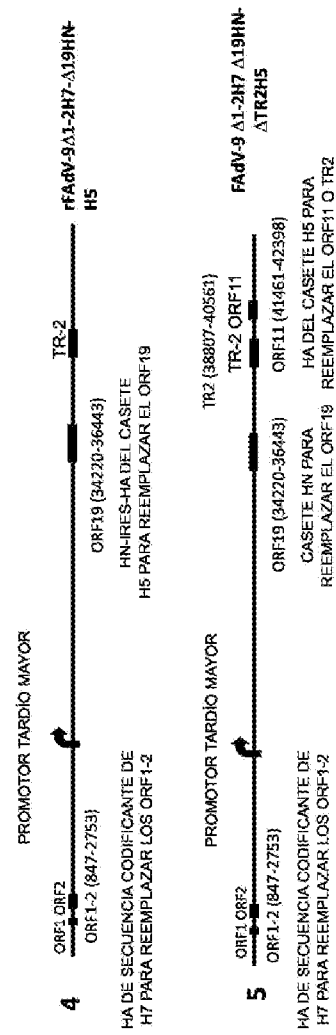


FIG. 22 (CONTINUACIÓN)