



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 281 420**

⑮ Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Número de solicitud europea: **01938492 .4**

⑯ Fecha de presentación : **18.05.2001**

⑯ Número de publicación de la solicitud: **1285062**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **26.02.2003**

⑭ Título: **Construcciones de vector.**

⑯ Prioridad: **19.05.2000 GB 0012233**

⑮ Titular/es: **Devgen N.V.**
Technologiepark 30
9052 Gent-Zwijnaarde, BE

⑯ Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.10.2007

⑯ Inventor/es: **Plaetinck, Geert;**
Renard, Jean-Pierre y
Bogaert, Thierry

⑯ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.10.2007

⑯ Agente: **Ungría López, Javier**

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

Construcciones de vector.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a construcciones de vector mejoradas para su uso en la expresión de ARN bicatenario, particularmente para su uso en la expresión de ARN bicatenario *in vitro* e *in vivo*.

10 **Antecedentes de la invención**

Desde la llegada de la inhibición por ARN bicatenario (ARNi) como herramienta para controlar la expresión génica, como se describe en el documento WO 99/32619 y WO 00/01846, se ha reconocido una necesidad de vectores especializados diseñados para la producción de ARN bicatenario (ARNds).

15 Los vectores de clonación diseñados para producir elevados niveles de ARNds se han descrito previamente por Plaetinck *et al.* (Documento WO 00/01846) y Timmons *et al.* *Nature*, 395: 854 (1998). Estos vectores generalmente contienen un sitio de clonación múltiple (MCS) en el que los fragmentos de ADN diana pueden clonarse flanqueados por dos promotores transcripcionales oponibles. Esencialmente, estos tres componentes (Promotor 1, MCS y Promotor 2) componen el sistema completo. En el sistema de expresión apropiado, el ADN clonado en el MCS puede transcribirse en ambas direcciones, conduciendo a la producción de dos cadenas de ARN complementarias.

20 Una desventaja de los sistemas conocidos es que no se transcribe solamente el fragmento clonado. La lectura de la ARN polimerasa provocará la transcripción del vector completo, y esto también en ambas direcciones. Como solamente la transcripción del fragmento de ADN clonado producirá ARNds activo para los propósitos de ARNi, la transcripción de parte del vector produce un ARN ineficaz, inútil. Más específicamente, el 80% de estos transcritos puede considerarse como no específico y por tanto no eficaz.

25 Las grandes cantidades de ARN no específico generado por los sistemas de plásmido y expresión de la técnica anterior produce algunos efectos secundarios no deseables. Primero, en protocolos de ARNi basados en la introducción de ARNds en *C. elegans* mediante un organismo de alimento tal como *E. coli* que expresa el ARNds (véase documento WO 00/01846), se considera que las cadenas de ARN grandes son tóxicas para el organismo de alimento. Como resultado, grandes cantidades de ARN acumulándose en *E. coli* provocan que una parte significativa de la población muera. Segundo, y probablemente más importante, es la reducción del potencial de inhibición. La presencia de grandes 30 cantidades de ARNds no específico produce un entorno competitivo por las secuencias específicas. El potencial de las secuencias de ARNds especificadas por el molde de inhibir la expresión de la proteína dirigida en, por ejemplo, células de *C. elegans* se reduce por la presencia de estas grandes regiones no específicas. Dicha inhibición por ARNds no específico también se ha demostrado en *Drosophila* por Tushl *et al.*, *Genes & Development* 13: 3191-3197 (1999). No solamente el potencial de inhibir la expresión génica está afectado, sino que también está limitada la cantidad de ARNds específico producido. Tercero, la transcripción de la parte estructural del vector, más particularmente la transcripción del origen de replicación y estructuras relacionadas, provoca la inestabilidad del plásmido y la reorganización 35 del plásmido, conduciendo a una producción reducida de ARNds. Esta concentración relativamente baja de ARNds eficaz a su vez conduce a un ARNi ineficaz.

40 45 Para concluir, los vectores descritos previamente tienen los siguientes inconvenientes: son tóxicos para el organismo de alimentación, una proporción mayor de los transcritos producidos son no específicos, el potencial inhibidor del ARNds se reduce por la presencia de regiones no específicas, una elevada incidencia de reorganizaciones del plásmido y una pérdida del plásmido del organismo de alimentación. Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar vectores mejorados para la producción de ARNds que evite las desventajas de los vectores de la técnica anterior.

50 Los vectores para su uso en la síntesis *in vitro* de transcritos de ARN, por ejemplo la producción de sondas de ARN, han sido conocidos y habitualmente usados en la técnica durante algún tiempo (véase, por ejemplo, F. M. Ausubel *et al.* (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (1994); Jendrisak *et al.*, *Vectors for in vitro production of RNA copies of either strand of a cloned DNA sequence*, documento US 4.766.072). En protocolos de transcripción *in vitro* convencionales el problema de la transcripción por lectura de las secuencias del vector generalmente se evita linealizando el vector de transcripción en el sitio de restricción situado en el extremo 3' del transrito deseado. Sin embargo, esta solución no es apropiada para la transcripción *in vivo* o para la traducción de ARNds donde es importante que el molde se transcriba en ambas direcciones.

55 60 Ahora se propone una nueva solución a los problemas encontrados con los vectores de la técnica anterior para la producción de ARNds, en base al uso de terminadores de la transcripción. Generalmente la solución consiste en el uso de al menos un terminador de la transcripción unido de forma operativa a al menos un promotor, donde el terminador detiene la transcripción iniciada por el promotor. Cualquier fragmento de ADN insertado entre el extremo 3' del promotor y el extremo 5' del terminador se transcribirá después, sin la transcripción no deseada de la estructura del vector. Preferentemente, el vector está compuesto por dos promotores y dos terminadores, como se describe adicionalmente a continuación.

ES 2 281 420 T3

Por lo tanto, de acuerdo con la invención se proporciona el uso de una construcción de ADN para producir ARN bicatenario correspondiente a una secuencia diana, comprendiendo la construcción de ADN:

5 (a) un primer promotor y

(b) un segundo promotor,

en la que el primer y segundo promotores están en orientación opuesta entre sí y definen una región entre promotores colocada cadena abajo del extremo 3' del primer promotor y cadena abajo del extremo 3' del segundo promotor; 10 y dicha construcción de ADN comprende adicionalmente:

(c) al menos un sitio de clonación colocado en la región entre promotores; y

15 (d) un primer terminador de la transcripción, colocado (como se observa desde el extremo 3' del primer promotor) cadena abajo del primer promotor y cadena abajo de la secuencia de nucleótidos correspondiente a la secuencia diana, en la que el primer terminador de la transcripción está unido de forma operativa al primer promotor,

caracterizada porque el primer promotor y el segundo promotor son promotores bacteriófago.

20 La región entre promotores también puede definirse adicionalmente como: la región de ADN entre el extremo 3' del primer promotor y el extremo 3' del segundo promotor, y que está cadena abajo del primer promotor, y que está cadena abajo del segundo promotor, y que preferiblemente no contiene el extremo 5' del primer promotor y del segundo promotor. El primer promotor y el segundo promotor oponibles dirigen la expresión direccional desde sus 25 extremos 5' hasta sus extremos 3' comenzando la transcripción cadena abajo de sus extremos 3', proporcionando de este modo la transcripción de ambas cadenas de cualquier secuencia o secuencias de nucleótidos presentes en la región entre promotores.

Los dos promotores presentes en la construcción de ADN de la invención son promotores de bacteriófagos y pueden ser idénticos o pueden ser diferentes. La naturaleza precisa de los promotores usados en la construcción puede 30 depender de la naturaleza del sistema de expresión en el que se espera que funcione la construcción (por ejemplo, célula hospedadora procariota frente a eucariota). Los promotores de bacteriófagos, por ejemplo los promotores T7, T3 y SP6, se usan en las construcciones de la invención, ya que proporcionan ventajas de elevado nivel de transcripción que depende solamente de la unión de la ARN polimerasa apropiada. Cada uno de estos promotores puede elegirse 35 independientemente. Los promotores de fagos también pueden funcionar en una amplia diversidad de sistemas hospedadores, es decir, hospedadores tanto procariotas como eucariotas, con la condición de que la polimerasa afín esté presente en la célula hospedadora.

La disposición de dos promotores “oponibles” que flanquean una región entre promotores de modo que el inicio 40 de la transcripción dirigido por unos de los promotores provoque la transcripción de la cadena con sentido de la región entre promotores y el inicio de la transcripción dirigido por el otro promotor provoque la transcripción de la cadena antisentido de la región entre promotores es una disposición bien conocida en la técnica, por ejemplo, en la serie de vectores pGEM7 de Promega Corp., Madison WI, USA.

Las construcciones de ADN de la invención difieren de las de la técnica anterior en la presencia de al menos un 45 terminador de la transcripción colocado transcripcionalmente cadena abajo de uno de los promotores. El terminador de la transcripción puede ser uni o bidireccional, estando influenciada la elección de terminadores unidireccionales frente a bidireccionales por la colocación del terminador o terminadores en o fuera de la región entre promotores, como se explica a continuación. El terminador puede ser de origen procariota, eucariota o fágico. Los terminadores de bacteriófagos, por ejemplo terminadores T7, T3 y SP6, son particularmente preferidos. El único requisito es que el 50 terminador debe ser capaz de provocar la terminación de la transcripción que se inicia en el promotor con relación al que está transcripcionalmente cadena abajo. En la práctica, esto significa que el promotor y el terminador deben formar una “combinación funcional”, es decir, el terminador debe ser funcional para el tipo de ARN polimerasa que inicia en el promotor. A modo de ejemplo, un promotor para la ARN pol II eucariota y un terminador para la ARN pol II eucariota generalmente formarían una combinación funcional. La selección de una combinación funcional es particularmente 55 importante cuando tienen que usarse promotores y terminadores de bacteriófagos en las construcciones de la invención, ya que los promotores y terminadores fágicos son ambos específicos de polimerasa. Para formar una combinación funcional tanto el promotor como el terminador deben ser específicos para la misma polimerasa, por ejemplo, promotor T7 y terminador T7, promotor T3 y terminador T3 etc.

60 En una realización, la construcción de ADN de la invención puede comprender un único terminador de la transcripción, colocado (como se observa a partir del extremo 3' del primer promotor) cadena abajo del primer promotor y cadena abajo de al menos un sitio de clonación, en la que el primer terminador de la transcripción está unido de forma operativa al primer promotor, donde el único terminador de la transcripción está colocado en la región entre promotores.

65 En una disposición alternativa, la construcción de ADN comprende un único terminador de la transcripción colocado fuera de la región entre promotores. En una realización adicional más, la construcción de ADN puede comprender dos terminadores de la transcripción, cada uno de los cuales está colocado transcripcionalmente cadena abajo de uno

de los dos promotores. En esta disposición, uno o ambos terminadores pueden colocarse en la región entre promotores. Estas diversas realizaciones de las construcciones de ADN de la invención se describirán más completamente a continuación, con referencia a los dibujos adjuntos. La colocación de un primer terminador de la transcripción fuera de la región entre promotores también puede definirse adicionalmente como, es decir, de modo que un primer terminador de la transcripción esté colocado (como se observa a partir del extremo 3' del primer promotor) cadena abajo del primer promotor, cadena abajo de al menos un sitio de clonación, y cadena abajo del extremo 5' de segundo promotor.

La colocación de un segundo terminador de la transcripción fuera de la región entre promotores también puede definirse adicionalmente como, es decir, de modo que un segundo terminador de la transcripción colocado (como se observa a partir del extremo 3' del segundo promotor) cadena abajo del segundo promotor, cadena abajo de al menos un sitio de clonación, y cadena abajo del extremo 5' del primer promotor.

Además, cuando el terminador no está localizado en la región entre promotores, la distancia entre el extremo 5' del primer promotor y el extremo 3' del segundo terminador, o la distancia entre el extremo 5' del segundo promotor y el extremo 3' del primer terminador es preferiblemente pequeña, es decir, tal que el extremo 3' del primer terminador de la transcripción esté separado del extremo 5' del segundo promotor en no más de 2000 nucleótidos, preferiblemente no más de 1000 nucleótidos, más preferiblemente no más de 500 nucleótidos, incluso más preferiblemente no más de 200 nucleótidos, de forma especialmente preferible no más de 100 nucleótidos, de forma más especialmente preferible no más de 50 nucleótidos, de forma incluso más especialmente preferible no más de 20 nucleótidos, de forma particularmente preferible no más de 10 nucleótidos, de forma más particularmente preferible no más de 6 nucleótidos.

Además, cuando el segundo terminador de la transcripción está localizado fuera de la región entre promotores, preferiblemente el extremo 3' del segundo terminador de la transcripción está separado del extremo 5' del primer promotor en no más de 2000 nucleótidos, preferiblemente no más de 1000 nucleótidos, más preferiblemente no más de 500 nucleótidos, incluso más preferiblemente no más de 200 nucleótidos, de forma especialmente preferible no más de 100 nucleótidos, de forma más especialmente preferible no más de 50 nucleótidos, de forma incluso más especialmente preferible no más de 20 nucleótidos, de forma particularmente preferible no más de 10 nucleótidos, de forma más particularmente preferible no más de 6 nucleótidos.

Como se ha definido anteriormente la expresión “región entre promotores” se refiere a toda la secuencia de ADN entre los dos promotores. Como se ha explicado anteriormente, en ciertas realizaciones de la invención el terminador o terminadores de la transcripción pueden estar situados en la región entre promotores. La región entre promotores puede, ventajosamente, comprender una secuencia de nucleótidos que forma un molde para la producción de ARNds. La longitud y naturaleza precisas de esta secuencia no es objeto de la invención. La invención proporciona adicionalmente construcciones de ADN en las que la región entre promotores comprende un sitio de clonación. La función del sitio de clonación es facilitar la inserción de un fragmento de ADN que forma un molde para la producción de ARNds entre los dos promotores. Por tanto, la invención proporciona una serie de vectores de clonación que son de uso general en la construcción de vectores molde para la producción de ARNds. También se incluyen en el alcance de la invención vectores derivados de los vectores de clonación que tienen un fragmento de ADN insertado en el sitio de clonación.

El sitio de clonación puede comprender adicionalmente uno o más de los siguientes:

- al menos un sitio de restricción, (como se sabe en la técnica), o uno o más sitios de restricción adicionales, por ejemplo, para proporcionar un sitio de clonación múltiple (como se sabe en la técnica),

- un ADN de relleno, por ejemplo, flanqueado por al menos dos sitios de restricción, tales como dos sitios de restricción *Bst*XI o dos sitios de restricción *Xcm*I,

- sitios de recombinación *att*R1 y *att*R2,

- una secuencia de nucleótidos *ccdB*,

- un nucleótido *ccdB* que comprende adicionalmente al menos un único sitio de restricción de extremo romo, tal como un sitio de restricción *Srf*I, y/o

- un fragmento de ADN insertado en al menos un sitio de clonación. Todas las construcciones de ADN proporcionadas por la invención pueden, ventajosamente, formar parte de un vector de clonación replicable, tal como, por ejemplo, un vector plasmídico. Además de los promotores oponibles, la región entre promotores y el terminador o terminadores de la transcripción, la “estructura” del vector puede contener adicionalmente uno o más de los elementos generales encontrados habitualmente en vectores replicables, por ejemplo un origen de replicación para permitir la replicación autónoma en una célula hospedadora y un marcador de selección, tal como un gen de resistencia a antibióticos. El gen marcador de selección (por ejemplo, el gen de resistencia a antibióticos) puede contener en sí mismo un promotor y un terminador de la transcripción y debe entenderse que estos son completamente independientes de los elementos promotores y terminadores necesarios por la invención y no deben tomarse en consideración para determinar si un vector particular entra dentro del alcance de la invención.

ES 2 281 420 T3

Las construcciones de ADN de acuerdo con la invención pueden construirse fácilmente a partir de los elementos componentes de la secuencia usando técnicas recombinantes convencionales bien conocidas en la técnica y descritas, por ejemplo, en F. M. Ausubel *et al.* (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons; Inc. (1994), como apreciará un especialista en la técnica a partir de la siguiente descripción detallada de la invención y los Ejemplos adjuntos.

A continuación se proporciona una descripción detallada de las construcciones de ADN de acuerdo con la invención, con referencia a los siguientes dibujos esquemáticos en los que:

10 Las Figuras 1 (a) a 1(e) son representaciones esquemáticas de varias realizaciones diferentes de la construcción de ADN de acuerdo con la invención que ilustra la colocación relativa de los elementos promotores y terminadores de la transcripción.

15 La Figura 2 (a) es una representación esquemática de un vector de la técnica anterior incluido para propósitos de comparación.

Las Figuras 2 (b) a 2 (e) son representaciones esquemáticas de varias realizaciones adicionales de la construcción de ADN de acuerdo con la invención que ilustra el uso de diferentes sitios de clonación en la región entre promotores.

20 Con referencia a los Dibujos, la Figura 1 (a) ilustra esquemáticamente una primera construcción de ADN de acuerdo con la invención que es un vector plasmídico que comprende dos promotores oponibles; un primer promotor a) y un segundo promotor b) 2 flanqueando una región entre promotores c), estando dicha región entre promotores cadena abajo del extremo 3' del primer promotor, y cadena abajo del extremo 3' del segundo promotor. El primer promotor y el segundo promotor pueden ser idénticos o diferentes. Esta realización comprende un primer terminador de la transcripción e) y un segundo terminador de la transcripción f) que están los dos colocados en la región entre promotores. En esta realización, el primer terminador y el segundo terminador son preferentemente terminadores unidireccionales.

30 Puede insertarse un fragmento de ADN en al menos un sitio de clonación d). Dicho fragmento se somete a transcripción dirigida por el primer promotor a) y el segundo promotor b) (es decir, transcripción de ambas cadenas), provocando la generación de dos fragmentos de ARN que pueden combinarse en ARN bicatenario del fragmento de ADN insertado (tanto *in vitro* como *in vivo*).

35 Cualquier secuencia de ADN deseada, tal como una secuencia de ADN genómico, o una secuencia de ADNc o cualquier otra secuencia codificante, puede insertarse en el al menos un sitio de clonación. Sin limitarse a ninguna explicación específica, se asume que cuando a) y e) forman una combinación funcional, la ARN polimerasa que inicia la transcripción en a) transcribirá la región entre promotores incluyendo el al menos un sitio de clonación y el fragmento de ADN insertado en el al menos un sitio de clonación y se terminará cuando alcance e). De forma similar, la ARN polimerasa que inicia la transcripción en b) transcribirá la región entre promotores incluyendo el al menos un sitio de clonación y el fragmento de ADN insertado en el al menos un sitio de clonación y terminará cuando alcance f). Los terminadores provocan que la ARN polimerasa se detenga, interrumpa la transcripción y se retire del molde. Esto evita la transcripción ilimitada de la estructura del vector, y reduce la transcripción no específica de ADN no esencial.

45 La región entre promotores comprende adicionalmente una secuencia de nucleótidos que corresponde a una diana para la inhibición por ARN bicatenario. Esta secuencia se denomina "TF" para el fragmento diana. Es esta secuencia la que, cuando se transcribe en ARNds, será responsable de la inhibición por ARN bicatenario específica de un gen diana. El fragmento diana puede formarse a partir de un fragmento de ADN genómico o ADNc del gen diana. Su longitud y secuencia nucleotídica precisas no son objeto de la invención.

50 En la disposición mostrada en la Figura 1 (a) los dos terminadores están colocados en cada lado del TF en la región entre promotores. Cada uno de los terminadores está colocado transcripcionalmente cadena abajo de uno de los promotores, el primer terminador e) está transcripcionalmente cadena abajo del primer promotor a) y el segundo terminador f) está transcripcionalmente cadena abajo del segundo promotor b). Suponiendo que a) y e) formen una combinación funcional, como se ha descrito anteriormente, la ARN polimerasa que inicia la transcripción en a) transcribirá la región entre promotores hasta e incluyendo TF y terminará cuando alcance e). De forma similar, la ARN polimerasa que inicia la transcripción en b) transcribirá la región entre promotores hasta e incluyendo TF en la cadena opuesta y terminará cuando alcance f). Los terminadores provocan que la ARN polimerasa se detenga, interrumpa la transcripción y se retire del molde. Esto evita la transcripción ilimitada de la estructura del vector, y reduce la transcripción no específica de ADN no esencial.

60 Los transcritos generados a partir de este vector, dependiendo de la colocación precisa de los terminadores en el vector, ser ARNds casi completamente específicos correspondientes a la región TF. A través de la colocación directa de las secuencias terminadoras en el extremo cadena abajo de la región TF en ambos lados del fragmento de ADN insertado, la cantidad de material transcritto se reduce completamente a las secuencias especificadas por el molde. 65 Por lo tanto, se obtiene una cantidad mayor de ARNds específico. Además, las construcciones ahora también son más estables, debido a la ausencia de transcripción de la estructura del vector. La última característica (estabilidad), combinada con el índice de transcripción específica ahora relativamente mayor, proporciona un sistema adaptado para sintetizar cantidades mayores de cadenas de ARNds cortas específicas. Esta cantidad proporcionalmente mayor de

ES 2 281 420 T3

transcrito, que provoca concentraciones mayores de ARNds específico, potencia el efecto inhibidor en protocolos de ARNi. En protocolos de ARNi basados en la expresión de ARNds en un organismo de alimento, la toxicidad para los organismos de alimentación debida a la elevada expresión de ARN se lleva a un nivel mínimo por el uso de este vector.

5 Un ejemplo específico de un vector del tipo ilustrado en la Figura 1 (a), considerado como la disposición óptima para aplicaciones de ARNi, es el plásmido pGN9 descrito en los Ejemplos adjuntos. Los terminadores de la transcripción usados en pGN9 son terminadores específicos de la ARN polimerasa T7, ya que el vector contiene dos promotores T7 oponibles. Sin embargo, podrían usarse otros sistemas tales como un sistema de expresión basado en el promotor, terminador y polimerasa T3 o SP6, u otros promotores y terminadores procariotas o eucariotas.

10 La Figura 1 (b) ilustra esquemáticamente una construcción de ADN adicional de acuerdo con la invención que es un vector plasmídico que comprende dos promotores oponibles a) y b) que flanquean una región entre promotores c). Este vector también comprende dos terminadores de la transcripción e) y f) pero en esta disposición los dos terminadores están colocados fuera de la región entre promotores, de hecho los elementos terminadores ahora flanquean los dos promotores. La disposición es tal que e) está transcripcionalmente cadena abajo de a) mientras que f) está transcripcionalmente cadena abajo de b). De nuevo e) termina la transcripción iniciada por a), mientras que f) termina la transcripción iniciada por el promotor b). La colocación de los terminadores fuera de d) permite el uso de terminadores bidireccionales así como terminadores unidireccionales, en contraste con la disposición de la Figura 1 (a) en la que se prefieren terminadores unidireccionales a causa de la colocación de los terminares entre los promotores. Son conocidos en la técnica varios terminadores bidireccionales que podrían usarse de acuerdo con la invención. Generalmente, se ha observado que estos son no específicos de polimerasa.

25 La realización mostrada en la Figura 1 (b) proporciona esencialmente las mismas ventajas que las mostradas en la Figura 1 (a) sobre los vectores de la técnica anterior para la producción de ARNds. El vector mostrado en la Figura 1 (b) conducirá a la producción de transcritos que son ligeramente más largos, incluyendo las regiones promotoras. Esta diferencia relativamente pequeña en la longitud del transcríto y por tanto el ARNds formado no afectará gravemente a la eficacia en un sistema ARNi.

30 La posición de los terminadores y el promotor en el ejemplo mostrado en la Figura 1 (b) se colocan preferiblemente en cercana proximidad, de modo que el extremo 5' de los promotores esté separado del extremo 3' de los terminadores de la transcripción en no más de 2.000 nucleótidos, preferiblemente no más de 1.000 nucleótidos, más preferiblemente no más de 500 nucleótidos, incluso más preferiblemente no más de 200 nucleótidos, de forma especialmente preferible no más de 100 nucleótidos, de forma más especialmente preferible no más de 50 nucleótidos, de forma incluso más especialmente preferible no más de 50 nucleótidos, de forma incluso más especialmente preferible no más de 20 nucleótidos, de forma particularmente preferible no más de 10 nucleótidos, de forma más particularmente preferible no más de 6 nucleótidos.

40 La Figura 1 (c) ilustra esquemáticamente una construcción de ADN adicional de acuerdo con la invención que es un vector plasmídico que comprende dos promotores oponibles a) y b) que flanquean una región entre promotores c). En esta realización se coloca un terminador (en este caso e)) en c) y el otro (f)) se coloca fuera de c). De nuevo, e) termina la transcripción iniciada por a) y f) termina la transcripción iniciada por b). Esta disposición puede proporcionar una solución útil al problema de la interferencia de uno de los terminadores con la actividad polimerasa en la otra dirección (por ejemplo, f) impide la transcripción iniciada por b)). Este vector proporciona esencialmente las mismas ventajas que las variaciones de vector mostradas en la Figura 1 (a) y Figura 1 (b) sobre la técnica anterior. La diferencia relativamente pequeña en la longitud del transcríto debida a la transcripción de uno de los promotores no afectará significativamente a la eficacia en sistemas de ARNi. Éste es más particularmente el caso cuando el terminador que se localiza fuera de la región entre promotores c) está en cercana proximidad del promotor, como se ha definido anteriormente.

50 Las Figuras 1 (d) y 1 (e) ilustran esquemáticamente dos construcciones de ADN adicionales de acuerdo con la invención que son las dos vectores plasmídicos que comprenden dos promotores oponibles a) y b) que flanquean una región entre promotores c). Estas realizaciones comprenden solamente un único terminador. En la disposición mostrada en la Figura 1 (d) se coloca fuera de c) un único terminador e) que termina la transcripción de a). La colocación del terminador fuera del IPR permite el uso de un terminador bidireccional o un terminador unidireccional en este sistema. En la realización mostrada en la Figura 1 (d) e) se coloca en c). Por lo tanto a) debe ser preferiblemente un terminador unidireccional.

60 Realizaciones adicionales de la construcción de ADN de acuerdo con la invención se ilustran esquemáticamente en las Figuras 2 (b) a 2 (e).

Estas realizaciones son todas vectores de clonación plasmídicos, basados en la disposición óptima de los promotores y terminadores mostrados en la Figura 1 (a), y descritos anteriormente, que contienen sitios de clonación para facilitar la inserción de un fragmento de ADN en el al menos un sitio de clonación.

65 Estas realizaciones son todas vectores de clonación plasmídicos, basados en la disposición óptima de los promotores y terminadores mostrados en la Figura 1 (a), que contienen sitios de clonación para facilitar la inserción de un fragmento de ADN diana en la región entre promotores.

ES 2 281 420 T3

La Figura 2 (a), que es una representación esquemática de un vector de clonación de la técnica anterior, se incluye para propósitos de comparación. Este vector comprende dos promotores oponibles a) y b), que pueden ser idénticos o diferentes, flanqueando un sitio de clonación múltiple (MCS).

- 5 La Figura 2 (b) ilustra un primer tipo de vector de clonación plasmídico de acuerdo con la invención. El vector contiene un primer promotor oponible a) y un segundo promotor oponible b) que flanquea una región entre promotores. La región entre promotores puede definirse adicionalmente como: la región de ADN entre el extremo 3' del primer promotor y el extremo 3' del segundo promotor, y que está cadena abajo del primer promotor, y que está cadena abajo del segundo promotor, y que preferiblemente no contiene el extremo 5' del primer promotor o del segundo promotor.
- 10 10 Esta región entre promotores comprende adicionalmente los terminadores e) y f) que flanquean un sitio de clonación múltiple MCS. El MCS comprende al menos un sitio de restricción individual, y preferiblemente más de un sitio de restricción como se sabe en la técnica, cualquiera de los cuales puede usarse para la inserción de un fragmento de ADN.
- 15 15 La Figura 2 (c) ilustra un tipo adicional de vector de clonación plasmídico de acuerdo con la invención. Este vector contiene de nuevo promotores a) y b) oponibles que flanquean una región entre promotores que comprende los terminadores e) y f). En esta realización, a) y b) flanquean un sitio de clonación que está adaptado para la clonación facilitada de fragmentos de PCR, que comprenden un ADN de relleno flanqueado por dos sitios de restricción idénticos, en este caso sitios BstXI. La secuencia específica del ADN de relleno no es esencial, con la condición de que dicho 20 20 ADN de relleno no impida el efecto deseado y/o la actividad deseada de las construcciones de ADN de la invención. Un ejemplo específico de un vector de acuerdo con este aspecto de la invención descrito en este documento es el plásmido pGN29.

La clonación de los productos de PCR usando los sitios de reconocimiento BstXI y adaptadores BstXI es generalmente conocida en la técnica. Los adaptadores BstXI se obtienen en el mercado, tal como de Invitrogen (Groningen, Países Bajos). Estos adaptadores son adaptadores no palindrómicos diseñados para una clonación más fácil y eficaz de productos de PCR en vectores. El uso de estos adaptadores reduce la concatemerización de adaptadores o ADN de inserto teniendo solapamientos no complementarios (CACA). El ADN de relleno se incluye simplemente para permitir una fácil diferenciación entre un vector cortado y no cortado por BstXI en base al tamaño. Su longitud y secuencia 30 30 precisas no son de importancia.

La Figura 2 (d) ilustra un tipo adicional de vector de clonación plasmídico de acuerdo con la invención. Este vector contiene de nuevo promotores oponibles a) y b) que flanquean una región entre promotores que comprende los terminadores e) y f). En esta realización, a) y b) flanquean un sitio de clonación que facilita una clonación de "Alto 35 35 Rendimiento" en base a la recombinación homóloga en lugar de la digestión con enzimas de restricción y ligamiento. Como se muestra esquemáticamente en la Figura 2 (d), el sitio de clonación comprende los sitios de recombinación attR1 y attR2 del bacteriófago lambda que flanquean un gen que es letal para *E. coli*, en este caso el gen ccdB.

Un método de clonación alternativo de fragmentos de ADN en este vector (no mostrado en la Figura 2 (d)), consiste 40 40 en una variante de este vector, en la que la secuencia de ADN de ccdB comprende adicionalmente al menos un sitio de restricción único, siendo preferiblemente el al menos un sitio de restricción único, un sitio de restricción de extremo romo, tal como un sitio de restricción SrfI. La inserción de un fragmento de ADN en el al menos un sitio de restricción único, provoca la inactivación del gen ccdB, y por tanto la inactivación del gen ccdB letal.

45 45 Se muestra una variante adicional de un vector en la Figura 2 (d) en la que el attR1 y el attE2 no están presentes. Dicho vector comprende al menos un sitio de clonación, estando compuesto dicho al menos un sitio de clonación por una secuencia de ccdB, comprendiendo adicionalmente dicha secuencia de ccdB al menos un sitio de restricción único, siendo preferiblemente el al menos un sitio de restricción único un sitio de restricción de extremo romo, tal como un sitio de restricción SrfI. La inserción de un fragmento de ADN en el al menos un sitio de restricción único, provoca la inactivación del gen ccdB, y por tanto la inactivación del gen ccdB letal.

Estos sitios de clonación que comprenden la secuencia de nucleótidos de ccdB y/o los sitios attR (R1 y/o R2) se obtienen del sistema de clonación GatewayTM disponible en el mercado en Life Technologies, Inc. El sistema de clonación GatewayTM se ha descrito ampliamente por Hartley *et al.* en el documento WO 96/40724 (PCT/US96/10082). 55 55 Un ejemplo específico de un vector de acuerdo con este aspecto de la invención descrito en este documento es pGN39.

La Figura 2 (e) y 2 (f) ilustran un tipo adicional más de vector de clonación plasmídico de acuerdo con la invención. Este vector contiene de nuevo promotores oponibles a) y b) que flanquean una región entre promotores c) que comprenden los terminadores e) y f). En la realización mostrada en la Figura 2 (e), e) y f) flanquean un sitio de clonación que facilita la clonación de "alto rendimiento" de productos de PCR por clonación TATM. Este sitio de clonación comprende un ADN de relleno flanqueado por dos sitios de restricción idénticos para una enzima que genera nucleótidos T de solapamiento. En este caso los sitios de restricción son sitios XcmI, pero podrían usarse otros sitios que se escinden para generar nucleótidos T de solapamiento con efecto equivalente. Los nucleótidos T de solapamiento que facilitan la clonación de productos de PCR que tienen un nucleótido A de solapamiento. Este principio es conocido 60 60 como clonación TATM. El vector cortado con nucleótidos T de solapamiento puede "topomerizarse" para generar un vector de clonación del tipo mostrado esquemáticamente en la Figura 2 (f), uniendo la enzima topoisomerasa a los nucleótidos T de solapamiento. El vector resultante también facilita la clonación de productos de PCR por el principio conocido como clonación TOPOTM.

ES 2 281 420 T3

Los sistemas de clonación tanto TOPO™ como TA™, aunque no para los vectores descritos en esta invención, están disponibles en el mercado en Invitrogen. El sistema de clonación TOPO™ se ha descrito ampliamente por Shuman en el documento WO 96/19497 (PCT/US95/16099). El sistema de clonación TA™ se ha descrito ampliamente por Hernstadt *et al.* en el documento WO 92/06189 (PCT/US91/07147)

5 Un especialista en la técnica apreciará fácilmente que aunque las Figuras 2 (b) - 2 (f) ilustran la inclusión de sitios de clonación diferentes en un vector del tipo ilustrado en la Figura 1 (a), estos sitios de clonación podrían incluirse en cualquiera de la construcciones de ADN de la invención, incluyendo las ilustradas esquemáticamente en las Figuras 1 (b) a 1 (e).

10 *Aplicación de las construcciones de ADN de la invención en tecnología de ARNi*

Como se ha mencionado anteriormente, una aplicación principal de las construcciones/vectores de ADN de la invención es en la producción de ARN bicatenario para el uso en tecnología de ARNi. En particular, las construcciones 15 son útiles en protocolos de ARNi *in vivo* en el gusano nematodo *C. elegans*.

20 En *C. elegans*, se ha realizado ARNi tradicionalmente por inyección de ARNdS en el gusano. Fire *et al.* describe estos métodos ampliamente en la Solicitud Internacional N° WO 99/32619. En resumen, se producen ambas cadenas de ARN *in vitro* usando kits de transcripción *in vitro* disponibles en el mercado. Se deja que ambas cadenas de ARN formen ARNdS, después de lo cual se inyecta el ARNdS en *C. elegans*. El nuevo sistema de vector desarrollado en la presente invención es una mejora drástica en este método tradicional. En primer lugar, puede producirse el ARN en una etapa, por ejemplo usando dos promotores idénticos tales como en el vector pGN9. En segundo lugar, y más importante, debido a la presencia de terminadores, los transcritos y por tanto el ARNdS formado, serán más específicos ya que solamente se transcribirá el fragmento diana clonado. Esto producirá un ARNi más eficaz.

25 Un método adicional para realizar experimentos de ARNi en *C. elegans*, se ha descrito por Plaetinck *et al.*, en el documento WO 00/01846. En este método se alimenta a los gusanos *C. elegans* con bacterias que producen ARNdS. El ARNdS pasa la barrera del intestino del gusano e induce el mismo ARNi que si se hubiera inyectado ARNdS. Para estos experimentos, la cepa de *E. coli* preferida es HT115. (DE3), y la cepa de *C. elegans* preferida es nuc-1; gun-1. 30 Los vectores mejorados proporcionados por la invención también mejoran la eficacia de ARNi en este método, como se muestra en el siguiente ejemplo, ya que solamente se produce ARNdS eficaz.

35 Otro método para realizar ARNi se ha descrito también por Plaetinck *et al.* en el documento WO 00/01846. En resumen, este método se basa en la producción de ARNdS en el propio gusano. Esto puede hacerse usando promotores del gusano en los vectores descritos, o usando un gusano transgénico que exprese una polimerasa específica para promotores no de *C. elegans* presentes en el vector, de modo que esta polimerasa dirija la transcripción del ARNdS. Los promotores se seleccionarán preferentemente entre los promotores de ARN bacteriófagos conocidos, tales como los promotores de ARN T7 o T3 o SP6, que proporcionan la ventaja de un elevado nivel de transcripción dependiente 40 solamente de la unión de la polimerasa afín.

45 El ADN del vector plasmídico puede introducirse en el gusano por varios métodos. Primero, el ADN puede introducirse por el método de inyección tradicional (Methods in Cell Biology, Vol 48, *C. elegans* Modern Biological Analysis of an organism, ed. por Epstein y Shakes). Segundo, el ADN puede introducirse por alimentación con ADN. Como han mostrado Plaetinck *et al.* en el documento WO 00/01846, el ADN plasmídico puede introducirse en el gusano alimentando al gusano con una cepa de *E. coli* que alberga el plásmido. Preferentemente la cepa de *E. coli* es OP50, o MC10161 o HT115 (DE3) pero sería adecuada cualquier otra cepa para este propósito. La cepa de *C. elegans* es preferentemente una cepa mutante nuc-1 o una cepa nuc-1; gun-1. El ADN plasmídico de *E. coli* pasa la barrera del intestino y se introduce en el nematodo, provocando la expresión de ARNdS. Como con otros métodos de ARNi descritos anteriormente, el uso del nuevo sistema de vector potenciará el ARNi por la producción de solamente ARNdS específico.

50 La invención se entenderá adicionalmente con referencia a los siguientes Ejemplos experimentales, junto con las siguientes Figuras adicionales en las que:

55 La Figura 3 es una representación (mapa de plásmido) de pGN1.

La Figura 4 es una representación (mapa de plásmido) de pGN9.

La Figura 5 ilustra la secuencia de nucleótidos de un fragmento del plásmido pGN1, indicado para mostrar las 60 posiciones de los promotores T7 oponibles.

La Figura 6 representa la secuencia de nucleótidos del terminador de la transcripción T7.

La Figura 7 ilustra las secuencias de oligonucleótidos oGN27, oGN28, oGN29 y oGN30 usados para insertar los 65 terminadores de la transcripción T7 en pGN1. Las posiciones de las secuencias terminadoras T7 pol y de diversos sitios de restricción están marcadas.

La Figura 8 ilustra la secuencia de nucleótidos de un fragmento del plásmido pGN9, indicado para mostrar las posiciones de los promotores T7 oponibles y los terminadores de la transcripción T7.

ES 2 281 420 T3

La Figura 9 (a) es una representación (mapa de plásmido) de pGN29; (b) es una representación (mapa de plásmido) de pGN39; (c) es una representación (mapa de plásmido) del plásmido TopoRNAi.

La Figura 10 muestra la secuencia de nucleótidos completa del plásmido pGN9.

5 La Figura 11 muestra la secuencia de nucleótidos completa de plásmido de pGN29.

La Figura 12 muestra la secuencia de nucleótidos completa del plásmido pGN39.

10 La Figura 13 muestra la secuencia de nucleótidos completa del plásmido TopoRNAi.

La Figura 14 muestra la secuencia completa del plásmido pGN49A.

15 La Figura 15 muestra la secuencia completa del plásmido pGN59A.

La Figura 16 es una representación (mapa de plásmido) de pGN49A.

20 La Figura 17 es una representación (mapa de plásmido) de pGN59A.

20 Ejemplo 1

Construcción de vector

25 El punto de partida para la construcción de los vectores ejemplificados en este documento fue el plásmido pGN1. Este plásmido, descrito en la Solicitud Internacional Nº WO 00/01846 del solicitante en trámite junto con la presente, contiene dos promotores T7 oponibles que flanquean un sitio de clonación múltiple.

30 La construcción del vector se realizó de acuerdo con las técnicas de biología molecular convencionales conocidas en la técnica y descritas, por ejemplo, en F. M. Ausubel *et al.* (eds.) *Current Protocols in Molecular Biology*, Jonh Wiley & Sons, Inc. (1994).

1) *Construcción de pGN9*

35 Primero se digirió pGN1 con las enzimas de restricción EcoRI y KpnI. Se hibridaron los oligonucleótidos oGN27 y oGN28 (Figura 7) para generar un fragmento bicatenario que después se ligó en el vector cortado con EcoRI/KpnI. El plásmido resultante se volvió a digerir con XbaI y HindIII. Se hibridaron los oligonucleótidos oGN29 y oGN30 para generar un fragmento bicatenario que después se hibridó en el vector cortado con XbaI/HindIII. El vector resultante se denominó pGN9 (Figuras 4 y 10).

40 2) *Construcción de vectores de clonación adicionales*

Se generó pGN29 (Figura 9(a); Figura 11) reemplazando el MCS en pGN9 con un ADN de relleno flanqueado por sitios BstXI. Los adaptadores de BstXI están disponibles en el mercado en Invitrogen (Groningen, Países Bajos).

45 Se generó pGN39 (Figura 9 (b); Figura 12) siguiendo etapas; se digirió pGN29 con BstXI. Los adaptadores BstXI (Invitrogen, Groningen, Países Bajos) se ligaron al Casete A proporcionado por el sistema GATEWAYTM (Life Technologies, Inc.). El Casete A contiene attR1, CmR, CcdA, CcdB, attR2. El Casete A con los adaptadores después se ligó en pGN29 digerido, produciendo pGN39A. pGN39A contiene un único sitio *SrfI* en el gen *ccdB*.

50 El vector TopoRNAi (Figura 9 (c); Figura 13) se generó del siguiente modo; se digirió pGN29 con BstXI. Usando PCR con los cebadores oGN103 y oGN104 y el molde pCDM8 (Invitrogen, Groningen, Países Bajos), se generó un relleno que incluye sitios *XcmI*. En el producto de PCR, se ligaron adaptadores BstXI, y el producto de ligamiento resultante se ligó en el vector pGN29 digerido con BstXI produciendo el vector TopoRNAi.

55

oGN103: 5' TACCAAGGCTAGCATGGTTATCACTGATAAGTTGG 3'

oGN104: 5' TACCAAGGCTAGCATGGCCTGCCTGAAGGCTGC 3'

60

Se construyó PGN49A para insertar un sitio único de restricción no romo adicional y para delecionar el gen CmR de pGN39. Se usó PCR de solapamiento. Se realizó una primera PCR con los cebadores oGN126 y oGN127 y PGN39A como molde. Usando los cebadores oGN128 y oGN129 y el mismo molde se generó un segundo fragmento. La PCR solapante usando los fragmentos resultantes y los cebadores oGN126P y oGN129P produjo un producto de PCR final. A este producto de PCR final, se ligaron los adaptadores BstXI, y el producto de ligamiento se ligó en pGN29 digerido con BstXI. El vector resultante se denominó PGN49A.

ES 2 281 420 T3

Se generó un vector de control para ensayar la eficacia del vector de clonación pGN49A, debiendo contener dicho vector los promotores T7, pero no los terminadores T7. Para esto, se aisló el inserto de XbaI de pGN49A y se clonó en pGN1 digerido con la misma enzima de restricción. El vector resultante se denominó pGN59A.

5 oGN126 pGATCTGGATCCGGCTTACTAAAAGCCAGATAACAGTATGC
 oGN127 GGAGACTTTATCGCTTAAGAGACGTGCCTGGCCAGGGGGATCACC
10 oGN128:
 CCAGTGCACGTCTCTTAAGCGATAAAGTCTCCCGTGAACTTACCCGGTGG
 oGN129 pGCTGTGTATAAGGGAGCCTGACATTATATTCCCCAG

15 Ejemplo 2

Para ilustrar la utilidad de los vectores mejorados en ARN

20 Este experimento se diseñó para ilustrar la eficacia mejorada de los vectores mejorados de esta invención en la inhibición por ARN bicatenario, en comparación con los vectores conocidos de la técnica anterior. Podría esperarse un aumento significativo en la eficacia del sistema, ya que se produjo ARNds más eficaz y por tanto el ARNi funcionó mejor. El sistema experimental para este experimento de prueba de concepto fue medir el rescate de *C. elegans* a 25°C en mutantes de *C. elegans* nuc-1/pha-1 (e2123) ts por ARNi de sup35 usando ARNds de alimentación de PGN-2 (-25 terminador) y pGN-12 (+ terminador), con PGN-1 (vector vacío) como control y diluidor. La mutación pha-1 ts/sup-35 se describió ampliamente por Schnabel en el documento WO 99/49066.

30 La mutación *nuc-1* en *C. elegans* proporciona una cepa de *C. elegans* que muestra mejores capacidades de captación, tales como la captación de los complejos de ARNds, que *C. elegans* de tipo silvestre. Este mutante está delecionado en la mayor parte de las enzimas ADNasa, y se ha demostrado en solicitudes anteriores en trámite junto con la presente que esta cepa de *C. elegans* produce ARNi potenciado alimentando al nematodo con ARNds.

35 La mutación pha-1 (e2123) ts proporciona una cepa mutante de *C. elegans* con un fenotipo de supervivencia a 15°C y letalidad a 25°C. Esta letalidad se puede suprimir por la inhibición de la expresión de sup-35. Por tanto el ARNi de sup-35 debe facilitar el rescate de pha-1 (e2123) ts a 25°C. Los vectores de la presente invención, cuando expresan el ARNds a partir de sup-35, deben aumentar la eficacia de ARNi de sup-35 en el rescate de mutantes pha-1 (e2123) ts a 25°C, en comparación con vectores que no contienen los terminadores.

40 El vector pGN1 se usó como vector vacío. El vector pGN2 (- terminador) es un vector que lleva el ADN de sup-35 y que expresa el ARNds de sup-35 cuando se introduce en el hospedador apropiado, el vector no tiene terminadores de la transcripción insertados. El vector pGN12 (+ terminador) es un vector que se ha descrito anteriormente, que contiene los terminadores transcripcionales, y por tanto provoca la producción mejorada de ARNds cuando se introduce en un hospedador apropiado. Por tanto, este vector tiene dos terminadores transcripcionales unidireccionales, ambos colocados en el interior de la región entre promotores, y que flanquean el fragmento sup-35. Se esperaba que el uso del último vector aumentara la eficacia del sistema, que aquí significa un mejor rescate (supervivencia) de mutantes pha-1 (e-2123) ts a 25°C.

Condiciones experimentales

50 Se llenaron placas de microtitulación de 12 pocillos con aproximadamente 2 ml de agar NGM por pocillo. (1 litro de agar NGM: 15 g de agar, 1 g de peptona, 3 g de NaCl, 1 ml de solución de colesterol (5 mg/ml en EtOH), con adición estéril después de esterilizar en autoclave 9,5 ml de CaCl₂ 0,1 M, 9,5 ml de MgSO₄ 0,1 mM, 25 ml de tampón KH₂PO₄/K₂HPO₄ 1 M pH 6, ampicilina (100 µg/l), 5 ml de IPTG 0,1 M y 5 ml de solución de nistatina (disuelta a 10 mg/ml en EtOH:CH₃COONH₄ 1:1 7,5 M).

55 Las placas secadas se salpicaron con aproximadamente 50 µl de un cultivo de una noche de bacterias HT115 (DE3) (Fire A, Carnegie Institution, Baltimore, MD) transformadas con los plásmidos. Después se sembraron en placas nematodos individuales en la fase de crecimiento L4 en pocillos individuales en el día 1. En cada pocillo 1 nematodo (P1). En el día dos, los nematodos P1 se colocaron en un nuevo pocillo y se dejaron incubar durante un día. Se repitió el mismo procedimiento en el día 3. Todas las placas se incubaron adicionalmente a 25°C para permitir que se formara la descendencia. La supervivencia inducida por ARNi de sup35 (rescate) se midió contando la descendencia.

Resultados

65 El experimento de ARNi en mutantes de *C. elegans* nuc-1/pha-1 (e2123) ts por alimentación con *E. coli* que expresa ARNds de sup-35.

ES 2 281 420 T3

Preparación

pGN1 como control

5 pGN2 (sup 35 - Term.)

pGN12 (sup 35 + Term.)

10 pGN2 + pGN1 diluciones 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32

pGN12 + pGN1 diluciones 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32

Condiciones

15 Temperatura de incubación 25°C

Lectura

20 Recuento de descendencia (hermafroditas adultos)

pGN1 (control)

Día 1	0	0	0	0
Día 2	0	0	0	0
Día 3	0	0	0	0

pGN2 (sin diluir)

Día 1	12	4	48	32
Día 2	24	23	80	85
Día 3	5	0	9	16

pGN12 (sin diluir)

Día 1	16	29	37	14
Día 2	27	22	57	2
Día 3	1	2	4	1

pGN2+1, dilución 1/2

Día 1	0	7	0	2
Día 2	9	10	0	3
Día 3	0	2	0	0

pGN12+1, dilución 1/2

Día 1	22	28	103	61
Día 2	36	45	53	40
Día 3	3	3	25	1

pGN2+1, dilución 1/4

Día 1	28	23	0	0
Día 2	6	3	0	0
Día 3	0	0	0	0

pGN12+1, dilución 1/4

Día 1	*	6	36	5
Día 2		24	55	3
Día 3				

pGN2+1, dilución 1/8

Día 1	0	0	4	0
Día 2	0	0	11	0
Día 3	0	0	0	0

pGN12+1, dilución 1/8

Día 1	31	12	16	38
Día 2	4	5	37	4
Día 3	0	0	2	1

pGN2+1, dilución 1/16

Día 1	0	0	0	0
Día 2	0	0	0	1
Día 3	0	0	0	0

pGN12+1, dilución 1/16

Día 1	1	0	0	0
Día 2	2	0	0	1
Día 3	0	1	1	1

pGN2+1, dilución 1/32

Día 1	0	0	0	0
Día 2	0	0	0	0
Día 3	0	0	0	0

* muere la madre

pGN12+1, dilución 1/32

Día 1	0	0	1	0
Día 2	0	L2	3	0
Día 3	2	0	L3- L4	0

Conclusiones

Como se esperaba los gusanos alimentados por bacterias que tenían pGN1, que no produjeron descendencia viable, debido al efecto letal de la mutación pha-1 a esta temperatura. La alimentación de la nematodo con *E. coli* que lleva pGN2 o pGN12 produjo una descendencia viable. Esto se debe a la alimentación del gusano con ARNd de sup-35. La diferencia remarcada entre los dos experimentos de alimentación puede observarse en la serie de dilución. Cuando se diluyen las bacterias que llevan pGN2, con bacterias que llevan pGN1, la cantidad de descendencia disminuye drásticamente, incluso a una dilución baja de uno a dos. Esta serie de dilución indica que se necesitan elevados niveles de ARNd para obtener una inducción de ARNi apropiada. En el experimento de alimentación con bacterias que llevan pGN12, aún se observa una descendencia significativa a una dilución de uno a ocho. Esto indica que en las bacterias que llevan pGN12, se forma ARNd mucho más eficaz. Este experimento muestra claramente que la adición de secuencias terminadoras en vectores para expresar ARNd como se ha descrito anteriormente, proporciona una ventaja significativa en la generación de ARNi.

Ejemplo 3

Comparación de la eficacia de ARNi de vectores con y sin terminadores T7 (pGN49 frente a pGN59)

Se han clonado tres genes diferentes en los vectores pGN49A y pGN59A. Se realizó la clonación amplificando los fragmentos génicos con ADN polimerasa PfuI que produce extremos romos, que facilitan la clonación en estos vectores. Estos fragmentos de PCR se clonaron en los vectores digeridos con SrfI. Se comprobó la inserción correcta del fragmento de los clones por PCR. Los fragmentos se eligen de modo que la expresión ds y ARNi provoquen un fenotipo letal de la descendencia. Este procedimiento permite comparar rápida y fácilmente la eficacia de los vectores pGN49 y pGN59 en ARNi.

ES 2 281 420 T3

Plásmido	Gen (acedb)	Estructura del vector ⁵
pGW5	B0511.8	pGN49A
pGW9	C01G8.7	PGN49A
pGW11	C47B2.3	pGN49A
pGW17	B0511.8	pGN59A
pGW21	C01G8.7	pGN59A
pGW23	C47B2.3	pGN59A

20 Todos los plásmidos (serie pGW) se transforman en bacterias *E. coli* AB301-105 (DE3) por metodología convencional. Después las bacterias se hacen crecer en LB/amp a 37°C durante 14-18 horas. Estos cultivos se centrifugaron y se disolvió el sedimento bacteriano en tampón S completo que contenía IPTG 1 mM y 100 µg/µl de ampicilina.

25 En placas de 96 pocillos que contenían 100 µl de tampón S completo (que contenía IPTG 1 mM y concentración final de 100 µg/µl de ampicilina) y 10 µl de solución de bacterias, se añadieron 3 nematodos a cada pocillo, estando todos los nematodos en la fase de crecimiento L1.

30 Se incubaron las placas a 25°C durante 5-6 días. Cada día se inspeccionan las placas para el desarrollo de las larvas y la producción de descendencia F1.

Resultados

35 Se realizó ARNi ocho veces para cada plásmido construido. Los resultados muestran que cuando se insertan terminadores T7 en la estructura del vector, el fenotipo esperado da una aparición del 100%. Cuando no se usan terminadores T7 puede disminuir la reproducibilidad hasta un 50%. Como en el experimento previo, los resultados muestran que la adición de terminadores potencia significativamente el rendimiento de ARNi.

40 ADN

Fragmento	B0511.8	B0511.8	C01G8.7	C01G8.7	C47B2.3	C47B2.3
-----------	---------	---------	---------	---------	---------	---------

Vector	pGN49A	pGN59A	PGN49A	pGN59A	pGN49A	pGN59A
--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------

Plásmido	PGW5	PGW17	PGW9	PGW21	PGW11	PGW23
----------	------	-------	------	-------	-------	-------

50 resultante

Porcentaje	100	75	100	87,5	100	50
------------	-----	----	-----	------	-----	----

55 Letal

Porcentaje de	0	25	0	12,5	0	50
---------------	---	----	---	------	---	----

descendencia

60

65

ES 2 281 420 T3

Fragmento de PCR generado por los cebadores *oGN103* y *oGN140* en el molde *pCDM8*

5 **TACCAAGGCT AGCATGGTT ATCACTGATA AGTTGG**
ATAAGTTGGT GGACATATTA TGTTTATCAG TGATAAAAGTG TCAAGCATGA
CAAAGTTGCA GCCGAATACA GTGATCCGTG CCGGCCCTGG ACTGTTGAAC
10 GAGGTCGGCG TAGACGGTCT GACGACACGC AAACTGGCGG AACGGTTGGG
GGTGCAGCAG CCGGCGCTTT ACTGGCACTT CAGGAACAAG CGGGCGCTGC
15 TCGACGCACT GGCGAAGCC ATGCTGGCGG AGAATCATAC GCTTCGGTGC
CGAGAGCCGA CGACGACTGG CGCTCATTTC TGATCGGGAA TCCCGCAGCT
TCAGGCAGGC CCATGCTAGC CTTGGTACCA GCACAATGG

20 Fragmento de PCR de solapamiento, que se usó para generar *pGN49A*

25 gatctggatccggcttactaaaagccagataacagtatgcgtatggcgctg
attttgcggtataagaatatactgatgtatcccgaaagtatgtcaaaaa
gaggtgtgctatgaagcagcgtattacagtgacagttgacagcgcacagctatca
30 gttgctcaaggcatatatgatgtcaatatctccggctggtaagcacaaccatg
cagaatgaagcccgctgtctgcgtgccgaacgcgtggaaagcggaaaatcaggaa
gggatggctgaggtcgcccggttattgaaatgaacggcttttgcgtacgag
aacaggactggtaatgcagttaaaggttacacctataaaagagagagccg
35 ttatcgctgtttgtggatgtacagagtatgtatattgacacgcggccggcga
cgatgggtgatccccctggccagtcacgtctttaagcgataaaagtctccc
gtgaactttaccgggtggtgcataatcgggatgaaagctggcgcatgtac
40 caccgatatggccagtgtgcggctccgttatcgaaaagatggctgat
ctcagccaccgcgaaaatgacatcaaaacgcattaaacctgatgttctggg
45 gaatataaatgtcaggctccctatacacagc

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Uso de una construcción de ADN para producir ARN bicatenario correspondiente a una secuencia diana, en el
5 que dicha construcción de ADN comprende:

a) un primer promotor y

b) un segundo promotor,

10 en la que el primer y segundo promotores están en orientación opuesta entre sí y definen una región entre promotores colocada cadena abajo del extremo 3' del primer promotor y cadena abajo del extremo 3' del segundo promotor;

c) al menos un sitio de clonación colocado en la región entre promotores;

15 d) una secuencia de nucleótidos que corresponde a dicha secuencia diana insertada en dicho al menos un sitio de clonación;

e) un primer terminador de la transcripción colocado, como se observa desde el extremo 3' del primer promotor, 20 cadena abajo del primer promotor y cadena abajo de la secuencia de nucleótidos correspondiente a dicha secuencia diana, en la que el primer terminador de la transcripción está unido de forma operativa al primer promotor;

caracterizada porque el primer promotor y el segundo promotor son promotores de bacteriófagos.

25 2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha construcción de ADN comprende adicionalmente:

f) un segundo terminador de la transcripción colocado, como se observa desde el extremo 3' del segundo promotor, 30 cadena abajo del segundo promotor y cadena abajo de la secuencia de nucleótidos correspondiente a dicha secuencia diana, en la que el segundo terminador de la transcripción está unido de forma operativa al segundo promotor.

3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que el primer terminador de la transcripción está colocado en 35 la región entre promotores.

4. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que el primer terminador de la transcripción está colocado, como se observa desde el extremo 3' del primer promotor, cadena abajo del primer promotor, cadena abajo de la secuencia de nucleótidos correspondiente a dicha secuencia diana, y cadena abajo del extremo 5' del segundo promotor.

5. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2, 3, ó 4, en el que el segundo terminador de la transcripción está colocado en la región entre promotores.

40 6. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2, 3 ó 4 en el que el segundo terminador de la transcripción está colocado, como se observa desde el extremo 3' del segundo promotor, cadena debajo del segundo promotor, cadena abajo de la secuencia de nucleótidos correspondiente a dicha secuencia diana, y cadena abajo del extremo 5' del primer promotor.

45 7. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4, 5 ó 6, en el que el extremo 3' del primer terminador de la transcripción está separado del extremo 5' del segundo promotor en no más 2000 nucleótidos.

8. Uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el extremo 3' del primer terminador de la transcripción está separado del extremo 5' del segundo promotor en no más de 1000 nucleótidos.

9. Uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el extremo 3' del primer terminador de la transcripción está separado del extremo 5' del segundo promotor en no más de 500 nucleótidos.

55 10. Uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el extremo 3' del primer terminador de la transcripción está separado del extremo 5' del segundo promotor en no más de 200 nucleótidos.

11. Uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el extremo 3' del primer terminador de la transcripción está separado del extremo 5' del segundo promotor en no más de 100 nucleótidos.

60 12. Uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el extremo 3' del primer terminador de la transcripción está separado del extremo 5' del segundo promotor en no más de 50 nucleótidos.

13. Uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el extremo 3' del primer terminador de la transcripción está separado del extremo 5' del segundo promotor en no más de 20 nucleótidos.

65 14. Uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el extremo 3' del primer terminador de la transcripción está separado del extremo 5' del segundo promotor en no más de 10 nucleótidos.

ES 2 281 420 T3

15. Uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el extremo 3' del primer terminador de la transcripción está separado del extremo 5' del segundo promotor en no más de 6 nucleótidos.
- 5 16. Uso de acuerdo con la reivindicación 6 o reivindicación 7, en el que el extremo 3' del segundo terminador de la transcripción está separado del extremo 5' del primer promotor en no más de 2000 nucleótidos.
- 10 17. Uso de acuerdo con la reivindicación 16, en el que extremo 3' del segundo terminador de la transcripción está separado del extremo 5' del primer promotor en no más de 1000 nucleótidos.
- 15 18. Uso de acuerdo con la reivindicación 17, en el que el extremo 3' del segundo terminador de la transcripción está separado del extremo 5' del primer promotor en no más de 500 nucleótidos.
19. Uso de acuerdo con la reivindicación 18, en el que extremo 3' del segundo terminador de la transcripción está separado del extremo 5' del primer promotor en no más de 200 nucleótidos.
- 15 20. Uso de acuerdo con la reivindicación 19, en el que el extremo 3' del segundo terminador de la transcripción está separado del extremo 5' del primer promotor en no más de 100 nucleótidos.
- 20 21. Uso de acuerdo con la reivindicación 20, en el que el extremo 3' del segundo terminador de la transcripción está separado del extremo 5' del primer promotor en no más de 50 nucleótidos.
- 25 22. Uso de acuerdo con la reivindicación 21, en el que el extremo 3' del segundo terminador de la transcripción está separado del extremo 5' del primer promotor en no más de 20 nucleótidos.
23. Uso de acuerdo con la reivindicación 22, en el que el extremo 3' del segundo terminador de la transcripción está separado del extremo 5' del primer promotor en no más de 10 nucleótidos.
- 30 24. Uso de acuerdo con la reivindicación 23, en el que el extremo 3' del segundo terminador de la transcripción está separado del extremo 5' del primer promotor en no más de 6 nucleótidos.
- 25 25. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el primer y el segundo promotores son idénticos.
26. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en el que el primer y el segundo promotores no son idénticos.
- 35 27. Uso de acuerdo con la reivindicación 25 o reivindicación 26 en el que el primer promotor y el segundo promotor se eligen independientemente entre los promotores T7, T3, o SP6.
- 40 28. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el sitio de clonación comprende al menos un sitio de restricción.
29. Uso de acuerdo con la reivindicación 28, en el que el sitio de clonación comprende al menos dos sitios de restricción que flanquean una secuencia de ADN de relleno.
- 45 30. Uso de acuerdo con la reivindicación 29, en el que al menos dos sitios de restricción son idénticos.
31. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 28 a 30 en el que el al menos un sitio de restricción o los al menos dos sitios de restricción son sitios BstXI.
- 50 32. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 28 a 30 en el que el sitio o sitios de restricción son sitios XcmI.
33. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el sitio de clonación comprende las secuencias de recombinación attR1 y attR2.
- 55 34. Uso de acuerdo con la reivindicación 33 en el que el sitio de clonación comprende adicionalmente una secuencia de nucleótidos ccdB.
35. Uso de acuerdo con la reivindicación 34 en el que la secuencia de nucleótidos ccdB comprende adicionalmente al menos un sitio de restricción único.
- 60 36. Uso de acuerdo con la reivindicación 35 en el que el al menos un sitio de restricción único es un sitio de restricción de extremo romo.
- 65 37. Uso de acuerdo con la reivindicación 36 en el que el sitio de restricción de extremo romo es un sitio SrfI.

ES 2 281 420 T3

38. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que la construcción de ADN está en forma de un plásmido o vector.
- 5 39. Uso de acuerdo con la reivindicación 38, en el que el plásmido o vector, sin la secuencia de nucleótidos correspondiente a dicha secuencia diana inserta en dicho al menos un sitio de clonación, tiene la secuencia de nucleótidos ilustrada en la SEC ID Nº 8, SEC ID Nº 9, SEC ID Nº 10, SEC ID Nº 11, SEC ID Nº 12, o SEC ID Nº 13.
- 10 40. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la construcción de ADN usada para producir ARN bicatenario está contenida en una cepa bacteriana.
- 15 41. Uso de acuerdo con la reivindicación 40, en el que la cepa bacteriana es una cepa de *E. coli*.
42. Uso de acuerdo con la reivindicación 40 ó 41, en el que la cepa bacteriana se suministra a un nematodo.
- 15 43. Uso de acuerdo con la reivindicación 42, en el que la cepa bacteriana se suministra a *C. elegans*.
44. Uso de acuerdo con la reivindicación 43, en la que la cepa bacteriana se suministra a un mutante nuc-1 de *C. elegans*.
- 20 45. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el ARN bicatenario producido se usa para interferencia por ARN.
46. Uso de acuerdo con la reivindicación 45, en el que el ARN bicatenario producido se usa para la interferencia por ARN en un nematodo.
- 25 47. Uso de acuerdo con la reivindicación 46, en el que ARN bicatenario producido se usa para interferencia por ARN en *C. elegans*.

30

35

40

45

50

55

60

65

FIG. 1(a)

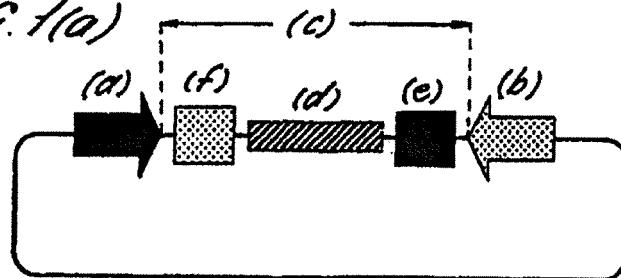
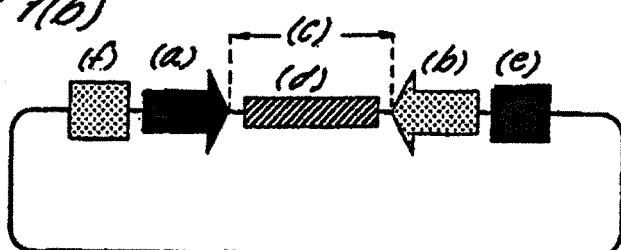


FIG. 1(b)



(a) : promotor 1

(b) : promotor 2

(e) : Terminador 1

(f) : Terminador 2

FIG. 1(c)

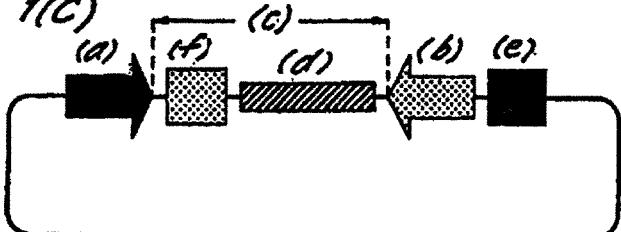


FIG. 1(d)

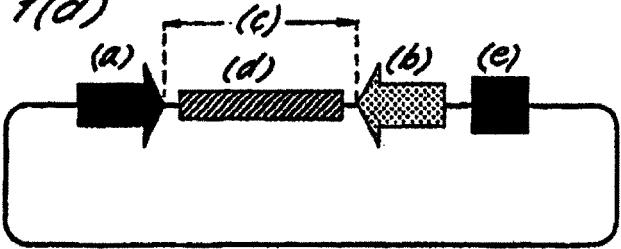


FIG. 1(e)

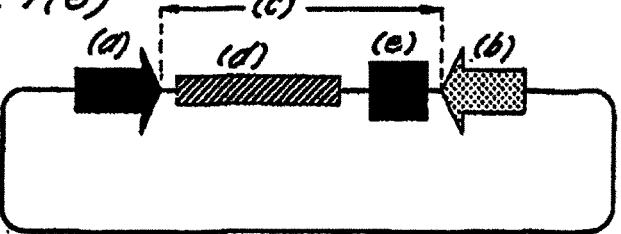


FIG. 2(a)

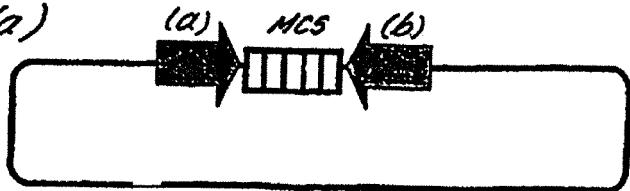


FIG. 2(b)

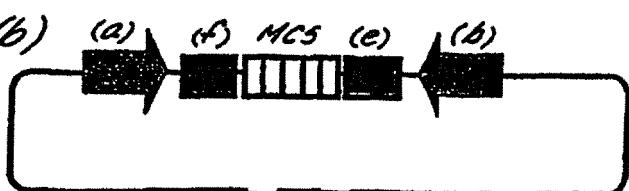


FIG. 2(c)

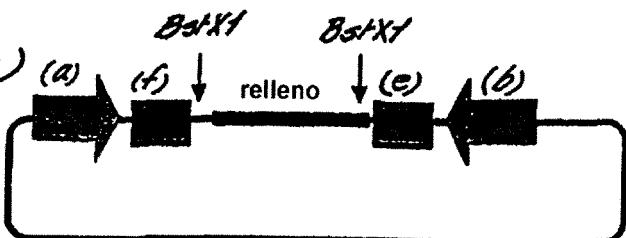


FIG. 2(d)

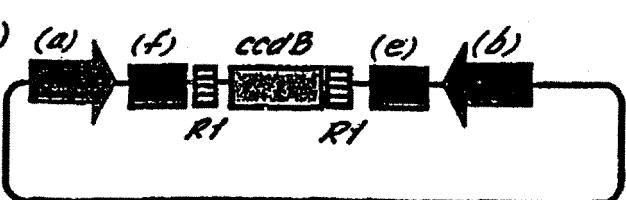


FIG. 2(e)

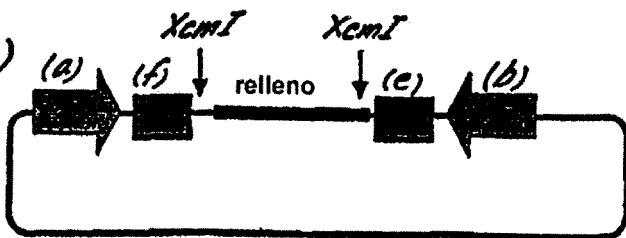
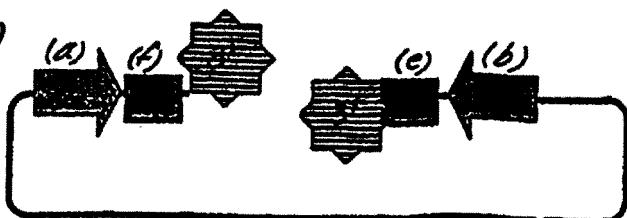


FIG. 2(f)



Construcción de vector ARNi con terminadores T7

FIG. 3.

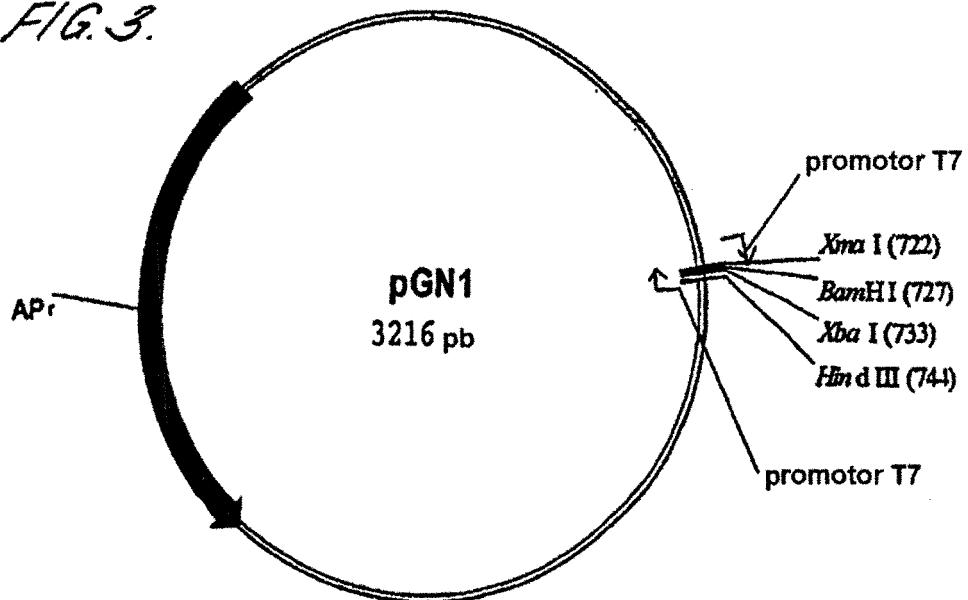


FIG. 4.

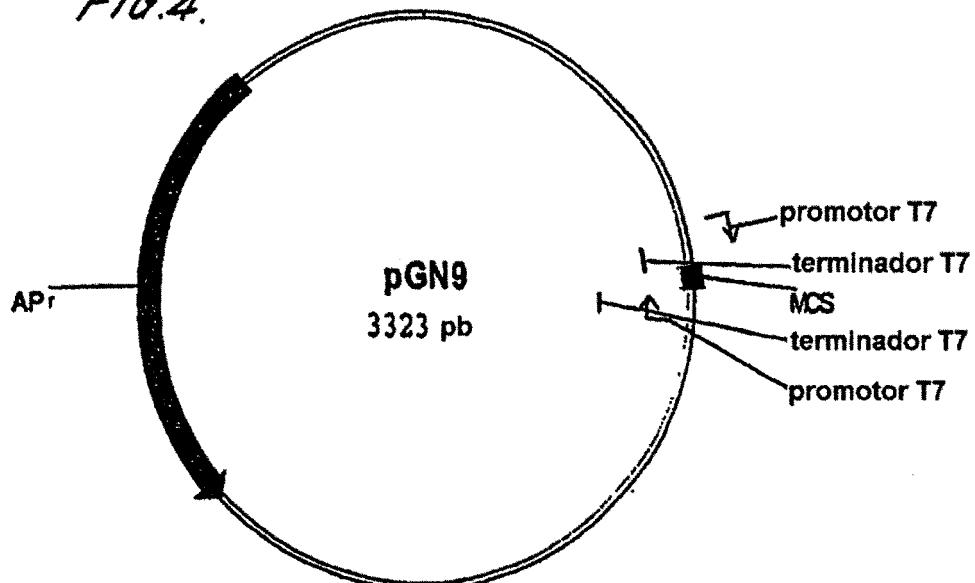


FIG. 5

The diagram shows a DNA sequence with two **pT7** promoters (indicated by boxes with arrows) and a transcription start site (indicated by a bracket). The sequence is as follows:

631 **pT7** **pT7**

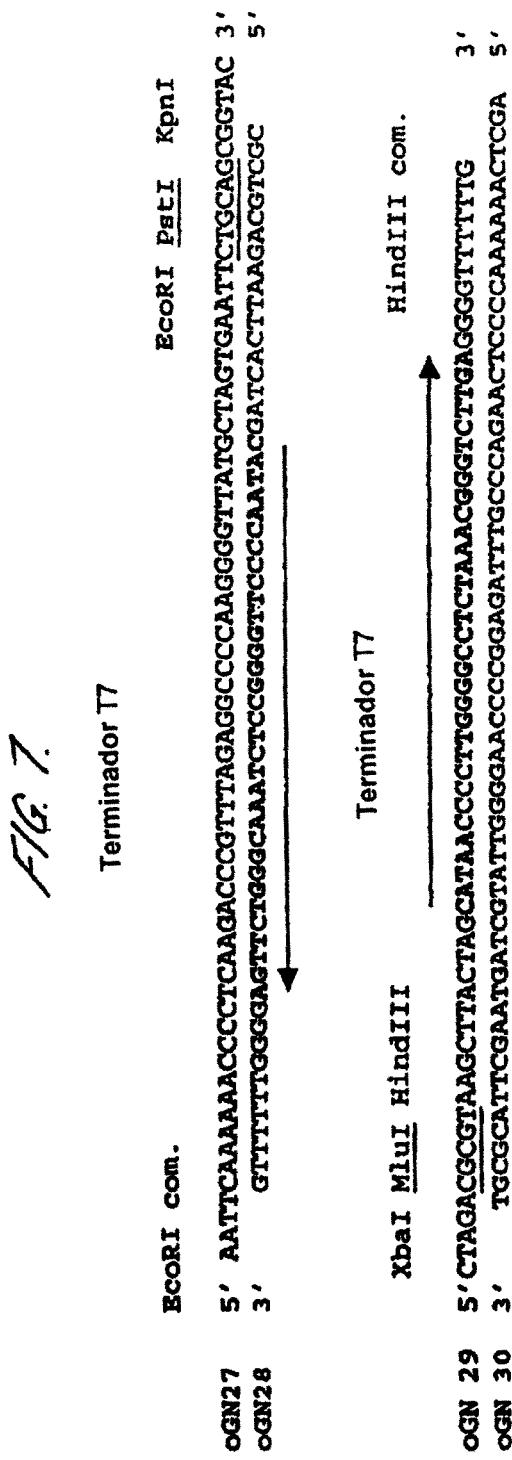
701 GGGCGATT GAACTCGATA CCCGGGAGTC CTCCTGAAAGC GAAAGCTTCT CCGCTTATAG TCTGCTTCTG
 702 CGGCTTAA GCTGGCCAT GGGCCCTAG GAGATCTAG CTTGGAAGA GCGGGATTC **pT7**

771 TACAGCTTA GATTTCTATA GGTGACCTTA AATAGCTTGG CTTATCTATG GTCATAGCTG TTTCTCTTGT
ATGCTGACT CATAAGATAT CAGCTGATAT TTATGAAACC GCAATTGATAC CAGTATGAC AMGGACACA

Fig. 6.

Terminador T7

ACTAGGATTAACCCCTTGGGCCCTAAACGGGTCTTGAAGGGTTTTG
TGATCTGATTGGGAACCCGGAGATTGCCCCGAACTCCCCAAAAAC



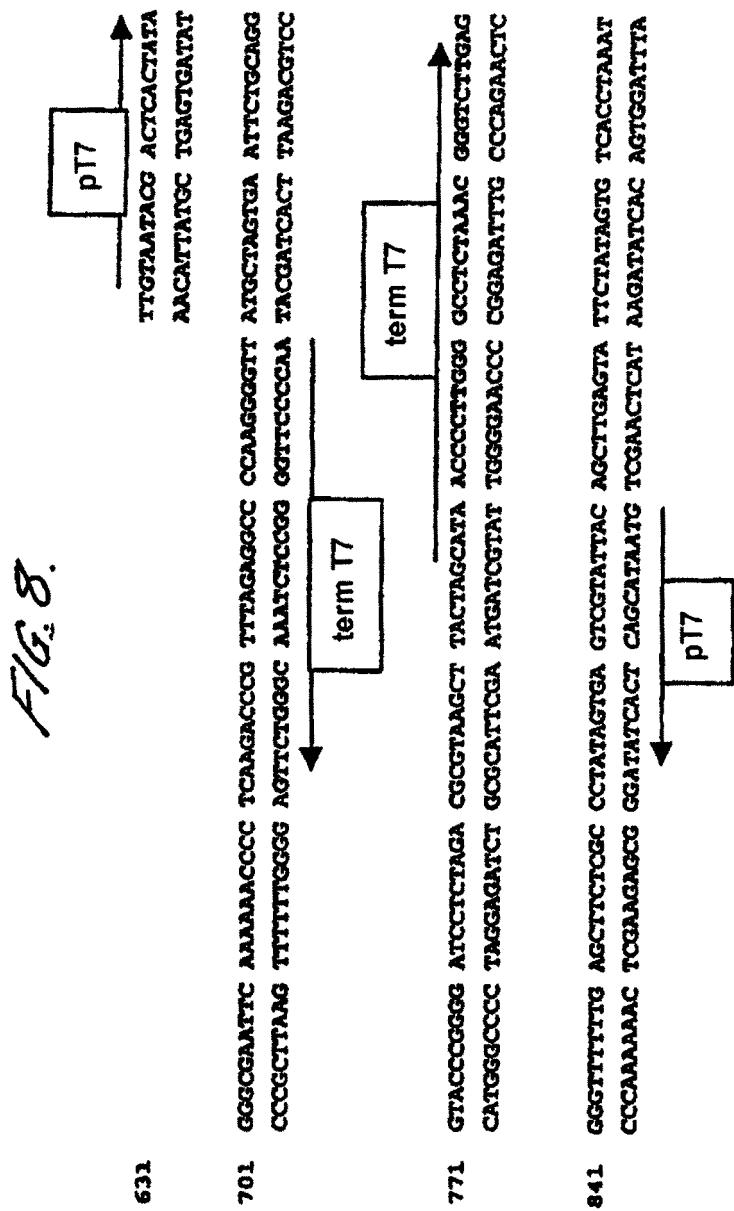


FIG. 9.

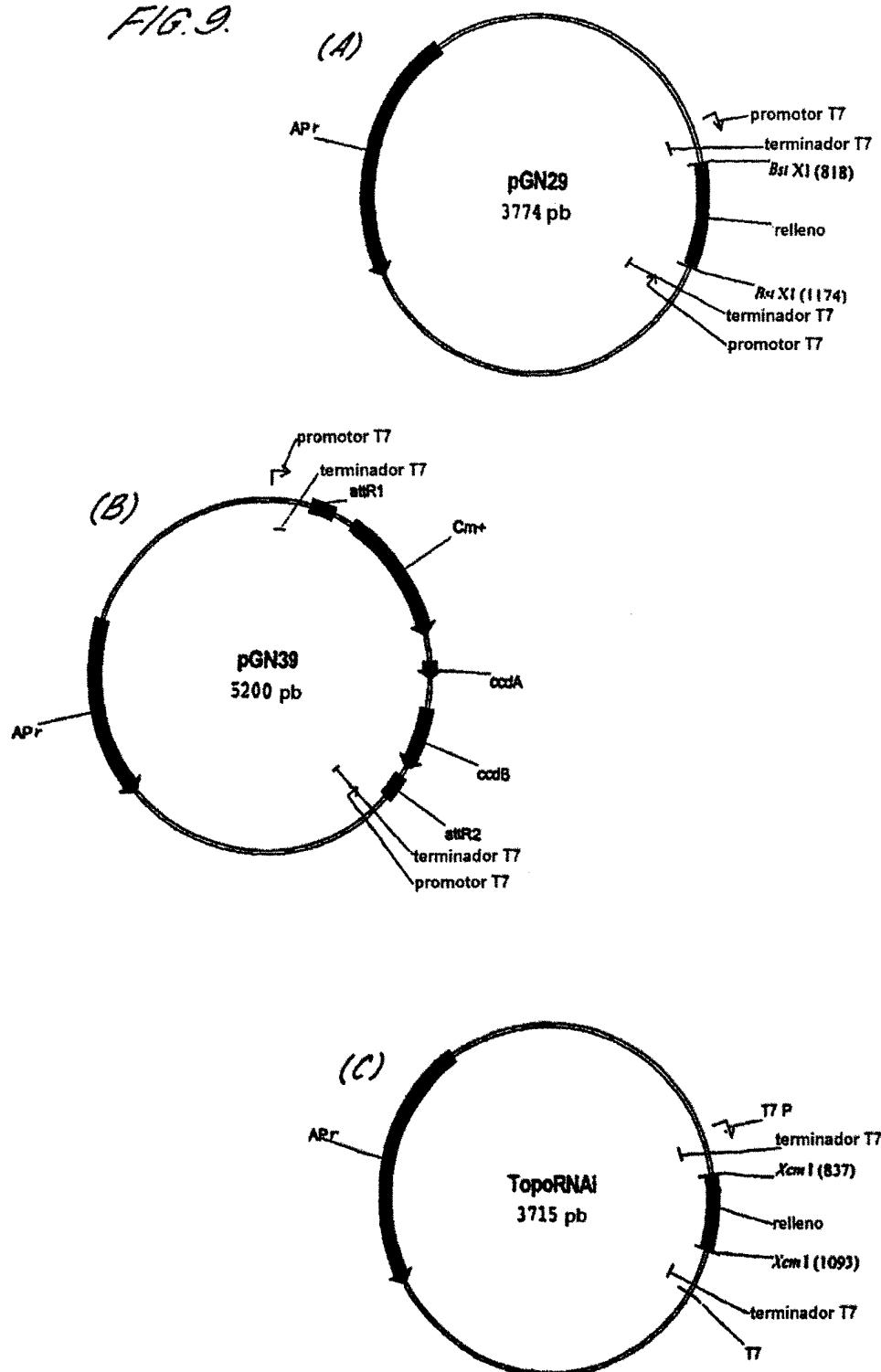


FIG. 10.

pGN9

1 gagtgcacca tatgcgggtg gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa taccgcacca
 61 ggcgaaattg taaacgtta tattttgtt aatttcgcgt taaatatttgc ttaaatcagc
 121 tcattttta accaataggc cgaatccgc aaaaatccctt ataaatcaaa agaatagacc
 181 gagatagggt tgagtgttgc tccagtttgg aacaagagtc cactattaa gaacgtggac
 241 tccaaacgtca aaggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg gcccactacg tgaaccatca
 301 cccaaatcaa gtttttgcg gtcgagggtgc cgtaaagctc taaatcgaa ccctaaaggg
 361 agcccccgat ttagagcttg acggggaaag ccggcgaacg tggegagaaa ggaagggaaag
 421 aaagcgaaag gagcgggcgc tagggcgtg gcaagtgttag cggtcacgt ggcgtaaacc
 481 accacacccg cccgccttaa tgccgcgtc caggcgcggt ccattcgcca ttcaaggctgc
 541 gcaactgttg ggaaggcgca tcggcgggg ctcttgcgtt attacgcccag ctggcgaaag
 601 gggatgtgc tgcaaggcgta ttaatgggg taacgcccagg gttttcccg tcaacgacgtt
 661 gtaaaacgac ggccagtgaa ttgtataacg actactatc gggcaattc aaaaaacccc
 721 tcaagacccg ttagagggcc ccaagggtt atgtatgtga attctgcagg gtacccgggg
 781 atccctctaga cgcgtaaatcgtactatc acccccttggg gcctctaaac ggttcttgc
 841 gggtttttg agcttctcg cctatagtga gtcgtattac agcttgcgtt ttctatagtgc
 901 tcacctaata gcttgcgtt aatcatggtc atagctgttt cctgtgtgaa attgttatacc
 961 gtcacacaatt ccacacaaca tacgagccgg aacgatataa tgtaaagctt ggggtgccta
 1021 atgagtgagc taactcacat taattgcgtt ggcgtactg cccgccttcc agtcgggaaa
 1081 cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcggt ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat
 1141 tggcgctct tccgcttcc cgctcaactg ctcgcgtgcgc tcggcgttgc ggcgtgcggc
 1201 agccgtatca gtcactcaa agggttaatc acgggtatcc acagaatcag ggataaacgc
 1261 aggaaaaaac atgtgagca aaggccagca aaggccagg aacgtaaaa agccgcgtt
 1321 gctggcgctt ttgcgttagc tccggggggc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag
 1381 tcagagggtgg cggaaacccg caggaactata aagataccgg gctgttcccc ctggaaagctc
 1441 cctcgctgcg tctctgttc cgaccctggc gtttacccgg tacctgtccg ctttctccc
 1501 ttccggaaagc gtggcgctt ctcatacgcc acgtgttagg tatctcgatc cggtgttaggt
 1561 cgttcgtcc aagctggct gtgtgcacga acccccccgtt cagccgacc gctgcgcctt
 1621 atccggtaaatc tatcgcttgc agtccaaaccc ggtaaagacac gacttatacg cactggcage
 1681 aaccactgtt aacaggatttgcgacggat gtagtgcgtt ggtgtacag agttcttgc
 1741 gtggtggctt aactacggtt acactaga gacagtggc ggtatctgcg ctctgcgtgaa
 1801 gccagttacc ttccggaaaaa gatgtgttagc ttcttgcattc ggcaaaacaaa ccaccgcgtq
 1861 tagcggtgg tttttgtt gcaagcggca gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga
 1921 agatctttg atctttctca cgggtctga cgctcgttgc aacgaaaact cacgttaagg
 1981 gatttggc atagatatttcaaaaaggat cttcacctatc atcctttaa attaaaaatg
 2041 aagtttaaa tcaatctaa gtatataatgat gtaaaatctgg tctgcacgtt accaatgcctt
 2101 aatcagttagc gcacctatct cagcgatctg tctatttcgt tcatccatag ttgcctgact
 2161 ccccgctgt tagataacta cgtacgggaa gggcttacca tctggccca gtgctgcaat
 2221 gatacccgaa gaccacgtt caccggctcc agatttatc gcaataaacc agccagccgg
 2281 aaggccggag cgcagaatgt gtcctgcacat tttatccggc tccatccagt ctatatttgc
 2341 ttccgggaa gctagatgaa gtatgcgtt cttttatgtt ttgcgcacg ttgttggcat
 2401 tgctacaggc atcggtgtt cacgtctgtc gtttggatgt gcttcattca gtcgggttc
 2461 ccaacgtatca aggcgaggta catgatcccc catgttgc aaaaaagccg ttatctcctt
 2521 cgttcctccg atcggtgtca gaagtaatggt ggcgcgttgc ttatctca tggatggc
 2581 agcaactgtatca aattcttta ctgtcatgcg atccgtatc gatctttctg tgcgttgc
 2641 gtactcaacc aagtcatctt gagaataccg cgcggcgca cggagggtgt ctgcggccgc
 2701 gtcaatacggt gataatagt tatgacatag cagaacttta aaagtgcgtca tcatattggaaa
 2761 acgttctcg gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgtgt ttgagatcca gtcgtatgt
 2821 acccaactgtt gtcacccact gatcttacttact ttccacccgcg ttcttgggt
 2881 agcaaaaaaca ggaaggccaa atgcgcacaa aaggaaata agggcgcac gggaaatgttgc
 2941 aataactctata ctcttcctt ttcataattt ttgaaggatt ttcagggtt attgtctcat
 3001 gagcgatatac atatttgcattt gatatttagaa aataaaacaa atagggttc cgcgcacatt
 3061 tccccgaaaaa gtgccacccgt acgtctatc aaccattttt atcatgacat taacctataaa
 3121 aaataggcgat atcacgggc ccttcgttgc cgcgcgttgc ggtgtatgc gtaaaaaaccc
 3181 ctgacacatcg cagctccgg agacggtcac agcttgcgttgc taacggatgc cccggagcag
 3241 acaagcccgat cagggcggtt caggggggtt gggggctggc ttaactatgc
 3301 ggcacatcgat cagattgtac tga

FIG. 11.

PGN29

FIG. 12.

PGN39

TAATACGACT CACTATAGGG CGAATTCAAA AAACCCCTCA AGACCCGTTT
 AGAGGGCCCA AGGGGTTATG CTAGTGAATT CTGCAGCGGT ACCCGGGGAT
 CCTCTAGAGA TCCCTCGACC TCGAGATCCA TTGTGCTGGA AAGATCACAA
 GTTTGTACAA AAAAGCTGAA CGAGAAACGT AAAATGATAT AAATATCAAT
 ATATTAATT AGATTTGCA TAAAAAACAG ACTACATAAT ACTGTAAAAC
 ACAACATATC CAGTCACTAT GGCGGCGCA TTAGGCACCC CAGGCTTAC
 ACTTTATGCT TCCGGCTCGT ATAATGTGTG GATTTGAGT TAGGATCCGG
 CGAGATTTTC AGGAGCTAAG GAAGCTAAAA TGGAGAAAAA AATCACTGGA
 TATACCACCG TTGATATATC CCAATGGCAT CGTAAAGAAC ATTTTGAGGC
 ATTCAGTCA GTTGCTCAAT GTACCTATAA CCAGACCGTT CAGCTGGATA
 TTACGGCCTT TTAAAGACC GTAAAGAAAA ATAAGCACAA GTTTATCCG
 GCCTTTATTC ACATTCCTGC CGCGCTGATG AATGTCATC CGGAATTCCG
 TATGGCAATG AAAGACGGTG AGCTGGTGT ATGGGATAGT GTTCACCCCTT
 GTTACACCGT TTCCATGAG CAAACTGAAA CGTTTTCATC GCTCTGGAGT
 GAATACCAAG CAGATTTCCG GCAGTTCTA CACATATATT CCCAAGATGT
 GGCCTGTTAC GGTGAAAACC TGGCCTATTT CCCTAAAGGG TTATTTGAGA
 ATATGTTTT CGTCTCAGCC AATCCCTGGG TGAGTTTCAC CAGTTTGTAT
 TTAAACGTGG CCAATATGGA CAACTCTTC GCCCCCGTT TCACCATGGG
 CAAATATTAC ACGCAAGGCG ACAAGGTGCT GATGCCGCTG GCGATTCAAG
 TTTCATCATGC CGTCTGTGAT GGCTTCCATG TCGGCAGAAT GCTTAATGAA
 TTACAACAGT ACTGCGATGA GTGGCAGGGC GGGCGTAAA GATCTGGATC
 CGGCTTACTA AAAGCCAGAT AACAGTATGC GTATTGCGC GCTGATTTTT
 GCGGTATAAG AATATATACT GATATGTATA CCCGAAGTAT GTCAAAAAGA
 GGTGTGCTAT GAAGCAGCGT ATTACAGTGA CAGTTGACAG CGACAGCTAT
 CAGTTGCTCA AGGCATATAT GATGTCAATA TCTCCGGTCT GGTAAAGCACA
 ACCATGCAGA ATGAAGCCCG TCGTCTGCGT GCGAACGCT GGAAAGCGGA
 AAATCAGGAA GGGATGGCTG AGGTGCCCG GTTTATTGAA ATGAACGGCT
 CTTTGTGTA CGAGAACACGG GACTGGTGAATGCACTTTA AGGTTTACAC
 CTATAAAAGA GAGAGCCGTT ATCGTCIGTT TGTGGATGTA CAGAGTGATA
 TTATTGACAC GCCCAGGCGA CGGATGGTGA TCCCCCTGGC CAGTGCACGT
 CTGCTGTCAG ATAAAGTCTC CGTGAACCT TACCCGGTGG TGCATATOGG
 GGATGAAAGC TGGCGCATGA TGACCACCGA TATGCCAGT GTGCCGGTCT
 CCGTTATCGG GGAAGAAAGTG GCTGATCTCA GCCACCGCGA AAATGACATC
 AAAACGCCA TTAAACCTGAT GTTCTGGGA ATATAATGT CAGGCTCCCT
 TATACACAGC CAGTCCTGAG GTGCGACATA GTGACTGGAT ATGTTGTGT
 TTACAGTATT ATGTAATGCTG TTTTTATGCA AAAATCTAAT TTAAATATATT
 GATATTTATA TCATTTTACG TTTCTCGTTC AGCTTCTTG TACAAAGTGG
 TGATCTTCC AGCACAAATGCG ATCTCGAGGG ATCTTCATA CCTACCAAGTT
 CTGCGCCCTGC AGGTGCCCGC CGCGACTCTA GACCGCTAAG CTTACTAGCA
 TAACCCCTTG GGGCTCTAA ACGGGCTCTG AGGGGTTTT TGAGCTTCTC
 GCCCTATAGT GAGTCGTATT ACAGCTGAG TATTCATAG TGTACACCTAA
 ATAGCTTGGC GTAAATCATGG TCATAGCTGT TTCCCTGGTGTG AAATTGTTAT
 CGCGTCACAA TTCCACACAA CATACTGAGCC GGAAGCATAA AGTGTAAAGC

FIG. 12 (CONTINUACIÓN 1)

CTGGGGTGCC TAATGAGTGA GCTAACTCAC ATTAATTGCG TTGCGCTCAC
 TCCCCGCTTT CCAGTCGGGA AACCTGTCGT GCGAGCTGCA TTAATGAATC
 GGCCAAACGCG CGGGGAGAGG CGTTTGCCT ATGGGGCGCT CTTCCGCTTC
 CTCGCTCACT GACTCGCTGC GCTCGGTGCT TCGGCTGCGG CGAGCGGTAT
 CAGCTCACTC AAAGGCGGTA ATACGGTTAT CCACAGAATC AGGGGATAAC
 GCAGGAAAGA ACATGTGAGC AAAAGGCCAG CAAAAGGCCA GGAAACCGTAA
 AAAGGCCGCG TTGCTGGCGT TTTTCGATAG GCTCCGCCCC CCTGACGAGC
 ATCACAAAAA TCGACGCTCA AGTCAGAGGT GGCAGAAACCC GACAGGACTA
 TAAAGATACC AGGCCTTCC CCGTGGAAAGC TCCCTCGTGC GCTCTCCGT
 TCGGACCCCTG CGCTTACCG GATACCTGTC CGCTTTCTC CCTTCGGGAA
 GCGTGGCGCT TTCTCATAGC TCACGCTGTA CGTATCTCAG TTCGGTGTAG
 GTCGTTCGCT CCAAGCTGGG CTGTTGTCAC GAACCCCCCG TTCAGCCCGA
 CGCGCTGCGCC TTATCCGGTA ACTATGCTCT TGAGTCCAAC CGGGTAANGAC
 ACGACTTATC GCGACTGGCA GCAGGCCACTG GTAAACAGGAT TAGCAGAGG
 AGGTATGTAAG CGGGTGTAC AGAGTTCTTG AAGTGGTGGC CTAACCTACGG
 CTACACTAGA AGGACAGTAT TTGGTATCTG CGCTCTGCTG AAGCCAGTTA
 CCTTCGGAAAG AAGAGTTGGT AGCTCTTGAT CGGGCAAAACAA ACCAACCGCT
 GGTAGCGGTG CTTTTTTGT TTGCAAGCAG CAGATTACGC CGAGAAGAAA
 AGGATCTCAA CGAGATCCTT TGATCTTTTC TACGGGGTCT GACGCTCGT
 GGAACGAAAAT CTCACGTTAA GGGATTTTG TGATGAGTT ATCAAAAGG
 ATCTTCACT AGATCTTTTAAATTAAGA TGAAGTTTA AATCAATCA
 AAGTATATAT GAGTAAACTT GGTCTGACAG TTACCATGTC TTAAATCAGT
 AGGCACCTAT CTCAAGCAGTC TGTCTATTTC GTTCATCCAT AGTTGGCTGAA
 CTCCCCGTCG TGTAGATTAAC TACGATAACG GAGGGCTTAC CATCTGGCCC
 CAGTGCCTGCA ATGATAACCGC GAGACCCACG CTACCCCGCT CCAGATTTT
 CAGCAATAAA CGAGCCAGCC GGAGGGGCCG AGCGCAGAAG TGGTCCCTGCA
 ACTTTATCCG CCTCCATCCA GTCTTAAAT TTGGCCCGGG AAGCTAGAGT
 AAGTAGTTTG CGAGTTAATA GTTGGCGCAA CGTTGTTGGC ATTGCTACG
 GCATCGTGGT GTCAAGCTCG TGTCTGGTA TGCTCTCTT CAGCTCGGT
 TCCCACGAT CGAGGCGAGT TACATGATCC CCCATGTTGT GCAAAAGG
 GGTAGCTCC TTGGTCTTC CGATCGTTGT CAGAAGTAAG TTGGCCCGGG
 TGTATCACT CGATGTTAG GCACACTGCA ATTAATTCTCT TACCTCTAG
 CCATCGTAA GATGCTTTTC TGTCTGGT GAGTACTCAA CCAGTCATT
 CTGAGAATAC CGCGCCCGGC GACCGAGTTG CTCTGGCGCG GCCTCAATAC
 GGGATTAATAG TGTATGACAT AGCGAAGCTT TAAAGTGTCT CATCATGGA
 AACGTTCTT CGGGCGAAA ACTCTCAAGG ATCTTACCCG TGTGAGAGTC
 CAGTTGATG TAACCCACTC GTGCAACCAA CTGATCTTCA GCATCTTTA
 CTTCACCCAG CGTTTCTGGG TGACCAAAAA CAGGAGGGCA AAAAGGCGCA
 AAAAAGGGAA TAAAGGCGAC ACCGAAATGT TGTATCTCA TACTCTCT
 TTTCAATAT TATGAGCA TTATCAGGG TGTGTCCTC ATGAGCGGT
 ACATATTGAA ATGATTTAG AAAATAAAC AATAGGGGT TCCGCGCACA
 TTCCCCGAA AAGTCCACCG TGAGTCTAA GAAACCTTA TTATCATGAC
 ATTAACCTAT AAAATAGGC GTATGAGAG GCGCTTTGGT CGCGCCGTT
 TCGGTGATGA CGGTGAAAC CTCTGACACCA TGAGCTCCG GGAGACCGTC
 ACAGCTGTC TGTAGCGGA TGCCTGGAGC AGACANGCCC GTCAGGGCGC
 GTCAGGGGT GTTGGGGGT GTGCGGGCTG CCTTAACTAT CGGGCACTAG

FIG. 12 (CONTINUACIÓN 2)

ACCGAGATTGT ACTGAGAGTG CACCATATGC GGTGTGAAAT ACCGCACAGA
TCCGTAAGGA GAAATACCG CTCAGGCAG AATTGTAAAC GTTAATATTT
TGTAAATT CGCGTTAAAT ATTTGTTAAA TCAGCTCATT TTTAACCAA
TAGGCCGAAA TCGGCAAAT CCCCTATATAA TCAAAGAAAT AGACCGAGAT
AGGGTTGAGT GTTGTCCAG TTGGAACAA GAGTCCACTA TAAAGAACG
TGGACTCCAA CGTCAAAGGG CGAAAAACCG TCTATCAGGG CGATGGCCCA
CTACGTGAC CTCACCCAA ATCAAGTTTT TTGCGGTGCA GGTGCCGTA
AGCTCTAAAT CGAACCCCTA TGGGAGCCC CGATTTAGA GCTTGACGGG
GAAAGCCGGC GAAACGGCG AGAAAGGAAG GGAAGAAAGC GAAAGGAGCG
GGCGCTAGGG CGCTGGCAAG TGTAGCGGTC ACGCTGGCG TAACCAC
ACCGCGCGCG CTAAATGCGC CGCTACAGGG CGCGTCCATT CGCCATTAG
GCTGCGCAAC TGTGGGAAG GGCATCGGT CGGGGCTCT TCGCTATTAC
GCCAGCTGGC GAAAGGGGA TGTGCTGCAA GGCGATTAAG TGGGTAACG
CCAGGGTTTT CCCAGTCACG ACGTGTAAA ACGACGGCCA GTGAATTG

FIG. 13.

TopoRNAi

1 gaggcaccat tatgcgggt gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa taccgcatca
 61 ggcgaattt taaacgtta tattttgtt aatattcggt taaatattt ttaaatcagc
 121 tcattttt accaataggc cgaaatccgc aaaatccctt ataaatcaaa agaataagacc
 181 gagatagggt ttagtgggt tccagttgg aacaagagtc cactattaa gaacgtggac
 241 tccaacgtca aaggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg gcccactacg tgaaccatca
 301 cccaaatcaa gtttttgcg gtcgagggtgc cgtaaagctc taaatcgaa ccctaaagg
 361 agcccccgat tttagcttgc acggggaaag ccggcgaacg tggcgagaaa ggaaggaaag
 421 aaagcgaaag gagcgccgcg tagggcgtg gcaagtgtag cggtcacgt ggcgttaacc
 481 accacacccg cccgcgttac tgcggccgtc caggcggtc catttcgcca ttcaagctgc
 541 gcaactgtt ggaaggcgaa tggatgtgcgtt ctttcgttgcattacgcca ctggcgaaag
 601 ggggatgtgc tcaaggcga ttaagttggg taacgcagg gttttcccg tcacgcgtt
 661 gtaaaacgac ggccagtgaa ttgtataacg actactata gggcgaattc aaaaaacccc
 721 tcaagacccg ttttagaggcc ccaagggtt atgttagtga attctgcagg gtacccgggg
 781 atcctctaga gatccctcga ctcgagatc cattgtgggtt gaattctacc aaggctagca
 841 tggcgccgc aatacagtga tccgtccgg ccctggactg ttgaacgagg tggcgtaga
 901 cggtctgacg acacgcggaa tggcggaacg gttgggggtg cagcagccgg cgctttactg
 961 gcaacttcagg aacaagcggg cgtctctcga cgcactggcc gaagccatgc tggcgagaa
 1021 tcatacgctt cggtgccggag agccgacac gacttgcgtt catttcgtat cgggaatccc
 1081 gcacccatgc tagcttggt agaatccac cacaatggat ctgcggggat ctteccatacc
 1141 taccgttct ggcctgcag 1201 taacccttgc gggcctctaa acgggttgcggtt aggggtttt ttagcttctc gcccatagt
 1261 gagtcgtatt acagcttgcg tattctatag tgcgttctc atagcttgcg gtaatcatgg
 1321 tcatacgctgt ttccgtgtg aaattgttac ccgtcacaat ttccacacaaa catacgagcc
 1381 ggaagcataa agtgtaaagc ctgggggtcc taatgtgtt gctaactcactc attaatttgc
 1441 ttgcgtcact tgcggcgctt 1501 ggcgtacgcg cggggagagg ccagtcggga aacctgtcgt gccagctgca ttaatgtatc
 1561 gactcgtgc gtcgggtcgat 1621 atacgggtt ccacagaacat gcaatgttgcg aatgtgtggc aaaaaggcc
 1681 caaaaggcca ggaaccgtaa 1741 cctgacggac atcacaaaaaa 1801 taaagatacc aggcgttcc 1861 ccgttaccg gatacctgtc
 1921 tcacgtgtt ggtatctcag 1981 gaaccccccgtt ttcagcccgaa 2041 cccgttaagac agcacttac 2101 aggtatgtt ggggtgtc
 2161 aggacatgtt ttgttatctg 2221 agctttgtt cccgcaaca 2281 cagattacgc gcaaaaaaaa 2341 gacgctcgtt ggaacgaaaa
 2401 attttacactt agatcctttt 2461 gaggtaactt ggttgcac 2521 tgcatttttccat 2581 gagggttacatctggcc
 2641 ccagattttt cagcaataaa 2701 actttatccg cttccatcca 2761 ccagttataa gtttgcgca 2821 tgcgttggta tggcttcatt
 2881 cccatgtgtt gcaaaaaaa 2941 ttggccgcacg ttttatctact 3001 ccattccgtaa gatgttttcc
 3061 cgcgcggcgc gaccgagttt 3121 agcagaactt taaaagtgtt 3181 atcttacccgc tggtagatc
 3241 gcatcttttta ctttccac 3301 aaaaaggaaa taaggcgac 3361 tattgaagca ttatcagggtt
 3421 aaaaataaaac aataagggggtt 3481 gaaaccatata tttcccgatc
 3541 ctgcgcgtt tgggtatgtt 3601 acagcttgcg tttcccgatc
 3661 gttgggggtt gtcgggggtt gtttaactat gccgttgcgacttgcg
 3661 gttgggggtt gtcgggggtt gtttaactat gccgttgcgacttgcg

PGN49A FIG. 14.

TGTAATACGA CTCACTATAG GGCGAATCA AAAAACCCCT CAAGACCCUT
 TTAGAGGCC CAAGGGTTA TGCTAGTGA TTCTGCAGCG GTACCCGGGG
 ATCCCTCTAGA GATCCCTCGA CCTCGAGATC CATTGTGCTG GAAAGGATCT
 GGATCCGGCT TACTAAAAGC CAGATAACAG TATGCGTATT TGCGCGCTGA
 TTTTGCGGT ATAAGAATAT ATACTGATAT GTATAACCGA AGTATGTCAA
 AAAGAGGTGT GCTATGAAGC AGCGTATTAC AGTACAGTT GACAGCGACA
 GCTATCAGTT GCTCAAGGCA TATATGATGT CAATATCTCC GGTCTGGTAA
 GCACAAACAT GCAGAAATGAA GCCCCTCGTC TGCGTGCCGA ACGCTGGAAA
 GCGGAAAATC AGGAAGGGAT GGCTGAGGTC GCCCCGTTA TTGAAATGAA
 CGGCTCTTT GCTGACGAGA ACAGGGACTG GTGAAATGCA GTTTAAGGTT
 TACACCTATA AAAGAGAGAG CCGTTATCGT CTGTTTGTGG ATGTACAGAG
 TGATATTATT GACACGCCCG GGCGACGGAT GGTGATCCCC CTGGCCAGTG
 CACGTCCTT AAGCGATAAA GTCTCCCGTG AACTTTACCC GGTGGTGCAT
 ATCGGGGATG AAAGCTGGCG CATGATGACC ACCGATATGG CCAGTGTGCC
 GGTCTCCGTT ATCGGGGAAG AAGTGGCTGA TCTCAGCCAC CGCGAAAATG
 ACATCAAAAA CGCCATTAAAC CTGATGTTCT GGGGAATATA ATGTCAGGC
 TCCCTTATAC ACAGCCTTTC CAGCACAATG GATCTCGAGG GATCTTCCAT
 ACCTACCACT TCTGCGCTG CAGGTOGGG CGCGOACTCT AGACGCGTAA
 GCTTACTAGC ATAACCCCTT GGGGCCTCTA AACGGGTCTT GAGGGGTTTT
 TTGAGCTCT CGCCCTATAG TGAGTCGTAT TACAGCTTGA GTATTCTATA
 GTGTCACCTA AATAGCTTGG CGTAATCATG GTCATAGCTG TTTCTGTGT
 GAAATTGTTA TCCGCTACAC ATCCACACAC ACATACGAGC CGGAAGCATA
 AAGTGTAAAG CCTGGGGTGC CTAATGAGTG AGCTAACTCA CATTAAATTGC
 GTTGCCTCA CTGCCCCCTT TCCAGTCGGG AAACCTGTCG TGCCAGCTGC
 ATTAATGAAT CGGCCAACGC CGGGGGAGAG GCGGTTTGCG TATGGGCAC
 TCTTCCGCTT CCTCGCTCAC TGACTCGCTG CGCTCGGTCTG TTCCGCTGCG
 GCGAGCGGT TAAGCTCACT CAAAGGGGT AATACGGTTA TCCACAGAAAT
 CAGGGGATAA CGCAGGAAAG AACATGTGAG CAAAGGCCA GCRAAAGGCC
 AGGAACCGTA AAAAGGCCGC GTTGCCTGGG TTTTCGATA GGCTCCGCC
 CCCTGACGAG CATCACAAAA ATCGACGCTC AAGTCAGAGG TGGCGAAACC
 CGACAGGACT ATAAAGATAC CAGGCGTTTC CCCCTGGAGA CTCCCTCGTG
 CGCTCTCCTG TTCCGACCT GCGCTTACCG GGATACCTGT CGCGCTTTCT
 CCCCTCGGGG AGCGCTGGGC TTTCTCATAG CTCACGCTGT AGGTATCTCA
 GTTCGGTGTGTA GGTCTCTTCG TCCAGCTGG GCTGTGTGCA CGAACCCCCC
 GTTCAGCCCG ACCGCTGCC CTTATCCGGT AACTATGTC TTGAGTCCAA
 CCCGGTAAGA CACGACTTAT CGCCACTGGC AGCAGCCACT GTAAACAGGA
 TTAGCAGAGC GAGGTATGTA GGCCTGCTA CAGAGTTCTT GAAGTGGTGG
 CCTAACTACG CCTACACTAG AAGGACAGTA TTTGGTATCT GCGCTCTGCT
 GAAGCCAGTT ACCTTCGGAA AAGGAGTTGG TAGCTCTTGA TCCGGCAAC
 AACCCACCGC TGGTAGCGGT GGTGTTTTTG TTGCAAGCA GCAGATTACG
 CGCGAAAAAA AAGGATCTCA AGAAGATCTT TTGATCTTTT CTACGGGGTC
 TGACGCTCAG TGGAAACGAA ACTCACGTTA AGGGATTTTG GTCATGAGAT
 TATCAAAAAG GATCTTCACC TAGATCTTTT TAATTAAAA ATGAAAGTTTT

FIG. 14 (CONTINUACIÓN)

AAATCAATCT AAAGTATATA TGAGTAACT TGGTCTGACA GTTACCAATG
 CTTAATCACT GAGGCACCTA TCTCAGCGAT CTGTCTATTT CGTTCATCCA
 TAGTTGCCTG ACTCCCCGTC GTGTAGATAA CTACGATAACG GGAGGGCTTA
 CCATCTGGCC CCAGTCTGC AATGATACCG CGAGACCCAC GCTCACCGGC
 TCCAGATTTA TCAGCAATAA ACCAGCCAGC CGGAAGGGCC GAGCCAGAA
 GTGGTCTGC AACTTTATCC GCCTCCATCC AGTCTATTAA TTGTTGGCGG
 GAAGCTAGAG TAAGTAGTTT GCCAGTTAAT AGTTTGCAGCA ACGTGTGG
 CATTGCTACA GGCATCGTGG TGTCAAGCTC GTCTTTGGT ATGGCTTCAT
 TCAGCTCCGG TTCCCCAACGA TCAAGGCGAG TTACATGATC CCCCAGTTG
 TGCAAAAAG CGGTTAGCTC CTTCGGCTC CGGATCGTTG TCAGAAAGAA
 GTTGGCCGCA GTGTTATCAC TCATGGTT GGCAGGCACTG CATAATTCTC
 TTACTGTCAT GGCATCCGTA AGATGCTTT CTGTGACTGG TGAGTACTCA
 ACCAAGTCAT TCTGAGAATA CGCGCCCGG CGACCGAGTT GCTCTGCC
 GGGGTCATAA CGGGATAATA GTGTAGACA TAGCAGAACT TTAAGAGTC
 TCATCATTTG AAAAGTCTC TGGGGCGAA AACTCTCAAG GATCTTACCG
 CTGGTGGAGAT CGAGTGGAT GTAACCCACT CGTGCACCCA ACTGATCTC
 AGCATCTTTT ACTTTCTCCA CGGTTCTGG GTGAGCAAAA ACAGGAAGGC
 AAAATGCCG AAAAAAGGGA ATAAGGGCGA CACGGAAATG TTGAAATACTC
 ATACTCTTC TTTTCATAA TTATGAGC ATTTATCAGG GTTATGCT
 CATGAGCGGA TACATATTTG AATGTTTTA GAAAAATAAA CAAATAGGG
 TTCCGCGCAC ATTTCCCGA AAAGTGGCAC CTGACGCTTA AGAAACCAAT
 ATATATCATGA CTTAACCTA TAAATAGG CGTATCACGA GGCCCTTCG
 TCTCGCGCGT TTCTGTGATG ACGGTGAAA CCTCTGACAC ATGAGCTCC
 CGGAGACGGT CACAGCTGT CTGTAGCGG ATGCCGGGAG CAGACAGCC
 CGTCAGGGCG CGTCAGCGG TGTGGCGG TGTGGGGCT GGCTTAACCA
 TGGGGCATCA GAGCAGATTG TACTGAGAGT GCACCATATG CGGTGTGAAA
 TACCGCACAG ATGCGTAAGG AGAAATACC GCATCAGGGG AAATGGAAA
 CGTTAATATT TGTGTTAAAT TGGGTTAA TATTGTTAA ATCAAGCTCAT
 TTTTAACCA ATAGGGCGAA ATCGGCGAAA TCCCTTATAA ATCAAAAGAA
 TAGACCGAGA TAGGTTGAG TGTGTTCCA GTTGGAAACA AGAGTCCACT
 ATTAAGAAC GTGGACTCCA AGCTCAAGG GCGAAAMACC GTCTATCAGG
 GCGATGGGCC ACTACGTGAA CCATCAGCA AATCAAGTTT TTTGGGCTCG
 AGGTGCCGTA AAGCTCTAA TGGGACCCCT AAGGGGAGCC CGCGATTAG
 AGCTTGACGG GGAAGGCCG CGAACGCGC GAGAAGGGAA GGGAGAGAG
 CGAAAGGAGC GGGCGCTAGG GCCTCGCNA GTGTAGCGGT CGCGCTCGC
 GTAACCCACCA CACCCCGCGC GCCTAAAGCG CGCGTACAGG GCGCGCTCGAT
 TCGCCATTCA GGCTGCGCAA CTGTGGGAA CGCGCGATCGG TGGGGGCC
 TTGCGTATTA CGCCAGCTGG CGAAAGGGGG ATGCGTGTCA AGGGCGTTAA
 GTTGGGTAAC GCCAGGGTTT TCCGAGTCAC GACGTTGTAA AACGACGGCC
 AGTGAAT

PGN59A FIG. 15.

GAGTGCACCA TATGCCGTGT GAAATACCGC ACAGATGCGT AAGGAGAAAA
 TACCGCATCA GGCAGAATTG TAAACGTTAA TATTTGTTA AAATTCGCGT
 TAAATATTG TTAAATCAGC TCATTTTTA ACCAATAGGC CGAAATCGGC
 AAAATCCCTT ATAAATCAA AGAATAGACC GAGATAGGGT TGAGTGTGTT
 TCCAGTTGG AACAAGAGTC CACTATTAA GAACGTGGAC TCCAACGTCA
 AAGGGCGAAA AACCGTCTAT CAGGGCGATG GCCCACTACG TGAACCATCA
 CCCAAATCAA GTTTTGCG GTCGAGGTGC CGTAAAGCTC TAAATCGGAA
 CCCTAAAGGG AGCCCCCGAT TTAGAGCTTG ACGGGGAAAG CCGCGAACG
 TGGCGAGAAA GGAAGGGAAAG AAAGCGAAAG GAGCGGGCGC TAGGGCGCTG
 GCAAGTGTAG CGGTACCGCT GCGCGTAACC ACCACACCCG CGCGCTTAA
 TGCGCCGCTA CAGGGCGCGT CCATTCGCCA TTCAGGCTGC GCAACTGTG
 GGAAGGGCGA TCGGTGCGGG CCTCTTGCCT ATTACGCCAG CTGGCGAAAG
 GGGGATGTGC TGCAAGGCGA TTAAGTGGG TAACGCCAGG GTTTTCCAG
 TCACGACGTT GTAAAACGAC GGCCAGTGAA TTGTAATACG ACTCACTATA
 GGGCGAATTC GAGCTCGGT A CCCGGGGATC CTCTAGAGAT CCCTCGACCT
 CGAGATCCAT TGTGCTGGAA AGGATCTGGA TCCGGCTTAC TAAAAGCCAG
 ATAACAGTAT GCGTATTGTC GCGCTGATT TTGCGGTATA AGAATATATA
 CTGATATGTA TACCGAAGT ATGTCAAAAA GAGGTGTGCT ATGAAGCAGC
 GTATTACAGT GACAGTTGAC AGCGACAGCT ATCAGTTGCT CAAGGCATAT
 ATGATGTCAA TATCTCCGT CTGGTAAGCA CAACCATGCA GAATGAAGCC
 CGTCGTCTGC GTGCCGAACG CTGGAAAGCG GAAAATCAGG AAGGGATGGC
 TGAGGTGCGCC CGGTTTATTG AAATGAACGG CTCTTTGCT GACCGAGAAC
 GGGACTGGTG AAATGCAGTT TAAGGTTTAC ACCTATAAAA GAGAGAGCCG
 TTATCGTCTG TTTGTTGGATG TACAGAGTGA TATTATTGAC ACGCCCGGGC
 GACGGATGGT GATCCCCCTG GCCAGTGCAC GTCTCTTAAG CGATAAAAGTC
 TCCCGTGAAC TTTACCCGGT GGTGCATATC GGGGATGAAA GCTGGCGCAT
 GATGACCACC GATATGGCCA GTGTGCCGGT CTCCGTTATC GGGGAAGAAG
 TGGCTGATCT CAGCCACCGC GAAAATGACA TCAAAAACGC CATTAACTTG
 ATGTTCTGGG GAATATAAT GTCAGGCTCC CTTATACACA GCTTTCCAG
 CACAATGGAT CTGAGGGAT CTTCCATACC TACCAAGTTCT CGGCGCTGCAG
 GTCGCGGGCCG CGACTCTCTA GAGTCGAAAG CTTCTOGCCC TATAGTGTAGT
 CGTATTACAG CTGAGGTATT CTATAGTGTGTC ACCTAAATAG CTGGCGTAA
 TCATGGTCAT AGCTGTTTCC TGTGTGAAAT TGTATCCGC TCACAAATTCC
 ACACAACATA CGAGCCGGAA GCATAAAAGTG TAAAGCTGG GGTGCCTAAT
 GAGTGAGCTA ACTCACATTA ATTCGCTTGC GCTCACTGCC CGCTTTCCAG
 TCGGGAAACC TGTGCTGCCA GCTGCATTAA TGAATCGGCC AACCGCGGG
 GAGAGGCGGT TTGCGTATTG GGCCTCTTC CGCTTCTCG CTCACTGACT
 CGCTGCGCTC GGTGCTTCCG CTGCGGCGAG CGGTATCAGC TCACCTCAAG
 GCGGTAATAC GGTTATCCAC AGAATCAGGG GATAACGCAG QAAAGAACAT
 GTGAGCAGAAA GGCAGCAGA AGGCCAGGAA CGTAAAGAG GCGCGTTGC
 TGGCGTTTT CGATAGGCTC CGCCCCCTG ACAGAGCATCA CAAAATCGA
 CGCTCAAGTC AGAGGTGGCG AACCCCGACA GGAACATATAA GATACCGGC
 GTTTCCCGCT GGAAGCTCCC TCGTGCCTC TCCCTGTTCCG ACCCTGCGC
 TTACCGGATA CCTGTCGGCC TTTCTCCCTT CGGGAAAGCGT GGCCTTTCT

FIG. 15 (CONTINUACIÓN)

CATAAGCTCAC GCTGTAGGTA TCTCAGTTCG GTGTAGGTCG TTGGCTCCAA
 GCTGGGCTGT GTGCACGAAC CCCCCGTTCA GCGCGACCGC TGCGCTTAT
 CGGGTAACTA TGGCTTGAG TCCRACCCGG TAAGACACGA CTTATCGCCA
 CTGGCAGCAG CCACTGGTAA CAGGATTAGC AGAGCGAGGT ATGTTAGGCGG
 TGCTACAGAG TTCTTGAAGT GGTGGCTAA CTACGGCTAC ACTAGAAGGA
 CAGTATTGGG TATCTGCCT CTGCTGAAGC CAGTTACCTT CGGAAAAAGA
 GTTGGTAGCT CTTGATCGGG CAAACAAACC ACGCGTGGTA GCGGTGGTTT
 TTTTGTTCG AAGCAGCAGA TTACGGCGAG AAAAAAAAGA TCTCAAGAAG
 ATCCTTTGAT CTTTCTACG GGGTCTGACG CTCACTGGAA CGAAAACCTCA
 CGTTAAGGGG TTTGGTCAT GAGATTATCA AAAAGGATCT TCACCTAGAT
 CCTTTTAAAT TAAATGAA GTTTTAATTC AATCTAAAGT ATATATGAGT
 AAACTGGTC TGACAGTTAC CAAATGCTAA TCACTGAGGC ACCTATCTCA
 CGATCTGTC TATTTCTGTC ATCCATAGTT GCCTGACTCC CGTCGCTGTA
 GATAACTACG ATACGGGAGG GCTTACCATC TGGCCCCAGT GCTGCAATGA
 TACCGCGAGA CGCACGCTCA CGGGCTCCAG ATTATCAGC AATAAACCAAG
 CCAGCCGGAA GGGCGAGCG CAGAAGTGGT CCTGCAACTT TATCGCCCTC
 CTCAGCTCT ATTAATGTT GCGCGGAAGC TAGAGTAAGT AGTTGGCCAG
 TTATAGTTT GCGAACGTT GTTGGCATTG CTACAGGCAT CGGGTGTCA
 CGCTCGTGTGTTGTTGTTGTCAGC TCCGGTTCCC AACGATCAG
 GCGAGTTACA TGATCCCCCA TGTGTTGCAA AAAAGCGGGTT AGCTCCCTCG
 GTCTCCGAT CGTGTGTCAGA AGTAAAGTTGG CGCAGTGGTT ATCACTCATG
 GTATGGCAG CACTGCATAA TTCTCTTACT GTCATGCCAT CGCTAAGATG
 CTTTCTGTC ACTGGTGAAGT ACTCAACAA GTCATTCTGA GAAATACCGCG
 CCCGGCGACC GAGTTGCTCT TGCCCCGGT CAATACGGGA TAAATGTTA
 TGACATAGCA GAACTTAAAGTGTCACTC ATTGGAAAAC GTTCTCGGG
 GCGAAAACTC TCAAGGATCT TACCGCTGTT GAGATCCAGT TCGATGTAAC
 CGACTCGTGC ACCCAACTGA TCTTCAGCT CTTTACTTT CACCAAGCGTT
 TCTGGGTGAG CAAACACGG AAGGCAAAAT GCGGCAAAA AGGGAAATAAG
 GGGGACACGG AAGGTTGAA TACTCATACT CTTCCTTTTT CAATATTTT
 GAAAGCATTTA TCAGGGTTAT TGTCTCATGA GCGGATACAT ATTGAAATGT
 ATTGAAAAA ATAAACAAAT AGGGGTTCG CGCACATTTC CCCGAAAAGT
 CCCACCTAAC GTCATGAAA CCATTTTAT CATGACATTA ACCATTTAA
 ATAGGGGTAT CAGGGGGCCC TTCTGCTCG CGCGTTTGG TGATGACGGT
 GAAAACCTCT GACACATGCA GCTCCCGGAG ACGGTCACAG CTGATCTGTA
 AGGGGATGCC GGGAGCGAC AAGCCGCTCA GGGCGCGCTCA GCGGGTGTG
 GCGGGTGTGCG GGGCTGGCTT AACTATGCGG CATCAGAGCA GATTGTACTG
 A

FIG. 16.

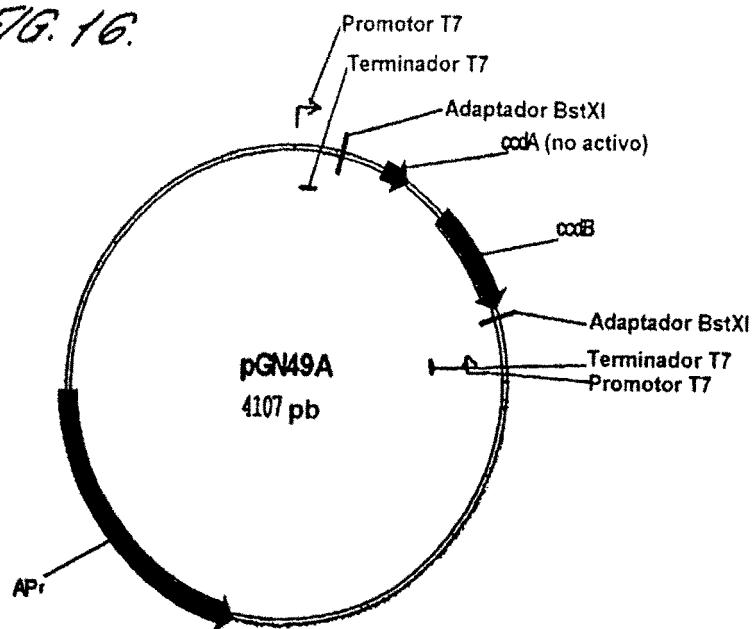
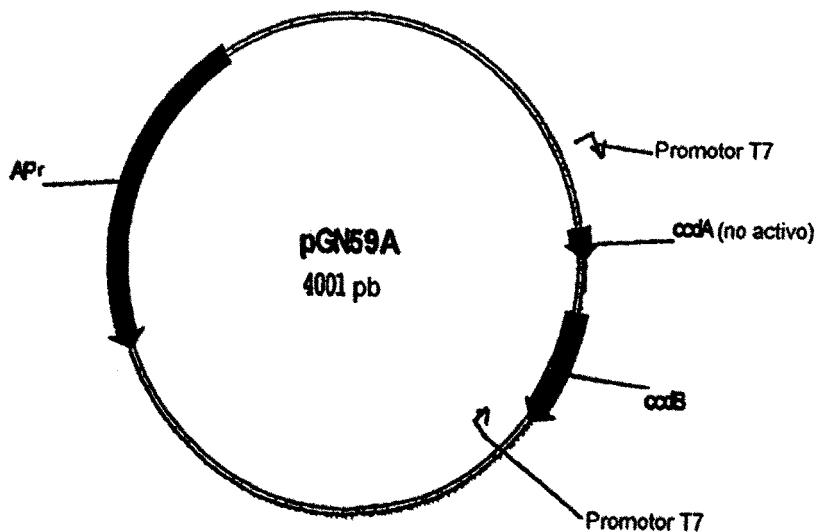


FIG. 17.



ES 2 281 420 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> DEVGEN NV

5 <120> CONSTRUCCIONES DE VECTOR

<130> ACB/55178/001

10 <140>

<141>

<160> 21

15 <170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

20 <211> 160

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Fragmento de pGN1 que contiene promotores T7 oponibles

<400> 1

30

**ttgttaatacg actcaactata gggcgaattc gagctcggtta cccggggatc ctctagagtc 60
gaaagttct cgcctatag ttagtcgtat tacagcttga gtattctata gtgtcaccta 120
aatagcttgg cgtaatcatg gtcatacgctg tttcctgtgt 160**

35 <210> 2

<211> 49

<212> ADN

40 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia de ADN que contiene un terminador T7

45 <400> 2

50

actagcataa ccccttgggg cctctaaacg ggtcttgagg ggtttttg 49

<210> 3

<211> 7

<212> ADN

55 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido oGN27

60 <400> 3

65

**aattcaaaaa acccctcaag acccgtttag aggccccaaag gggttatgct agtgaattct 60
gcagcggtaac 70**

ES 2 281 420 T3

<210> 4
<211> 62
<212> ADN
5 <213> Secuencia Artificial

<220>
10 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido oGN28
<400> 4

15 **cgctgcagaa ttcactagca taacccttg gggcctctaa acgggtcttg aggggtttt 60**
tg **62**

<210> 5
20 <211> 65
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido oGN29
<400> 5

30 **ctagacgcgt aagcttacta gcataacccc ttggggcctc taaacgggtc ttgaggggtt 60**
ttttg **65**

35 <210> 6
<211> 65
40 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
45 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido oGN30
<400> 6

50 **agctcaaaaa acccctcaag acccgtttag aggccccaaag gggttatgct agtaagctt 60**
cgcgt **65**

55 <210> 7
<211> 230
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

60 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Fragmento del plásmido pGN9 que contiene promotores T7 oponibles y terminadores de la transcripción T7

ES 2 281 420 T3

<400> 7

5 ttgttaatacg actcaactata gggcgaattc aaaaaaccc tcaagacccg ttttagaggcc 60
 ccaaggggtt atgcgtatgt aatttcgcagg gtacccgggg atccctctaga cgcgtaagct 120
 tactagcata acccccttggg gcctctaaac gggctttttag gggtttttgc agcttctcg 180
 cctatagtga gtcgttattac agctttagtgc ttctatagtg tcacctaata 230

10 <210> 8

 <211> 3323

 <212> ADN

15 <213> Secuencia Artificial

 <220>

 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Plásmido pGN9

20 <400> 8

25 gagtgcacca tatgcggtgt gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa taccgcata 60
 ggcggaaattt gaaacgttta tattttgtta aaatttcgcgt taaatatttgc ttaaatcagc 120
 tcattttttta accaataggc cgaaatcgcc aaaaatccctt ataaatcaaa agaatacgacc 180
 gagatagggt tgagtgttgttccagggttgg aacaagatgc cactattaaa gaacgtggac 240

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 281 420 T3

tccaaacgtca aaggcgaaaa aaccgtotat caggcgatg gccactacg tgaaccatca 300
cccaaatcaa gtttttgcg gtcgagggtgc cgttaaagtc taaatcgaa ccctaaagg 360
agccccccgat ttagagctt acggggaaaag cggcgaaacg tggcgagaaa ggaagggaag 420
aaagcgaaag gagcgggcgc tagggcgctg gcaagtgtag cggtcacgct ggcgttaacc 480
accacacccg ccgcgcttaa tgccgcgcta cagggcgctg ccattcgca ttcaggctgc 540
gcaactgtt ggaaggcga tcggcgcccc cctcttcgtt attacgcacg ctggcgaaag 600
ggggatgtgc tgcaaggcga ttaagttggg taacgcagg gtttcccaag tcacgacgtt 660
gtaaaacgac ggcacgtgaa ttgtataatcg actcaactata gggcgaattc aaaaaacccc 720
tcaagacccg ttttagaggcc ccaagggggt atgctagtga attctgcagg gtacccgggg 780
atccctctaga cgcgttaagct tactagcata accccttggg gcctctaaac gggctttag 840
gggtttttt agctctcgcc cctatagtga gtcgtattac agottgagta ttctatagtg 900
tcacctaata agcttggcgt atcatggtc atagctgtt cctgtgtgaa attgttatcc 960
getcacaatt ccacacaaca tacgagccgg aagcataaag tgtaaagcct ggggtgccta 1020
atagtgagc taactcacat taattcggtt ggcgtcaactg cccgccttcc agtggggaaa 1080
cctgtcgcc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgc gggagaggcg gtttgcgtat 1140
tggcgctct tccgcttcct cgctcaactga ctcgcgtgcg tggcgcttc gggtgcggc 1200
agcggtatca gtcactcaa aggccggtat acggttatcc acagaatcag gggataacgc 1260
agggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa agggccgctt 1320
gctggcgttt ttcgataggc tccggcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag 1380
tcagaggtgg cgaaacccga caggactata aagataccag gcgttcccc ctggcgcc 1440
cctcgtgcgc tctctgttc cgaccctgcg gcttaccggg tacctgtccg ctttctcc 1500
ttcgggaagc gtggcgctt ctcatagtc acgctgtagg tattctcgat cgggtgttagt 1560
cgttcgctcc aagctggct gtgtgoacga acccccccgtt cagcccgacc gtcgcgtt 1620
atccggtaac tatcgctttt agtccaaaccc ggtaaagacac gacttacgc cactggc 1680
agccactgtt aacaggatta gcagagcggg gtatgttagc ggtgtacag agttcttigaa 1740
gtggtgccct aactacggct acactagaag gacagtattt ggtatctcg gtcgttagaa 1800
gccagttacc ttcgaaaaaa gagttgttag ctcttgatcc ggccaaacaaa ccaccegtgg 1860
tagcgggtgt tttttgttt gcaagcggca gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga 1920
agatcctttt atctttctta cgggggtctga cgctcgtgg aacggaaaact cacgttaagg 1980
gattttggtc atgagattat caaaaaggat cttcacccat atctttttaa attaaaaatg 2040
aagttttaaa tcaatctaaa gtatatatgt gtaaacttgg tctgacagtt accaatgtt 2100
aatcagtggc gcaactatct cagcgatctg tctatttgcg tcatccatag ttgcctgact 2160
ccccgtcggt tagataacta cgatacgggg gggcttacca tctggccccca gtgtcgcaat 2220
gatacccgca gaccacacgt caccggctcc agatttacca gcaataaaacc agccagccgg 2280
aaggcccgag cgccagaatg gtcctgcac tttatccggc tccatccaaat ctattaaattt 2340
ttgcccggaa gctagagtaa gtatgtggcc agttatagt ttgcgcacac ttgttggcat 2400
tgctacaggc atcgctgggtt cagcgatcgcc gtttggatg gtttcattca gtcgggttcc 2460
ccaacgcata aggcgatgtt catgatoccc catgttgc aaaaaagccg ttagctcctt 2520
cggttctccg atcggtgtca gaagtaagtt ggccgcgtt ttatcactca tgggtatggc 2580
agcaactgcatt aattcttcta ctgtcatgccc atccgtaaaga tgcttttgcg tgacttggta 2640
gtactcaacc aagtctttt gagaatacccg cgccggccgaa cggagttgtctt ccgttccggc 2700
gtcaatacgg gataatagt tatgacatag cagaacatttta aaagtgcata tcattggaaa 2760
acgttctcg gggcgaaaaac tctcaaggat cttagccgtt ttgagatcca gttcgtatgt 2820
acccactcgat gcacccaaact gatcttcgtc atctttact ttccacccggg tttctgggtt 2880
agcaaaaaaca ggaaggcaaa atgcgcacaa aaaggaaata agggcgacac gggaaatgtt 2940
aataactcata ctcttcctt tcaatattttt ttaagcatt tattcagggtt attgtctcat 3000
gagcggatac atatttgcattt gatatttagaa aaataaacaat atagggggttcc gtcggatgt 3060
tccccggaaaaa gtgcacccgt acgtctaaaga aaccattttt atcatgcacat taacctataa 3120
aaataggcgt atcacggc ctttgcgtt cgcgcgttcc ggtgtatgcgtt gtaaaaaact 3180
ctgacacatg cagctcccg agacgggtcac agcttgcgtt taagcggatg cggggagcc 3240
acaagccccgt cagggcgctt caggggggtt tggcggttcc gggggctggc ttaactatgc 3300
ggcattcagag cagattgtac tga 3323

<210> 9

60 <211> 3774

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

65 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Plásmido pGN29

ES 2 281 420 T3

<400> 9

5	gagtgcacca	tatgcggtgt	aaaataccgc	acagatcggt	aaggagaaaa	taccgcacca	60
	ggcggaaatttgc	taaacgttaa	tattttgtta	aaattcggt	taaatatttgc	ttaaatcagc	120
	tcatttttta	accaataaggc	cgaaatcggt	aaaatccctt	ataaatcaaa	agaatagacc	180
	gagatagggt	tgagtgttgt	tccagtttgg	aacaagagtc	cactattaaa	gaacgtggac	240
10	tccaacgtca	aaggcgaaa	aaccgtctat	cagggcgatg	gcccactacg	tgaaccatca	300
	cccaaataaa	gttttttgcg	gtcgaggtgc	cgtaaagctc	taaatcgaa	ccctaaagggg	360
	agcccccgat	ttagagcttgc	acggggaaag	ccggcgaaacg	tggcgagaaa	ggaagggaaag	420
	aaagcgaaag	gagcgggcgc	tagggcgctg	gcaagtgttag	cggtcacgt	goggcgtaacc	480
	accacacccg	ccgcgcttaa	tgcgocgcta	cagggcgctg	ccattcgca	ttcaggctgc	540
	gcaactgttgc	ggaaggggcg	tccgtgcggg	cctcttcgt	attacgcag	ctggcgaaag	600
15	ggggatgtgc	tgcaaggcg	ttaagtggg	taacgcagg	gttttccag	tcacgacgtt	660
	gtaaaaacgac	ggccagtgaa	ttgttaatacg	actcaactata	gggcgaaattc	aaaaaaacccc	720
	tcaagacccg	tttagagcc	ccaagggttgc	atgctagtg	attctgcagg	gtacccgggg	780
	atccctctaga	gatccctcg	cctcgagatc	cattgtgtcg	gcgcgattc	tttatcactg	840
20	ataagttggt	ggacatatta	tgttatcag	tgataaaagt	tcaagcatga	caaagttgca	900
	gccgaatacaca	gtgatccgtg	ccggccctgg	actgttgcac	gagggtggcg	tagacggct	960
	gacgacacgc	aaactggcg	aacgggttggg	ggtgcagcag	ccggcgctt	actggcactt	1020
	caggaacaag	cgggcgtc	tcgacgcact	ggccgaaagcc	atgctggcg	agaatcatac	1080
25	gcttcgggtgc	cgagagccg	cgacgactgg	cgctcatttgc	tgatcgggaa	tcccgagct	1140
	tcaggcaggc	gtgtctcgcc	taccgcage	acaatggatc	tcgagggtac	ttccatcacct	1200
	accagttctg	cgcctgcagg	tcgcccgc	gactctctag	acgcgtaaagc	ttactagcat	1260
	aacccttgg	ggcctctaaa	cgggtcttgc	ggggtttttgc	gagctctcg	ccctatagtg	1320
30	agtcgtattat	cagcttgagt	attctatagtg	gtcacctaaa	tagctggcg	taatcatggt	1380
	catacgcttt	tcctgtgtgc	aatttttgc	cgctcacaat	tccacacaac	atacgagccg	1440
	gaagcataaa	gtgtaaagcc	tgggtgcct	aatgagttag	ctaactcaca	ttaattcggt	1500
	tgcgtctact	gcccgccttgc	cagtcggaa	acctgtgtcg	ccagctgc	taatgaatcg	1560
35	gccaacgcgc	ggggagaggc	ggtttgcgt	ttgggcgtc	ttccgcgttcc	tcgctcactg	1620
	actcgctgcg	ctcggtcggt	oggctgcggc	gagcggtatc	agctcactca	aaggcggtaa	1680
	tacggttatc	cacagaatca	ggggataacg	caggaaagaa	catgtgagca	aaaggccagc	1740
	aaaaggccag	gaaccgtaaa	aaggccgt	tgctggcg	tttcgatagg	tcccgcccc	1800
40	ctgacgagca	tcacaaaaat	cgacgtca	gtcagagggt	gcaaaaaaccc	acaggactat	1860
	aaagataccca	ggcgcccccc	cctggaaagct	ccctcggt	ctctctgtt	ccgaccctgc	1920
	cgttacccgg	atacctgtcc	gccttctcc	ttcggggaa	cgtggcgctt	tctcatagct	1980
	cacgcgttag	gtatctcgat	tcgggtgttgc	tcgttgcgtc	caagctggc	tgtgtgcacg	2040
45	aacccttgcgt	tcagcccac	cgctcgcc	tatccgtaa	ctatcgctt	gagtccaaac	2100
	cggtaagaca	cgacttatcg	ccactggcag	cagccactgg	taacaggatt	agcagagcga	2160
	ggtatgttgc	cgggtctaca	gagtttgc	agtgggtggcc	taactacggc	tacactagaa	2220
	ggacagtatt	ttgtatctgc	gctctgtgt	agccagttac	tttcggaaaa	agagttggta	2280
50	gtctttgtac	cggcaacaa	accacccgt	gtagcggttgc	ttttttgtt	tgcagcgc	2340
	agattacgcg	cagaaaaaaa	ggatctcaag	agatcccttgc	gatctttct	acggggctcg	2400
	acgttcgttgc	gaacgaaaac	tcacgttac	ggattttgc	catgagatta	tcaaaaagga	2460
	tctcaccta	gatcccttta	aattaaaaat	gaagttttaa	atcaatctaa	agtatataat	2520
55	agtaaaacttgc	gtctgtacgt	taccaatgt	taatcgtgt	ggcacccatc	tcagcgatct	2580
	gtctatccgt	ttcatccata	gttgcctgac	tcccccgt	gtagataact	acgatacggg	2640
	agggcttacc	atctggcccc	agtgtgtca	tgataccgcg	agaccacgc	tacccggctc	2700
	cagattttatc	agcaataaaac	cagccagccg	gaaggggccg	gcccgc	ggcgcagaatg	2760
60	cttattccgc	ctccatccag	tctattaaat	gttgcgggaa	agctagagta	agtagttcg	2820
	cagttatata	tttgcgttac	gttgcgttgc	ttgtctacagg	categtgggt	tcaagctcg	2880
	cgtttgttat	ggcttcatttc	agctccgtt	cccaacgc	aaggcgagtt	acatgatccc	2940
65	ccatgttgttgc	aaaaaaagcg	gttagcttgc	tccgttcc	gatcggttgc	agaagtaagt	3000
	tggccgcagt	gttatcactc	atgggtatgg	cagcactgtc	taatttcctt	actgtcatgc	3060
	catccgttaa	atgttttct	gtgactgggt	agtaactcaac	caagtcattc	tgagaatacc	3120
	gcggccggcg	accgagtgtc	tcttgcggg	cgtcaatacg	ggataatagt	gtatgacata	3180
	gcagaacttt	aaaagtgtc	atcattggaa	aacgttcttc	ggggcgaaaa	ctctcaagga	3240
	tcttacccgt	gttgagatcc	agttcgatgt	aaccctactcg	tgccaccaac	tgtatcttgc	3300
	cattttttac	tttcaccacgc	gtttctgggt	gagaaaaaac	aggaaggc	aatgcccgc	3360
	aaaagggaaat	aaggggcgaca	cggaaatgtt	gaataactcat	actcttcctt	tttcaatatt	3420
	attgaagcat	ttatcaggttgc	tattgtgtc	tgatcggtat	catatttgaa	tgtatatttgc	3480
	aaaataaaaca	aataggggttgc	ccgcgcacat	ttccccggaa	agtgccac	gacgtctaa	3540
	aaaccattat	tatcatgaca	ttaacctata	aaaataggcg	tatcagcagg	cccttcgtc	3600

ES 2 281 420 T3

```
tcgcgcgttt cggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacggtca 3660
cagcttggct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg 3720
ttggcgggtg tcggggctgg cttaaactatg cggcatcaga gcagattgt a 3774
```

5 <210> 10
<211> 5148
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
10 <220>
<223> Descripción de Sec
15 <400> 10

tatacagact	cactataggg	cgaattcaaa	aaaccctca	agaccgggtt	agaggccccca	60
agggttatg	ctagtgaatt	ctgcagcggt	acccgggat	cctctagaga	tccctcgacc	120
tcgagatcca	tttgctgga	aagatcacaa	gttttacaa	aaaagctgaa	cgagaaacgt	180
aaaatgatat	aatatcaat	atattaaatt	agatttgca	aaaaaacag	actacataat	240
actgtaaaac	acaacatatc	cagtcactat	ggcgccgca	ttaggcaccc	caggcttac	300
actttatgt	tccggctcg	ataatgtgt	gattttgagt	taggatocgg	cgagatttc	360
aggagctaag	gaagctaaaa	tggagaaaaa	aatcaactgga	tataccaccc	ttgatataatc	420
ccaatggcat	cgtaaagaac	attttgaggc	atttcagtca	gttgccta	gtacctataa	480
ccagaccgtt	cagctggata	ttacggccct	ttaaagacc	gtaaagaaaa	ataagcacaa	540
gttttatccg	gccttatttc	acattcttc	ccgcttgc	atgtctcattc	cggaaattccg	600
tatggcaatg	aaagacggtg	agctgggtat	atggatagt	gttacccctt	gttacaccgt	660
tttccatgag	caaactgaaa	cgttttccatc	getctggagt	gaataccacg	acgatttccg	720
gcagtttcta	cacatatatt	cgcaagatgt	ggcgtgttac	gtgtaaaacc	tggcctattt	780
ccctaaaggg	tttattgaga	atatgtttt	cgtctcagecc	atccccctggg	tgagtttca	840
cagttttgtat	ttaaacgtgg	ccaatatgg	caacttcttc	gccccccgtt	tcaccatggg	900
caaataattat	acgcaaggcg	acaagggtgt	gatggcgctg	gcgattcagg	ttcatcatgc	960
cgtctgtat	ggcttccatg	tccggcagaat	gtttaatgaa	ttacaacagt	actgcgatga	1020
gtggcagggc	ggggcgtaaa	gatctggatc	cggttacta	aaagccagat	aacagtatgc	1080
gtatatttgc	gctgattttt	gcccgtataag	aatatatact	gatatgtata	cccgaaagtat	1140
gtcaaaaaaga	gggtgtctat	gaagcagcgt	attacagtga	cagttgacag	cgacagctat	1200
cagttgtca	aggcatatat	gatgtcaata	tctccggct	gttaagcaca	accatgcaga	1260
atgaagccg	tcgtctgcgt	gcccgaacgct	ggaaagcgg	aatcaggaa	gggatggctg	1320
aggtcggcc	gtttattgaa	atgaacggct	cttttgc	cgagaacagg	gactgggtaa	1380
atgcagtta	aggtttacac	ctataaaaga	gagagccgtt	atcgctgtt	tgtggatga	1440
cagagtata	ttattgacac	gccccggcga	cggtatggta	tccccctggc	cagtgcacgt	1500
ctgctgtcag	ataaaagtctc	ccgtgaactt	tacccgggtt	tgcataatcg	ggatgaaaacg	1560
tggcgcatga	tgaccaccga	tatggccagt	gtgcegggt	ccgttatecg	ggaagaagtg	1620
gtgtatctca	gccaccgcga	aatatgacatc	aaaaacgc	ccatctgtat	gttctgggga	1680
atataaatgt	cagtcctcct	tatacacacg	cagtcgtcag	gtcgaccata	gtgactggat	1740
atgttgtt	ttacagtatt	atgtatctg	tttttatgc	aaaatcta	ttaatataatt	1800
gatatttata	tcattttacg	tttctcg	agctttctt	tacaaaagtgg	tgatcttcc	1860
agcacaatgg	atctcgaggg	atcttccata	cctaccagt	ctgcgcctgc	aggtcgcggc	1920
cgcgactcta	gacgcgtaa	cttactagca	taaccctt	gggcctctaa	acgggtctt	1980
aggggtttt	ttagcttctc	gcccataatg	gagtctgtatt	acagctttag	tattctatag	2040
tgtcacctaa	atagcttgc	gtaatcatgg	tcatactgt	ttccctgtgt	aaattgttat	2100
cgcgtcacaa	ttccacacaa	catacgagcc	ggaagcataa	agtgtaaacg	ctggggtgcc	2160
taatgagtga	gctaaactcac	attaatttgc	ttgcgtctac	tgcccgctt	ccagtccgg	2220
aacctgtcg	gccagctca	ttaatgaatc	ggccaaacg	cggggagagg	cggtttgt	2280
attggcgct	cttccgcttc	ctcgctact	gactcg	gtcggtcg	tcggctcg	2340
cgagcggtat	cagctcactc	aaaggcggt	atacggtt	ccacagaatc	aggggataac	2400
gcagggaaaga	acatgtgagc	aaaaggccag	aaaaggcc	ggaaccgtaa	aaaggcccg	2460
ttgctggcg	ttttcgatag	gtcccgcccc	cctgacg	atcacaaaa	tcgacgctca	2520
agtcaagagg	ggcgaaaccc	gacaggacta	taaagatacc	aggcg	ccctggaa	2580
tcctctgtc	gtctctgt	tcctcg	ccgcttcc	ccatctgt	cgccctt	2640
ccttgggaa	gcgtggcgct	ttctcatagc	tcacgtgt	gttatctca	ttcgggtgt	2700
gtcggtcg	ccaaagctgg	ctgtgtgcac	gaaccccc	ttagcccc	ccgctg	2760
ttatccoggt	actatcg	tgagtccaa	ccggtaaagac	acgacttata	gcactgg	2820
gcagccactg	gtaacaggat	tagca	aggtatgt	goggtgt	tcac	2880

ES 2 281 420 T3

5	aagtgggtgc ctaactacgg ctacactaga aggacagttat ttggtatctg cgctctgctg 2940 aaggccagtt ccttcggaaa aagagtggt agcttttgat ccggcaaaaca aaccaccgct 3000 ggtagcggtg gttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa 3060 gaagatcctt tgatctttc taqgggtct qacgctcagt ggaacgaaaaa ctacagttaa 3120 gggattttgg tcatgagatt atcaaaaagg atcttacccct agatccttt aaatiaaaaaa 3180 tgaagttta aatcaatcta aagtatataat gagaactt ggtctgacag ttaccaatgc 3240 ttaatcgtg aggcacctat ctcagcgtc tgcattttc gttcatccat agttgcctga 3300 ctccccgtcg ttagataac tacgatacgg gagggtttac catctggccc cagtgcgtc 3360 atgataccgc gagacccacg ctcacccggc ccaagatttat cagcaataaa ccagccagcc 3420 ggaaggggccg aegcgcagaag tggtcctgca actttatccg cctccatcca gtcttataat 3480 tgttgcgggg aagcttaggt aagttagttc ccaagttataa gtttgcgc aa cgttgttggc 3540 attgtctacag gcatctgtgt gtcacgctcg tggttttgtt tggtttcatt cagotccgg 3600 tcccaacgat caaggcggat tacatgatcc cccatgttgc gcaaaaaaagc ggtagctcc 3660 ttcggtectc cgatcggtt cagaagtaag ttggccgcag tggttatcaact catggttatg 3720 gcagcaactgc ataattctct tactgtcatg cccatccgtaa gatgctttc tggacttgg 3780 gagtactcaa ccaagtcatt ctgagaatac cggcccccggc gaccggatgg ctctggccc 3840 gcgtcaatac gggataatag tggatgacat agcagaactt taaaagtgtt catcatttgg 3900 aaacgttctt cggggcggaaa actctcaagg atottaccgc tggtagatc cagtcgtat 3960 taacccactc gtgcacccaa ctgatctca gcatttttt ctttcaccag cgttctggg 4020 tgagcaaaaa caggaaggca aaatccgc aaaaaggggaa taagggcgc acggaaatgt 4080 tgaatactca tactcttcct tttcaatataat tattgaagca ttatcaggg ttattgtctc 4140 atgagcggtat acatatttg aatgtatattt aaaaataaaac aaatagggtt tccgcgcaca 4200 tttcccgaa aagtgcacc tggactctaa gaaaccatttta ttatcatgac attaacctat 4260 aaaaataggc gtatcacgag gccccttcgt ctgcgcgtt tcggtgatga cggtaaaac 4320 ctctgacaca tgcagtcctt ggagacgggc acagttgtc tggtaagcggg tgccggggc 4380 agacaagccc gtcagggcgc gtcaggggtt gttgggggtt gtcggggctg gettaactat 4440 gcggcatcag agcagattgt actgagagtg cccatatgc ggtgtgaat accgcacaga 4500 tgcgtaaaggaa aaaaataccg catcaggcga aattgtaaac gttaatattt tggtaaaattt 4560 cgcgtaaat atttgtttaa tcaagtcatt ttttaacccaa taggcccggaa tggccaaaat 4620 cccttataaa tcaaaagaat agacccggat agggttgagt gttgtccag tttggaccaa 4680 gagtccacta taaaagaacg tggactccaa cgtccaaagggg cggaaaaacccg tctatcagg 4740 cgatggccca ctacgtgaac catcacccaa atcaagttt ttgcggcgtga ggtgcgtaa 4800 agctctaaat cggaaacccta aaggggcccccc cccattttgc gtttgacggg gaaagccggc 4860 gaacgtggcg agaaaaggaaag ggaagaaaagc gaaaggagcg ggcgcgttggg cgtggcaag 4920 tgttaggggtc acgctgcgcg taaccaccac accccggccgc cttaatgcgc cgctacagg 4980 cgcgccattt cggccattca gctgcgcac tggggggaa ggcgcgttggg cggggccctct 5040 tgcgtattac gccagctggc gaaagggggaa tggactgc ggcgatataag ttggtaacg 5100 ccagggtttt cccagtcacg acgttgaaa acgacggccaa gtgaattt 5148
10	
15	
20	
25	
30	
35	
40	

<210> 11

<211> 3715

45 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

50 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Plásmido TopoRNAi

<400> 11

55	gagtgcacca tatgcggtgt gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa taccgcata 60 ggcgaatttgc taaacgtta tattttgtta aaattcgcgt taaatatttgc ttaatcagc 120 tcatttttta accaataggc cgaatcgcc aaaaatccctt ataaatcaaa agaataagacc 180 gagatagggt tgagtgttgc tccagtttgg aacaagagtc cactattaaa gaacgtggac 240 tccaaacgtca aaggggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg gcccactacg tgaaccatca 300 cccaaatcaa gtttttgcg gtcgagggtgc cgtaaaagctc taaatcgaa ccctaaagg 360 agccccccgat ttagagcttgc acggggaaag cccgcgaacg tggcgagaaaa ggaagggaag 420 aaagcgaaag gagcggggcgc tagggcgctg gcaagtgttag cggtcactcgct ggcgttaacc 480 accacaccccg ccgcgtttaa tgccgcgtca cagggcgctg ccattcgcca ttcaaggctgc 540 gcaactgttg ggaaggggcgta tcgggtgcggg octcttcgcgt attacgcccag ctggcgaaag 600 ggggatgtgc tgcaaggcgta ttaagtttggg taacgcagg gttttcccgat tcacgacgtt 660 gtaaaacgcac ggccagtggaa ttgtataacg actcactata gggcgaattc aaaaaacccc 720
60	
65	

ES 2 281 420 T3

5	tcaagacccg ttttagaggcc ccaagggggtt atgcttagtga attctgcagg gtacccgggg 780 atccctaga gatccctcga cctcgagatc cattgtggtg gaattctacc aaggctagca 840 tggcagccg aatacagtga tccgtccgg ccttggactg ttgaacgagg tcggcgtaga 900 cggtctgacg acacgc当地 aacggcggg cgctgtccga cgcactggcc gaagccatgc tggcgagaa 1020 gcacttcagg aacaaggcggg cgctgtccga cgcactggcc gaagccatgc tggcgagaa 1020 tcatacgctt cggtgc当地 agccgacgc gactggcgtt catttctgtat cggaaatccc 1080 gcagccatgc tagccttggta agaattccac cacaatggat ctcgaggat cttccatacc 1140 taccagtctt gcgc当地 cag gtgc当地 cggc cgcactctcta gacgc当地 ag cttactatagca 1200 taacccttgc当地 ggccctctaa acgggcttgc当地 agggggtttt tgagcttctc gccc当地 atagcttgc当地 gtaatcatgg 1260 gagtcgtatt acagcttgc当地 tattctatag tgc当地 cccctaa atagcttgc当地 gtaatcatgg 1320 tcatacgctgt ttccctgtgtg aaatttggat ccgctc当地 cccacacaa catacgagcc 1380 ggaacgatcaa agtgtaaagc ctggggtgc当地 taatgagtga gctaactcac attaattgc当地 1440 ttgc当地 ctac tgcccttgc当地 ccagtc当地 ggaa aacctgtc当地 gccagctgc当地 ttaatgaatc 1500 ggccaaacgc当地 cggggagagg cggttgc当地 attgggctc当地 cttccggttcc ctcgctca 1560 gactcgctgc gctc当地 ctgc当地 cggc cgacgc当地 gatcggtat cagtc当地 ctac aaaggcggta 1620 atacggttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag 1680 caaaaggc当地 ggaaccgtaa aaaggccgc当地 ttgc当地 ggct ccttgc当地 tttcgatag gctccgcccc 1740 cctgacgagc atcacaaaaaa tcgacgtca atgc当地 agggacta 1800 taaagatacc aggc当地 ttcc cccctgaaagc tccctgtc当地 gctcttctgt tccgaccctg 1860 ccgcttaccg gatacctgtc cgc当地 ttctc ctttgc当地 gctggc当地 ttctcatagc 1920 tcacgctgtt ggtatctc当地 ttccgttgc当地 gtc当地 ttccgtc当地 ccaagctggg ctgtgtgc当地 1980 gaacccccc当地 ttccgccc当地 ccgctglocal cc当地 ttatccgttta actatgtct tgagtccaa 2040 ccggttaagac acgacttatac gccactggc当地 gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg 2100 aggtatgttag gccgtgctac agagtcttgc当地 aagtgggtgc当地 ctaactacgg ctacactaga 2160 aggacagtat ttgtatctc当地 cgctctgctc当地 aagccagttt ctttgc当地 aagagtggg 2220 agcttctgtat ccggcaaaaca aaccaccgc当地 gtagccggg gttttttgt ttgc当地 aagc 2280 cagattacgc gc当地 aaaaaaa aggatctcaa gaagatc当地 ttatccgtt tgatcttgc当地 tacggggfct 2340 gacgctc当地 ggaacgaaaaa ctcacgttgc当地 gggatttgg tcatgagatt atcaaaaagg 2400 atcttccatc当地 agatc当地 tttttgc当地 aaattaaaaaa tgaatgtttt aatcaatcta aagtatataat 2460 gagtaaactt ggctgacag ttaccatgc当地 ttaatc当地 aggtttttgt ttgc当地 aagc 2520 tgttcttgc当地 gttcatccat agttgc当地 tgc当地 cttccctgtc当地 tgtagataac tacgataacgg 2580 gagggttac catctggccc cagtgctgc当地 atgataccgc gagacccacg ctcaccggct 2640 ccagatttgc当地 cagcaataaa ccagccaggc当地 ggaaggggccg agcgcaag tggctctgca 2700 actttatccg cctccatcc当地 gtcttataat ttttgc当地 ggccatccat ctc当地 cgc当地 2760 ccagttataa gtttgc当地 ctttgc当地 ctttgc当地 atgatc当地 aggtttttgt ttgc当地 aagc 2820 tcgtttggta tggcttccat cagctccggc当地 tcccaacgc当地 gcatgtggg gtc当地 cgtc当地 2880 cccatgttgc当地 gcaaaaaaaagc gtttagctc当地 ttccgttccat cgtatgttgc当地 cagaagtaag 2940 ttggccgc当地 ctttgc当地 ctttgc当地 atgatc当地 gtttgc当地 ctttgc当地 ataaattctt tactgtcatg 3000 ccatccgttaa gatgttttgc当地 ttttgc当地 atgatc当地 gtttgc当地 gtttgc当地 ccaagtc当地 ttgagaatac 3060 cgccccc当地 gaccgagtttgc当地 ctcttgc当地 ggttgc当地 atgatc当地 gggataatag ttttgc当地 3120 agcagaactt taaaagtgttgc当地 catcattgc当地 aacgttccat cggggc当地 aactctcaagg 3180 atcttaccgc ttttgc当地 atgatc当地 gtttgc当地 taaccctactc当地 gtgc当地 ccccaatc当地 3240 gcatcttttgc当地 ctccatccat ctttgc当地 gtttgc当地 tgatc当地 ctttgc当地 ctttgc当地 3300 aaaaaggaa taaggccgac acggaaatgt ttttgc当地 atgatc当地 ctttgc当地 ctttgc当地 3360 tattgaagca ttttgc当地 atgatc当地 gtttgc当地 ttttgc当地 atgatc当地 ctttgc当地 3420 aaaaataaaac saatagggtt tccgccc当地 ctttgc当地 ctttgc当地 aatatttgc当地 atgatc当地 3480 gaaaccatta ttatcatgc当地 attaacctat aaaaataggc gtttgc当地 ctttgc当地 ctttgc当地 3540 ctcgccgctt tc当地 ctttgc当地 ctttgc当地 ctttgc当地 ctttgc当地 3600 acagcttgc当地 ttttgc当地 ctttgc当地 ctttgc当地 ctttgc当地 3660 gttggccgggtt gtttgc当地 ctttgc当地 ctttgc当地 ctttgc当地 ctttgc当地 3715
---	---

55

<210> 12

<211> 4107

60 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

65 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Plásmido pGN49A

ES 2 281 420 T3

<400> 12

5	tgtaatacga ctcaactatacg ggcgaattca aaaaacccct caagacccgt ttagaggccc 60 caagggtta tgctagtcaa ttctgcagcg gtacccgggg atcctctaga gatccctcga 120 cctcgagatc cattgtgtg gaaaggatct ggatccggct tactaaaagc cagataacag 180 tatgcgtatt tgcgcgctg ttttgcgggt ataagaatata atactgatata gtataccgc 240 agtatgtcaa aaagagggtgt gctatgaagc agcgattac agtgacagtt gacagcgaca 300 gctatcgtt gctcaaggca tatatgtatgt caatatctcc ggtctggtaa gcacaaccat 360 gcagaatgaa gcccgtgtc tgcggtccga acgctggaa gcgaaaatc aggaaggat 420 ggctgaggtc gcccgggtta ttgaaatgaa cggctttt gctgacgaga acagggactg 480 gtgaaatgca gtttaagggtt tacacctata aaagagagag cggttatctgt ctgttigtgg 540 atgtacagag tgatattatt gacacgccccg ggcgacggat ggtatcccc ctggccagtg 600 cagtcgttcc aaggatataa gtctcccgta aactttaccc ggtgtgcata atcggggatg 660 aaagctggcg catgatgacc accgatatagg ccagtgccg ggtctccgtt atcggggaaag 720 aagtggctga ttcagccac cgcggaaatg acatcaaaaaa cgccattaaac ctgatgttct 780 gggaaatata aatgtcaggc tccctatac acagccccc cagcacaatg gatctcgagg 840 gatcttccat acctaccgt tctgcgcctg caggcgcgg ccgogactct agacgcgtaa 900 gcttactagc ataaccctt ggggcctcta aacgggtttt gagggggttt ttgagcttct 960 20 cgcctatag tgagtcgtat tacagttga gtattctata gttcaccta aatagcttgg 1020 cgtaatcatg gtcatagctg ttcctgtgt gaaattgtta tccgctcaca attccacaca 1080 acatacgacg cggaaagcata aagtgtaaag cctgggggtgc ctaatgagtg agctaactca 1140 cattaattgc gttgcgcctca ctgcgcctt tccagtcggg aaacctgtcg tgcagctgc 1200 attaatgaat cggccaaacgc gggggagag ggggttgcg tattggcgc tttccgcctt 1260 cctcgctcac tgactcgctg cgctcggtcg ttcggctgcg gcgagcggtt tcaagctca 1320 25 caaaggcggt aatacggta tccacagaat caggggataa cgcaggaaag aacatgtgag 1380 caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgtt aaaaaggccgc gttgtggcg ttttgcata 1440 ggctccggcc ccctgcacg catcacaaaa atcgaacgctc aagtcaaggg tggcggaaacc 1500 cgacaggact ataaagatatac caggcgttcc cccctggaaag ctccctcgctg cgctctccctg 1560 30 ttccgaccct gcccgttacc ggataactgt ccgccttttcccttcggg agcgtggcgc 1620 tttctcatag ttcacgcgtt aggtatctca gttcggtgtt ggtcggttc tccaaagctgg 1680 gctgtgtca cgaacccccc gttcagcccg accgctgcgc ttatccgtt aactatcgctc 1740 ttgagtccaa cccggttaaga caccgacttat cgcactggc agcagccact ggttaacagga 1800 ttagcagagc gaggtatgtt ggcgggtcta cagagttttt gaaatgggtt cctaactacg 1860 gctacactag aaggacagta tttgttatct ggcctctgtt gaaagccagg accttcggaa 1920 35 aaagagttgg tagcttttgc tccggcaaac aaaccacccgc tggtagccgt ggtttttttt 1980 tttgcagca gcaaggatatac cgcggaaaaa aaggatctca agaagatctt ttgatctttt 2040 ctacggggtc tgacgcgttca gggacggaaa actcacgtt aaggattttt gtcagatgg 2100 tataaaaag gatcttcacc tagatctttt taaaattaaaa atgaagttttt aaatcaatct 2160 aaagtatata tgagttttt ggttotgaca gttaccatg cttaatcgtt gaggcaccta 2220 40 tctcagcgat ctgtctattt ctgttcatcca tagttgcctt actcccoctt gtttagataa 2280 ctacgatacg ggagggtctt ccacgtggcc ccagtgctgc aatgataccg cgagacccac 2340 gctcaccggc tccagattt tcaagaaacc accagccgcg ccgaaggccg gagccgcagaa 2400 gtgtctctgc aactttatcc gctccatcc agtctattaa ttgttgcgg gaaatcgag 2460 taagtgttc gcoagttat agtttgcgtt acgttgggtt cattgttaca ggcacgttgg 2520 tgtcacgttc gtgttttgtt atgggttcat tcaagctccgg ttcccaacgaa tcaaggcgag 2580 ttacatgatc cccatgttgc tgcaaaaaag cggtttagctc ttccggctt ccgatcggtt 2640 tcagaagttt gttggccgca gtgttatcac tcatggttat ggcagactg cataattctc 2700 ttactgtcat gccatccgtt aagatgtttt ctgttgcgtt gtagtactca accaagtcat 2760 50 tctgagaata cccggccgg cgcacgatgtt gtcgttttttccgg ggcgtcaata cgggataata 2820 gtgtatgaca tagcagaact taaaatgtt tcatcattgg aaaacgttct tggggcgaa 2880 aactctcaag gatcttaccg ctgttgcgtt ccagttcgat gtaacccact cgtgcacccca 2940 actgatcttcc agcatctttt actttccacca gcttttgcgtt gttgagaaaa acaggaaaggc 3000 aaaatgccgc aaaaaaggaa ataaggccga caccggaaatg ttgaaatactc atactcttcc 3060 tttttcaata ttattgttgc atttattcagg gttattgtct catgagccga tacatatttgc 3120 aatgtatttta gaaaaataaaa caaatagggg ttcggccac atttcccgaa aaatgtccac 3180 ctgacgtcttta agaaaaccattt attatcatgtt cattaaaccta taaaatagg cgtatcacgt 3240 ggccctttcg tctcgccgtt ttcgggtatg acgggttttttccgg gctctgcacat atgcagctcc 3300 60 cggagacggc cacagttgtt ctgttgcgtt atgcggggag cagacaagcc cgatcggttgg 3360 cgtcagcggtt ttttgcggg ttttgcgggtt ggtttacta tgcggatca gagcagattt 3420 tactgagatg gcaccatatac cgggtgttttccgg taccgcacag atgcgttactt agaaaatacc 3480 gcatcaggcg aaattgtttttt cgtttaatatt ttgtttttttt tttttttttt 3540 atcagctcat ttttttacca ataggccaaat tcccttataaa atcaaaagaa 3600 tagaccgaga taggggttgcgtt gttttttttt gtttggaaaca agatccactt attaaagaac 3660 65 gtggacttca acgttcaaaagg ggcggaaaaacc gtcgttacttccgg ggcgttttttttccgg 3720
---	---

ES 2 281 420 T3

5 ccatcaccca aatcaagttt tttcggtcg aggtgcccgt aagctctaaa tcggaaccct 3780
 aaaggagcc cccgatttag agcttgcacgg ggaaagccgg cgaacgtggc gagaaaggaa 3840
 gggaaagaaag cgaaaggagc gggcgctagg gcgcgtggaa gtgtacggc caccgtgcgc 3900
 gtaaccacca caccgcgcgc gcttaatgcg cgcgtacagg gcgcgtccat tcgccattca 3960
 ggctgcgcaa ctgttggaa gggcgatcgg tgcgggcctc ttgcgtattt cgccagctgg 4020
 cgaaaaggggg atgtgcgtca aaggcattaa gttggtaac gccagggttt tcccagtac 4080
 gacgttgtaa aacgacggcc agtgaat 4107

<210> 13

10 <211> 4001

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Plásmido pGN59A

<400> 13

20

25 gagtgcacca tatgcgtgt gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa taccgcata 60
 ggcgaaattt taaacgttaa tattttgtta aaattcgcgt taaatatttgc taaatatcgc 120
 tcatttttta accaataggc cgaatcgcc aaaatccctt ataaatcaaa agaatacgacc 180
 gagatagggt tgagtgtgt tccagtttgg aacaagagtc cactattaaa gaacgtggac 240
 tccaaacgtca aaggcgaaa aacgtctat cagggcgatg gcccactacg tgaaccatca 300
 cccaaatcaa gtttttgcg gtgcgggtgc cgtaaagctc taaatcgaa ccctaaagg 360
 agcccccgtt ttagacttgc acggggaaag cggcgaacg tggcgagaaa ggaagggaag 420
 aaagcgaaaag gacggggcgc tagggcgctg gcaagtgtag cggtcacgct ggcgcgtaa 480
 accacaccccg ccgcgtttaa tgcgcgcata cagggcgctg ccattcgcca ttcaggctgc 540
 gcaactgttgc ggaaggcgca tcgttgcggg ccttttcgtt attacgcccag ctggcgaa 600
 ggggatgtgc tgcaagcgca ttaagtttggg taacgcagg gttttccag tcacgacgtt 660
 gtaaaaacgac ggccagtgaa ttgttaatacg actcaactata gggcaattt gagctcggtt 720
 cccggggatc ctctagagat ccctcgaccctt cggatccat tgcgttgcg aggatctgg 780
 tcccggttac taaaagccag ataaacagtat ggcgttgcgtt tgcgttgcg aggatctgg 840
 agaaatataatactgtatgtat taccgcgtt atgtcaaaaa gaggtgtgt atgaagcagc 900
 gtattacagt gacagtgcg acggacagctt atcgttgcgtt caaggcatat atgtatgtcaa 960
 tatctccgggt ctggtaagca caaccatgcg aatgcggcc cgtcgctgc gtgcgcgaa 1020
 ctggaaagcg gaaaatcagg aaggatggc tgagggtcgcc cggtttatttgc aatgaacgg 1080
 ctctttgtc gacgagaaca gggactgggtt aatgcgtt taaggtttac acctataaaa 1140
 gagagagccgtt ttagctgtctg ttttggatg tacagagtgat tattattgac acgcccgggc 1200
 gacggatgggtt gatccccctg gccaggcgcac gtcgtttaag cgataaaatgc tcccgtgaac 1260
 tttaaccgggtt ggtgcataatc ggggatgaaa gtcggcgtt gatgaccacc gatatggca 1320
 gttgtgcgggtt ctccgttac ggggaaagaa tggctgtatc cagccacccgc gaaaatgaca 1380
 tcaaaaacgc cattaaacctg atttctggg aatataat gtcaggctcc cttatacaca 1440
 gcctttccag cacaatggat ctcgaggat cttccatacc taccgttgc ggcgcctgcag 1500
 gtcgcggccgc cgactctcta gagtcgaaag cttctcgccc tatagtgtgt cgtattacag 1560
 cttagtattt ctatgtgtc acctaaatag cttggcgtaa tcatggcat agctgtttcc 1620
 tttgtgaaat ttttccgc tcacaattcc acacaacata cgagccggaa gatataatgt 1680
 taaagcctgg ggtgcctaattt gaggatgtt actcacatata attgcgttgc gtcactgc 1740
 cgctttccag tggggaaacc tggcgatgcg gtcgttgcgc tgaatcgcc aacgcgcggg 1800
 gagaggcggtt tggcgatgtt ggcgttcc cgtttccgc ttcactgtact cgtcgctc 1860
 ggtcggttgcg tggcgccgag cggatcgttgc tcaactcaat ggcgttataac gtttatccac 1920
 agaatcagggtt gataacgcgtt gaaagaacat gtggcaaaa ggcgcgtt ggcgcgtt 1980
 ccgtaaaaaaag ggcgcgttgc tggcgatgtt cgttgcgtt cgcgttccgc acgacgttca 2040
 caaaaatcgtt cgttgcgtt cgttgcgtt cgttgcgtt cgttgcgtt cgttgcgtt 2100
 gttttccctt ggaagctccc tcgtgcgttcc ttcgttccgc acctgtccgc ttaccggata 2160
 cctgtccgc ttttccctt cggaaaggctt ggcgttccgc ttcgttccgc ttcgttccgc 2220
 ttcgttccgc ttcgttccgc ttcgttccgc ttcgttccgc ttcgttccgc ttcgttccgc 2280
 gcccgcgttccgc tggcgatgtt cgttgcgtt cgttgcgtt cgttgcgtt cgttgcgtt 2340
 cttatcgccatc tggcgatgtt cgttgcgtt cgttgcgtt cgttgcgtt cgttgcgtt 2400
 tgctacagat ttttgcgtt ggtggccatc ttcgttccgc ttcgttccgc ttcgttccgc 2460
 tatctgcgtt ctggcgatgtt cgttgcgtt cgttgcgtt cgttgcgtt cgttgcgtt 2520
 caaaaacacc accgttgcgtt ggcgttgcgtt ttttgcgtt cgttgcgtt cgttgcgtt 2580
 aaaaaaaaggatc ttcgttccgc ttcgttccgc ttcgttccgc ttcgttccgc ttcgttccgc 2640

ES 2 281 420 T3

	cgaaaactca cguttaaggga ttttggcat gagattatca aaaaggatct tcacctagat 2700
	cctttaaat taaaatgaa gttttaaatac aatctaaagt atatatgagt aaacttggtc 2760
5	tgacagttac caatgctta tcagtggc acctatctca gcgatctgc tatttcgttc 2820
	atccatagtt gcctgactcc cctgtgtta gataactacg atacgggagg gcttaccatc 2880
	tggccccagt gtcgaatga taccgcgaga cccacgctca cccgctccag atttatacgc 2940
10	aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg cagaagtggt cctgcaactt tatccgcctc 3000
	catccagtct attaatttgtt gcgggaagc tagagtaagt agttcgcacg ttaatagttt 3060
	gchgcaacgtt gttggcattt ctacaggcat cgtgggtgtca cgctcgctgt ttggatggc 3120
15	ttcattcgc tccgggttccc aacgatcaag gcgagttaca tgatccccca tgggtgtgcaa 3180
	aaaagcggtt agtccttcg gtcctccgt cgttgtcaga agtaagtgg cccgcaatgtt 3240
	atcactcatg gttatggcag cactgcataa ttctcttact gtcatgcacat cccgtaaatgt 3300
	ctttctgtg actgggtgagt actcaaccaa gtcattctga gaataccgcg cccggcgacc 3360
20	gagttgtct tgccggcggt caatacggga taatagtgtt tgacatagca gaactttaaa 3420
	agtgtcatc attggaaaac gttcttcggg gcggaaaactc tcaaggatct taccgctgtt 3480
	gagatccagt tcgatgttac ccactcgac acccaactga tcttcagcat cttttacttt 3540
	caccacgtt tctgggttag caaaaacagg aaggcaaaaat gcccggaaaaa aggaaataag 3600
25	ggcgcacacgg aaatgttga tactcataact ctccctttt caatattattt gaagcattta 3660
	tcagggttat tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaaat 3720
	agggttccg cgcacatttc cccgaaaaat ggcacactgac gtctaaagaaa ccatatttat 3780
	catgacatta acctataaaa ataggcgat cacgaggccc tttcgatcg cgcgttccgg 3840
	tgatgacggt gaaaacctct gacacatgca gtcggggag acggtcacag cttgtctgtt 3900
	agcggatgcc gggagcagac aagccgtca gggcgctca gcggtgttg gcggtgtcg 3960
	gggctggctt aactatgcgg catcagagca gattgtactg a 4001

<210> 14

<211> 36

30 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido oGN103

<400> 14

40	taccaaggct agcatggttt atcactgata agttgg	36
----	---	----

<210> 15

<211> 34

45 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

50 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido oGN104

<400> 15

55	taccaaggct agcatggccc tgcctgaagg ctgc	34
----	---------------------------------------	----

<210> 16

60 <211> 40

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

65 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido oGN126

ES 2 281 420 T3

<400> 16

gatctggatc cggttacta aaagccagat aacagtatgc

40

5 <210> 17

<211> 46

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido oGN127

15 <400> 17

ggagacttta tcgttaaga gacgtgcact ggccaggggg atcacc

46

20 <210> 18

<211> 51

<212> ADN

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido oGN128

30 <400> 18

ccagtgcacg tctcttaagc gataaagtct cccgtgaact ttaccgggtg g

51

35 <210> 19

<211> 37

<212> ADN

40 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido oGN129

45 <400> 19

gctgtgtata agggagcctg acatttatat tccccag

37

50 <210> 20

<211> 375

<212> ADN

55 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Fragmento de PCR generado por los cebadores oGN103 y oGN104 en pCDM8

ES 2 281 420 T3

<400> 20

taccaaggct agcatggttt atcaactgata agttggataa gttgggtggac atattatgtt 60
tatcagtgtat aaagtgtcaa gcatgacaaa gttcagccg aatacagtga tccgtgcgg 120
ccctggactg ttgaacgagg tcggcgtaga cggtctgacg acacgaaac tggcggaaacg 180
gttgggggtg cagcagccgg cgctttactg gcacttcagg aacaagcggg cgctgtcga 240
cgcactggcc gaagccatgc tggcggagaa tcatacgctt cggtgccgag agccgacgac 300
gactggcgct catttctgtat cgggaaatccc gcagcttcag gcaggcccat gctagccttg 360
gttaccacac aatgg 375

<210> 21

<211> 670

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Fragmento de PCR

<400> 21

gatctggatc	cggttacta	aaagccagat	aacagtatgc	gtatggcgc	gctgat	ttttt	60
gcggtataag	aatatatact	gatatgtata	cccgaaagtat	gtcaaaaaga	ggtgtgc	at	120
gaagcagcgt	attacagtga	cagttgacag	cgacagctat	cagttgctca	aggcatat	at	180
gatgtcaata	tctccggct	ggttaagcaca	accatgcaga	atgaagcccg	tgcgtctgcgt		240
gccgaacgc	ggaaagcgg	aaatcaggaa	gggatggctg	aggtcgcccg	gtttattgaa		300
atgaacgcgt	ctttgtctga	cgagaacagg	gactggtaa	atgcagtta	aggtttacac		360
ctataaaaga	gagagccgtt	atcgtctgtt	tgtggatgt	cagagtgtata	ttattgacac		420
gccccggcga	cggatggtga	tccccctggc	cagtgcacgt	ctcttaagcg	ataaaagtctc		480
ccgtgaacct	tacccggtgg	tgcataatcgg	ggatgaaagc	tggcgcatga	tgaccacccg		540
tatggccagt	gtgcggct	ccgttatcgg	ggaagaagtgc	gctgatctca	gccaccgcga		600
aaatgacatc	aaaaacgc	cca ttaacctgtat	gttctgggaa	atataaatgt	caggctcoct		660
tatacacac	gc						670

40

45

50