



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

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

51 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

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

86 Fecha de presentación : **18.05.2001**

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

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

54 Título: **Construcciones de vector.**

30 Prioridad: **19.05.2000 GB 0012233**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.10.2007

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

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

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

74 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.

25 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.

30 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 cantidades de ARNds no específico produce un entorno competitivo por las secuencias especificadas. 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 del plásmido, conduciendo a una producción reducida de ARNds. Esta concentración relativamente baja de ARNds eficaz a su vez conduce a un ARNi ineficaz.

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 transcrito 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.

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.

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:

(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; y dicha construcción de ADN comprende adicionalmente:

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

(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 de bacteriófago.

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 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 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 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 aún esté presente en la célula hospedadora.

La disposición de dos promotores "oponibles" que flanquean una región entre promotores de modo que el inicio de la transcripción dirigido por uno 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 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 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 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.

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.

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 ARNs. 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 ARNs 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 ARNs. 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 oponible, 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.

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:

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.

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.

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.

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*).

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.

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 ARNs, 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.

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 el molde. Esto evita la transcripción ilimitada de la estructura del vector, y reduce la transcripción no específica de ADN no esencial.

Los transcritos generados a partir de este vector, dependiendo de la colocación precisa de los terminadores en el vector, ser ARNs 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 transcrito se reduce completamente a las secuencias especificadas por el molde. Por lo tanto, se obtiene una cantidad mayor de ARNs 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 ARNs cortas específicas. Esta cantidad proporcionalmente mayor de

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.

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.

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 fueran 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.

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 transcrito y por tanto el ARNds formado no afectará gravemente a la eficacia en un sistema ARNi.

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.

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 transcrito 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.

Las Figuras 1 (d) y 1 (e) ilustran esquemáticamente dos construcciones de ADN adicionales de acuerdo con la invención que son los 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.

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.

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.

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).

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. 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.

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 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 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 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 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.

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 Gateway™ disponible en el mercado en Life Technologies, Inc. El sistema de clonación Gateway™ se ha descrito ampliamente por Hartley *et al.* en el documento WO 96/40724 (PCT/US96/10082). 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 TA™. 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 como clonación TA™. 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 TOPO™.

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)

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 las construcciones de ADN de la invención, incluyendo las ilustradas esquemáticamente en las Figuras 1 (b) a 1 (e).

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 son útiles en protocolos de ARNi *in vivo* en el gusano nematodo *C. elegans*.

En *C. elegans*, se ha realizado ARNi tradicionalmente por inyección de ARNs 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 ARNs, después de lo cual se inyecta el ARNs 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 ARNs formado, serán más específicos ya que solamente se transcribirá el fragmento diana clonado. Esto producirá un ARNi más eficaz.

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 ARNs. El ARNs pasa la barrera del intestino del gusano e induce el mismo ARNi que si se hubiera inyectado ARNs. Para estos experimentos, la cepa de *E. coli* preferida es HT115. (DE3), y la cepa de *C. elegans* preferida es nuc-1; gun-1. 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 ARNs eficaz.

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 ARNs 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 ARNs. 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 solamente de la unión de la polimerasa afín.

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 ARNs. Como con otros métodos de ARNi descritos anteriormente, el uso del nuevo sistema de vector potenciará el ARNi por la producción de solamente ARNs específico.

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

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 posiciones de los promotores T7 oponible.

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 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 oponible 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.

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.

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

La Figura 14 muestra la secuencia completa del plásmido pGN49A.

La Figura 15 muestra la secuencia completa del plásmido pGN59A.

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

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

Ejemplo 1

Construcción de vector

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 N° WO 00/01846 del solicitante en trámite junto con la presente, contiene dos promotores T7 oponibles que flanquean un sitio de clonación múltiple.

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*, John Wiley & Sons, Inc. (1994).

1) Construcción de pGN9

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).

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).

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 GATEWAY™ (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*.

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.

oGN103: 5' TACCAAGGCTAGCATGGTTTATCACTGATAAGTTGG 3'

oGN104: 5' TACCAAGGCTAGCATGGGCCTGCCTGAAGGCTGC 3'

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.

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.

oGN126 pGATCTGGATCCGGCTTACTAAAAGCCAGATAACAGTATGC
 oGN127 GGAGACTTTATCGCTTAAGAGACGTGCACTGGCCAGGGGGATCACC
 oGN128:
 CCAGTGCACGTCTCTTAAGCGATAAAGTCTCCCGTGAACCTTTACCCGGTGG
 oGN129 pGCTGTGTATAAGGGAGCCTGACATTTATATTCCCCAG

Ejemplo 2

Para ilustrar la utilidad de los vectores mejorados en ARN

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 (-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.

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.

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.

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 fragmentos 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

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).

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

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)

25	Día 1	0	0	0	0
	Día 2	0	0	0	0
30	Día 3	0	0	0	0

pGN2 (sin diluir)

35	Día 1	12	4	48	32
	Día 2	24	23	80	85
40	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

45	Día 1	0	7	0	2
	Día 2	9	10	0	3
50	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

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

pGN12+1, dilución 1/4

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

65

ES 2 281 420 T3

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 pequeño
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

pGN12+1, dilución 1/32

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

* muere la madre

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 nematodos con *E. coli* que lleva pGN2 o pGN12 produjo una descendencia viable. Esto se debe a la alimentación del gusano con ARNs 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 ARNs 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 ARNs mucho más eficaz. Este experimento muestra claramente que la adición de secuencias terminadoras en vectores para expresar ARNs 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.

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

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.

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.

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

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.

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
resultante						
Porcentaje	100	75	100	87,5	100	50
Letal						
Porcentaje de	0	25	0	12,5	0	50
descendencia						

ES 2 281 420 T3

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

5 **TACCAAGGCT AGCATGGTTT ATCACTGATA AGTTGG**
 ATAAGTTGGT GGACATATTA TGTTTATCAG TGATAAAGTG TCAAGCATGA
 CAAAGTTGCA GCCGAATACA GTGATCCGTG CCGGCCCTGG ACTGTTGAAC
10 **GAGGTCCGCG TAGACGGTCT GACGACACGC AACTGGCGG AACGGTTGGG**
 GGTGCAGCAG CCGGCGCTTT ACTGGCACTT CAGGAACAAG CGGGCGCTGC
 TCGACGCACT GGCCGAAGCC ATGCTGGCGG AGAATCATAC GCTTCGGTGC
15 **CGAGAGCCGA CGACGACTGG CGCTCATTTT TGATCGGGAA TCCCGCAGCT**
 TCAGGCAGGC CCATGCTAGC CTTGGTACCA GCACAATGG

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

 gatctggatccggcttactaaaagccagataacagtatgCGTatttgcgcgctg
25 atTTTTgcggtataagaatatatactgatatgtataaccgaagtatgtcaaaaa
 gaggtgtgctatgaagcagcgtattacagtGacagttgacagcgacagctatca
 gttGctcaaggcatatatgatgtcaatatctccggtctggtAagcacaaccatg
30 cagaatgaagcccgtcgtctgCGtgccgaacgctggaaagcggaaaatcaggaa
 gggatggctgaggtcGcccggtttattgaaatgaacggctcttttGctgacgag
 aacagggactggtgaaatgcagtttaaggtttacacctataaaagagagagccg
35 ttatcgtctgtttgtggatgtacagagtGatattattgacacgcccgggcga
 cggatggtgatccccctggccagtgCacgtctcttaagcgataaagtctccc
 gtGaaactttaccCGgtggtgcataatcggggatgaaagctggcgcatgatgac
40 caccgatatggccagtgTgccggtctccgttatcggggaagaagtggctgat
 ctcagccaccgcgaaaatgacatcaaaaacgccattaacctgatgttctggg
 gaatataaatgtcaggctcccttatacacagc

REIVINDICACIONES

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

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;

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

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, 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.

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, 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 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.

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.

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.

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.

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.

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.
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.
- 10 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.
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.
- 20 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.
- 25 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.
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.
- 30 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.
- 60 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.
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 N° 8, SEC ID N° 9, SEC ID N° 10, SEC ID N° 11, SEC ID N° 12, o SEC ID N° 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.

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.

25 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.

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

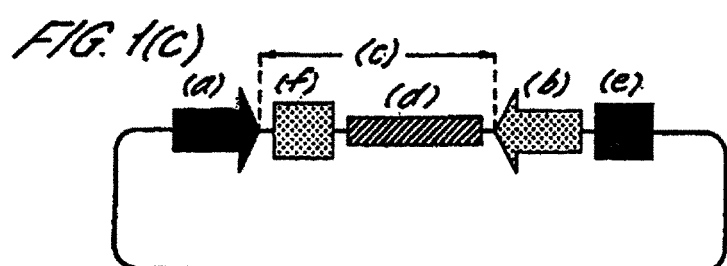
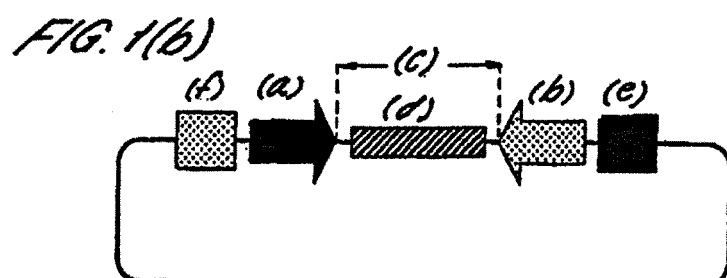
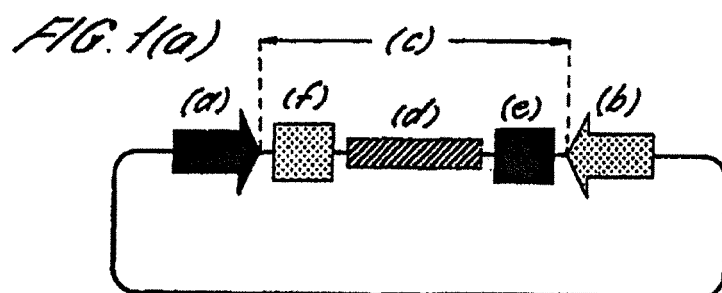
45

50

55

60

65

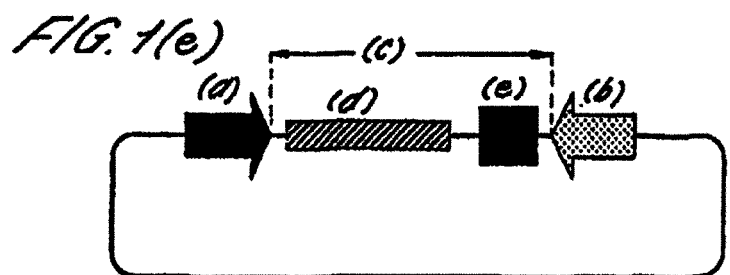
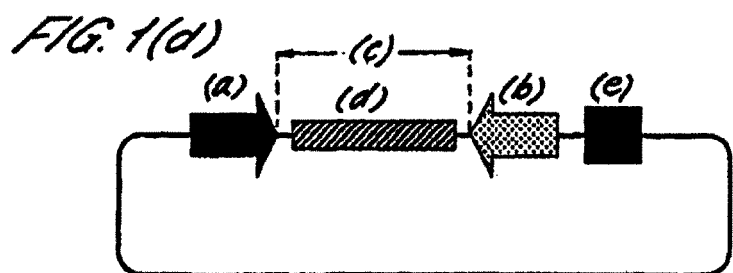


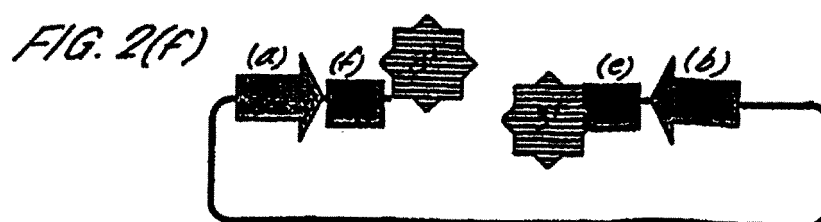
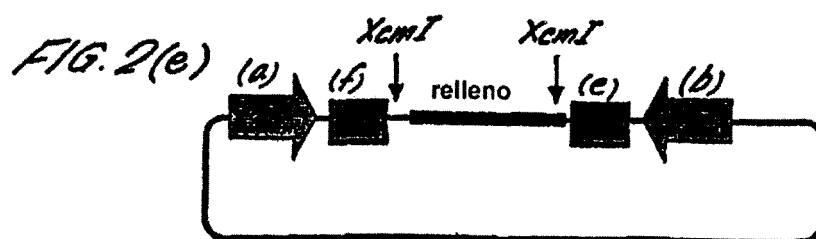
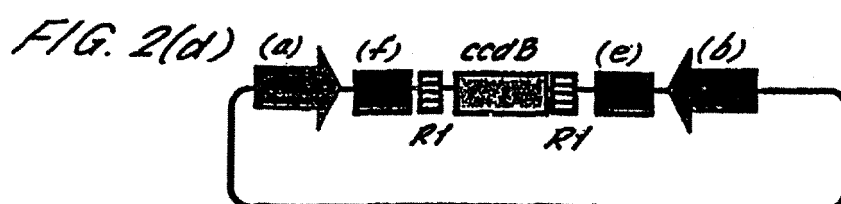
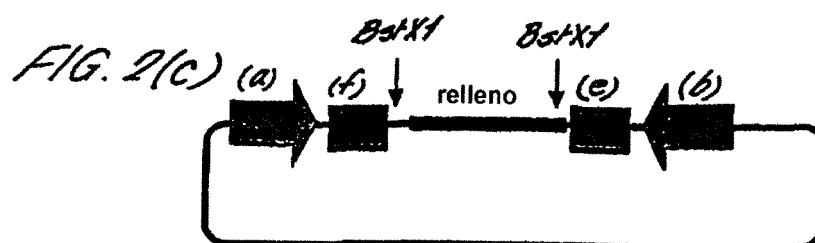
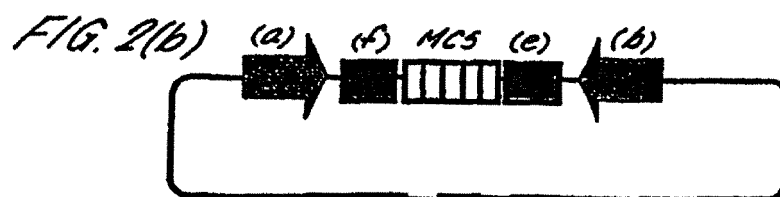
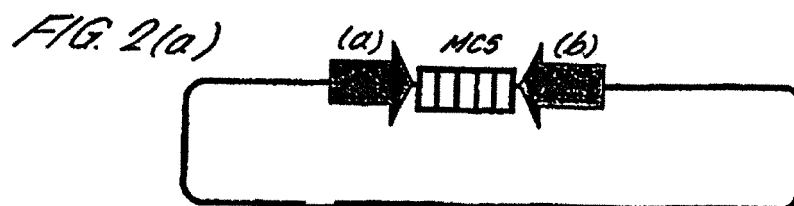
(a): promotor 1

(b): promotor 2

(e): Terminador 1

(f): Terminador 2





Construcción de vector ARNi con
terminadores T7

FIG. 3.

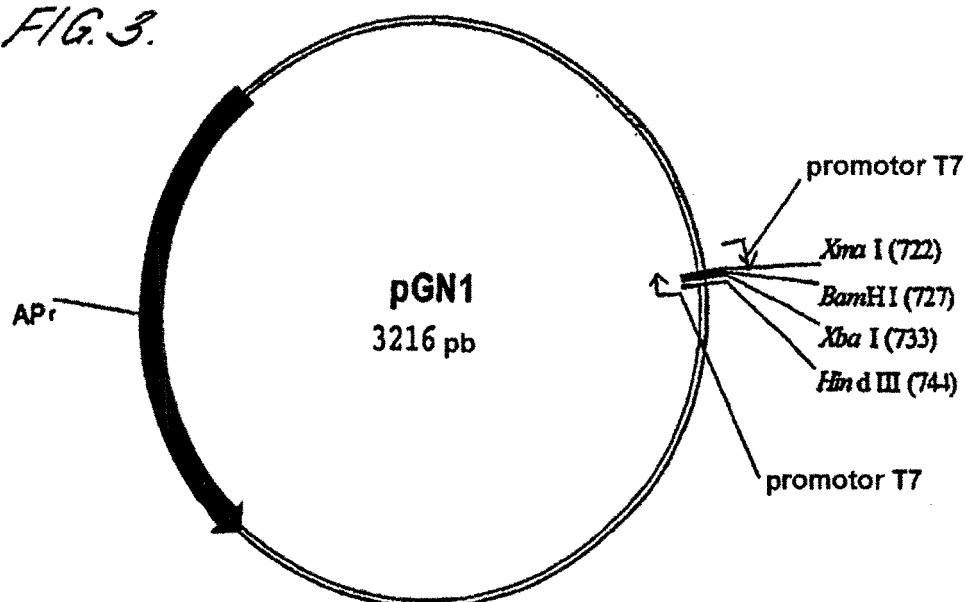


FIG. 4.

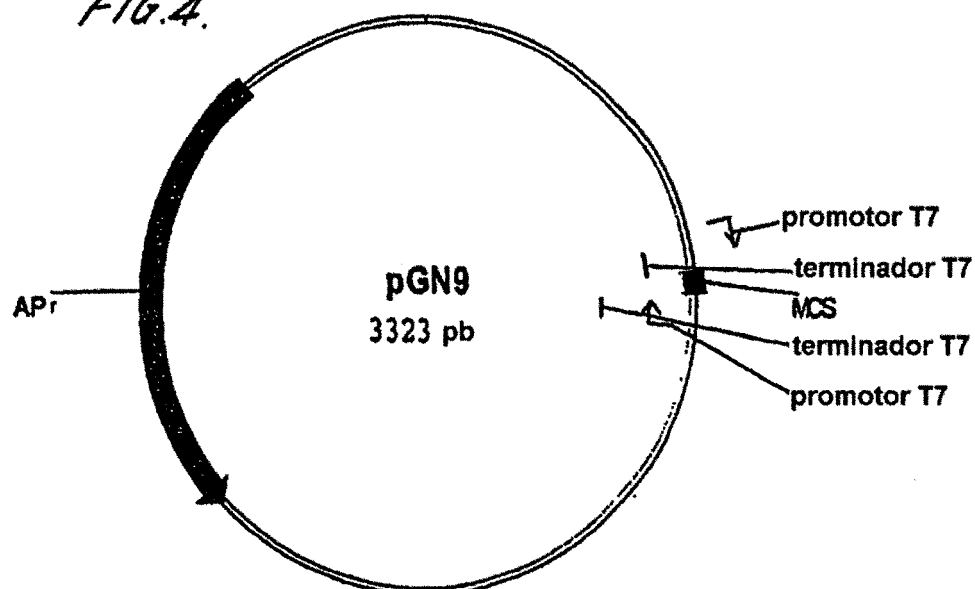


FIG. 5

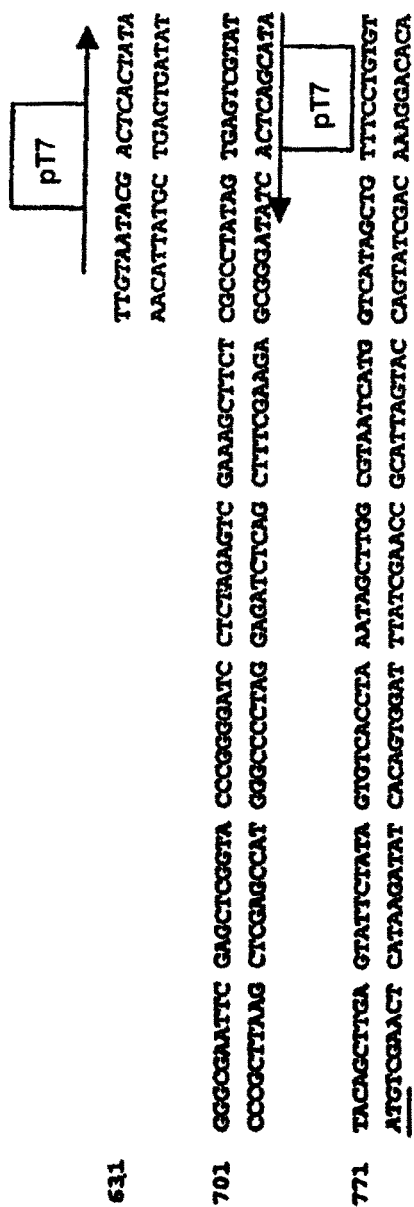


FIG. 6.

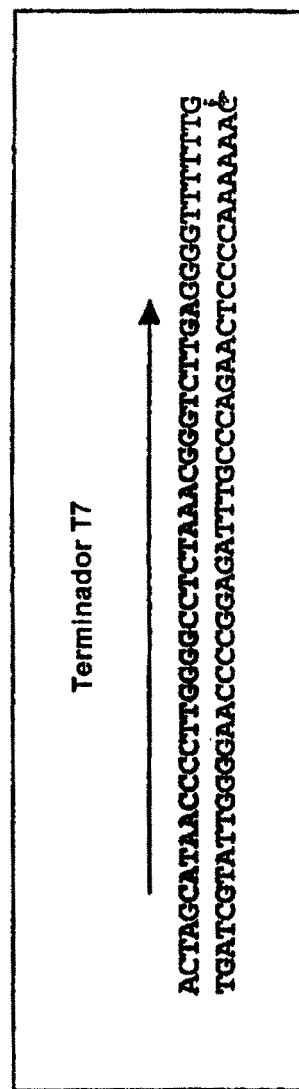


FIG. 7.

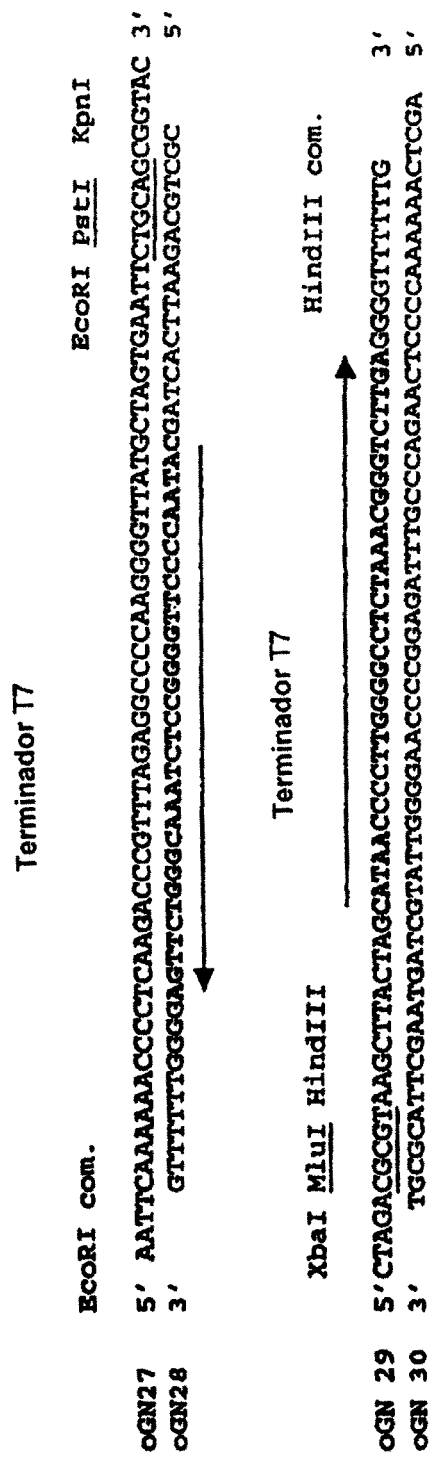


FIG. 8.

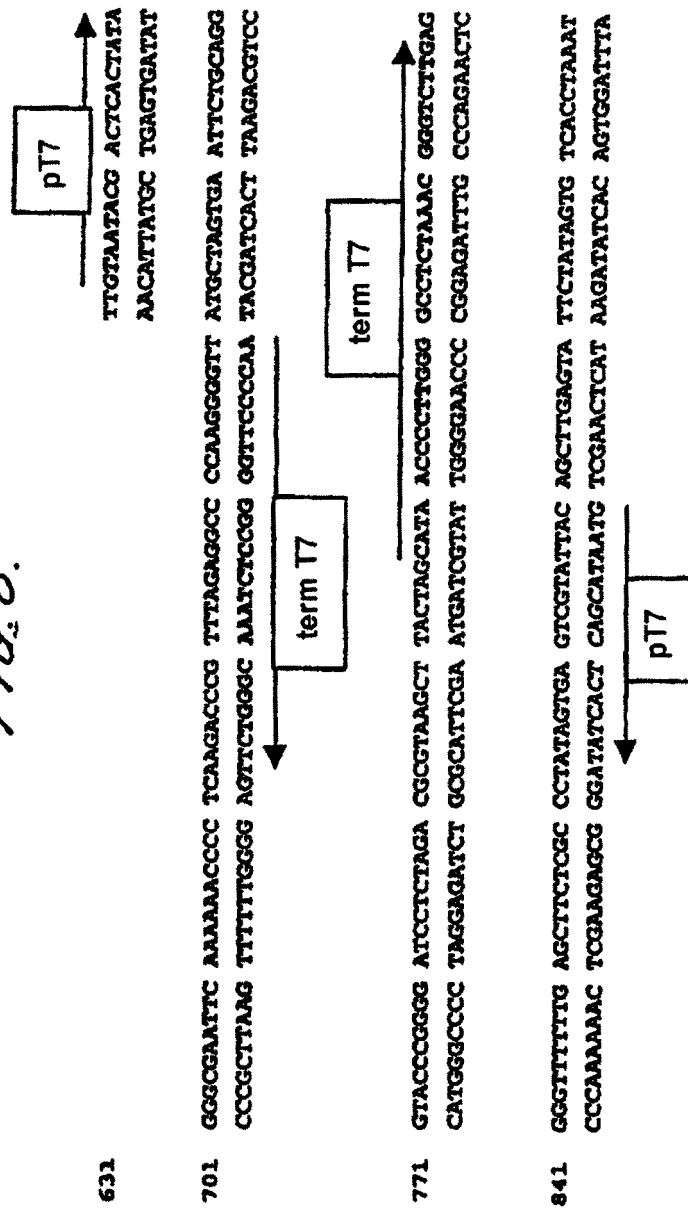


FIG. 9.

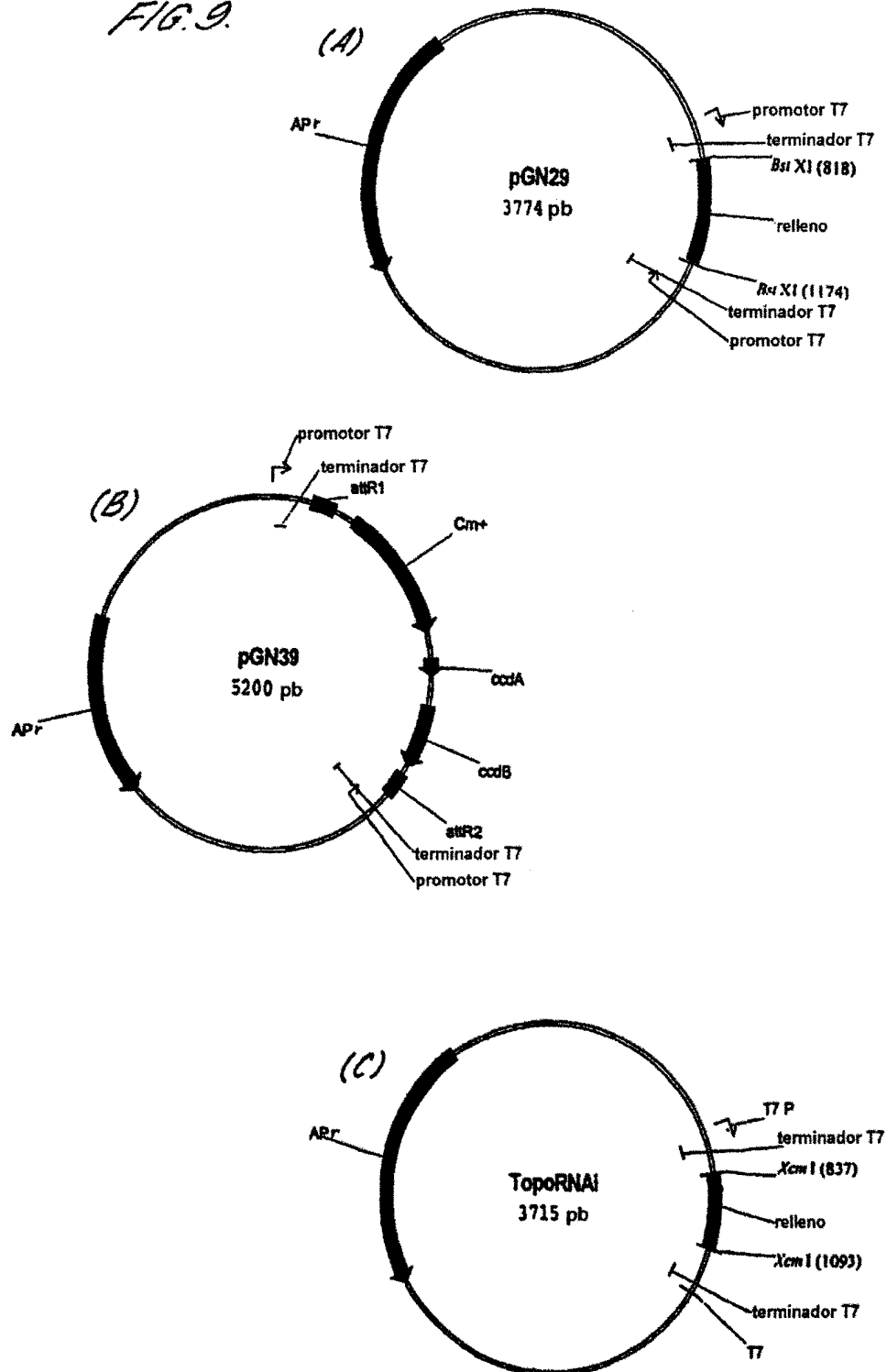


FIG. 10.

pGN9

```

1  gagtgaccca tatgcggtgt gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa taccgcatca
61  ggcgaaattg taaacggtta tattttgtta aaattcgcgt taaatatttg ttaaatacagc
121  tcatttttta accaataggc cgaaatcggc aaaatccctt ataatcaaa agaatagacc
181  gagatagggg tgagtgttgt tccagtttgg aacaagagtc cactattaaa gaacgtggac
241  tccaacgtca aaggggcga aaaccgtctat caggggcgatg gccactacg tgaacatca
301  cccaaatcaa gttttttgcg gtcgaggtgc cgtaaagctc taaatcgga ccctaaagg
361  agccccgat ttagagcttg acggggaaag ccggcgaaagc tggcgagaaa ggaagggaag
421  aaagcgaaa ggcggggcgc tagggcgctg gcaagtgtag cggtcacgct gcgcgtaacc
481  accacacccg ccgcgcttaa tgcgcgcta caggggcgct ccattcgcca ttcaggctgc
541  gcaactgttg ggaagggcga tcgggtgcgg cctcttcgct attacgccag ctggcgaaag
601  ggggatgtgc tgcaaggcga ttaagttggg taacgccagg gttttccag tcacgacgtt
661  gtaaacgac gccagtgaa ttgtaatacg actcactata gggcgaaatc aaaaaacccc
721  tcaagacccg ttagagggcc ccaaggggtt atgctagtga attctgcagg gtacccgggg
781  atcctctaga cgcgtaagct tactagcata accccttggg gcctctaaac gggctctgag
841  ggggtttttg agcttctcgc cctatagtga gtcgtattac agcttgagta ttctatagt
901  tcacctaaat agcttggcgt aatcatggtc atagctgttt cctgtgtgaa attgttatcc
961  gctcacaatt ccacacaaca tacgagccgg aagcataaag tgtaaagcct ggggtgccta
1021  atgagtgaag taactcacat taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa
1081  cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat
1141  tgggcgctct tccgcttcc cgtcactga ctcgctgcgc tcggtcgttc ggctgcggcg
1201  agcggatca gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc
1261  aggaagaaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggcgcgctt
1321  gctggcggtt ttcgataggc tccgcccccc tgacgagcat caaaaaatc gacgctcaag
1381  tcagagggtg cgaaaccgga caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc
1441  cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg ccttctccc
1501  ttcgggaagc gtggcgcttt ctcatagttc acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt
1561  cggttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga acccccgctt cagcccgacc gctgcgctt
1621  atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc
1681  agccactggt aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa
1741  gtgggtggct aactacggct acactagaag gacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa
1801  gccagttacc ttcggaaaaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaacaaa ccaccgctgg
1861  tagcgggtgt ttttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaag gatctcaaga
1921  agatcctttg atcttttcta cgggtcttga cgctcagtg aacgaaaact caggttaagg
1981  gattttgttc atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa attaaaaatg
2041  aagtttttaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaacttgg tctgacagtt accaatgctt
2101  aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg tctatttcgt tcatccatag ttgcctgact
2161  ccccgctcgt tagataacta cgatacggga gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat
2221  gataccgcga gacccacgct caccggctcc agatttatca gcaataaacc agccagccgg
2281  aaggggccgag cgcaagagt gtcctgcaac tttatccgcc tccatccagt ctattaattg
2341  ttgcccggaa gctagagtaa gtagttcgcc agttaatagt ttgcgcaacg ttgttggcat
2401  tgctacaggc atcgtggtgt cacgctcgtc gtttggtagt gcttcattca gctccggttc
2461  ccaacgatca agcgagttta catgatcccc catgttgtgc aaaaaagcgg ttagtctctt
2521  cggtcctccg atcgttgta gaagtaagtt ggccgcagtg ttatcactca tgggtatggc
2581  agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg tgactggtga
2641  gtactcaacc aagtcattct gagaataccg cgcccgcgga ccgagttgct cttgccgggc
2701  gtcaatacgg gataatagt tatgacatag cagaacttta aaagtgtca tcatggaaa
2761  acgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta
2821  acccactcgt gcacccaact gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg
2881  agcaaaaaca ggaaggcaaa atgccgcaaa aaagggaata agggcgacac ggaaatgttg
2941  aatactcata ctcttctctt ttcaatatata ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat
3001  gagcggatag atatttgaat gtatttagaa aaataaaca ataggggttc cgcgcacatt
3061  tcgccgaaaa gtgccacctg acgtctaaga aaccattatt atcatgacta taacctataa
3121  aaataggcgt atcacgaggg cctttcgtct cgcgcggttc ggtgatgacg gtgaaaacct
3181  ctgacacatg cagctcccgg agacgggtcac agcttgtctg taagcggatg ccgggagcag
3241  acaagcccg cagggcgctg cagcgggtgt tggcgggtgt cggggctggc ttaactatgc
3301  ggcacagag cagattgtac tga

```

FIG. 11.

PGN29

```

1  gagtgcacca tatgcggtgt gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa taccgcatca
61  ggcgaaattg taaacgttaa tatatttgta aaattcgcgt taaatatttg ttaaatacagc
121 tcatttttta accaataggg cgaaatcggc aaaatccctt ataatcaaaa agaatagacc
181 gagatagggg tgagtgttgt tccagtttgg aacaagagtc cactattaaa gaacgtggac
241 tccaacgtca aagggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg gccactacg  tgaacatca
301 cccaaatcaa gttttttgcg gtcgaggtgc cgtaaagctc taaatcgaa  ccctaagggg
361 agccccgat  ttagagcttg acgggggaaa ccggcgaaac tggcgagaaa  ggaagggaag
421 aaagcgaag  gagcggcgcg tagggcgctg gcaagtgtag cggtcacgct  gcgcgtaacc
481 accacacccg ccgcgcctaa tgcgccgcta cagggcgctg ccattcgcca  ttcaggctgc
541 gcaactgttg ggaaggcgga tcggtgcggg cctcttcgct attacgccag  ctggcgaaag
601 ggggatgtgc tgcaaggcga ttaagttggg taacgccagg gttttccag  tcacgacgtt
661 gtaaaacgac ggccagtga  ttgtaatacg actcactata gggcgaattc  aaaaaacccc
721 tcaagacccg ttttagaggc ecaaggggtt atgctagtga attctgcagg  gtacccgggg
781 atcctctaga gatccctcga cctcgagatc catttgtctg  gcgcggattc  tttatcactg
841 ataagttgg  ggacatatta tgtttatcag tgataaagt  tcaagcatga  caaagttgca
901 gccgaataca gtgatccgtg ccggccctgg actggtgaac  gaggtcggcg  tagacgtct
961 gacgacacgc aaactggcgg aacggttggg ggtgcagcag ccggcgcttt  actggcactt
1021 caggaacaag cgggcgctgc tcgacgcact ggccgaagcc atgctggcgg  agaatacatc
1081 gcttcggtgc cgagagccga cgacgactgg cgctcatttc  tgatcgggaa  tcccgacgt
1141 tcaggcaggc gctgctcgcc taccgccagc acaatggatc  tcgagggatc  ttcatacct
1201 accagttctg cgctgcagg  tcgcggccgc gactctctag acgcgtaaag  ttactagcat
1261 aacccttgg  ggctctaaa  cgggtcttga ggggtttttt  gagcttctcg  ccctatagtg
1321 agtcgtatta cagcttgagt attctatagt gtcacctaaa  tagcttggcg  taatcatggt
1381 catagctgtt tcctgtgtga aattgttatc cgctcacaat  tccacacaa  atacgagccg
1441 gaagcataaa gtgtaaagc  tggggtgcct aatgagtga  ctaactcaca  ttaattgcgt
1501 tgcgctcact gccgccttc  cagtcgggaa acctgtcgtg ccagctgcat  taatgaatcg
1561 gtcaacgcgc ggggagaggc ggtttgcgta ttgggcgctc  ttccgcttcc  tcgctcactg
1621 actcgctgcg ctcggtcggt  cggctgcggc gagcggatc  agctcactca  aaggcggtaa
1681 tacggttatc cacagaatca caggataaac  catgtgagca  aaaggccagc  aaaggccagc
1741 aaaaggccag gaaccgtaa  aaggccgcgt tgctggcggt  tttcgatagg  ctccgcccc
1801 ctgacgagca tcacaaaaat  cgacgctcaa gtcagaggtg  gcgaaacccg  acaggactat
1861 aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct  ccctcgtcgc  ctctcctgt  ccgacccgtc
1921 cgcttaccgg atacctgtcc gcttcttccc  ctccgggaag  cgtggcgctt  tctcatagct
1981 cagcgtgtag gtatctcagt tcggtgtagg  tcggtcgtc  caagctgggc  tgtgtgcagc
2041 aacccccgt  tcagcccgac  cgctgcgct  tatccggtaa  ctatcgtctt  gagtccaacc
2101 cggtaagaca cgacttatcg  ccactggcag  cagccactgg  taacaggatt  agcagagcga
2161 ggtatgtagg cgggtctaca  gacttcttga agtgggtgcc  taactacggc  tacactagaa
2221 ggacagttat tggatctgc  gctctgtga  agccagttac  ctccgaaaa  agagtgtgta
2281 gctcttgatc cggcaaaaa  accaocgctg  gtagcgggtg  tttttttgtt  tgcaagcagc
2341 agattacgcg cagaaaaaaa  ggtctcaag  aagatocctt  gatctttct  accgggtctg
2401 acgctcagtg gaacgaaaa  tcacgttaag  ggttttggg  catgagatta  tcaaaaagga
2461 tcttcaccta gatccttta  aattaaaaat  gaagtttta  atcaatctaa  agtatatag
2521 agtaaaactg gtctgacagt  taccaatgct  taatcagtga  ggcacctatc  tcagcgtatc
2581 gtotatttgc ttcattcata  gttgcctgac  tccccgtcgt  gtagataact  acgatacggg
2641 agggcttacc atctgcccc  agtgctgcaa  tgataccgcg  agaccoacgc  tcaccggctc
2701 cagattttat agcaataaac  cagccagccg  gaagggcga  ggcagaagt  ggtcctgcaa
2761 ctttatccge ctcoatccag  tctattaatt  gttgcccggg  agctagagta  agtagttcgc
2821 cagttaatag tttgoccaac  gttgttgga  ttgctacagg  catcgtggtg  tcacgctcgt
2881 cgtttgggat ggcttcatto  agctcoggtt  cccaacgac  aaggcgagtt  acatgatccc
2941 ccatggttg  caaaaaagcg  gttagctcct  tcggtcctcc  gatcgttgc  agaagtaagt
3001 tggcgcgagt gttatcactc  atggttatgg  cagcactgca  taattctctt  actgtcatgc
3061 catocgtaag atgcttttct  gtgactggtg  agtactcaac  caagtcattc  tgagaatacc
3121 gcgcocggcg accgagttgc  tcttgcccgg  cgtcaatacg  ggataatagt  gtatgacata
3181 gcagaacttt  aaaagtgtc  atcattggaa  aacgttcttc  ggggcgaaa  ctctcaagga
3241 tcttaccgct gttgagatcc  agttcagatg  aaocccactc  tgcacccaac  tgatcttcag
3301 catcttttac  tttcaccag  gtttctgggt  gagcaaaaac  aggaaggcaa  aatgccgcaa
3361 aaaagggaat aaggcgaca  cggaaatgtt  gaatactcat  actcttctt  tttcaatatt
3421 attgaagcat ttatcagggt  tattgtctca  tgagcggata  catatttgaa  tgtatttaga
3481 aaaataaaca aatagggtt  ccgcgcacat  ttccccgaaa  agtgccacct  gacgtctaa
3541 aaaccattat tatcatgaca  ttaacctata  aaaataggcg  tatcagag  cctttcgtc
3601 tcgcgcgttt  cgggtgatgc  ggtgaaaaac  tctgacacat  gcagctccg  gagacggtca
3661 cagcttgtct  gtaagcggat  gccgggagca  gacaagccc  tcagggcgcg  tcagcgggtg
3721 ttggcgggtg tcggggctgg  ctttaactat  cggcatcaga  gcagattgta  ctga

```

FIG. 12.

p6N39

```

TAATACGACT CACTATAGGG CGAATTCAAA AAACCCCTCA AGACCCGTTT
AGAGGCCCCA AGGGGTATG CTAGTGAATT CTGCAGCGGT ACCCGGGGAT
CCTCTAGAGA TCCCTCGACC TCGAGATCCA TTGTGCTGGA AAGATCACAA
GTTTGTACAA AAAAGCTGAA CGAGAAACGT AAAATGATAT AAATATCAAT
ATATTAAAT AGATTTTGCA TAAAAAACAG ACTACATAAT ACTGTAAAAC
ACAACATATC CAGTCACTAT GCGGCCCGCA TTAGGCACCC CAGGCTTTAC
ACTTTATGCT TCCGGCTCGT ATAATGTGTG GATTTTGAGT TAGGATCCGG
CGAGATTTTC AGGAGCTAAG GAAGCTAAAA TGGAGAAAAA AATCACTGGA
TATACCACCG TTGATATATC CCAATGGCAT CGTAAAGAAC ATTTTGAGGC
ATTTCACTCA GTTGCTCAAT GTACCTATAA CCAGACCGTT CAGCTGGATA
TTACGGCCTT TTAAAGACC GTAAAGAAAA ATAAGCACAA GTTTTATCCG
GCCTTTATTC ACATTCCTGC CCGCTGATG AATGCTCATC CGGAATTCGG
TATGGCAATG AAAGACGGTG AGCTGGTGAT ATGGGATAGT GTTACCCTT
GTTACACCGT TTTCCATGAG CAACTGAAA CGTTTTTCATC GCTCTGGAGT
GAATACCACG ACGATTTCCG GCACTTTCTA CACATATATT CGCAAGATGT
GGCGTGTAC GGTGAAAACC TGGCTATTT CCCTAAAGGG TTTATTGAGA
ATATGTTTTT CGTCTCAGCC AATCCCTGGG TGAGTTTCAC CAGTTTGTAT
TTAAACGTGG CCAATATGGA CACTTCTTC GCCCCCGTTT TCACCATGGG
CAATATTAT ACGCAAGGCG ACAAGGTGCT GATGCCGCTG GCGATTGAGG
TTATCATGCG CGTCTGTGAT GGCCTCCATG TCGGCAGAAT GCTTAATGAA
TTACAACAGT ACTGCGATGA GTGGCAGGGC GGGGCGTAAA GATCTGGATC
CGGCTTACTA AAAGCCAGAT AACAGTATGC GTATTTGCGC GCTGATTTTT
GCGGTATAAG AATATATACT GATATGTATA CCCGAAGTAT GTCAAAAGA
GGTGTGCTAT GAAGCAGCGT ATTACAGTGA CAGTTGACAG CGACAGCTAT
CAGTTGCTCA AGGCATATAT GATGTCAATA TCTCGGTCT GGTAAGCACA
ACCATGCAGA ATGAAGCCCG TCGTCTGCGT GCCGAACGCT GGAAGCGGA
AAATCAGGAA GGGATGGCTG AGGTCGCCCG GTTTATTGAA ATGAACGGCT
CTTTTCTGA CGAGAACAGG GACTGGTGA ATGCAGTTTA AGGTTTACAC
CTATAAAAGA GAGAGCCGTT ATCGTCTGTT TGTGGATGTA CAGAGTGATA
TTATTGACAC GCGCGGGCGA CGGATGGTGA TCCCCCTGGC CAGTGACGCT
CTGCTGTGAG ATAAAGTCTC CCGTGAACTT TACCCGGTGG TGCATATCGG
GGATGAAAGC TGGCGCATGA TGACCACCGA TATGGCCAGT GTGCCGGTCT
CCGTTATCGG GGAAGAAGTG GCTGATCTCA GCCACGCGA AAATGACATC
AAAAACGCCA TTAACCTGAT GTTCTGGGGA ATATAAATGT CAGGCTCCCT
TATACACAGC CAGTCTGCGG GTCGACCATA GTGACTGGAT ATGTTGTGTT
TTACAGTATT ATGTAGTCTG TTTTTTATGC AAAATCTAAT TTAATATATT
GATATTTATA TCATTTTACG TTTCTCGTTC AGCTTCTTGG TACAAAGTGG
TGATCTTTCC AGCACAATGG ATCTCGAGGG ATCTTCCATA CCTACCAGTT
CTGCGCCTGC AGGTGCGGGC CGCGACTCTA GACGCGTAAG CTTACTAGCA
TAACCCCTTG GGGCTCTAA ACGGGTCTTG AGGGGTTTTT TGAGCTTCTC
GCCCTATAGT GAGTCGTATT ACAGCTTGAG TATTTCTATG TGTCACCTAA
ATAGCTTGGC GTAAATCATG TCATAGCTGT TTCCTGTGTG AAATTGTTAT
CCGCTCACAA TTCCACACAA CATACGAGCC GGAAGCATAA AGTGTAAGC

```

FIG. 12 (CONTINUACIÓN 1)

```

CTGGGGTGCC TAATGAGTGA GCTAACTCAC ATTAATTGCG TTGCGCTCAC
TGCCCGCTTT CCAGTCGGGA AACCTGTGCT GCCAGCTGCA TTAATGAATC
GGCCAACGCG CGGGGAGAGG CGGTTTGCGT ATTGGGCGCT CTTCGGCTTC
CTCGCTCACT GACTCGCTGC GCTCGGTGCT TCGGCTGCGG CGAGCGGTAT
CAGCTCACTC AAAGGCGGTA ATACGGTTAT CCACAGAATC AGGGGATAAC
GCAGGAAAGA ACATGTGAGC AAAAGGCCAG CAAAAGGCCA GGAACCGTAA
AAAGGCCGCG TTGCTGGCGT TTTTCGATAG GCTCCGCCCC CCTGACGAGC
ATCACAAAAA TCGACGCTCA AGTCAGAGGT GCGGAAACCC GACAGGACTA
TAAAGATACC AGGCGTTTCC CCTTGGAAAG TCCCTCGTGC GCTCTCTGCT
TCCGACCCCTG CCGCTTACCG GATACCTGTC CGCCTTTCTC CCTTGGGGAA
GCGTGGCGCT TTCTCATAGC TCACGCTGTA GGTATCTCAG TTCGGTGTAG
GTCGTTGCGT CCAAGCTGGG CTGTGTGCAC GAACCCCCG TTCAGCCCGA
CCGCTGCGCC TTATCCGGTA ACTATCGTCT TGAGTCCAAC CCGGTAAGAC
ACGACTTATC GCCACTGGCA GCAGCCACTG GTAAACAGAT TAGCAGAGCG
AGGTATGTAG GCGGTGCTAC AGAGTTCTTG AAGTGGTGGC CTAACACGG
CTACACTAGA AGGACAGTAT TTGGTATCTG CGCTCTGCTG AAGCCAGTAA
CCTTCGGAAA AAGAGTTGGT AGCTCTTGAT CCGGCAAAAC AACCACCGCT
GGTAGCGGTG GTTTTTTTGT TTGCAAGCAG CAGATTACGC GCAGAAAAAA
AGGATCTCAA GAAGATCCTT TGATCTTTTC TACGGGGTCT GACGCTCAGT
GGAACGAAAA CTCACGTTAA GGGATTTTGG TCATGAGATT ATCAAAAAGG
ATCTTCACCT AGATCCTTTT AAATTA AAAA TGAAGTTTAA AATCAATCTA
AAGTATATAT GAGTAAACTT GGTCTGACAG TTACCAATGC TTAATCAGTG
AGGCACCTAT CTCAGCGATC TGTCTATTTT GTTCATCCAT AGTTGCCCTGA
CTCCCCGTGG TGTAGATAAC TACGATAAGG GAGGGCTTAC CATCTGGCCC
CAGTGCTGCA ATGATACCGC GAGAGCCACG CTCACCGGCT CCAGATTAT
CAGCAATAAA CCAGCCAGCC GGAAGGGCCG AGCGCAGAG TGGTCTGCA
ACTTTATCCG CCTCATCCA GTCTATTAAAT TGTTCGCGG AAGCTAGAGT
AAGTAGTTGG CCAATTAAAT GTTTGCGCAA GGTGTTGGC ATTGCTACAG
GCATCGTGGT GTACGCTCG TGGTTGGTA TGGCTTCAT CAGCTCCGGT
TCCCAACGAT CAAGCGAGT TACATGATCC CCCATGTTGT GCAAAAAGC
GGTTAGCTCC TTGGGTCTC CGATCGTTGT CAGAAGTAAG TTGGCCCGAG
TGTATCACT CATGGTTATG GCAGCACTGC ATAAITCTCT TACTGTCTG
CCATCCGTAA GATGCTTTTC TGTGACTGGT GAGTACTCAA CCAGTCAAT
CTGAGAATAC CGCGCCCGC GACCGAGTTG CTCTTGCCCC GCTCAATAC
GGGTAAATAG TGTATGACAT AGCAGAACTT TAAAAGTGT CATCAATGA
AAAGTTCTT CGGGCGAAA ACTCTCAAGG ATCTTACCG TGTGAGATC
CAGTTCGATG TAACCCACTC GTGCACCCAA CTGATCTTCA GCATCTTTA
CTTTCACCG CGTTTCTGGG TGAGCAAAA CAGGAAGGCA AAATGCCGCA
AAAAAGGGA TAAAGGCGAC ACGGAAATGT TGAATACTCA TACTCTTCT
TTTCAATAT TATTGAAGCA TTTATCAGG TTAATGTCTC ATGAGCGGAT
ACATATTTGA ATGTATTTAG AAAATAAAC AATAGGGGT TCCGCGACA
TTTCCCGAA AAGTGCCAC TGAAGTCTAA GAACCATTA TTATCATGAC
ATTAACCTAT AAAATAGGC GTATCACGAG GCGCTTTGCT CTCGCGGTT
TGGTGATGA CGGTGAAAAC CTCTGACACA TCGAGCTCCC GAGAGCGCTC
ACAGCTTGTG TGTAAAGCGA TGGCGGAGC AGACAGCCC GTCAAGGCGC
GTCAGCGGT GTTGGCGGGT GTCGGGCTG GCTTAACAT GCGCATCAG

```

FIG. 12 (CONTINUACIÓN 2)

```

AGCAGATTGT ACTGAGAGTG CACCATATGC GGTGTGAAAT ACCGCACAGA
TGGTAAAGGA GAAAATACCG CATCAGGCGA AATTGTAAAC GTTAATATTT
TGTTAAATTT CGCGTTAAAT ATTTGTTAAA TCAGCTCATT TTTTAACCAA
TAGGCCGAAA TCGGC AAAAT CCCTTATAAA TCAAAAGAAT AGACCGAGAT
AGGGTTGAGT GTTGTTCAG TTTGGAACAA GAGTCCACTA TTAAAGAACG
TGGACTCCAA CGTCRAAGGG CGAAAAACCG TCTATCAGGG CGATGGCCCA
CTACGTGAAC CATCACCCAA ATCAAGTTTT TTGCGGTGGA GGTGCCGTAA
AGCTCTAAAT CGGAACCCCTA AAGGGAGCCC CGGATTTAGA GCTTGACGGG
GAAAGCCGGC GAACGTGGCG AGAAAGGAAG GGAAAGAAAGC GAAAGGAGCG
GGCGCTAGGG CGCTGGCAAG TGTAGCGGTC ACGCTGCGCG TAACCACCAC
ACCGCCCGCG CTTAATGCGC CGCTACAGGG CGCGTCCATT CGCCATTGAG
GCTGCGCAAC TGTGGAAG GCGGATCGGT GCGGCGCTCT TCCTATTAC
GCCAGCTGGC GAAAGGGGA TGTGCTGCAA GCGGATTAAG TTGGGTAAAG
CCAGGGTTTT CCCAGTCACG ACGTTGTAAA ACGACGGCCA GTGAATTG

```

FIG. 13.

TopoRNA1

```

1  gagtgcacca tatgcggtgt gaataaccgc acagatgcgt aaggagaaaa taccgcatca
61  ggcgaaattg taaacgttaa tattttgtta aaattcgcgt taaatatttg ttaaatacagc
121 tcatttttta accaataggc cgaatccggc aaaatccctt ataaatcaaa agaataagacc
181 gagatagggt tgagtgttgt tccagtttgg aacaagagtc cactattaaa gaacgtggac
241 tccaacgtca aagggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg gccactacg tgaaccatca
301 cccaaatcaa gttttttgcg gtcgaggtgc cgtaaagctc taaatcggaa ccctaaaggg
361 agccccgat ttagagcttg acggggaaa cggcgaaagc tggcgagaaa ggaagggaag
421 aaagcgaaag gagcggcgcg tagggcgctg gcaagtgtag cggtcacgct gcgcgtaacc
481 accacacccg ccgcgcttaa tgcgcccgtc cagggcgctt ccattcgcga ttcaggctgc
541 gcaactgttg ggaaggcgca tcggtgcggg cctcttcgct attacgccag ctggcgaaag
601 ggggatgtgc tgcaaggcga ttaagttggg taacgccagg gttttccag tcacgacgtt
661 gtaaaacgac ggccagtga ttgtaatacg actcactata gggcgaaatc aaaaaacccc
721 tcaagaccgg tttagaggcc ccaaggggtt atgctagtga attctgcagg gtaccggggg
781 atcctctaga gatccctcga cctcgagatc catttgtgtg gaattctacc aaggctagca
841 tgggcagccg aatacagtga tccgtgcggc ccctggactg ttgaacgagg tcggcgtaga
901 cggctctgac acacgcaaac tggcggaaag gttgggggtg cagcagccgg cgctttactg
961 gcacttcagg aacaagcggg cgctgctcga cgactggcc gaagccatgc tggcgagaaa
1021 tcatacgctt cggtgccgag agccgacgac gactggcgct catttctgat cgggaatccc
1081 gcagccatgc tagccttggg agaattccac cacaatggat ctcgagggat cttccatacc
1141 taccagttct gcgcctgcag gtgcggcgcc cgactctcta gacgcgtaag cttactagca
1201 taaccocctg gggcctctaa acgggtcttg aggggttttt tgagcttctc gccctatagt
1261 gagtcgtatt acagcttgag tattctatag tgtcacctaa atagcttggc gtaatcatgg
1321 tcatagctgt ttccgtgttg aaattgttat ccgctcacia tccacacaaa catacagacc
1381 ggaagcataa agtgtaaagc ttgggggtgc taatgagtga gctaactcac attaatggc
1441 ttgcgctcac tgcccgcttt ccagtcggga aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc
1501 ggcgaacgag cggggagagg cggtttgcgt attgggcgct cttccgcttc ctgcctcact
1561 gactcgctgc gtcggtcgt tcggctgcgg cgagcggtat cagctcactc aaaggcggtg
1621 atacggttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag
1681 caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgag ttgctggcgt ttttcgtag gctccgcccc
1741 cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt ggcgaacccc gacaggacta
1801 taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg
1861 ccgcttaccg gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc
1921 tcacgctgta ggtatctcag ttcggtgtag gtctgtcgt ccaagctggg ctgtgtcac
1981 gaacccccg tttagcccgga ccgtgcggc ttatccggtg actatcgtct tgagtccaac
2041 ccggtaaagc acgacttatc gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg
2101 aggtatgtag gcggtgctac agagtctctg aagtgggtgg ctaactacgg ctacactaga
2161 aggcagtat ttggtatctg cgtctcgtct aagccagtta ccttcggaaa aagagtggg
2221 agctcttgat ccggcaaaac aaccacgctt ggtagcgggt gttttttgt ttgcaagcag
2281 cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatctttc taoggggtct
2341 gacgctcagt ggaacgaaaa ctacagttaa gggatttttg tcatgagatt atcaaaagg
2401 atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat
2461 ggtctgaact ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat ctacggatc
2521 tgtctatttc gttcatccat agttgcctga ctcccgtcg tgtagataac tacgatacgg
2581 gagggcttac catctggccc cagtgcgtga atgataccgc gagaccacg ctaccggct
2641 ccagatttat cagcaataaa ccagccagcc ggaaggccg agcgagaaag tggctctgca
2701 actttatccg cctccatcca gtttattaat tgttgccggg aagctagagt aagtgttcg
2761 ccagtttaata gtttgcgcaa cgttgttggc attgctacag gcatcgtgtt gtcacgctcg
2821 tcgtttggtg tggcttcatt cagctccggg tcccaacgat caaggcgagt tacatgatcc
2881 cccatgttgt gcaaaaaagc ggttagctcc ttcggtcctc cgatcgttgt cagaagttag
2941 ttggcgcgag tgttatcact catggttatg gbagactgc ataattctct tactgtcatg
3001 ccatccgtaa gatgcttttc tgtgactggt gagtactcaa ccaagtcatt ctgagaatac
3061 cgcgcgcggc gaccgagttg ctcttgccc gctcaatac gggataatag tgtatgacat
3121 agcagaactt taaaagtgt catcattgga aaaggttctt cggggcgaaa actctcaagg
3181 atcttaccgc tgttgagatc cagtccgatg taaccactc gtgcaccaa ctgatcttca
3241 gcatctttta ctttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca aaatgccgca
3301 aaaaagggaa taaggcgagc acggaatgt tgaatactca tactcttctt tttcttat
3361 tattgaagca tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat acatatttga atgtatttag
3421 aaaaataaac aaataggggt tccgogcaca tttcccogaa aagtgcaccc tgacgtctaa
3481 gaaacattta ttatcatgac attaaoctat aaaaataggc gtatcaogag gccctttcgt
3541 ctgcgcgctt tcggtgatga cggtgaaac ctctgacaca tgcagctccc ggagacggct
3601 acagcttgtc tgaagcgga tgcggggagc agacaagccc gtcaggcgct cgcagcggt
3661 gttggcggtg gtcggggctg gcttaactat cgggcacag agcagattgt actga

```

OGN49A *FIG. 14.*

```

TGTAATACGA CTCACTATAG GGCGAATTCA AAAAACCCTT CAAGACCCGT
TTAGAGGCCC CAAGGGGTTA TGCTAGTGAA TTCTGCAGCG GTACCCGGGG
ATCCTCTAGA GATCCCTCGA CCTCGAGATC CATTGTGCTG GAAAGGATCT
GGATCCGGCT TACTAAAAGC CAGATAACAG TATGCGTATT TGCGCGCTGA
TTTTTGCGGT ATAAGAATAT ATACTGATAT GTATACCCGA AGTATGTCAA
AAAGAGGTGT GCTATGAAGC AGCGTATTAC AGTGACAGTT GACAGCGACA
GCTATCAGTT GCTCAAGGCA TATATGATGT CAATATCTCC GGTCTGGTAA
GCACAACCAT GCAGAATGAA GCCCGTCGTC TGCGTGCCGA ACGCTGGAAA
GCGGAAAATC AGGAAGGGAT GGCTGAGGTC GCCCGGTTTA TTGAAATGAA
CGGCTCTTTT GCTGACGAGA ACAGGGACTG GTGAAATGCA GTTTAAGGTT
TACACCTATA AAAGAGAGAG CCGTTATCGT CTGTTTGTGG ATGTACAGAG
TGATATTATT GACACGCCCC GGCGACGGAT GGTGATCCCC CTGGCCAGTG
CACGTCTCTT AAGCGATAAA GTCTCCCGTG AACTTTACCC GGTGGTGCAT
ATCGGGGATG AAAGCTGGCG CATGATGACC ACCGATATGG CCAGTGTGCC
GGTCTCCGTT ATCGGGGAAG AAGTGGCTGA TCTCAGCCAC CGCGAAAATG
ACATCAAAAA CGCCATTAACT CTGATGTTCT GGGGAATATA AATGTCAGGC
TCCCTTATAC ACAGCCTTTC CAGCACAATG GATCTCGAGG GATCTTCCAT
ACCTACCAGT TCTGCGCCTG CAGGTGCGCG CCGCGACTCT AGACGCGTAA
GCTTACTAGC ATAACCCCTT GGGGCCTCTA AACGGGTCTT GAGGGGTTTT
TTGAGCTTCT CGCCCTATAG TGAGTCGTAT TACAGCTTGA GTATTCTATA
GTGTCACCTA AATAGCTTGG CGTAATCATG GTCATAGCTG TTTCTGTGT
GAAATTGTTA TCCGCTCACA ATTCCACACA ACATACGAGC CGGAAGCATA
AAGTGTAAG CCTGGGGTGC CTAATGAGTG AGCTAACTCA CATTAAATTG
GTTGCGCTCA CTGCCCGCTT TCCAGTCGGG AAACCTGTCTG TGCCAGCTGC
ATTAATGAAT CGGCCAACGC GCGGGGAGAG GCGGTTTGCG TATTGGGCGC
TCTTCCGCTT CCTCGCTCAC TGA CTGCTG CGCTCGGTCTG TTCCGCTGCG
GCGAGCGGTA TCAGCTCACT CAAAGGCGGT AATACGGTTA TCCACAGAAT
CAGGGGATAA CGCAGGAAAG AACATGTGAG CAAAAGGCCA GCRAAGGCC
AGGAACCGTA AAAAGGCCGC GTTGCTGGCG TTTTTCGATA GGCTCCGCCC
CCCTGACGAG CATCAAAAA ATCGACGCTC AAGTCAGAGG TGCGGAAACC
CGACAGGACT ATAAAGATAC CAGGCGTTTC CCCCTGGAAG CTCCCTCGTG
CGCTCTCTG TTCCGACCCCT GCGGCTTACC GGATACCTGT CCGCCTTTCT
CCCTTCGGGA AGCGTGGGCG TTTCTCATAG CTCACGCTGT AGGTATCTCA
GTTGCGTGTA GGTGCTTCCG TCCAAGCTGG GCTGTGTGCA CGAACCCCCC
GTTGAGCCCG ACCGCTGGCG CTTATCCGGT AACTATCGTC TTGAGTCCAA
CCCCTAAGA CACGACTTAT CGCCACTGGC AGCAGCCACT GGTAACAGGA
TTAGCAGAGC GAGGTATGTA GCGGTGCTA CAGAGTTCTT GAAGTGGTGG
CCTAACTACG GCTACACTAG AAGGACAGTA TTTGGTATCT GCGCTCTGCT
GAAGCCAGTT ACCTTGGGAA AAAGAGTTGG TAGCTCTTGA TCCGGCAAAC
AAACCACCGC TGGTAGCGGT GGTTTTTTTG TTTGCAAGCA GCAGATTACG
CGCAGAAAAA AAGGATCTCA AGAAGATCCT TTGATCTTTT CTACGGGGTC
TGACGCTCAG TGGAAACGAA ACTCAGTTA AGGGATTTTG GTCATGAGAT
TATCAAAAAG GATCTTCACC TAGATCCTTT TAAATTAAAA ATGAAGTTTT

```

FIG. 14 (CONTINUACIÓN)

```

AAATCAATCT AAAGTATATA TGAGTAAACT TGGTCTGACA GTTACCAATG
CTTAATCAGT GAGGCACCTA TCTCAGCGAT CTGTCTATTT CGTTCATCCA
TAGTTGCCCTG ACTCCCGGTC GTGTAGATAA CTACGATACG GGAGGGCTTA
CCATCTGGCC CCAGTGCTGC AATGATACCG CGAGACCCAC GCTCACCGGC
TCCAGATTTA TCAGCAATAA ACCAGCCAGC CGGAAGGGCC GAGCGCAGAA
GTGGTCCTGC AACTTTATCC GCCTCCATCC AGTCTATTAA TTGTTGCCGG
GAAGCTAGAG TAAGTAGTTC GCCAGTTAAT AGTTTGCGCA ACGTTGTGCG
CATTGCTACA GGCATCGTGG TGTCACGCTC GTCGTTTGGT ATGGCTTCAT
TCAGCTCCGG TTCCAACGA TCAAGGCGAG TTACATGATC CCCCATGTTG
TGCAAAAAG CGGTTAGCTC CTTCGGTCCT CCGATCGTTG TCAGAAGTAA
GTTGGCCGCA GTGTTATCAC TCATGTTTAT GGCAGCACTG CATAATTCTC
TTACTGTCTAT GCCATCCGTA AGATGCTTTT CTGTGACTGG TGAGTACTCA
ACCAAGTCAT TCTGAGAATA CCGCGCCCGG CGACCGAGTT GCTCTTGCCC
GGCGTCAATA CCGGATAATA GTGTATGACA TAGCAGAACT TTAAGAAGTC
TCATCATTGG AAAAAGTTCT TCGGGCGGAA AACTCTCAAG GATCTTACCG
CTGTTGAGAT CCAGTTGAT GTAAOCCACT CGTGCAOCCA ACTGATCTTC
AGCATCTTTT ACTTTCACCA GCGTTTCTGG GTGAGCAAAA ACAGGAAGGC
AAATGCGCGC AAAAAAGGGA ATAAGGCGGA CACGGAAATG TTGAATACTC
ATACTCTTCC TTTTCAATA TTATTGAAGC ATTTATCAGG GTTATTGTCT
CATGAGCGGA TACATATTG AATGTATTTA GAAAAATAAA CAAATAGGGG
TTCCGCGCAC ATTTCCCGA AAAGTGCCAC CTGACGTCTA AGAAACCAT
ATTATCATGA CATTAACTA TAAAAATAGG CGTATCACGA GGCCCTTTCG
TCTCGCGCGT TTCGGTGATG ACGGTGAAA CCTCTGACAC ATGCAGCTCC
CGGAGACGGT CACAGCTTGT CTGTAAOCCG ATGCCGGGAG CAGACAAGCC
CGTCAGGGCG CGTCAGCGGG TGTGCGCGG TGTGCGGGCT GGCTTAACTA
TGCGGCATCA GAGCAGATTG TACTGAGAGT GCAOCTATG CGGTGTGAAA
TACCGCACAG ATGCGTAAGG AGAAAATACC GCATCAGGCG AAATTGTAAA
CGTTAATATT TTGTTAAAA TCGCGTAAA TATTGTGTTAA ATCAGCTCAT
TTTTAAACCA ATAGGCGGAA ATCGGCAAAA TCCCTTATAA ATCAAAAGAA
TAGACCGAGA TAGGGTTGAG TGTGTTCCA GTTGGGAACA AGAGTCCACT
ATTAAAGAAC GTGGACTCCA AGTCAAGG GCGAAAAACC GTCTATCAGG
GCGATGGCCC ACTACGTGAA CCATCACCCA AATCAAGTTT TTTCGGGTGG
AGGTGCCGTA AAGCTCTAAA TCGGAACCT AAAGGGAGCC CCGGATTAG
AGCTTGACGG GGAAGGCCGG CGAACGTGGC GAGAAAGGAA GGGAGAGAG
CGAAAGGAGC GCGCGCTAGG GCGCTGCAA GTGTAGCGGT CACGCTGCGC
GTAACCACCA CACCGCGCGC GCTTAATGCG CCGCTACAGG GCGCGTCCAT
TCGCCATTCA GCGTGCGCAA CTGTTGGGA GCGCGATCGG TGCGGGCCTC
TTCCCTATTA CCGCAGCTGG CGAAAGGGG ATGTGCTGCA AGCGGATTAA
GTTGGGTAA CCGAGGGTTT TCCAGTCAC GACGTTGTAA AACGACGGCC
AGTGAAAT

```


pgN59A *FIG. 15.*

```

GAGTGCACCA TATGCGGTGT GAAATACCGC ACAGATGCGT AAGGAGAAAA
TACCGCATCA GGCGAAATTG TAAACGTTAA TATTTTGTTA AAATTCGCGT
TAAATATTTG TTAAATCAGC TCATTTTTTA ACCAATAGGC CGAAATCGGC
AAAATCCCTT ATAAATCAAA AGAATAGACC GAGATAGGGT TGAGTGTTGT
TCCAGTTTGG AACAAGAGTC CACTATTAAA GAACGTGGAC TCCAACGTCA
AAGGGCGAAA AACCCTCTAT CAGGGCGATG GCCCACTACG TGAACCATCA
CCCAAATCAA GTTTTTTGCG GTCGAGGTGC CGTAAAGCTC TAAATCGGAA
CCCTAAAGGG AGCCCCCGAT TTAGAGCTTG ACGGGGAAAG CCGGCGAACG
TGGCGAGAAA GGAAGGGAAG AAAGCGAAAG GAGCGGGCGC TAGGGCGCTG
GCAAGTGTAG CGGTACGCT GCGCGTAACC ACCACACCCG CCGCGCTTAA
TGCGCCGCTA CAGGGCGCGT CCATTGCGCA TTCAGGCTGC GCAACTGTTG
GGAAGGGCGA TCGGTGCGGG CCTCTCGCT ATTACGCCAG CTGGCGAAAG
GGGGATGTGC TGCAAGGCGA TTAAGTTGGG TAACGCCAGG GTTTTCCAG
TCACGACGTT GTAAAACGAC GGCCAGTGAA TTGTAATACG ACTCACTATA
GGGCGAATTC GAGCTCGGTA CCCGGGGATC CTCTAGAGAT CCCTCGACCT
CGAGATCCAT TGTGCTGGAA AGGATCTGGA TCCGGCTTAC TAAAAGCCAG
ATAACAGTAT GCGTATTTGC GCGCTGATTT TTGCGGTATA AGAATATATA
CTGATATGTA TACCGAAGT ATGTCAAAA GAGGTGTGCT ATGAAGCAGC
GTATTACAGT GACAGTTGAC AGCGACAGCT ATCAGTTGCT CAAGGCATAT
ATGATGTCAA TATCTCCGGT CTGCTAAGCA CAACCATGCA GAATGAAGCC
CGTCGTCTGC GTGCCGAACG CTGGAAAGCG GAAAATCAGG AAGGGATGGC
TGAGGTGCGC CGGTTTATTG AAATGAACGG CTCTTTTGCT GACGAGAACA
GGGACTGGTG AAATGCAGTT TAAGGTTTAC ACCTATAAAA GAGAGAGCCG
TTATCGTCTG TTTGTGGATG TACAGAGTGA TATTATTGAC ACGCCCGGGC
GACGGATGGT GATCCCCCTG GCCAGTGCAC GTCTCTTAAG CGATAAAGTC
TCCCGTGAAC TTTACCCGGT GGTGCATATC GGGGATGAAA GCTGGCGCAT
GATGACCACC GATATGGCCA GTGTGCCGGT CTCCGTTATC GGGGAAGAAG
TGGCTGATCT CAGCCACCGC GAAAATGACA TCAAAAACGC CATTAACTG
ATGTTCTGGG GAATATAAAT GTCAGGCTCC CTTATACACA GCCTTTCCAG
CACAAATGGT CTCGAGGGAT CTTCCATACC TACCAGTTCT GCGCCTGCAG
GTCGCGGCCG CGACTCTCTA GAGTCGAAAG CTCTCGCCC TATAGTGAGT
CGTATTACAG CTTGAGTATT CTATAGTGTG ACCTAAATAG CTTGGCGTAA
TCATGGTCAT AGCTGTTTCC TGTGTGAAAT TGTATCCGC TCACAATTCC
ACACAACATA CGAGCCGGAA GCATAAAGTG TAAAGCCTGG GGTGCCTAAT
GAGTGAGCTA ACTCACATTA ATTGCGTTGC GCTCACTGCC CGCTTTCCAG
TCGGGAAACC TGTGCTGCCA GCTGCATTAA TGAATCGGCC AACGCGCGGG
GAGAGGCGGT TTGCGTATTG GCGGCTCTTC CGCTTCCTCG CTCACTGACT
CGCTGCGCTC GGTGCTTCGG CTGCGGCGAG CGGTATCAGC TCACTCAAAG
GCGGTAATAC GGTATATCCAC AGAATCAGGG GATAACGCAG GAAAGAACAT
GTGAGCAAAA GGCCAGCAA AGGCCAGGAA CCGTAAAAAG GCGCGTTGTC
TGGCGTTTTT CGATAGGCTC CGCCCCCTG ACGAGCATCA CAAAAATCGA
CGCTCAAGTC AGAGGTGGCG AAACCGGACA GGAATAAA GATACCAAGC
GTTTCCCCCT GGAAGCTCCC TCGTGCGCTC TCCTGTTCCG ACCCTGCCGC
TTACCGGATA CCTGTCCGCC TTTCTCCCTT CGGGAAGCGT GCGGCTTTCT

```

FIG. 15 (CONTINUACIÓN)

CATAGCTCAC GCTGTAGGTA TCTCAGTTCG GTGTAGGTCG TTCGCTCCAA
 GCTGGGCTGT GTGCACGAAC CCCCCGTTCA GCCCGACCCG TCGCCCTTAT
 CCGGTAACCTA TGGTCTTGAG TCCAACCCGG TAAGACACGA CTTATCGCCA
 CTGGCAGCAG CCACTGGTAA CAGGATTAGC AGAGCGAGGT ATGTAGGCGG
 TGCTACAGAG TTCTTGAAAT GGTGGCCTAA CTAOGGCTAC ACTAGAAGGA
 CAGTATTGAG TATCTGCGCT CTGCTGAAGC CAGTTACCTT CGGAAAAAGA
 GTTGGTAGCT CTTGATCOGG CAAACAAACC ACCGCTGGTA GCGGTGGTTT
 TTTTGTGTC AAGCAGCAGA TTACGCGCAG AAAAAAGGA TCTCAAGAAG
 ATCCTTTGAT CTTTCTACG GGGTCTGACG CTCAGTGGAA CGAAAACTCA
 CGTTAAGGGA TTTTGTGTCAT GAGATTATCA AAAAGGATCT TCACCTAGAT
 CCTTTTAAAT TAAAAATGAA GTTTTAAATC AATCTAAGT ATATATGAGT
 AAACCTGGTC TGACAGTTAC CAATGCTTAA TCAGTGAGGC ACCTATCTCA
 GCGATCTGTC TATTTGTTT ATCCATAGTT GCGTGAATCC CGGTGCTGTA
 GATAACTACG ATACGGGAGG GCTTACCATC TGGCCCCAGT GCTGCAATGA
 TACGCGCAGA CCCACGCTCA CCGGCTCCAG ATTTATCAGC AATAAACGAG
 CCAGCCGGAA GGGCCGAGCG CAGAAGTGGT CTTGCAACTT TATCCGCTC
 CATCCAGTCT ATTAATTGTT GCCGGGAAGC TAGAGTAAGT AGTTCCGCGG
 TTAATAGTTT GCGCAACGTT GTTGGCATTG CTACAGGCAT CGTGGTGTCA
 CGCTCGTGTG TTGGTATGGC TTCTTTCAGC TCGGTTCCG AACGATCAAG
 GCGAGTTACA TGATCCCCCA TGTGTGTCAA AAAGCGGTT AGCTCCTTCG
 GTCCTCCGAT CGTTGTCAGA AGTAAGTTGG CCGCAGTGTT ATCACTCATG
 GTTATGGCAG CACTGCATAA TTCTCTTACT GTCATGCCAT CCGTAAGATG
 CTTTTCTGTG ACTGGTGAGT ACTCAACCAA GTCATTCTGA GAATACCGCG
 CCGGCGGACC GAGTTGCTCT TGCCCGGCGT CAATACGGGA TAATAGTGTG
 TGACATAGCA GAACCTTAAA AGTGCTCATC ATTGGAAAAA GTTCTTCGGG
 GCGAAAACTC TCAAGGATCT TACGCTGTT GAGATCCAGT TCGATGTAAAC
 CCACTCGTGC AOCCAACTGA TCTTCAGCAT CTTTACTTT CACCAGCGTT
 TCTGGGTGGG CAAAAACAGG AAGGCAAAAT GCCGCAAAA AGGGAATAAG
 GCGGACACGG AAATGTTGAA TACTCATACT CTTCTTTTT CAATATTATT
 GAAGCATTTA TCGGGTAT TGTCTCATGA GCGGATACAT ATTTGAATGT
 ATTTAGAAAA ATAAACAAAT AGGGGTTCCG CGCACATTC CCGAAAAAT
 GCCACCTGAC GTCTAAGAAA CCATTATTAT CATGACATTA ACCTATRAAA
 ATAGGCGTAT CACGAGGCCC TTTCGTCTCG CGGTTTCCG TGATGACGGT
 GAAAACTCT GACACATCCA GCTCCCGGAG ACCTTCACAG CTGTCTGTGA
 AGCGGATGCC GCGGACGAC AAGCCCGTCA GGGCGCGTCA GCGGTTGTTG
 GCGGGTGTG GGGCTGGCTT AACTATGCGG CATCAGAGCA GATTGTACTG

A

FIG. 16.

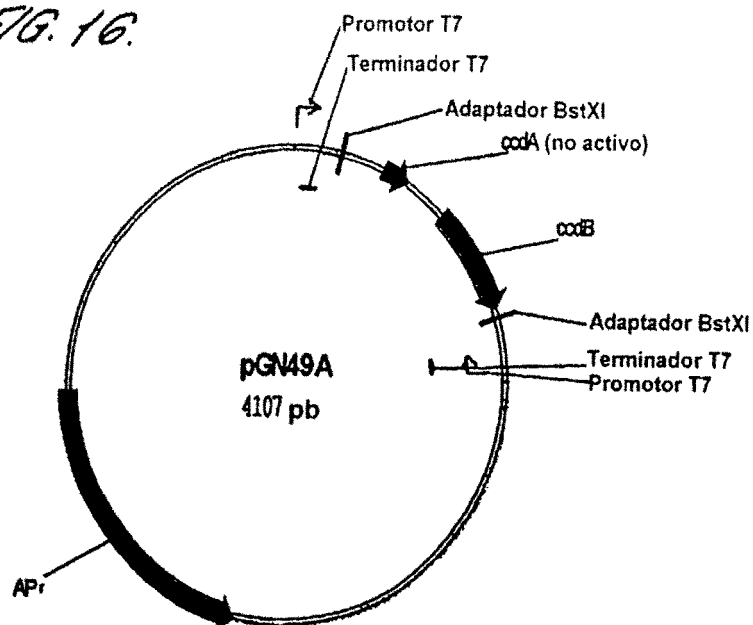
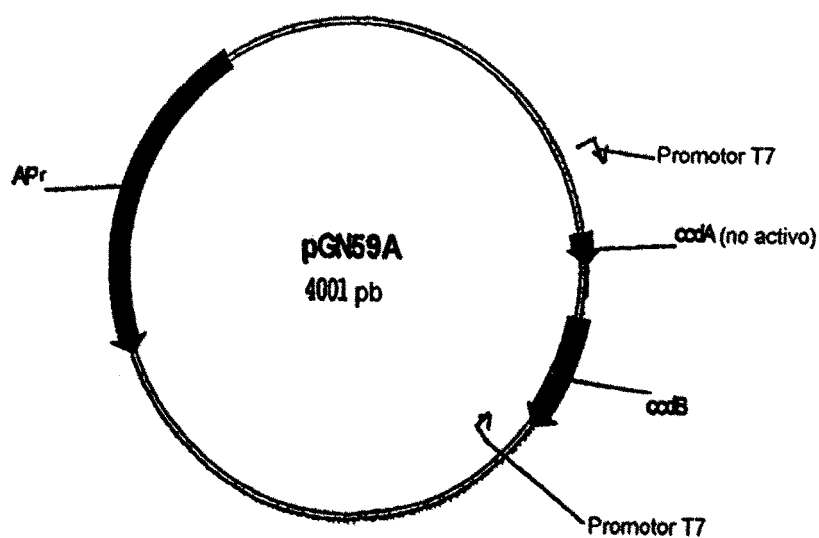


FIG. 17.



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

ttgtaatacg actcactata gggcgaattc gagctcggtt cccggggatc ctctagagtc 60
gaaagcttct cgccctatag tgagtcgtat tacagcttga gtattctata gtgtcaccta 120
aatagcttgg cgtaatcatg gtcataagctg 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

actagcataa ccccttgggg cctctaaacg ggtcttgagg ggtttttg 49

50 <210> 3

<211> 7

<212> ADN

55 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido oGN27

60 <400> 3

65 **aattcaaaaa acccctcaag acccggttag aggccccaag gggttatgct agtgaattct 60**
gcagcggtac 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 ggcctctaa acgggtcttg aggggttttt 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 **ctagacgogt 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 aggccccaag gggttatgct agtaagctta 60**
cgcgt 65

<210> 7

55 <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

65

ES 2 281 420 T3

<400> 7

```

5      ttgtaatacg actcactata gggcgaattc aaaaaacccc tcaagaccgc tttagaggcc 60
      ccaagggggt atgctagtga attctgcagg gtaccggggg atcctctaga cgcgtaagct 120
      tactagcata accccttggg gcctctaaac gggctctgag gggttttttg agcttctcgc 180
      cctatagtg  gtcgtattac agcttgagta ttctatagtg tcacctaaat          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 taccgcatca 60
      ggcgaaattg taaacggtta tatTTTgtta aaattcgcgt taaatattg ttaaatcagc 120
      tcatTTTTta accaataggc cgaaatcggc aaaatccctt ataaatcaaa agaatagacc 180
      gagatagggt tgagtgttgt tccagtttgg aacaagagtc cactattaaa gaacgtggac 240

```

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 281 420 T3

```

tccaaogtca aagggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg gccactacg tgaaccatca 300
cccaaataca gttttttgcg gtgcaggtgc cgtaaagctc taaatcgga ccctaaaggg 360
agcccccgat ttagagcttg acgggggaaag cgggcgaacg tggcgagaaa ggaagggaag 420
5 aaagcgaaag gagcgggcgc tagggcgctg gcaagtgtag cggtcacgct gcgcgtaacc 480
accacacccg ccgcgcttaa tgcgcgccta cagggcgctg ccattcgcca ttcaggctgc 540
gcaactgttg ggaagggcga tccgtgcggg cctcttcgct attacgccag ctggcgaaa 600
ggggatgtgc tgcaaggcga ttaagttggg taacgccagg gttttcccag tcacgacgtt 660
10 gtaaaacgac ggccagtga tttgtaatac actcactata gggcgaaattc aaaaaacccc 720
tcaagaccgg ttttagaggcc ccaaggggtt atgctagtga attctgcagg gtaccggggg 780
atcctctaga cgcgttaagct tactagcata accccttggg gcctctaaac gggctctgag 840
gggttttttg agcttctcgc cctatagtga gtgcgtattac agcttgagta ttctatagtg 900
tcacctaaat agcttggcgt aatcatgtgc atagctgttt cctgtgtgaa attgttatcc 960
15 gctcacaatt ccacacaaca tacgagccgg aagcataaag tgtaaagcct ggggtgccta 1020
atgagttagc taactcacat taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa 1080
cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagagggc gtttgcgtat 1140
tgggcgctct tccgcttccct cgtcactga ctcgctgcgc tcggtcgttc ggcgtgcggc 1200
agcggtatca gtcactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc 1260
20 aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggcgcggtt 1320
gctggcgctt ttcgataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag 1380
tcagaggttg cgaaaccga caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc 1440
cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg cctttctccc 1500
25 ttccgggaagc gtggcgcttt ctcatagtgc acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt 1560
cgttcgtctc aagctgggct gtgtgcacga acccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt 1620
atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc 1680
agccactggt aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgtacag agttcttgaa 1740
gtggtggcct aactacggct acactagaag gacagtattt ggtatctgcg ctctgtgaa 1800
30 gccagttacc ttccgaaaaa gaggttgtag ctcttgatcc ggcaaacaaa ccaccgctgg 1860
tagcgggtgt tttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaag gatctcaaga 1920
agatcctttg atcttttcta cggggtctga cgctcagtg aacgaaaact caggttaagg 1980
gatttttggt atgagattat caaaaaggat ctacactag atccttttaa attaaaaatg 2040
aagttttaaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaaacttg tctgacagtt accaatgctt 2100
35 aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg tctatttctg tcatccatag ttgcctgact 2160
ccccgtcgtg tagataacta cgatacggga gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat 2220
gataccgcga gaccacgct caccggctcc agatttatca gcaataaacc agccagccgg 2280
aagggccgag cgcagaagtg gtcctgcaac tttatccgcc tccatcoagt ctattaattg 2340
40 ttgcgggaa gctagagtaa gtagttcgcc agttaatagt ttgcgcaacg ttgttggcat 2400
tgctacaggc atcgtggtgt cacgctcgtc gtttggtatg gcttcattca gctccggtt 2460
ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc catgttgtgc aaaaaagcgg ttagctcctt 2520
cggctcctcg atcgttgtca gaagtaagtt ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc 2580
agcactgcac aattctctta ctgtcatgac atccgtaaga tgctttctg tgaactggtg 2640
45 gtaactcaacc aagtcattct gagaataacc cgcccgccga ccgagttgct cttgccgggc 2700
gtcaatacgg gataatagtg tatgacatag cagaacttta aaagtgtca tcattggaaa 2760
acgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta 2820
acccactcgt gcaaccaact gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg 2880
agcaaaaaa ggaaggcaaa atgccgcaaa aaagggaata agggcgacac ggaaatgttg 2940
50 aatactcata ctcttccttt ttcaatatta ttgaagcatt tatcaggggtt attgtctcat 3000
gagcggatca atatttgaat gtatttagaa aaataaacia ataggggttc cgcgcacatt 3060
tccccgaaaa gtgccacctg acgtctaaga aaccattatt atcatgacat taacctataa 3120
aaataggcgt atcacgaggc ccttctgtct cgcgcgtttc ggtgatgacg gtgaaaacct 3180
ctgacacatg cagctcccg agacggtcac agcttgtctg taagcggtg ccgggagcag 3240
55 acaagcccg cagggcgctg cagcgggtgt tggcgggtgt cggggctggc ttaactatgc 3300
ggcatcagag 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

	gagtgaccca	tatgcgggtgt	gaaataccgc	acagatgcgt	aaggagaaaa	taccgcatca	60
	ggcgaaattg	taaacggttaa	tatttttgta	aaattcgcgt	taaataatttg	ttaaatacagc	120
5	tcatttttta	accaataggc	cgaaatcggc	aaaatccctt	ataaatcaaa	agaatagacc	180
	gagataggg	tgagtgttgt	tccagtttgg	aacaagagtc	cactattaaa	gaacgtggac	240
	tccaacgtca	aagggcgaaa	aaccgtctat	cagggcgatg	gcccactacg	tgaaccatca	300
	cccaaataca	gttttttgcg	gtcgaggtgc	cgtaaagctc	taaatacgaa	ccctaaaggg	360
	agccccgat	ttagagcttg	acggggaaa	cgggcgaaacg	tgggcgagaaa	ggaagggaag	420
10	aaagcgaaa	gagcgggctg	tagggcgctg	gcaagtgtag	cggtcacgct	gcgcgtaacc	480
	accacacccg	ccgcgcttaa	tgcgcgcta	cagggcgctg	ccattcgcca	ttcaggctgc	540
	gcaactgttg	ggaagggcga	tcgggtgcgg	cctcttcgct	attacgccag	ctggcgaaa	600
	ggggatgtgc	tgcaaggcga	ttaaagttgg	taacgccagg	gttttcccag	tcacgacgtt	660
	gtaaaacgac	ggccagtgaa	ttgtaatacg	actcactata	gggcgaattc	aaaaaacccc	720
15	tcaagacccg	tttagaggcc	ccaaggggtt	atgctagtga	attctgcagg	gtaccggggg	780
	atcctctaga	gatccctcga	cctcgagatc	cattgtgctg	gcgcggatto	tttatcactg	840
	ataagttggt	ggacatatta	tgtttatcag	tgataaagtg	tcaagcatga	caaagttgca	900
	gccgaatata	gtgatccgtg	ccggccctgg	actgttgaa	gaggtcggcg	tagacggtct	960
20	gacgacacgc	aaactggcgg	aacggttggg	gggtgcagcag	ccggcgcttt	actggcactt	1020
	caggaacaag	cgggcgctgc	tcgacgcact	ggccgaagcc	atgctggcgg	agaatcatac	1080
	gcttcggtgc	cgagagccga	cgacgactgg	cgctcatttc	tgatcgggaa	tcccgcagct	1140
	tcaggcaggc	gctgctcgcc	taccgccagc	acaatggatc	tcgagggatc	ttccatacct	1200
	accagttctg	cgcttcgagg	tcgcggccgc	gactctctag	acgcgtaagc	ttactagcat	1260
25	aaccctcttg	ggcctctaaa	cggttcttga	gggggttttt	gagcttctcg	ccctatagtg	1320
	agtcgtatta	cagcttgagt	attctatagt	gtcacctaaa	tagcttggcg	taatcatggt	1380
	catagctgtt	tcctgtgtga	aattgttatc	cgctcacaa	tccacacaac	atacgagccg	1440
	gaagcataaa	gtgtaagcc	tggggtgcct	aatgagttag	ctaactcaca	ttaattgcgt	1500
	tgcgctcact	gccgccttc	cagtcgggaa	acctgtcgtg	ccagctgcac	taatgaactg	1560
30	gccaacgcgc	ggggagaggg	cggttgcgta	ttgggcgctc	ttccgcttc	tcgctcactg	1620
	actcgctgcg	ctcggtcggt	cggtgcggc	gagcgtatc	agctcactca	aaggcggtaa	1680
	tacggttatc	cacagaatca	ggggataacg	caggaaagaa	catgtgagca	aaagggcagc	1740
	aaaagggcag	gaaccgtaaa	aaggccgcgt	tgctggcggt	tttcgatagg	ctccgcccc	1800
35	ctgacgagca	tcacaaaaat	cgacgctcaa	gtcagagggtg	gcgaaacccg	acaggactat	1860
	aaagatacca	ggcgtttccc	cctggaagct	ccctcgtgog	ctctcctgtt	ccgaccctgc	1920
	cgcttacccg	atacctgtcc	gcctttctcc	cttcgggaag	cgtggcgctt	tctcatagct	1980
	cacgctgtag	gtatctcagt	tcgggtgtagg	tcgttcgctc	caagctgggc	tgtgtgcacg	2040
	aaccccccg	tcagcccgac	cgctgcgcct	tatccggtaa	ctatcgtctt	gagtcacacc	2100
40	cggttaagaca	cgacttatcg	ccactggcag	cagccactgg	taacaggatt	agcagagcga	2160
	ggatatgtagg	cggtgctaca	gagttcttga	agtggtggcc	taactacggc	tacactagaa	2220
	ggacagattt	tggtatctgc	gctctgctga	agccagttac	cttcggaaaa	agagttggta	2280
	gctcttgatc	cggaacacaa	accaccgctg	gtagcggtgg	tttttttgtt	tgcaagcagc	2340
45	agattacgog	cagaaaaaaa	ggatctcaag	aagatccctt	gatcttttct	acggggctctg	2400
	acgctcagtg	gaacgaaaa	tcacgttaag	ggatttttgt	catgagatta	tcaaaaagga	2460
	tcttcacctt	gatcctttta	aattaaaaat	gaagttttta	atcaatctaa	agtatatatg	2520
	agtaaaactt	gtctgacagt	taccaatgct	taatcagtga	ggcacctatc	tcagcgatct	2580
	gtctatttct	ttcatccata	gttgctgac	tcccgcgtg	gtagataact	acgatacggg	2640
50	agggcttacc	atctggcccc	agtgcgcaa	tgataccgcg	agaccacgc	tcaccggctc	2700
	cagatttatc	agcaataaac	cagccagccg	gaagggccga	gcgcagaagt	ggtcctgcaa	2760
	ctttatccgc	ctccatccag	tctattaatt	gttgccggga	agctagagta	agtagttcgc	2820
	cagttaatag	tttgcgcaac	gttggttgca	ttgctacagg	catcgtgggtg	tcacgctcgt	2880
	cgtttggtat	ggcttcattc	agctccggtt	cccaacgatc	aaggcgagtt	acatgatccc	2940
55	ccatgttggtg	caaaaaagcg	gttagctcct	tcggtcctcc	gatcgttggtc	agaagtaagt	3000
	tgggccgag	gttatcactc	atggttatgg	cagcaactgca	taattctctt	actgtcatgc	3060
	catccgtaag	atgcttttct	gtgactgggtg	agtaotcaac	caagtcattc	tgagaataacc	3120
	gcgcccggcg	accgagttgc	tcttgccggg	cgtcaataacg	ggataatagt	gtatgacata	3180
	gcagaacttt	aaaagtgtct	atcattggaa	aacgttcttc	ggggcgaaaa	ctctcaagga	3240
60	tcttaccgct	gttagatcc	agttcgatgt	aaccactcg	tgacccaac	tgatcttcag	3300
	catcttttac	tttaccagc	gtttctgggt	gagcaaaaa	aggaaggcaa	aatgcgcaa	3360
	aaaagggaat	aagggcgaca	cggaatgtt	gaatactcat	actcttctct	tttcaatatt	3420
	attgaagcat	ttatcaggg	tattgtctca	tgagcgga	catatttgaa	tgtatttaga	3480
	aaaataaaca	aataggggtt	ccgcgcacat	ttccccgaaa	agtgcacact	gacgtctaag	3540
65	aaaccattat	tatcatgaca	ttaacctata	aaaataggcg	tatcacgagg	ccctttcgtc	3600

ES 2 281 420 T3

```
tcgcgcgttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca 3660
cagcttgctc gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcaggcgccg tcagcgggtg 3720
ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctga 3774
```

<210> 10

<211> 5148

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Plásmido pGN39

<400> 10

```
taatacagact cactataggg cgaattcaaa aaacccctca agacccggtt agaggcccca 60
aggggttatg ctagtgaatt ctgcagcggg acccggggat cctctagaga tccctcgacc 120
tcgagatcca ttgtgctgga aagatcacia gtttgtaaa aaaagctgaa cgagaaacgt 180
aaaatgatat aaatatcaat atattaaatt agattttgca taaaaaacag actacataat 240
actgtaaaac acaacatata cagtcactat ggccggccga ttaggcaccc caggctttac 300
actttatgct tccggctcgt ataattgtgt gattttgagt taggatcccg cgagattttc 360
aggagctaa gaaagctaaa tggagaaaaa aatcactgga tataccaccg ttgatataat 420
ccaatggcat cgtaaagaac attttgaggc atttcagtca gttgctcaat gtacctataa 480
ccagaccgtt cagctggata ttacggcctt tttaaagacc gtaaagaaaa ataagcacia 540
gttttatccg gcctttatcc acattcttgc ccgcctgatg aatgctcatc cggaattccg 600
tatggcaatg aaagacgggt agctgggtat atgggatagt gttcacccct gttacaccgt 660
tttccatgag caaactgaaa cgttttcatc gctctggagt gaataccacg acgatttccg 720
gcagtttcta cacatatatt cgcaagatgt ggcgtgttac ggtgaaaacc tggcctattt 780
ccctaaaggg ttatttgaga atatgttttt cgtctcagcc aatccctggg tgagtttcc 840
cagttttgat taaacgtgg ccaatatgga caacttcttc gcccccgtt tcaccatggg 900
caaataattat acgcaaggcg acaagggtgt gatgccgtg gcgattcagg ttcattcatg 960
cgtctgtgat ggcttccatg tcggcagaat gcttaataaa ttacaacagt actgcgatga 1020
gtggcagggc gggcgctaaa gatctggatc cggcttacta aaagccagat aacagtatgc 1080
gtatttgccg cgtgattttt gcggtataag aatatatact gatattgata cccgaagtat 1140
gtcaaaaaga ggtgtgctat gaagcagcgt attacagtga cagttgacag cgacagctat 1200
cagttgctca aggcataat gatgtcaata tctccggtct ggtaagcaca accatgcaga 1260
atgaagcccg tcgtctgcgt gccgaacgct ggaaagcgga aaatcaggaa gggatggctg 1320
aggtcgccc gtttattgaa atgaacggct cttttgctga cgagaacagg gactgggtga 1380
atgcagttta aggtttacac ctataaaaaga gagagccgtt atcgtctgtt tgtggatgta 1440
cagagtgata ttattgacac gcccgggcga cggatgggtg tccccctggc cagtgcacgt 1500
ctgctgtcag ataaagtctc ccgtgaactt taccgggtgg tgcataatcg ggatgaaagc 1560
tggcgcatga tgaccaccga tatggccagt gtgcgggtct ccgttatcgg ggaagaagtg 1620
gctgactcca gccaccgca aatggacatc aaaaacgcca ttaacctgat gttctgggga 1680
atataaatgt caggtccctt tatacacagc cagctctgag gtcgaccata gtgactggat 1740
atgttggtgt ttacagtatt atgtagtctg ttttttatgc aaaatctaatt ttaatatatt 1800
gataattata tcattttacg tttctcgttc agctttcttg taaaaagtgg tgatctttcc 1860
agcacaatgg atctcgaggg atcttccata cctaccagtt ctgcgcctgc aggtcgccgc 1920
cgcgactcta gacgcgtaag ctactagca taaccccttg gggcctctaa acgggtcttg 1980
aggggttttt tgagcttctc gcctatatgt gagtcgtatt acagcttgag tattctatag 2040
tgtaacctaa atagcttggc gtaatcatgg tcatagctgt ttcctgtgtg aaattgttat 2100
ccgctcacia ttccacacia catagcagcc ggaagcataa agtgtaaaag ctgggggtgc 2160
taatgagtga gctaactcac attaatggc ttgcgctcac tgcccgctt ccagtcggga 2220
aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgag cggggagagg cggtttggt 2280
attgggcgtt cttccgcttc ctgcgtcact gactcgctgc gtcgggtcgt tcggctgcgg 2340
cgagcgggtat cagctcactc aaaggcggta atacgggtat ccacagaatc aggggataac 2400
gcaggaaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgag 2460
ttgctggcgt ttttcgatag gtcggccccc cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgctca 2520
agtcagagggt ggcaaaaccc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc 2580
tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg gatacctgtc cgcctttctc 2640
ccttcgggaa cgtggcgct ttctcatagc tcacgctgta ggtatctcag ttcgggtgag 2700
gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaacccccc ttacgcccga ccgtcgccc 2760
ttatccggta actatcgtct tgagtcacac ccggtaaagc acgacttata gccactggca 2820
gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag ggggtgctac agagttcttg 2880
```

ES 2 281 420 T3

```

aagtgggtggc ctaactacgg ctacactaga aggacagtat ttggtatctg cgtctgtctg 2940
aagccagtta ccttcggaaa aagagttggt agctcttgat ccggcaaaaa aaccaccgct 3000
ggtagcgggtg gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa 3060
gaagatcctt tgatcttttc taoggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa ctacggttaa 3120
5 gggattttgg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa 3180
tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat gagtaaactt ggtctgacag ttaaccaatgc 3240
ttaatcagtg aggcacctat ctacagcgtc tgtctatttc gttcatccat agttgcctga 3300
ctccccgtcg tgtagataac tacgatacgg gagggcttac catctggccc cagtgtgca 3360
10 atgataccgc gagaccacg ctacccggct ccagatttat cagcaataaa ccagccagcc 3420
ggaaggggcg agcgcagaag tggtcctgca actttatccg cctccatcca gtctattaat 3480
tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg ccagttaata gtttgcgcaa cgttggtggc 3540
attgctacag gcatcgtggt gtcacgctcg tctgttggtg tggttcatt cagctccggt 3600
tcccaacgat caaggcgagt tacatgatcc cccatgttgt gcaaaaaagc ggttagctcc 3660
15 ttcggctctc cgatcgttgt cagaagtaag ttggcgcgag tgttatcact catggttatg 3720
gcagcactgc ataattctct tactgtcatg ccacccgtaa gatgcttttc tgtgactggt 3780
gagtactcaa ccaagtcatt ctgagaatac cgcgcccggc gaocgagttg ctcttgcccg 3840
gctcaatac gggataatag tgtatgacat agcagaactt taaaagtgtc catcattgga 3900
aaagcttctt cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc tgttgagatc cagttcgatg 3960
20 taaccactc gtgcaccaa ctgatcttca gcagatttat ctttcaccag cgtttctggg 4020
tgagcaaaaa cggcaaggca aaatgccgca aaaaagggaa taaggcgac acggaaatgt 4080
tgaatactca tactcttctt tttcaatat tattgaagca tttatcaggg ttattgtctc 4140
atgagcggat acatatttga atgtatttag aaaaataaac aaataggggt tccgcgcaca 4200
tttccocgaa aagtgccacc tgacgtctaa gaaaccatta ttatcatgac attaacctat 4260
25 aaaaataggc gtatcacgag gccctttcgt ctgcgcgctt tcggtgatga cggtgaaaaa 4320
ctctgacaca tgcagctccc ggagacggtc acagcttgct tctaagcgga tgccgggagc 4380
agacaagccc gtcaggggcg gtcagcgggt gttggcgggt gtcggggctg gcttaactat 4440
gcggcatcag agcagattgt actgagagtg caccatagtc ggtgtgaaat accgcacaga 4500
30 tgcgtaagga gaaaataccg catcaggcga aattgtaaac gttaatattt tgttaaaatt 4560
cgcgttaaat atttgttaaa tcagctcatt ttttaaccaa taggccgaaa tcggcaaaat 4620
cccttataaa tcaaaagaat agaccgagat aggggtttagt gttgttccag tttggaacaa 4680
gagtccacta ttaaagaacg tggactccaa cgtcaaaggc cgaaaaaccg tctatcaggg 4740
cgatggocca ctacgtgaac catcacccaa atcaagtttt ttgocggtcg ggtgccgtaa 4800
35 agctctaaat cggaacccta aagggagccc ccgatttaga gcttgacggg gaaagccggc 4860
gaacgtggcg agaaagggaag ggaagaaagc gaaaggagcg ggcgctaggg cgttgcaag 4920
tgtagogggt acgctgcgcg taaccaccac acccgccgcg cttaatgcgc cgctacaggg 4980
cgcgtccatt cgcatttcag gctgcgcaac tgttggaag ggcgatcggg gcgggcctct 5040
40 tcgctattac gccagctggc gaaaggggga tgtgctgcaa ggcgattaag ttgggtaaag 5100
ccagggtttt ccaggtcacg acgttgtaaa acgacggcca gtgaattg 5148

```

<210> 11

<211> 3715

45 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

50 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Plásmido TopoRNAi

<400> 11

```

55 gagtgacca tatgcggtgt gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa taccgcatca 60
ggcgaaattg taaacgttaa tattttgtaa aaattcgcgt taaatatttg ttaaatcagc 120
tcatttttta accaataggc cgaatccgc aaaatccctt ataatcaaa agaatagacc 180
gagatagggg tgagtgttgt tccagtttgg aacaagagtc cactattaaa gaacgtggac 240
60 tccaacgtca aagggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg gccactacg tgaaccatca 300
cccaaatcaa gttttttgcg gtcgaggtgc cgtaaagtc taaatcgaa ccctaaaggg 360
agccccgat ttagagcttg acggggaaag ccggcgaaag tggcgagaaa ggaagggaag 420
aaagcgaaag gagcgggccc tagggcgctg gcaagtgtag cggtcacgct ggcgtaacc 480
accacaccg ccgcgcttaa tgcgcgcta cagggcgctg ccattcgca tttaggtgac 540
65 gcaactgttg ggaaggcgca tgggtgcggg cctcttcgct attacgccag ctggcgaaag 600
ggggatgtgc tgcaaggcga ttaagttggg taacgccag gttttcccag tcacgacgtt 660
gtaaaacgac ggccagtga tttgaatac actcactata ggcgaattc aaaaaacccc 720

```

ES 2 281 420 T3

tcaagaccg tttagaggcc ccaaggggtt atgctagtga attctgcagg gtacccgggg 780
 atcctctaga gatccctcga cctcgagatc catttgtgtg gaattctacc aaggctagca 840
 tgggcagccg aatacagtga tccgtgccgg cctggactg ttgaacgagg tcggcgtaga 900
 5 cggctctgacg acacgcaaac tggcggaacg gttgggggtg cagcagccgg cgctttactg 960
 gcacttcagg aacaagcggg cgctgctcga cgactggcc gaagccatgc tggcgagaa 1020
 tcatacgctt cgggtgccgag agccgacgac gactggcgct cttttctgat cgggaatccc 1080
 gcagccatgc tagccttggg agaattccac cacaatggat ctgagggat cttccatacc 1140
 10 taccagttct gcgcctgcag gtcgcggccg cgaactctta gacgcgtaag cttactagca 1200
 taaccctttg gggcctctaa acgggtcttg aggggtttt tgagcttctc gccctatagt 1260
 gagtcgtatt acagcttgag tattctatag tgtcacctaa atagcttggc gtaatcatgg 1320
 tcatagctgt ttctgtgtg aaattgttat ccgctcaca ttccacacaa catcagagcc 1380
 ggaagcataa agtgtaaagc ctgggggtgc taatgagtga gctaactcac attaatgctg 1440
 15 ttgcgctcac tgcccgttt ccagtcggga aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc 1500
 ggccaacgcg cggggagagg cgggttgctg attggcgct cttccgcttc ctgcctcact 1560
 gactcgctgc gctcggtcgt tcgggtgcgg cgagcggat cagctcactc aaaggcggta 1620
 atacggttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag 1680
 caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgca ttgctggcgt ttttcgatag gctccgcccc 1740
 20 cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaacc gacaggacta 1800
 taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgacctg 1860
 ccgcttaccg gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc 1920
 tcacgctgta ggtatctcag ttcggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac 1980
 gaaccccccg ttcagccga ccgctgcgcc ttatccggt actatcgtct tgagtccaac 2040
 25 ccggtaaagc acgacttat gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg 2100
 aggtatgtag gcggtgctac agagtctctg aagtgtggc ctaactacgg ctacactaga 2160
 aggacagtat ttggtatctg cgtctgctg aagccagtta ccttcggaaa aagagttgg 2220
 agctcttgat ccggcaaaaa aaccaccgct ggtagcggg gttttttgt ttgcaagcag 2280
 30 cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcct tgatcttttc tacggggctc 2340
 gacgctcagt ggaacgaaaa ctcacgttaa gggattttgg tcatgagatt atcaaaaagg 2400
 atcttcacct agatctttt aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta aagtatat 2460
 gagtaaaact ggctgacag ttaccaatgc ttaatcagt aggcacctat ctacagcatc 2520
 tgtctatttc gttcatccat agttgcctga ctcccgcgt ttagataaac tacgatacgg 2580
 35 gagggcttac catctggccc cagtgtgca atgataccg gagacccacg ctccacggct 2640
 ccagatttat cagcaataaa ccagccagcc ggaaggccg agcgagaag tggtoctgca 2700
 actttatccg cctccatcca gtctattaat tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg 2760
 ccagttaata gtttgcgcaa cgttgttggc attgctacag gcatcgtggg gtcaogctcg 2820
 tcgtttggta tggcttcatt cagctccggt tcccaacgat caaggcgagt tacatgatcc 2880
 40 cccatgttgt gcaaaaaagc ggttagctcc ttcggtctc cgatcgttgt cagaagtaag 2940
 ttggccgcag tggtatcact catggttatg gcagcactgc ataattctct tactgtcatg 3000
 ccattccgta gatgcttttc tgtgactggg gactactcaa ccaagtcatt ctgagaatac 3060
 cgcgcgccgg gaccgagttg ctcttgccc ggcgtcaatac gggataatag tgtatgacat 3120
 45 agcagaactt taaaagtgt catcattgga aaacgttctt cggggcgaaa actctcaagg 3180
 atcttacgcg tgttgagatc cagtctgat taaccactc gtgcacccaa ctgatcttca 3240
 gcatctttta ctttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca aatgccgca 3300
 aaaaagggaa taaggcgac acggaatgt tgaatactca tactcttct ttttcaatat 3360
 tattgaagca tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat acatatttga atgtatttag 3420
 50 aaaaataaac aaatagggt tccgcgcaca tttcccgaa aagtgccacc tgacgtctaa 3480
 gaaaccatta ttatcatgac attaacctat aaaaataggc gtatcacgag gccctttcgt 3540
 ctgcgcggtt tcggtgatga cggtgaaaac ctctgacaca tgcagctccc ggagacggtc 3600
 acagcttgtc tgtaagcgga tgccgggagc agacaagccc gtcagggcgc gtcaggggt 3660
 55 gttggcgggg gtcggggctg gcttaactat gcggcatcag agcagattgt actga 3715

<210> 12

<211> 4107

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Plásmido pGN49A

ES 2 281 420 T3

<400> 12

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

t g t a a t a c g a c t c a c t a t a g g g c g a a t t c a a a a a a c c c c t c a a g a c c c g t t t a g a g g c c c 60
 c a a g g g g t t a t g c t a g t g a a t t c t g c a g c g g t a c c c g g g g a t c c t c t a g a g a t c c c t c g a 120
 c c t c g a g a t c c a t t g t g c t g g a a a g g a t c t g g a t c c g g c t t a c t a a a a g c c a g a t a a c a g 180
 t a t g c g t a t t t g c g c g c t g a t t t t t g c g g t a t a a g a a t a t a t a c t g a t a t g t a t a c c c g a 240
 a g t a t g t c a a a a a g a g g t g t g c t a t g a a g c a g c g t a t t a c a g t g a c a g t t g a c a g c g a c a 300
 g c t a t c a g t t g c t c a a g g c a t a t a t g a t g t c a a t a t c t c c g g t c t g g t a a g c a c a a c c a t 360
 g c a g a a t g a a g c c c g t c g t c t g c g t g c c g a a c g c t g g a a a g c g g a a a a t c a g g a a g g g a t 420
 g g c t g a g g t c g c c c g g t t t a t t g a a t g a a c g g c t c t t t t g c t g a c g a g a a c a g g g a c t g 480
 g t g a a t g c a g t t t a a g g t t t a c a c c t a t a a a a g a g a g a g c c g t t a t c g t c t g t t t g t g g 540
 a t g t a c a g a g t g a t a t t a t t g a c a c g c c c g g g c g a c g g a t g g t g a t c c c c c t g g c c a g t g 600
 c a c g t c t c t t a a g c g a t a a a g t c t c c c g t g a a c t t t a c c c g g t g g t g c a t a t c g g g g a a g 660
 a a a g c t g g c g c a t g a t g a c c a c c g a t a t g g c c a g t g t g c c g g t c t c c g t t a t c g g g g a a g 720
 a a g t g g c t g a t c t c a g c c a c c g c g a a a a t g a c a t c a a a a a c g c c a t t a a c c t g a t g t t c t 780
 g g g g a a t a t a a a t g t c a g g c t c c c t t a t a c a c a g c c t t t c c a g c a c a a t g g a t c t c g a g g 840
 g a t c t t c c a t a c c t a c c a g t t c t g c g c c t g c a g g t c g c g g c c g c g a c t c t a g a c g c g t a a 900
 g c t t a c t a g c a t a a c c c c t t g g g c c c t c t a a a c g g g t c t t g a g g g g t t t t t t g a g c t t c t 960
 c g c c c t a t a g t g a g t c g t a t t a c a g c t t g a g t a t t c t a t a g t g t c a c c t a a a t a g c t t g g 1020
 c g t a a t c a t g g t c a t a g c t g t t t c c t g t g t g a a a t t g t t a t c c g c t c a c a a t t c c a c a c a 1080
 a c a t a c g a g c c g g a a g c a t a a a g t g t a a a g c c t g g g g t g c c t a a t g a g t g a g c t a a c t c a 1140
 c a t t a a t t g c g t t g c g c t c a c t g c c c g c t t t c c a g t c g g g a a a c c t g t c g t g c c a g c t g c 1200
 a t t a a t g a a t c g g c c a a c g c g c g g g g a g a g g c g g t t t g c g t a t t g g g c g c t c t t c c g c t t 1260
 c c t c g c t c a c t g a c t c g c t g c g t c g g t c g t t c g g c t g c g g c g a g c g g t a t c a g c t c a c t 1320
 c a a a g g c g g t a a t a c g g t t a t c a c a g a a t c a g g g g a t a a c g c a g g a a a g a a c a t g t g a g 1380
 c a a a a g g c c a g c a a a a g g c c a g g a a c c g t a a a a a g g c c g c g t t g c t g g c g t t t t t c g a t a 1440
 g g c t c o g c c c c c c t g a c g a g c a t c a c a a a a a t c g a c g c t c a a g t c a g a g g t g g c g a a a c c 1500
 c g a c a g g a c t a t a a a g a t a c c a g g c g t t t c c c c c t g g a a g c t c c c t c g t g c g c t c t c c t g 1560
 t t c c g a c c c t g c c g c t t a c c g g a t a c c t g t c c g c c t t t c t c c c t t c g g g a a g c g t g g c g c 1620
 t t t c t c a t a g c t c a c g c t g t a g g t a t c t c a g t t c g g t g t a g g t c g t t c g c t c c a a g c t g g 1680
 g c t g t g t g c a c g a a c c c c c c g t t c a g c c c g a c c g c t g c g c o t t a t c c g g t a a c t a t c g t c 1740
 t t g a g t c c a a c c c g g t a a g a c a c g a c t t a t c g c c a c t g g c a g c a g c c a c t g g t a a c a g g a 1800
 t t a g c a g a g c g a g g t a t g t a g g c g g t g c t a c a g a g t t c t t g a a g t g g t g g c c t a a c t a c g 1860
 g c t a c a c t a g a a g g a c a g t a t t t g g t a t c t g c g c t c t g c t g a a g c c a g t t a c c t t c g g a a 1920
 a a a g a g t t g g t a g c t c t t g a t c c g g c a a a c a a a c c a c c g c t g g t a g c g g t g g t t t t t t t g 1980
 t t t g c a a g c a g c a g a t t a c g c g c a g a a a a a a a g g a t c t c a a g a a g a t c c t t t g a t c t t t t 2040
 t t c g g g g t c t g a c g t c a g t g g a a c g a a a a c t c a c g t t a a g g g a t t t t g g t c a t g a g a t 2100
 t a t c a a a a a g g a t c t t c a c c t a g a t c c t t t t a a a t t a a a a a t g a a g t t t t a a a t c a a t c t 2160
 a a a g t a t a t a t g a g t a a a c t t g g t o t g a c a g t t a c c a a t g c t t a a t c a g t g a g g c a c c t a 2220
 t c t c a g c g a t c t g t c t a t t t c g t t c a t c c a t a g t t g c o c t g a c t c c c c g t c g t g t a g a t a a 2280
 c t a c g a t a c g g g a g g g c t t a c c a t c t g g c c c c a g t g c t g c a a t g a t a c c g c g a g a c c c a c 2340
 g c t c a c c g g c t c c a g a t t t a t c a g c a a t a a a c c a g c c a g c c g g a a g g g c c g a g c g c a g a a 2400
 g t g g t c c t g c a a c t t t a t c c g c o t c a t a c c a g t c t a t t a a t t g t t g c c g g g a a g c t a g a g 2460
 t a a g t a g t t c g c o a g t t a a t a g t t t g c g c a a c g t t g t t g g c a t t g c t a c a g g c a t c g t g g 2520
 t g t c a c g t c g t c g t t t g g t a t g g o t t c a t t c a g c t c c g g t t c c c a a c g a t c a a g g c g a g 2580
 t t a c a t g a t c c c c c a t g t t g t g c a a a a a a g c g g t t a g c t c c t t c g g t c o c t c o g a t c g t t g 2640
 t c a g a a g t a a g t t g g c c g c a g t g t t a t c a c t c a t g g t t a t g g c a g c a c t g c a t a a t t c t c 2700
 t t a c t g t c a t g c c a t c c g t a a g a t g c t t t t c t g t g a c t g g t g a g t a c t c a a c c a a g t c a t 2760
 t c t g a g a a t a c c g c g c c c g g c g a c c g a g t t g c t c t t g c c c g g o g t c a a t a c g g g a t a a t a 2820
 g t g t a t g a c a t a g c a g a a c t t t a a a a g t g c t c a t c a t t g g a a a a c g t t c t t c g g g g c g a a 2880
 a a c t c t c a a g g a t c t t a c c g c t g t t g a g a t c c a g t t c g a t g t a a c c c a c t c g t g c a c c c a 2940
 a c t g a t c t t c a g c a t c t t t t a c t t t c a c c a g c g t t t c t g g g t g a g c a a a a a c a g g a a g g c 3000
 a a a a t g c c g c a a a a a a g g g a a t a a g g g c g a c a c g g a a a t g t t g a a t a c t c a t a c t c t t t c 3060
 t t t t t c a a t a t t a t t g a a g c a t t t a t c a g g g t t a t t g t c t c a t g a g c g g a t a c a t a t t t g 3120
 a a t g t a t t t a g a a a a t a a a c a a a t a g g g g t t c c g c g c a c a t t t c c c c g a a a a g t g c c a c 3180
 c t g a c g t o t a a g a a a c c a t t a t t a t c a t g a c a t t a a c c t a t a a a a a t a g g c g t a t c a c g a 3240
 g g c c c t t t c g t c t c g c g o g t t t c g g t g a t g a c g g t g a a a a c c t c t g a c a c a t g c a g c t c c 3300
 c g g a g a c g g t c a c a g c t t g t c t g t a a g c g g a t g c c g g g a g c a g a c a a g c c c g t c a g g g c g 3360
 c g t c a g c g g g t g t t g c g g g g t g t c g g g g c t g g c t t a a c t a t g c g g c a t c a g a g c a g a t t g 3420
 t a c t g a g a g t g c a c c a t a t g c g g t g t g a a a t a c c g c a c a g a t g c g t a a g g a g a a a a t a c c 3480
 g c a t c a g g o g a a a t t g t a a a c g t t a a t a t t t g t t a a a a t t c g c g t t a a a t a t t t g t t a a 3540
 a t c a g c t c a t t t t t t a a c c a a t a g g c c g a a a t c g g c a a a a t c c c t t a t a a a t c a a a a g a a 3600
 t a g a c c g a g a t a g g g t t g a g t g t t g t t c o a g t t t g g a a c a a g a g t c c a c t a t t a a a g a a c 3660
 g t g g a c t c c a a c g t c a a a g g g c g a a a a a c c g t c t a t c a g g g c g a t g g c c c a c t a c g t g a a 3720

ES 2 281 420 T3

```
ccatcaccca aatcaagttt tttgcggtcg aggtgccgta aagctctaaa tcggaaccct 3780
aaagggagcc cccgatttag agcttgacgg ggaaagccgg cgaacgtggc gagaaaggaa 3840
gggaagaaag cgaaaggagc gggcgctagg gcgctggcaa gtgtagcggc cacgctgcgc 3900
gtaaccacca cccccgcgc gcttaatcgc ccgctacagg gcgctccat tcgccatca 3960
5 ggctgcgcaa ctgttgggaa gggcgatcgg tgcgggcctc ttcgctatta cgccagctgg 4020
cgaaaggggg atgtgctgca aggcgattaa gttgggtaac gccagggttt tcccagtcac 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

```
gagtgaccca tatgcggtgt gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa taccgcatca 60
ggcgaaaattg taaacgttaa ttttttgtta aaattcgcgt taaatatattg ttaaatcagc 120
tcattttttta accaataggc cgaaatccgc aaaatccctt ataaatcaaa agaatagacc 180
25 gagatagggg tgagtgttgt tccagtttgg aacaagagtc cactattaaa gaacgtggac 240
tccaaactca aagggcgaaa aacgctctat cagggcgatg gccactacg tgaacctca 300
cccaaataca gttttttgcg gtgcgaggtgc cgtaaagctc taaatcgga ccctaaagg 360
agcccccgat ttagagcttg acgggggaaag ccggcgaaag tggcgagaaa ggaagggaag 420
aaagcgaaag gagcgggcgc tagggcgctg gcaagtgtag cggtcacgct gcgcgtaacc 480
30 accacacccc ccgcgcttaa tgcgcgcgcta cagggcgcgct ccattcgcca ttcagggtgc 540
gcaactgttg ggaaggcgca tccgtgctgg cctcttcgct attacgccag ctggcgaaa 600
ggggatgtgc tgcaaggcga ttaagttggg taacgccagg gttttcccag tcacgacgtt 660
gtaaaacgac ggccagtga tttgtaatac actcactata gggcgaaatc gagctcggt 720
cccggggatc ctctagagat ccctcgacct cgagatccat tgtgctggaa aggatctgga 780
35 tccggcttac taaaagccag ataacagtat gcgtatttgc gcgctgattt ttgcggtata 840
agaatatata ctgatatgta taccggaagt atgtcaaaaa gaggtgtgct atgaagcagc 900
gtattacagt gacagttgac agcgacagct atcagttgct caaggcata atgatgtcaa 960
tatctccggt ctggtaagca caaccatgca gaatgaagcc cgtcgtctgc gtgccgaac 1020
40 ctggaaagcg gaaaatcagg aagggatggc tgaggtcgcc cggtttattg aaatgaacgg 1080
ctcttttgcg gacgagaaca gggactgggt aaatgcagtt taaggtttac acctataaaa 1140
gagagagccg ttatcgtctg tttgtggatg tacagagtga tattattgac acgcccgggc 1200
gacggatggt gatccccctg gccagtgcac gtctcttaag cgataaagtc tcccgtgaac 1260
tttaccgggt ggtgcatac ggggagaaa gctggcgcat gatgaccac gatattggcc 1320
45 gtgtgccggt ctccgttatc ggggaagaag tggctgatct cagccaccgc gaaaatgaca 1380
tcaaaaacgc cattaacctg atgttctggg gaataataat gtcaggctcc cttatacaca 1440
gcctttccag cacaatggat ctcgagggat cttccatacc taccagttct gcgcctgcag 1500
gtcgcgccg cgactctcta gactcgaaag cttctcgccc tatagtgagt cgtattacag 1560
cttgagtatt ctatagtgtc acctaaatag cttggcgtaa tcatggtcat agctgtttcc 1620
50 tgtgtgaaat tgttatcgc tcacaattcc acacaacata cgagccggaa gcataaagt 1680
taaagcctgg ggtgccta at gagtgagcta actcacatta attgcgttgc gctcactgcc 1740
cgctttccag tcgggaaacc tgcgtgccca gotgcattaa tgaatcggcc aacgcgcggg 1800
gagaggcggg ttgcgtattg ggcgctcttc cgcttctctg ctactgact cgctgcgctc 1860
ggctgttcgg ctgcggcgag cggtatcagc tcaactcaaag gcgtaatac gggtatccac 1920
55 agaatacagg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa 1980
cogtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt cgataggctc cgccccctg acgagcatca 2040
caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaaccgcaca ggactataaa gataccaggc 2100
gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tctgttccg acctgcccgc ttaccggata 2160
60 cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct catagctcac gctgtaggta 2220
tctcagttcg gtgtaggtcg ttgcgtccaa gctgggctgt gtgcacgaac ccccggttca 2280
gcocgacgcg tgcgccttat ccggtacta tctgtttgag tccaacccgg taagacacga 2340
cttatcgcca ctggcagcag ccaactggtaa caggattagc agagcgagg atgtaggcgg 2400
tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagga cagtatttgg 2460
65 tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg 2520
caaacaaacc acogctggta gcggtgggtt ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag 2580
aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggctcgacg ctcagtgga 2640
```

ES 2 281 420 T3

```

cgaaaaactca cgtaaagggga ttttgggtcat gagattatca aaaaggatct tcacctagat 2700
ccttttaaat taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt atatatgagt aaacttgggtc 2760
tgacagttac caatgcttaa tcagtgggc acctatctca gcgatctgtc tatttcgttc 2820
5 atccatagtt gcctgactcc ccgtcgtgta gataactacg atacgggagg gcttaccatc 2880
tggtccaggt gctgcaatga taccgcgaga cccacgctca ccggtccag atttatcagc 2940
aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg cagaagtggc cctgcaactt tatccgcctc 3000
catccagttc attaattggt gccgggaagc tagagtaagt agttcgccag ttaatagttt 3060
10 gcgcaacggt gttggcattg ctacaggcat cgtgggtgtc cgctcgtcgt ttggtatggc 3120
ttcattcagc tccggttccc aacgatcaag gcgagttaca tgatcccca tgttgtgcaa 3180
aaaagcgggt agtccttcg gtcctccgat cgttgtcaga agtaagttgg ccgcagtgtt 3240
atcactcatg gttatggcag cactgcataa ttctottact gtcatgccat ccgtaagatg 3300
cttttctgtg actggtgagt actcaaccaa gtcattctga gaataccgcg cccggcgacc 3360
15 gagttgctct tgcccgcggt caatacggga taatagtgtg tgacatagca gaactttaaa 3420
agtgtcatc attgaaaaac gttcttcggg gcgaaaactc tcaaggatct taccgctgtt 3480
gagatccagt tcgatgtaac ccactcgtgc acccaactga tcttcagcat cttttacttt 3540
caccagcgtt tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaaat gccgcaaaa agggaataag 3600
ggcgacacgg aaatgttgaa tactcatact cttcctttt caatattatt gaagcattta 3660
20 tcagggttat tgtctcatga gcggatacat attgaaatgt atttagaaaa ataaacaaat 3720
aggggttccg cgcacatttc cccgaaaagt gccacctgac gtctaagaaa ccattattat 3780
catgacatta acctataaaa ataggcgtat cacgaggccc tttcgtctcg cgcgtttcgg 3840
tgatgacggt gaaaacctct gacacatgca gtcctccggag acggtcacag cttgtctgta 3900
agcggatgcc gggagcagac aagcccgta gggcgcgta gcgggtgttg gcgggtgtcg 3960
25 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 agcatggtt 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 agcatgggcc 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 cggcttacta 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 tcgcttaaga 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

ccagtgacag 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

60

65

ES 2 281 420 T3

<400> 20

```

5      taccaaggct agcatgggtt atcaactgata agttggataa gttggtggac atattatgtt 60
      tatcagtgat aaagtgtcaa gcatgacaaa gttgcagccg aatacagtga tccgtgccgg 120
      ccctggactg ttgaacgagg tcggcgtaga cggctctgacg acacgcaaac tggcggaacg 180
      gttgggggtg cagcagccgg cgctttactg gcaacttcagg aacaagcggg cgctgctcga 240
      cgcaactggcc gaagccatgc tggcggagaa tcatacgctt cggtgccgag agccgacgac 300
      gactggcgct catttctgat cgggaatccc gcagcttcag gcaggcccat gctagccttg 360
10     gtaccagcac aatgg                                     375

```

<210> 21

<211> 670

<212> ADN

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Fragmento de PCR

<400> 21

```

25     gatctggatc cggcttacta aaagccagat aacagtatgc gtatttgccg gctgattttt 60
      gcggtataag aatatatact gatatgtata ccgaagtat gtcaaaaaga ggtgtgctat 120
      gaagcagcgt attacagtga cagttgacag cgacagctat cagttgctca aggcataatat 180
      gatgtcaata tctccggtct ggtaagcaca accatgcaga atgaagcccg tcgtctgcgt 240
      gccgaacgct ggaaagcggg aaatcaggaa gggatggctg aggtcgcccg gtttattgaa 300
      atgaacggct cttttgctga cgagaacagg gactgggtgaa atgcagttta aggtttacac 360
30     ctataaaaga gagagccgtt atcgtctgtt tgtggatgta cagagtgata ttattgacac 420
      gcccgggcga cggatggtga tccccctggc cagtgcacgt ctcttaagcg ataaagtctc 480
      ccgtgaactt taccgggtgg tgcataatcg ggatgaaagc tggcgcatga tgaccaccga 540
      tatggccagt gtgccggtct ccgttatcgg ggaagaagtg gctgatctca gccaccgcga 600
35     aaatgacatc aaaaacgcca ttaacctgat gttctgggga atataaatgt caggctcoct 660
      tatacacagc                                     670

```

40

45

50

55

60

65