

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 718 187**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/69

(2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.04.2014 PCT/EP2014/058459**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **30.10.2014 WO14174078**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2014 E 14724009 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2019 EP 2989205**

(54) Título: **Cromosomas artificiales bacterianos**

(30) Prioridad:

26.04.2013 GB 201307528

(73) Titular/es:

**KATHOLIEKE UNIVERSITEIT LEUVEN (100.0%)
K.U. Leuven R&D Waaistraat 6 Box 5105
3000 Leuven, BE**

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

28.06.2019

(72) Inventor/es:

**DALLMEIER, KAI y
NEYTS, JOHAN**

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 718 187 T3

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

DESCRIPCIÓN

Cromosomas artificiales bacterianos

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un sistema del vector del plásmido adecuado para manipular, mantener y propagar ADNc infeccioso de genomas de virus de ARN para uso como vacuna.

Antecedentes de la invención

Anteriormente, el ADN de copia (ADNc) de varios flavivirus y otros virus de ARN se han clonado en diferentes vectores bacterianos de baja copia para superar su toxicidad intrínseca (debido al gran tamaño y la expresión críptica de las secuencias virales) (Bredenbeek et al. (2003) J. Gen. Virol. 84, 1261-1268; Durbin, et al. (2006) Hum Vaccin. 2, 255-260; Fan y Bird (2008) J. Virol. Methods. 149, 309-315; Li et al. (2011) PLoS One 6, e18197; Pu et al. (2011) J. Virol. 85, 2927-2941; Rice et al. (1989) New Biol. 1, 285-296) Almazán et al. (2008) Methods Mol Biol. 454, 275-91) Pierro et al. (2006) J. Gen. Virol. 87, 2263-2268, Yun et al. (2003) J. Virology 77, 6450-6465.

Los ADNc clonados se han utilizado como moldes para la producción de virus recombinantes infecciosos, ya sea por síntesis in vitro y transfección de los genomas de ARN (Bredenbeek et al. 2003, citado anteriormente), o incorporando el ADNc viral en un casete de expresión, que comprende un promotor tal como el promotor CMV-IE (temprano inmediato de Citomegalovirus) que permite la transcripción del ARN viral de los ADNs plasmídicos transfectados (Enjuanes et al. (2001) J. Biotechnol. 88, 183-204; Hall et al. (2003) Proc. Natl Acad Sci. EE. UU. 100, 10460-10464). Dichos casetes de expresión viral dirigen la expresión de la fiebre aftosa atenuada (Ward et al. (1997) J. Virol. 71, 7442-7447) y los virus Kunjin (Hall et al. (2003) Proc Natl Acad Sci EE. UU. 100, 10460-10464) se han utilizado como vacunas de ADN experimentales. Aunque los sistemas vectoriales de bajo número de copias que comprenden un casete de expresión viral se pueden mantener en la célula huésped bacteriana en una manera estable, tienen la importante desventaja de que solo permiten la purificación de ADNc viral infectivo en cantidades que son simplemente suficientes para uso experimental a pequeña escala. Por lo tanto, su uso como una fuente de rutina de ADNc viral infectivo es imposible, por ejemplo, en la producción de una vacuna viva de ADNc.

La producción de vacunas de ADN viral requiere una amplificación sustancial de los vectores de clonación para obtener suficiente ADN, pero estos métodos de amplificación están sujetos a rigurosas restricciones. Para evitar mutaciones, los vectores que comprenden ADN viral se propagan en condiciones que evitan eventos mutagénicos (recombinación, mutaciones, mejora de la reparación de despareamientos y similares). Los cromosomas artificiales bacterianos (BAC) son conocidos por su estabilidad y pueden contener inserciones de hasta 500 kb o más.

Sin embargo, el tamaño de dicho vector con ADN extraño es una seria carga para las bacterias, y su replicación requiere un esfuerzo metabólico sustancial. Además, el agotamiento de los nucleótidos puede conducir a un aumento de las mutaciones. Finalmente, se puede producir una expresión no deseada de ADN extraño (llamada expresión críptica), que puede conducir a proteínas recombinantes tóxicas. La producción de proteínas tóxicas por transcriptos crípticos es inherente al ADN de flavivirus y solo se puede resolver disminuyendo el número de copias de plásmidos. De hecho, cuanto mayor sea el número de copias de un vector, mayor será la concentración de proteínas tóxicas. Como consecuencia, los huéspedes bacterianos pueden contraseleccionar los mutantes en donde no se expresan estas proteínas.

Pu et al. (2011) J. Virol. 85, 2927-2941, describen en detalle diversos intentos para resolver la toxicidad intrínseca del ADNc de flavivirus en bacterias. Estos incluyen la ligación in vivo de plásmidos que comprenden partes del genoma viral, huéspedes específicos, mutantes para evitar la expresión críptica y también plásmidos de bajo número de copias.

Tretyakova I et al. (2014) J. Virol. 468-470, 28-35 describen la toxicidad causada por las proteínas crípticas del ADNc viral y describen la introducción de un intrón sintético artificial en la secuencia del ADN viral en sí.

Jiang et al. (2015) J. Gen. Virol. 96, 804-814 describen el problema de la escasez de vacunas para la vacunación contra la fiebre amarilla y la necesidad de producir vacunas adicionales. Los autores destacan la importancia de la estabilidad genética. La única forma de abordar esta inestabilidad según los autores es el uso de vectores BAC de bajo número de copias.

Almazan F. et al. en "Fernando Almazanin Helena Jane Maier et al. (eds.)", "Coronaviruses: Methods and Protocols", Methods in Molecular Biology, 1282, Springer Science + Business Media New York 2015, páginas 275-291, es un capítulo de un manual en el campo de la clonación de virus de ARN y describen el uso de sistemas BAC para superar los problemas de estabilidad de los clones de ADNc viral.

El uso de BACs que se producen como una sola copia en una bacteria proporciona así una solución para estos problemas.

El bajo número de copias no es un inconveniente para aquellas aplicaciones en donde el ADN del BAC se subclona o amplifica posteriormente para aumentar la concentración y en donde la introducción de algunas mutaciones por estas

técnicas no es crítica para los experimentos previstos. Sin embargo, tales métodos de amplificación no se pueden aplicar en la fabricación de vacunas de ADN, que hacen de los BAC un vehículo no preferido para preparaciones de plásmidos a gran escala para vacunas de ADN. Se requieren cultivos a escala muy grande para obtener cantidades sustanciales de BAC.

- 5 El uso de vectores BAC inducibles se conoce por Wild et al. (2002) Genome Res. 12, 1434-1444, Wild et al. (2001) Plasmids 45, 142-143, US5874259, US2003049665 según el cual el número de copias del BAC aumenta de 1 copia por celda hasta 100 copias por celda, o incluso más. Aunque este sistema proporciona un método para aumentar el rendimiento del ADN del BAC, existe una preocupación legítima de que la actividad fuertemente incrementada del sistema de replicación tras la inducción aumentará la frecuencia de mutación. La fabricación de vacunas de ADN requiere, por lo tanto, un sistema en donde se obtiene un alto número de copias de un vector, pero en donde la replicación de los vectores se produce sin una introducción intolerable de mutaciones.

Compendio de la invención

La presente invención resuelve el problema de la amplificación del ADNc viral para la preparación de una vacuna en los sistemas de vectores de la técnica anterior proporcionando un vector que se puede mantener de manera estable en la célula huésped con un número de copias bajo, pero que se puede amplificar significativamente modificando las condiciones de cultivo de su huésped, sin eventos de mutagénesis no deseados. En esta memoria se proporciona un vector que puede ser transportado desde y hacia ambos, una levadura y un huésped bacteriano, que proporciona así un sistema muy versátil susceptible de manipular el vector tanto en el sistema genético de la levadura como en el bacterianos. La aplicación demuestra, contra lo que se esperaba, que el aumento inducible en el número de copias de un vector BAC proporciona ADN que tiene una tasa de mutación sorprendentemente baja. Incluso más sorprendente, las pocas mutaciones que ocurren son en su mayoría mutaciones por desplazamiento del marco o codones de parada, que conduce a versiones truncadas en la expresión. Las mutaciones puntuales, que o son sin efecto o que conducen a aminoácidos modificados, están poco representadas.

Este efecto inesperado conduce al efecto ventajoso de que se obtienen altas cantidades de vectores y que la cantidad limitada de errores que ocurren conduce a un genoma viral no funcional, en lugar de un genoma viral mutado de lo cual la virulencia se puede aumentar en comparación con la construcción originalmente clonada.

En esta memoria se describe un cromosoma artificial bacteriano que comprende una secuencia de ori bacteriana inducible, que permite inducir la amplificación de dicho cromosoma artificial bacteriano a un alto número de copias, por ejemplo, modificando las condiciones de cultivo del huésped bacteriano. Los cromosomas artificiales bacterianos, como se usan en la presente memoria, comprenden además un casete de expresión viral que comprende un ADNc de un genoma de virus de ARN flanqueado por elementos reguladores en cis, que tras la introducción de dicho cromosoma artificial bacteriano en una célula de mamífero favorece la transcripción de dicho ADNc viral y permite el procesamiento del ARN transcripto en ARN viral infeccioso. El ADNc viral contenido en el casete de expresión viral puede o corresponder a la de un genoma de virus de ARN tipo silvestre o ser una construcción de ADNc viral químico, en donde se han insertado secuencias de ADN heterólogas y/o se han eliminado, truncado o mutado secuencias virales nativas. Normalmente, las secuencias de ADN heterólogas codifican uno o más péptidos/proteínas, que se expresan de manera heteróloga por el virus recombinante, después de la introducción en una célula de mamífero de un cromosoma artificial bacteriano que contiene un casete de expresión viral que comprende dicho ADNc viral químico. El cromosoma artificial bacteriano puede comprender además una secuencia de replicación de manera autónoma en levadura para transportar y mantener dicho cromosoma artificial bacteriano en levadura. La posibilidad de transportar y mantener dicho cromosoma artificial bacteriano en una célula de levadura proporciona la ventaja de que es susceptible para la manipulación genética tanto en los sistemas genéticos de la levadura como en los bacterianos. Como tal, la aplicación proporciona un sistema de vector único adecuado para manipular, mantener y propagar ADNc infeccioso de genomas de virus de ARN.

En ausencia de un estímulo del ori inducible, los cromosomas bacterianos artificiales en la solicitud se pueden utilizar para almacenar y clonar de forma estable el ADNc viral infeccioso en un huésped bacteriano, mientras que en presencia de tal estímulo, dicho ADNc se puede amplificar fácilmente y posteriormente aislar para ser utilizado. Los cromosomas artificiales bacterianos según la presente descripción son particularmente útiles en el desarrollo, mantenimiento estable y producción de ADNc viral para utilizarse como una vacuna viva contra patógenos virales de ARN. Alternativamente, dichos cromosomas bacterianos artificiales se utilizan para el mantenimiento y propagación de virus nativos o recombinantes de ADNc, por ejemplo, para fines de investigación.

En la presente invención, se usan BACs con un ori bacteriano inducible para la preparación de una vacuna de un casete de expresión viral que comprende ADNc de un virus de ARN y elementos reguladores en cis para la transcripción de ADNc viral en células de mamífero y el procesamiento del ARN transcripto en ARN viral infeccioso.

Sorprendentemente, la generación de copias múltiples del BAC que comprende el ADN viral no condujo a las desventajas que se conoce que ocurren con los sistemas de alto número de copias.

En general, las proteínas tóxicas se producen en sistemas bacterianos, debido a la expresión crítica de las secuencias virales. De hecho, la generación de clones infecciosos de flavivirus se ha visto tradicionalmente impidiida por la

toxicidad de sus ADNc de longitud completa en las bacterias.

Se han empleado diversos enfoques para superar este problema, incluido el uso de plásmidos de muy bajo número de copias y cromosomas artificiales bacterianos (tratado en Edmonds (2013) J. Virol. 87, 2367-2372). Este es un fenómeno que se refiere a la inserción que se clona en el BAC y obstaculiza el metabolismo y el crecimiento bacteriano.

5 Las bacterias con mutantes en donde la expresión críptica no tiene lugar tienen una ventaja de crecimiento y crecerán en exceso en la población original. En la técnica anterior, esto se refleja por el tamaño de las colonias bacterianas. Las construcciones no mutadas producen proteínas tóxicas y normalmente se obtienen colonias pequeñas. Las construcciones mutadas producen menos o ninguna proteína tóxica, lo que da como resultado la aparición de colonias más grandes.

10 En base a este conocimiento de la técnica anterior, se esperaba que la inducción de la replicación del plásmido daría como resultado así un aumento de los transcriptos tóxicos y a un aumento concomitante en los mutantes en donde no tiene lugar la expresión críptica.

Sorprendentemente, el sistema de replicación inducible parece ser insensible a la toxicidad de las proteínas crípticas. De hecho, en comparación con los sistemas de alto número de copias de la técnica anterior, las colonias bacterianas son un poco más grandes, lo que indica que el huésped bacteriano es menos sensible a proteínas tóxicas eventuales. 15 Más importante aún, no se encuentran colonias muy grandes, que representan plásmidos mutados.

El hallazgo de que el sistema inducible es insensible a las proteínas tóxicas es inesperado. No había indicaciones en la técnica anterior que indicaran que este sistema no sería sensible a proteínas tóxicas (o tal vez que no se producen proteínas tóxicas).

20 Otra desventaja del sistema inducible es inherente a la generación de múltiples copias del BAC. De hecho, los autores del sistema inducible explican que la característica más importante de los clones de BAC es su estabilidad como resultado de su muy bajo número de copias. Wild et al. (2002), citado anteriormente, muestra que el número de copias se puede disminuir aún más mediante la adición de glucosa. Este estado de copia única mejora la estabilidad del mantenimiento de las bibliotecas de BAC al reducir la oportunidad de recombinación intracelular entre clones. Esto demuestra que el sistema inducible publicado por Wild et al. no disminuye los cambios de eventos de recombinación 25 no deseados que ocurren tan pronto como las copias múltiples de un BAC están presentes en una célula huésped. El experto en la técnica entiende que la inducción y el alto número de copias posterior reintroducirán los eventos de recombinación. En consecuencia, el experto en la técnica se abstendría de utilizar tales sistemas para preparaciones de ADN que están destinadas a ser usadas para los fines de vacunación.

30 En la presente invención, los BAC se han amplificado en el sistema ori inducible y el BAC amplificado se ha ensayado para los eventos de recombinación. Contrariamente a lo que se esperaría, los eventos de recombinación son raros.

Además, aparte del ensayo para eventos de recombinación, los BAC amplificados también se han ensayado para la presencia de otras mutaciones. La frecuencia de mutación que se encontró fue muy baja y, además, la fracción de sentido erróneo es sorprendentemente más baja de lo que se esperaba teóricamente. Las mutaciones, si ocurren, son 35 predominantemente sin sentido o mutaciones por desplazamiento del marco que conducen a ARN viral no funcional.

La presente invención permite un aumento significativo de la producción de vacunas de ADN. Por ejemplo, los principales fabricantes de la vacuna viva atenuada contra la fiebre amarilla actualmente no pueden satisfacer las demandas existentes. Con la tecnología de la presente invención, será posible producir vacunas de ADN a costos significativamente más bajos y en cantidades más altas que la actual vacuna viva atenuada, cumpliendo así una necesidad desde hace tiempo.

También para otras enfermedades virales tales como las vacunas contra el JEV, el WNV, el sarampión, la rubéola y el VIH, existe una necesidad de un programa de preparación de vacunas que pueda proporcionar cantidades suficientes de ADN.

45 Un primer aspecto de la invención se refiere a usos de un cromosoma artificial bacteriano (BAC) para la preparación de una vacuna, en donde el BAC comprende:

-una secuencia de ori bacteriana inducible para la amplificación de dicho BAC a más de 10 copias por célula bacteriana, y

-un casete de expresión viral que comprende un ADNc de un genoma de virus de ARN atenuado y que comprende elementos reguladores en cis para la transcripción de dicho ADNc viral en células de mamífero y para el procesamiento 50 del ARN transcripto en un virus de ARN infeccioso.

Las realizaciones de los ADNc de un genoma de virus de ARN atenuado de este primer aspecto de la invención son una construcción de ADNc viral químico de un genoma de virus de ARN, en donde se ha insertado una secuencia de ADN heteróloga o en donde se ha eliminado, truncado o mutado una secuencia viral nativa.

- Las realizaciones del casete de expresión viral de este primer aspecto de la invención comprenden
- un ADNc de un genoma de virus de ARN de cadena positiva,
 - un promotor dirigido por ARN polimerasa que precede al extremo 5' de dicho ADNc para iniciar la transcripción de dicho ADNc, y
- 5 -un elemento para la autoescisión del ARN después del extremo 3' de dicho ADNc para escindir el transcripto de ARN de dicho ADNc viral en una posición establecida.
- Las realizaciones del virus de ARN de cadena positiva de este primer aspecto de la invención son flavivirus, hepatitis, pestivirus, togavirus, picornavirus, coronavirus, hepevirus y calicivirus.
- 10 En una realización típica de este primer aspecto de la invención, el casete de expresión viral comprende un ADNc de un virus de la fiebre amarilla, por ejemplo un ADNc de la vacuna viva atenuada contra el virus de la fiebre amarilla YFV-17D.
- En otras realizaciones, el casete de expresión viral de este primer aspecto de la invención comprende un ADNc de un virus que pertenece al grupo de virus de ARN de cadena negativa, virus de ARN de doble cadena o virus de ARN ambisentido.
- 15 En realizaciones específicas, el cromosoma artificial bacteriano de este primer aspecto de la invención comprende además una secuencia de replicación de manera autónoma en levadura para transportar y mantener dicho cromosoma artificial bacteriano en levadura.
- Un ejemplo de una secuencia ori de levadura es el origen del plásmido de 2 μ o el ARS1 (secuencia de replicación de manera autónoma 1).
- 20 En ciertas realizaciones, el promotor dirigido por ARN polimerasa de este primer aspecto de la invención es un promotor de ARN polimerasa II, tal como el promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV-IE), o el promotor del virus Simian 40.
- En otras realizaciones, el promotor dirigido por ARN polimerasa de este primer aspecto de la invención es un promotor de la ARN polimerasa I o III.
- 25 Unos ejemplos de un elemento para la autoescisión del ARN es el ADNc de la ribozima genómica del virus de la hepatitis delta.
- En una realización particular, el casete de expresión viral de este primer aspecto de la invención comprende un ADNc de la vacuna viva atenuada contra YFV-17D, en donde una o más de las secuencias de ADNc que codifican las proteínas superficiales del virión o están eliminadas, truncadas o mutadas de modo que dicha proteína superficial del virión funcional de YFV-17D no se expresa y en donde se inserta una secuencia de ADNc que codifica una proteína heteróloga en el ADNc de YFV-17D. Un ejemplo de dicha proteína heteróloga es una proteína superficial del virión de un flavivirus.
- 30 Las realizaciones de un casete de expresión viral de este primer aspecto de la invención comprenden un ADNc de la vacuna viva atenuada contra YFV-17D, en donde una o más secuencias de ADNc no relacionadas se insertan para expresarse como una o más proteínas heterólogas dentro de la poliproteína viral.
- En otras realizaciones, el casete de expresión viral de este primer aspecto de la invención comprende un ADNc viral en donde se insertan secuencias de ADNc extrañas para ser expresadas de forma heteróloga por dichos virus recombinantes.
- 35 Un aspecto adicional se refiere a los métodos de preparación que comprenden las etapas de:
- 40 a) proporcionar un huésped bacteriano transfectedo con un BAC como se describe en el primer aspecto y en las diversas realizaciones de las mismas
- b) amplificar el BAC añadiendo un compuesto que activa dicho ori inducible
- c) aislar el BAC amplificado,
- d) formular el BAC en una vacuna.
- 45 Un aspecto adicional se refiere a un BAC como se describe en el primer aspecto y en las diversas realizaciones del mismo para uso como vacuna.
- Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un BAC como se describe en el primer aspecto y en las diversas realizaciones del mismo para uso en la prevención de una infección por virus de ARN.

Un aspecto adicional se refiere a los usos de un BAC como se describe en el primer aspecto y en las diversas realizaciones del mismo como una vacuna viva de ADN.

Un aspecto adicional se refiere a un cromosoma artificial bacteriano (BAC) como se describe en el primer aspecto y en las diversas realizaciones del mismo para la preparación de una vacuna.

5 Descripción detallada de la invención

Leyendas a las figuras

Figura 1. Generación de la serie pShuttleBAC de plasmidos de expresión de virus de ARN. (A) Esquema que muestra la construcción de pShuttleBAC/Pme como construcción de vector de partida. (B) Esquema que muestra la construcción de los vectores de expresión flaviviral derivados de pShuttleBAC/Pme mediante la inserción de los ADNc virales mediante recombinación homóloga entre el promotor de SV40 (SV40p) y la ribozima del HDV (HDrz).

Figura 2. Estabilidad del plásmido mejorada de construcciones pShuttleBAC en *E. coli*. Mapas de plásmidos genéricos que muestran la disposición principal de los plásmidos de ADNc flaviviral de la técnica anterior (A) y la nueva serie de vectores pShuttleBAC (B, DNA-YFVax). Tras la transformación en *E. coli* una sola colonia de cada (A) y (B) se cultivó durante la noche a 37°C y se sembró en placas en medios selectivos. En general, las construcciones de tipo A crecen en tamaños de colonias mucho más pequeños que los del tipo B (Figura 2C y D, respectivamente). Además, las construcciones de tipo A dan lugar a la progenie de un amplio intervalo de tamaños de colonias (histograma para diámetros de colonias normalizados, panel derecho de la figura 2C) indicativo para la selección y segregación de clones de plásmidos mutantes que ocasionalmente hacen que los ADNc sean menos tóxicos para *E. coli*. El análisis clonal identificó múltiples posibles mutaciones subyacentes, que incluye la inserción del transposición en la región viral E/NS1. Por el contrario, los clones de plásmidos que comprenden construcciones de tipo B de la serie pShuttleBAC no se segregan y muestran un tamaño de colonia más homogéneo incluso después del pase repetido en *E. coli* que indica alta estabilidad genética.

Figura 3A. Detección de intermedios replicativos de la replicación del ARN de YFV-17D después de la transfección de células Vero-B con pShuttle/YF17D (tipo silvestre, WT) y su derivado deficiente de replicación pShuttle/YF17DAGDD (AGDD) por transferencia Northern. Los antigenomas orientados antisentido, ARN(-) (panel superior A, 11 kb) y genomas virales orientados al sentido, ARN(+) (panel inferior A, 11 kb), se pudieron detectar 5 días después de la transfección solo en células transfectadas WT. La replicación en curso en presencia de actinomicina D (ACD), un inhibidor de la síntesis de ARN dirigida por ADN, confirma que después de la puesta en marcha inicial de la transcripción del genoma YFV-17D desde pShuttle/YF17D, la replicación viral continúa de manera autónoma en forma de plásmido independiente.

Figura 3B. Detección del tratamiento adecuado del transcripto de ARN de YFV-17D mediante 5'- y 3'-RACE (amplificación rápida de los extremos del ADNc). pShuttle/YF17D pone en marcha la transcripción de los ARN nacientes de YFV-17D (casos en negrita en la figura 3B) que comienzan y terminan con los extremos 5' y 3' adecuados (panel superior e inferior, respectivamente) según lo confirmado por la rápida amplificación de los extremos de ADNc (RACE).

Figura 4A-C. CPE similar inducido por YFV-17D de diferente origen. Los virus YFV-17D derivados de ARN transcrita y bloqueado terminalmente in vitro utilizando pACNR-FLYF17DII como molde (A) o recolectado después de la transfección del ADN plasmídico de pShuttle/YF17D (B) produce un efecto citopático (CPE) inducido por el virus idéntico en células BHK-21 5 días después de la infección (d.d.i.); C, células no infectadas para la comparación.

40 Figura 4D-E. Placa similar de fenotipo de YFV-17D de diferente origen. Los virus YFV-17D derivados de ARN transcrita y bloqueado terminalmente in vitro utilizando pACNR-FLYF17DII como molde (D) o recolectado después de la transfección del ADN plasmídico de pShuttle/YF17D (E) produce un número comparable (5 días d.i. 3×10^5 unidades formadoras de placa (pfu) mL⁻¹ vs 2×10^5 pfu mL⁻¹) e idéntica morfología de las placas (diámetro $6,4 \pm 0,7$ mM frente a $6,1 \pm 1,1$ mM; n=8, valor de p=0,6 mediante la prueba de la t) en células BHK-21.

45 Figura 5. Detección de DENV2 recombinante infeccioso mediante ensayo de inmunofluorescencia (IFA). El DENV2 NGC recombinante producido por las células BHK-21 transfectadas con pShuttle/DV2 muestra infección dependiente de la dosis de las células Vero-B, se visualiza como focos virales por tinción de inmunofluorescencia para la proteína E viral 5 días d.i. (A, sobrenadante no diluido, B, sobrenadante diluido 100 veces, C, células de control no infectadas).

50 Figura 6. Supervivencia de ratones AG129 infectados con Stamaril (cuadrados abiertos) o transfecido con pShuttle/YF17D (cruces). Desafío aproximadamente 10 a 12 días después de la i.p., los ratones (AG129) deficientes en el receptor de interferón tipo I y II comienzan a perder peso y desarrollan un conjunto uniforme de síntomas, concretamente, ondulamiento del pelaje, temblor y parálisis flácida de las extremidades posteriores. Los animales control transfecidos con la variante del plásmido NS5ΔGDD deficiente en su replicación (ΔGDD, círculos abiertos) no muestran patogénesis. Sin embargo, permanecen susceptibles a un segundo desafío con Stamaril® (triángulo relleno) 20 días después de la transfección inicial y luego mueren dentro de un período de tiempo comparable y muestran síntomas similares. Los ADN plasmídicos se transfecaron i.p. utilizando microflores de carbonato de calcio en propilenglicol al 33% como portador.

Figura 7. Morbilidad (A) y detección de ARN de YFV-17D (B) de ratones AG129 infectados. (A) Si se infecta o con Stamaril® o se transfecta con pShuttle/YF17D (pYF17D), los ratones AG129 pierden alrededor del 20% del peso corporal antes de tener que ser sacrificados después de un promedio de 12 a 13 días (MDD, día promedio hasta la muerte). Por el contrario, los ratones transfectados con pShuttle/YF17DΔGDD (ΔGDD) ganan peso, antes de ser desafíados con Stamaril® (ΔGDD + 2º Stamaril) y mueren a causa de la infección por YFV-17D en aproximadamente dos semanas. (B) Se pueden detectar cantidades comparables de ARN de YFV-17D mediante la qRT-PCR en muestras de cerebro de ratones AG129 de (A) recogidas a la muerte.

Figura 8. Mapa de pShuttle/YF17D (construcción sintética #1). Leyenda: SV40p: promotor/origen del virus Simian 40, YFV-17D: vacuna de ADNc contra el virus de la fiebre amarilla cepa 17D, HDVrz: ADNc de ribozima del virus de hepatitis delta; 2μ: S. cerevisiae origen de 2 micras; TRP1: gen TRP1 que confiere crecimiento prototrófico hacia triptófano; parABC: genes de partición del plásmido F; repE: gen repE del plásmido F; oriS: origen del plásmido F; oriV: origen del plásmido RK2; CmR: gen de resistencia al cloranfenicol.

Figura 9. Crecimiento de colonias de E. coli después de la transformación con diferentes vectores de ADNc de YFV-17D. (A) Colonias E. coli EPI-300T después de la transformación con pACNR-FLYF17DII y crecimiento durante 16h a 37°C. Se puede observar una distribución de tamaño de colonias con dos subpoblaciones con diferencias de tamaño mayores, microcolonias (diámetro menor que 0,2mm) y macrocolonias (diámetro alrededor de 0,4mm). Las microcolonias representan la mayoría de las colonias E. coli EPI-300T (B+C) después de la transformación con pShuttle/YFV17D. Siembra en placas sobre placas sin inductor (B) o con L-arabinosa al 0,01% (C) para la inducción de la replicación de alta copia mediada por el origen inducible de alta copia. Los círculos negros grandes son perlas de zirconia de 2,5 mm de diámetro embebidas en el agar para servir como calibradores. Las figuras intercaladas son dibujos lineales esquemáticos que representan los contornos de la colonia observados en cada caso.

Figura 10. Distribución del tamaño de las colonias de E. coli después de la transformación con diferentes vectores de ADNc de YFV-17D. (A) Colonias E. coli EPI-300T después de la transformación con pACNR-FLYF17DII. (B+C) Colonias E. coli EPI-300T después de la transformación con pShuttle/YFV17D. Siembra en placas sobre placas sin inductor (B), o con L-arabinosa al 0,01% (C) para la inducción de la replicación de alta copia mediada por el origen inducible de alta copia.

Figura 11a. Mapa de pShuttle/ChimeriVax-JE. pShuttle/ChimeriVax-JE contiene el siguiente promotor/origen de SV40 de nt 1-481 y 2452-10862 de YFV-17D, en el que se insertan 477-2477 de la vacuna de la cepa neuroatenuada SA14-14-2 del JEV. Los segundos últimos dos últimos aminoácidos del JEV E-ORF se mutan a partir de una histidina a un codón de glicina para generar un sitio Kasl, el NS2A y el NS4B-ORF contienen dos mutaciones adaptativas G4055a y G7349a encontradas en Imojev® que cambia una metionina a valina en el YFV-17D NS2A y una lisina a glutamina en los NS4B-ORF, respectivamente. Las mutaciones silenciosas adicionales generan marcadores de restricción en las posiciones 406 (Xhol), 4009 (BstEII) y 7315 (Nhel).

Figura 11b. Mapa de pShuttle/ChimeriVax-WN. pShuttle/ChimeriVax-WN contiene el siguiente promotor/origen de SV40 de nt 1-481 y 2452-10862 de YFV-17D, en el que se insertan 477-2477 de una cepa neuroatenuada NY-99 de WNV. Los segundos últimos dos últimos aminoácidos del WN E-ORF se mutan a partir de una histidina a un codón de glicina para generar un sitio Kasl, el NS2A y el NS4B-ORF contienen dos mutaciones adaptativas G4055a y G7349a encontradas en Imojev® que cambia una metionina a valina en el YFV-17D NS2A y una lisina a glutamina en los NS4B-ORF, respectivamente. Las mutaciones silenciosas adicionales generan marcadores de restricción en las posiciones 406 (Xhol), 4009 (BstEII) y 7315 (Nhel).

Figura 12. Mapa de pShuttle/EV71. pShuttle/EV71 contiene el ADNc de la cepa BrCr-TR de EV71 (Genbank AB204852.1) insertado entre el promotor/origen de SV40 en su extremo 5' terminal y una repetición larga de polyA de 30 nt de longitud más la ribozima del virus de la hepatitis delta en su extremo 3'.

Figura 13. Representa secuencias con la SEC ID NO 1-7.

45 Definiciones

El término "cromosoma artificial bacteriano (BAC)" se refiere a una construcción de ADN plasmídico utilizado para clonar secuencias de ADN en células bacterianas, tal como E. coli. Normalmente, las secuencias de ADN que van desde 30000 hasta aproximadamente 300000 pares de bases se pueden insertar en un BAC. El BAC, con el ADN insertado, puede ser captado por células bacterianas. A medida que las células bacterianas crecen y se dividen, el ADN del BAC se mantiene de manera estable dentro de las células bacterianas con un número de copias muy bajo por célula bacteriana, preferiblemente que no exceda de 3 copias por célula, tal como en una sola copia por célula. La replicación de un BAC se inicia en una secuencia del origen de replicación (ori), típicamente la secuencia oriS. Esta replicación está estrechamente regulada por los productos génicos, generalmente la repE y/o repF, codificados por el BAC. El BAC codifica además para proteínas, tal como parA, B y C, que dirigen la partición de las copias del BAC a las células hijas durante la división. Normalmente los vectores BAC comprenden además marcadores seleccionables, tales como resistencia a antibióticos o marcadores de enzimas informadoras, tales como lacZ que permite la selección azul-blanco. Un ejemplo de un BAC generalmente utilizado es el pBeloBac11 (Shizuya et al. (1992) Proc. Natl Acad Sci. EE.UU. 89, 8794-8797.) La secuencia de este vector se describió en el GenBank, número de acceso U51113.

pBeloBac11 es un plásmido circular que incluye oriS, el gen repE que produce una proteína que inicia y regula la replicación en oriS y los genes de partición par A, B y C. Para la selección, pBeloBac11 incluye un gen que codifica la resistencia al cloranfenicol. El vector también incluye un gen lacZα que puede deshacerse o eliminarse del vector cuando se clona un inserto en el BAC.

- 5 El término "secuencia de ori bacteriana inducible" se refiere a una secuencia de ori plasmídica que funciona en una célula huésped bacteriana y responde a la(s) proteína(s) mediadora(s) de la amplificación. Preferiblemente, la función de replicación del ori inducible se suprime severamente o no existe en ausencia de dicha(s) proteína(s) mediadora(s) de la amplificación. Además, se prefiere que en presencia de dicha(s) proteína(s) mediadora(s) de la amplificación, el ori inducible amplifique el plásmido a un alto número de copias, preferiblemente a más de 20 copias por célula, más preferiblemente a más de 100, por ejemplo a más de 500 o 1000 copias por célula. Para uso en la presente invención también se prefiere, aunque no es esencial, que el ori inducible responda a una única proteína mediadora de la amplificación.

10 El oriV es particularmente útil para uso como ori bacteriano inducible en la presente invención debido a su amplio intervalo de huéspedes, su conocida capacidad para replicar fragmentos de ADN de 100 kb o más, su alto número de copias y su requerimiento para una sola proteína inductora. Ejemplos de cromosomas artificiales bacterianos que comprenden un oriV inducible son pBeloBAC/oriV (Wild et al. (2002) Genome Res. 12, 1434-1444) y pBAC-LacZ (Addgene plasmid 13422: pBAC-lacZ, Addgene, Cambridge MA, EE.UU.). El plásmido pBAC-lacZ es un mini-F que se puede replicar en cepas habituales de *E. coli*, pero debido a que se mantiene como una única copia de episoma, proporciona bajos rendimientos de ADN. El pBAC-lacZ también contiene un segundo origen de replicación (oriV) con un número de copia mayor que solo está activo en presencia de un factor de acción trans codificado por el gen trfA. La transformación de este plásmido en las células de *E. coli* que expresan trfA a partir de un promotor inducible permiten aumentar el número de copias del plásmido pBAC-lacZ induciendo la expresión de trfA. Las células de *E. coli* TransformMax™ EPI300™ (Epicenter, Madison WI, EE. UU.) contienen un gen trfA mutante inducible cuyo producto génico se requiere para el inicio de la replicación a partir del origen de replicación oriV. La expresión de trfA se puede inducir mediante la adición de L-arabinosa al medio de cultivo, que da como resultado la activación del oriV.

15 "Origen de replicación de levadura" se refiere a una secuencia dentro de un plásmido, tal como un cromosoma artificial bacteriano, que permite la replicación y el mantenimiento de este plásmido en células de levadura. El origen de replicación presente en el plásmido de 2μ (Huberman et al. (1987) Cell 51, 473-481.; Brewer y Fangman (1987) Cell 51, 463-471; Hartley y Donelson (1980) Nature 286, 860-865.) ha demostrado ser un ori adecuado para transportar los cromosomas bacterianos artificiales a la levadura. Se han descrito otros ORIs de levadura adecuadas (Liachko et al. (2013) Genome Res. 23, 698-704, por ejemplo, el ARS1 (secuencia de replicación de manera autónoma 1) y los derivados funcionalmente homólogos de los mismos como se usan en los plásmidos centroméricos de levadura (Ycp) o el origen sintético CEN6/ARSH4 (Frazer y O'Keefe (2007) Yeast. 24, 777-789).

20 "casete de expresión viral" en el contexto de la presente invención se refiere a un ADNc de un genoma de virus de ARN flanqueado por elementos reguladores en cis, que tras la introducción de dicho cromosoma artificial bacteriano en una célula de mamífero favorece la transcripción de dicho ADNc viral y permite el procesamiento del ARN transcritto en ARN viral infeccioso, como se describe con más detalle a continuación.

25 "ARN viral infeccioso" se refiere al ARN viral que, tras la introducción en su huésped mamífero, es suficiente para proporcionar todas las funciones virales requeridas para la replicación viral y la producción de la progenie viral infecciosa. Esto incluye (i) servir como un molde transcripcional para la síntesis de ARN viral y la amplificación del genoma, y (ii) servir como molde translacional para la síntesis de proteínas virales que se requieren para la replicación viral. Otras funciones accesorias tal como, por ejemplo, señuelo de factores de la célula huésped implicados en la respuesta antiviral innata (Moon et al. (2012) ARN. 18, 2029-40. puede que tengan que ser proporcionadas también por el ARN viral infeccioso.

30 "Atenuación" en el contexto de la presente invención se refiere al cambio en la virulencia de un patógeno por el cual la naturaleza nociva de los organismos causantes de enfermedades se debilita (o atenúa); Los patógenos atenuados se pueden utilizar como vacunas vivas. Las vacunas atenuadas se pueden derivar de varias maneras, a partir de organismos vivos que se han debilitado, normalmente del cultivo bajo condiciones subóptimas (también llamadas atenuación), o de la modificación genética, que tiene el efecto de reducir su capacidad de causar enfermedades.

35 En esta memoria se describe un cromosoma artificial bacteriano que comprende una secuencia de ori bacteriana inducible, que en presencia de un estímulo induce la amplificación de dicho cromosoma artificial bacteriano dentro de una célula bacteriana a un alto número de copias, preferiblemente a más de 10 copias por célula, más preferiblemente a más de 100, por ejemplo, a más de 500 o 1000 copias por célula. En general, la amplificación de dicho cromosoma artificial bacteriano como resultado de dicho estímulo no excede más de 10000, por ejemplo, no más de 5000 copias por célula. Un cromosoma artificial bacteriano, como se utiliza en la presente invención, comprende además un casete de expresión viral que comprende un ADNc de un genoma de virus ARN flanqueado por elementos reguladores en cis, que tras la introducción dicho cromosoma artificial bacteriano en una célula de mamífero favorece la transcripción de dicho ADNc viral y permitir el procesamiento del ARN transcritto en ARN viral infeccioso. El ADNc viral comprendido en el casete de expresión viral de un cromosoma artificial bacteriano, como se utiliza en la presente invención, se puede derivar o de un virus que pertenece al grupo de los virus de cadena positiva, los virus de cadena negativa, los

virus de ARN de doble cadena o los virus que usan una estrategia de ARN ambisentido para la replicación. Dicho ADNc viral contenido en el casete de expresión viral puede corresponder o a la de un genoma de virus de ARN de tipo silvestre o ser una construcción de ADNc viral químico en donde se han insertado secuencias de ADN heterólogas y/o se han eliminado secuencias virales nativas. Preferiblemente, dichas secuencias de ADN heterólogas codifican una o más proteínas, que se expresan de forma heteróloga por el virus recombinante después de la introducción en una célula de mamífero de un cromosoma artificial bacteriano que contiene un casete de expresión viral que comprende dicho ADNc viral químico. Opcionalmente, el cromosoma artificial bacteriano, como se utiliza en la presente invención, comprende además una secuencia de replicación de manera autónoma en levadura para transportar y mantener dicho cromosoma artificial bacteriano en levadura. La posibilidad de transportar y mantener el cromosoma artificial bacteriano en una célula de levadura proporciona la ventaja de que es susceptible de manipulación genética tanto en los sistemas genéticos de la levadura como en los bacterianos.

En ausencia de un estímulo del ori inducible, los cromosomas bacterianos artificiales se pueden utilizar para almacenar y clonar de forma estable el ADNc viral infeccioso en un huésped bacteriano, mientras que en presencia de tal estímulo, dicho ADNc se puede amplificar y posteriormente aislarse para ser utilizado. Los cromosomas artificiales bacterianos utilizados en la presente invención son particularmente útiles en el desarrollo, mantenimiento estable y producción de ADNc viral para utilizarse como una vacuna viva contra patógenos virales de ARN. Alternativamente, dichos cromosomas bacterianos artificiales se utilizan para el mantenimiento y propagación de virus nativos o recombinantes a partir de ADNc, por ejemplo, con fines de investigación. Los cromosomas artificiales bacterianos según la presente invención, particularmente aquellos que comprenden un origen de replicación de levadura, tienen la ventaja además de que proporcionan un sistema versátil para diseñar genéticamente el ADNc viral. Esta versatilidad es particularmente importante en los usos de investigación y desarrollo de dichos cromosomas bacterianos artificiales, por ejemplo, en el diseño de una vacuna viva de ADNc contra un patógeno viral de ARN o en investigaciones que apuntan a ilustrar el papel y la función de ciertos productos génicos virales utilizando un enfoque genético inverso.

En caso de que el cromosoma artificial bacteriano, como se utiliza en la presente invención, comprenda un casete de expresión viral que comprende un ADNc de un genoma de virus de ARN de cadena positiva, se prefiere que dicho ADNc viral esté precedido en su extremo 5' por un promotor dirigido por ARN polimerasa, que tras la introducción en una célula de mamífero, se inicia la transcripción del ADNc viral, mientras que en su extremo 3' está seguido preferiblemente por un elemento para la autoescisión del ARN para escindir el transcripto de ARN de dicho ADNc viral en una posición establecida. Juntos, estos elementos reguladores en cis permiten la transcripción y el procesamiento de dicho ADNc viral en ARN viral infeccioso cuando se introduce el cromosoma artificial bacteriano en una célula de mamífero. Preferiblemente, dicho promotor dirigido por ARN polimerasa es un promotor dirigido por ARN polimerasa II, tal como, por ejemplo, el promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV-IE) (Thomsen et al. (1984) Proc. Natl Acad Sci. EE.UU. 81, 659-663), el promotor del virus Simian 40 (Deboist y Chambon (1981) Nature 290, 304-310) o los derivados funcionalmente homólogos de los mismos, tal como el promotor químico CMV-IE/beta-actina de pollo (CAG) (Niwa et al. (1991) Gene 108, 193-199.) o versiones inducibles de dichos promotores de ARN polimerasa II, tal como el promotor mínimo de CMV-IE que lleva un operador de tetraciclina, (Gossen et al. (1995) Science. 268, 1766-1769; Baron y Bujard (2000) Methods Enzymol. 327, 401-421). Alternativamente, dicho promotor dirigido por ARN polimerasa es un promotor de ARN polimerasa I (Russel y Zomerdijk (2006) Biochem. Soc. Simp. 73, 203-216) o de ARN polimerasa III, tal como el promotor U6 o H1. Además, se prefiere que dicho elemento para la autoescisión del ARN sea el ADNc de la ribozima genómica del virus de la hepatitis delta (Chadalavada et al., (2007) RNA 13, 2189-2201) o el ADNc de los elementos de ARN de ribozimas autoescindibles similares al virus de la hepatitis delta funcionalmente homólogos, tal como se describe en Webb y Luptak (2011) RNA Biol. 8, 719-727. Preferiblemente, el ADNc viral de un virus de ARN de cadena positiva contenido en dicho casete de expresión viral se deriva de un virus que pertenece a una cualquiera de las siguientes familias virales: los Flaviviridae, que incluye el virus de la fiebre amarilla y otros flavivirus, los hepacivirus que incluye el virus de la hepatitis C, los pestivirus, que incluye el virus de la diarrea viral bovina y el virus de la peste porcina clásica, los Togaviridae, que incluye el alfavírus, el chikungunya y el rubivirus, el virus de la rubéola, los Picornaviridae, que incluye los enterovirus, tal como poliovirus y rinovirus, y los aftosvirus, los Coronaviridae, que incluye el HCoV-229E, el SARS-CoV, el MERS-CoV (descrito inicialmente como coronavirus Novel 2012/London1_novel CoV 2012) y el coronavirus felino, y los hepevirus, que incluye el virus de la hepatitis E, y los Caliciviridae, que incluye el norwalkvirus y el norovirus. Dicho ADNc viral contenido en el casete de expresión viral puede corresponder o a la de un genoma de virus de ARN de tipo silvestre o puede ser una construcción de ADNc viral químico en donde se han insertado secuencias de ADN heterólogas y/o se han eliminado, truncado o mutado secuencias virales nativas. Preferiblemente, dichas secuencias de ADN heterólogas codifican uno o más péptidos/proteínas, que se expresan de forma heteróloga por el virus recombinante tras la introducción de un cromosoma artificial bacteriano en un mamífero que contiene un casete de expresión viral que comprende dicho ADNc viral químico.

En particular, el cromosoma artificial bacteriano utilizado en la presente invención contiene un casete de expresión viral que comprende el ADNc de la vacuna viva atenuada contra el virus de la fiebre amarilla (YFV)-17D de cadena positiva (Figura 6). Estos cromosomas bacterianos artificiales se pueden utilizar para la clonación estable y la propagación del ADNc de YFV-17D. Además, tales cromosomas bacterianos artificiales pueden servir como una vacuna viva de ADN contra YFV-17D como una alternativa para la vacuna viva atenuada del virus YFV-17D utilizada actualmente (Stamaril® y preparaciones similares como YF-Vax® y otras). Con respecto a la vacuna existente del virus YFV-17D, la vacuna de ADN contra YFV-17D según la presente invención tiene la ventaja de que se puede producir

a un costo menor sin la necesidad de cultivos de células eucariotas o huevos de gallina embrionados. Además, su distribución no requiere una cadena de frío y se puede administrar sin agujas.

Más particularmente, el cromosoma artificial bacteriano utilizado en la presente invención contiene un casete de expresión viral que comprende el ADNc de la vacuna viva atenuada contra YFV-17D en donde se han insertado

- 5 secuencias de ADN heterólogas y/o se han eliminado las secuencias virales nativas. Por ejemplo, con referencia al documento US6962708, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína prM-E en el ADNc de YFV-17D se puede o eliminar, truncar o mutar de modo que la proteína prM-E funcional de YFV-17D no se exprese, mientras que una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de la envoltura viral de un segundo virus diferente, de modo que la proteína de la envoltura viral del segundo virus se expresa a partir del genoma alterado de la vacuna contra YFV-17D.
- 10 Preferiblemente, dicho segundo virus es también un flavivirus, tal como la encefalitis japonesa (JE, p. ej., JE SA14-14-2), Dengue (DEN, p. ej., cualquiera de los tipos 1-4 de Dengue; p. ej., la cepa PUO-218 de Dengue-2) (Gruenberg et al. (1988) J. Gen. Virol. 67, 1391-1398.), encefalitis del Valle del Murray (MVE), encefalitis de San Luis (SLE), Nilo Occidental (WN), encefalitis transmitida por garrapatas (TBE) (es decir, encefalitis centroeuropea (CEE) y encefalitis rusa de primavera-verano (RSSE)), y virus de la hepatitis C (VHC). Los flavivirus adicionales para uso como segundos
- 15 flavivirus incluyen el virus Kunjin, el virus Powassan, el virus de la enfermedad de la selva de Kyasanur, el virus Zika, el virus Usutu y el virus de la fiebre hemorrágica de Omsk. La introducción de dicho cromosoma artificial bacteriano que comprende un ADNc químérico de YFV-17D en una célula de mamífero da como resultado la producción de un virus químérico compuesto por los genes y productos génicos responsables de la replicación intracelular que pertenece a YFV-17D y los genes y productos génicos de la cubierta del segundo virus. Dado que la envoltura viral contiene
- 20 determinantes antigenicos responsables de inducir anticuerpos neutralizantes, el resultado de la infección con el virus químérico es que se generan dichos anticuerpos contra el segundo virus. Alternativamente, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína prM-E y/o NS1 en el ADNc de YFV-17D se puede o eliminar, truncar o mutar de modo que la proteína funcional prM-E y/o NS1 de la YFV-17D no se exprese como tal, mientras una secuencia de nucleótidos que codifica para un péptido/proteína que contiene un epítopo/antígeno específico de manera que dicha
- 25 proteína se exprese desde el genoma alterado de la vacuna contra YFV-17D. Alternativamente, los ADNc que codifican proteínas heterólogas se pueden insertar en otras posiciones en el ADNc de YFV-17D dentro del cromosoma artificial bacteriano utilizado en la presente invención, tal como las inserciones entre los genes E y NS1 (Bonaldo et al. (2007) Virol. J. 4, 115.), inserción en el gen C (Jones et al. (2005) Virology 331, 247-259.; Schoggings et al. (2012) Proc. Natl Acad Sci. EE.UU. 109, 14610-14615) o las regiones no traducidas del ADNc de YFV-17D (Jones et al. (2005) citada
- 30 anteriormente). Preferiblemente, dicha proteína que contiene epítopo/antígeno es un antígeno tumoral, o un antígeno de origen vírico, bacteriano o patógeno parasitario. La introducción de dicho cromosoma artificial bacteriano que comprende un ADNc de YFV-17D químérico en una célula de mamífero da como resultado la producción de un virus químérico compuesto por los genes y productos génicos responsables de la replicación intracelular que pertenece a YFV-17D y un gen y producto genético de dicho epítopo/proteína que contiene antígeno. Dado que la envoltura viral
- 35 contiene determinantes antigenicos responsables de inducir anticuerpos neutralizantes, el resultado de la infección con el virus químérico es que dichos anticuerpos se generan contra dicho epítopo/proteína que contiene antígeno.

En caso de que el cromosoma artificial bacteriano utilizado en la presente invención comprenda un casete de expresión viral que comprenda un ADNc de un genoma de virus de ARN de cadena negativa, la construcción como se describió previamente para virus de ARN de cadena positiva tiene que ser modificado en una forma que el ADNc viral genómico

- 40 esté presente en su orientación sentido (antigenómica) con respecto a los elementos cis que impulsan su expresión (Radecke et al. (1995) EMBO J. 14, 5773-5784), y que además comprende el ADNc en orientación sentido que codifica los productos génicos virales en orientación sentido que junto con el ARN viral forman parte del complejo de replicasa viral necesario para el rescate de la replicación de ARN viral. Estos ADNc están flanqueados por los elementos reguladores cis requeridos para expresar estos productos génicos virales que construyen el complejo de replicasa viral a partir del plásmido. En el caso de los virus de ARN de cadena negativa no segmentados (Conzelmann (1998) Annu. Rev. Genet. 32, 123-162) estos productos génicos virales son las proteínas N (NP), P y L. La expresión del ADNc antigenómico del genoma de ARN de cadena negativa puede ser dirigida o por los promotores de ARN polimerasa I o II (Martin et al., (2006) J. Virol. 80, 5708-5715; mientras que el casete de expresión para las proteínas virales que forman el complejo de la replicasa viral puede ser o policistrónico como se encuentra de forma natural en los propios virus o monocistrónico empleando un conjunto de diferentes promotores de la ARN polimerasa (Morita et al. (2012) Biotechniques 0, 1-5) para la expresión equilibrada de cada componente de la replicasa. El rescate del virus de ARN de cadena negativa con genomas de ARN segmentados de un cromosoma artificial bacteriano según la presente invención requiere modificación con respecto al sistema como se describe para virus de ARN de cadena negativa con genomas de ARN no segmentados; más particularmente necesitan ser incorporadas unas casetes de expresión para
- 50 cada segmento del genoma (Neumann y Kawaoka (2004) Curr. Top. Microbiol. Immunol. 283, 43-60) impulsadas por los promotores apropiados de ARN polimerasa I y II (Fodor et al. (1999) J. Virol. 73, 9679-9682). Debido a la capacidad limitada del vector de los sistemas de vectores de plásmidos utilizados para este propósito según la técnica anterior, todas las funciones requeridas para el rescate de tales virus tienen que proporcionarse en la técnica anterior mediante cotransfección de varios plásmidos, por ejemplo para el rescate de virus influenza utilizando hasta 8 o 12 plásmidos se describió anteriormente en Hoffmann et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 99, 11411-11416 y Fodor et al. 1999 respectivamente (citado anteriormente). La alta capacidad del vector de los cromosomas bacterianos artificiales para contener grandes insertos, permite expresar genomas de virus de ARN de cadena negativa o segmentos de genoma más secuencias codificantes de proteínas virales adicionales de un solo cromosoma artificial bacteriano de una manera similar a la de los genomas de virus de cadena positiva.
- 55
- 60

Preferiblemente, dicho ADNc viral de un virus de ARN de cadena negativa contenido en dicho casete de expresión viral y los cassetes de expresión adicionales necesarios para el rescate de la replicación viral se derivan de un virus que pertenece a una cualquiera de las siguientes familias virales: Orthomyxoviridae, que incluye los virus de influenza A, B y C, y los paramixovirus, que incluye el virus del sarampión, el virus de las paperas y el virus sincitial respiratorio.

5 Dicho ADNc viral contenido en el casete de expresión viral puede corresponder o a la de un genoma de virus de ARN de tipo silvestre o puede ser una construcción de ADNc viral químico en donde se hayan insertado secuencias de ADN heterólogas y/o se hayan eliminado, truncado o mutado secuencias virales nativas. Preferiblemente, dichas secuencias de ADN heterólogas codifican uno o más péptidos/proteínas, que se expresan de forma heteróloga por el virus recombinante tras la introducción de un cromosoma artificial bacteriano en un mamífero utilizado en la presente invención que contiene un casete de expresión viral que comprende dicho ADNc viral químico.

10 En caso de que el cromosoma artificial bacteriano utilizado en la presente invención comprenda un casete de expresión viral que comprenda los ADNc de un genoma de virus de ARN de doble cadena, la construcción se debe modificar de tal manera que todos los segmentos de genoma de ARN viral necesarios para el rescate de la replicación de ARN viral como se describe en Boyce et al. (2008) J. Virol. 82, 8339-8348), es decir, los 10 ARNs en el caso del virus de la lengua azul, se pueden expresar a partir de los promotores de ARN polimerasa II, que permiten el procesamiento adecuado, principalmente el bloqueo terminal, de los transcritos nacientes. Alternativamente, se pueden utilizar para este propósito promotores de ARN polimerasa I y III. Preferiblemente, dicho ADNc viral de un virus de ARN de doble cadena contenido en dichos cassetes de expresión viral se deriva de un virus que pertenece a una cualquiera de las siguientes familias virales de los Reoviridae, que incluye reovirus, rotavirus y virus de la lengua azul. Dichos ADNc virales contenidos en el casete de expresión viral pueden o corresponder a los de un genoma de virus de ARN de tipo silvestre o ser una construcción de ADNc viral químico en donde se han insertado secuencias de ADN heterólogas y/o se han eliminado, truncado o mutado secuencias virales nativas. Preferiblemente, dichas secuencias de ADN heterólogas codifican uno o más péptidos/proteínas, que se expresan de forma heteróloga por el virus recombinante tras la introducción de un cromosoma artificial bacteriano en un mamífero utilizado en la presente invención que contiene un casete de expresión viral que comprende dicho ADNc viral químico.

15 En caso de que el cromosoma artificial bacteriano utilizado en la presente invención comprenda un casete de expresión viral que comprenda un ADNc de un virus que utiliza una estrategia de ARN ambisentido para la replicación, la construcción tiene que ser modificada en una forma que todos los segmentos del genoma de ARN viral necesarios para el rescate de la replicación del ARN viral como se describe (Lowen et al. (2004) Virology 330, 493-500.), se expresan a partir de los promotores de la ARN polimerasa I o II. Preferiblemente, dicho ADNc viral de un virus que utiliza una estrategia de ARN ambisentido para la replicación contenida en dicho casete de expresión viral se deriva de un virus que pertenece a una cualquiera de las siguientes familias virales, los Bunyaviridae, que incluye el virus de la fiebre del Valle del Rift, el virus Hantaan y el virus Schmallenberg, y los Arenaviridae que incluye el virus Lassa. Dicho ADNc viral contenido en el casete de expresión viral puede corresponder o a la de un genoma de virus de ARN de tipo silvestre o puede ser una construcción de ADNc viral químico en donde se han insertado secuencias de ADN heterólogas y/o se han eliminado, truncado o mutado secuencias virales nativas. Preferiblemente, dichas secuencias de ADN heterólogas codifican uno o más péptidos/proteínas, que se expresan de forma heteróloga por el virus recombinante tras la introducción de un cromosoma artificial bacteriano en un mamífero que contiene cassetes de expresión viral que comprenden dicho ADNc viral químico.

20 40 Como se describió anteriormente y como se ilustró por los ejemplos, la presente invención permite generar altas cantidades de ADNc viral de una calidad suficientemente alta para ser usada en vacunas de ADN.

25 45 La formulación de ADN en una preparación de vacuna es conocida en la técnica y se describe en detalle, por ejemplo, en el capítulo 6 al 10 de "DNA Vaccines" "Methods in Molecular Medicine Vol 127, (2006) Springer Saltzman, Shen y Brandsma (Eds.) Humana Press. Totowa, N.J. y en el capítulo 61 de Alternative vaccine delivery methods, páginas 1200-1231, of Vaccines (6^a edición) (2013) (Plotkin et al. Eds.). Los detalles sobre el portador aceptable, diluyentes, excipientes y adyuvantes adecuados en la preparación de vacunas de ADN también se pueden encontrar en el documento WO2005042014, como se indica a continuación.

"Portador, diluyente o excipiente aceptable" se refiere a una sustancia adicional que es aceptable para uso en medicina humana y/o veterinaria, con atención particular a la inmunoterapia.

50 55 60 A modo de ejemplo, un portador, diluyente o excipiente aceptable puede ser una carga sólida o líquida, diluyente o sustancia de encapsulación que se puede utilizar de manera segura en la administración sistémica o tópica. Dependiendo de la vía de administración particular, se pueden utilizar una variedad de portadores, bien conocidos en la técnica. Estos portadores se pueden seleccionar de un grupo que incluye azúcares, almidones, celulosa y sus derivados, malta, gelatina, talco, sulfato de calcio, aceites vegetales, aceites sintéticos, polioles, ácido algínico, disoluciones tamponadas con fosfato, emulsionantes, solución salina isotónica y sales tales como, sales de ácidos minerales que incluyen hidrocloruros, bromuros y sulfatos, ácidos orgánicos tal como acetatos, propionatos y malonatos y agua libre de pirógenos.

Una referencia útil que describe los portadores, diluyentes y excipientes farmacéuticamente aceptables es Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co. N. J. USA, 1991) que se incorpora en la presente memoria como referencia.

Se puede emplear cualquier vía segura de administración para proporcionar a un paciente la vacuna de ADN. Por ejemplo, se puede emplear la vía oral, rectal, parenteral, sublingual, bucal, intravenosa, intraarticular, intramuscular, intradérmica, subcutánea, inhalatoria, intraocular, intraperitoneal, intracerebroventricular, transdérmica y similares. La inyección intramuscular y subcutánea puede ser apropiada, por ejemplo, para la administración de composiciones inmunoterapéuticas, vacunas proteináceas y vacunas de ácido nucleico. También se contempla que el bombardeo de micropartículas o la electroporación pueden ser particularmente útiles para la administración de vacunas de ácido nucleico.

Las formas de dosificación incluyen comprimidos, dispersiones, suspensiones, inyecciones, soluciones, jarabes, trociscos, cápsulas, supositorios, aerosoles, parches transdérmicos y similares. Estas formas de dosificación también pueden incluir inyectar o implantar dispositivos de liberación controlada diseñados específicamente para este propósito u otras formas de implantes modificados para actuar adicionalmente de esta manera. La liberación controlada del agente terapéutico se puede efectuar recubriendo el mismo, por ejemplo, con polímeros hidrófobos que incluyen resinas acrílicas, ceras, alcoholes alifáticos superiores, ácidos polilácticos y poliglicólicos y ciertos derivados de celulosa, tal como la hidroxipropilmetylcelulosa. Además, la liberación controlada se puede efectuar utilizando otras matrices de polímeros, liposomas y/o microesferas.

Las vacunas de ADN adecuadas para administración oral o parenteral se pueden presentar como unidades discretas, tal como cápsulas, sobres o comprimidos, cada una contiene una cantidad predeterminada de ADN plasmídico, como un polvo o gránulos o como una disolución o suspensión en un líquido acuoso, un líquido no acuoso, una emulsión de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite. Dichas composiciones se pueden preparar por cualquiera de los métodos de farmacia, pero todos los métodos incluyen la etapa de asociar uno o más agentes como se describió anteriormente con el portador que constituye uno o más ingredientes necesarios. En general, las composiciones se preparan mezclando de manera uniforme e íntima los plásmidos de ADN con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos, y luego, si es necesario, se da forma al producto en la presentación deseada.

Las composiciones anteriores se pueden administrar de una manera compatible con la formulación de dosificación, y en tal cantidad que sea efectiva. La dosis administrada a un paciente debe ser suficiente para efectuar una respuesta beneficiosa en un paciente durante un período de tiempo apropiado. La cantidad de agente(s) a administrar puede depender del sujeto a tratar, incluida la edad, el sexo, el peso y el estado general de salud del mismo, factores que dependerán del juicio del profesional.

Normalmente, las vacunas de ADN se usan para la inmunización profiláctica o terapéutica de seres humanos, pero para ciertos virus se pueden aplicar también en animales vertebrados (normalmente mamíferos, aves y peces), incluidos animales domésticos tal como el ganado y animales de compañía. Se considera la vacunación de animales que son un reservorio vivo de virus (zoonosis) tal como monos, ratones, ratas, aves y murciélagos.

Las vacunas pueden incluir un adyuvante, es decir, una o más sustancias que mejoran la inmunogenicidad y/o la eficacia de una composición de vacuna. Sin embargo, las vacunas vivas se pueden dañar eventualmente por los adyuvantes que pueden estimular inmediatamente la respuesta inmune innata de la replicación viral. Ejemplos no limitantes de adyuvantes adecuados incluyen escualano y escualeno (u otros aceites de origen animal); copolímeros de bloque; detergentes tales como Tween-80; Quill A, aceites minerales tales como Drakeol o Marcol, aceites vegetales tales como aceite de cacahuete; adyuvantes derivados de Corynebacterium tales como el Corynebacterium parvum; adyuvantes derivados del Propionibacterium tales como el Propionibacterium acne; el Mycobacterium bovis (bacilo de Calmette y Guerin o BCG); interleucinas tales como interleucina 2 e interleucina 12; monocinas tales como la interleucina 1; factor de necrosis tumoral; interferones tales como el gamma-interferón; combinaciones tales como saponina-hidróxido de aluminio o Quil A-hidróxido de aluminio; liposomas; ISCOMt) y adyuvante ISCOMATRIX (B); extracto de pared celular micobacteriana; glicopéptidos sintéticos tales como dipéptidos de muramilo u otros derivados; avridina; derivados del lípido A; sulfato de dextrano; DEAE-Dextrano o con fosfato de aluminio; carboxipolimetileno tal como Carbopol'EMA; emulsiones de copolímero acrílico tales como Neocryl A640; vacunas o proteínas de poxvirus animales; adyuvantes de partículas subvirales-iricas, tales como la toxina del cólera, o mezclas de los mismos.

La presente invención se ilustra además por medio de los siguientes ejemplos:

Ejemplos

Ejemplo 1: Animales, virus, células, bacterias y levaduras utilizados en el trabajo experimental presentado en los Ejemplos 2 y 3

Animales

Se criaron en casa ratones 129/Sv con desactivación de ambos receptores de interferón tipo I y II (ratones AG129; B&K Universal Ltd/UK).

Virus y células

Se obtuvieron de ATCC células Vero-B (riñón de mono verde africano; American Type Culture Collection (ATCC) CCL-81) y BHK-21 (células de riñón de hámster bebé; ATCC CCL-10). Todas las células se cultivaron esencialmente como

se describe (De Burghgraeve et al. (2012) PLoS ONE 7, e37244). Se adquirió la vacuna contra el virus de la fiebre amarilla cepa 17D (Stamaril®) de Sanofi Pasteur MSD, Bruselas, Bélgica.

Bacterias y levaduras

Las cepas bacterianas utilizadas para la clonación y propagación de rutina de pShuttle-BAC fueron E. coli Top 10 (Invitrogen) y Epi300-T (Epicenter), respectivamente. Las bacterias transformadas con plásmidos de ADNC de flavivirus de longitud completa pACNR-FL17DII, pACNR-DENV2 y p4 (véase a continuación) se cultivaron habitualmente a 28°C y los rendimientos de ADN plasmídico aumentaron por amplificación con cloranfenicol. El plásmido Shuttle que contenía células Epi-300T se cultivó a 37°C y se amplificó como se describe a continuación. Se cultivó la cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* YPH500 (genotipo: MAT α ura3-52 lys2-801_amber ade2-101_ochre trp1- Δ63 his3-Δ200 leu2-Δ1) en medios selectivos de Difco-BD Biosciences y Sigma-Aldrich. La transformación de células de levadura competentes se llevó a cabo utilizando el método del acetato de litio, y las levaduras se cultivaron a 28°C.

Los cebadores que se utilizan en la sección experimental se muestran a continuación:

Tabla 1: lista de cebadores

#	Nombre del cebador	Secuencia 5' a 3'	SEQ ID NO:
16	mRFP(+)_Age/BstX/NcoKozak	ATCCACCGGTCCACAACCAtggcctccgaggac	8
17	m RFP(-)_Not/Xba	TGATCTAGAGTCGCAGGCCGCTTAggcgccggtggagtg	9
55	YF17D(-)10862	AGTFFTTTFTFTTFTCATCC	10
109	YF3'-HDrz5'(+)	GGATGACAAACACAAAACCActGGCCGGCATGGTCCCAGCCTCCTCGCTGG	11
110	HDrzMiddle(+)	GGTCCCAGCCTCCTCGCTGGCGCCGGCTGGCACACATTCCGAGGGG	12
111	HDrz3'(-)	GTCCTTCATTGCCATTACCGAGGGGACGGTCCCCTCGGAATGTTGCC	13
173	YF17D(+)1_SP6_Xm a/Not	CCCGGGCGGCCGCGcatacgattttagtgacaatagAGTAAATCCTGTGCTAATTG	14
194	Trp1(+)_Nsi/Not/Sal	atgcattgcggccgcgtcgacGGTCGAAAAAAGAAAGGAG	15
195	2micron(+)_Nsi/Ngo M4/R1	Atgcattgcggccgaattctgaaccagtccctaaaacgag	16
231	DENV2(+)1_T7_Xma/Not_tataGGGAGTT	ccggggccgcctaatacgactcactataGGGAGTTGTTAGTCTACGTGG	17
334	pBABEfwd	Accccgcctcaatcctc	18
391	YF17D(+)10627	GGTTTCTGGACCTCCCACCCCAGAGT	19
393	miRNA Cloning Linker 1	/5rApp/CTGTAGGCACCATCAAT/3ddC/	20
394	Linker1_reverse/Nhe/Sal	gtcgacgctagcGATTGATGGTGCCTACAG	21
425	HDrz_BstE_Hygro(-)	GGAGGCTGGGACCATGCCGGCCaGGTcACCqgtaqcttgcgtccggca	22
426	Hygro_BstE_HDrz	tgcggatcaagagctaccGGTgACCTGGCCGGCATGGTCCCAGCCTCC	23

ES 2 718 187 T3

453	SV40(+-)76	Ctccgcccagttccgcccattctccggcccatggctga ctaatttttttatgtcag	24
454	SV40/YF17D(+)1	gactaattttttatgtcagaggccgaggccgc cAGTAAATCCTGTGTGCTAAT	25
455	SV40/DV2(+)1	gactaattttttatgtcagaggccgaggccgc cAGTTGTTAGTCTACGTGGAC	26
456	HDrz(-)5'	CCCTCGGAATGTTGCCAGCCGGGCCA GCGAGGAGGCTGGGACCATGCCGGCCa	27
457	YF17D(-)10862_HDrz	GAGGCTGGGACCATGCCGGCCaGTGGTT TTGTGTTGTCAATCC	28
458	DV2(-)10724_HDrz	GAGGCTGGGACCATGCCGGCCaAACCT GTTGATTCAACAGCACC	29
474	SV40(-)_HDrz/Pme	CGAGGAGGCTGGGACCATGCCGGCCaGG TCACCqtttaaacGCCqaggccgcctcgcc	30
475	HDrz(+)_Sfi/Pme/BstE	ttatgcagaggccgaggccgc cGGTGACCTGGCCGGCATGGTCCC	31
552	SV40(-)-1	Gaggcggcctcgcccttgca	32
553	HDrz(+)5'	tGCCGGCATGGTCCCAGCCT	33
856	SV40/DV4(+)1	gactaattttttatgtcagaggccgaggccgc cAGTTGTTAGTCTGTGGAC	34
857	DV4(-)10649_HDrz	GAGGCTGGGACCATGCCGGCCaAACCT GTTGGATCAACAACACC	35
946	HA-tag_H1(-)	ttaTGCATAGTCAGGCACGT ggatcc	36
947	YF17D(+)7637_T7p	TCGACTAATACGACTCACTATAGGGggagc gcqaatggaaaaac	37
948	YF17D(-)8136_Sp6p	CGCGCATA tatcaagaactctcacgg	38
208		AGTAAATCCTGTGTGCTAATT	39
94		GGCAATCACGACTCGTTGCG	40
953		AGATGGTATCTCATATTTAGAG	41
954		ACATTTGCTTGGTCCCTGTCT	42
453	SV40(+-)76	ctccgcccagttccgcccattctccggcccat ggctgactaattttttatgtcag	43
988	SV40/hRV14(+)1	gactaattttttatgtcagaggccgaggccgc cTTAAAACAGCGGATGGGT	44
989	hRV14pA(-)7214_30xA_HDrz	GAGGCTGGGACCATGCCGGCCtttttttt tttttttttttttttATAAACTCC	45
991	SV40/EV71(+)1	gactaattttttatgtcagaggccgaggccgc cTTAAAACAGCCTGTGGGT	46
992	EV71 pA(-)7408_30xA_HDrz	GAGGCTGGGACCATGCCGGCCtttttttt ttttttttttttttt	47

		ttttttttttttttttGCTATTCTG	
990	HDrz(-)5'#2	CCCTCGGAATGTTGCCAGCCGGGCCA GCGAGGAGGCTGGGACCATGCCGGCC	48

Ejemplo 2: Producción de cromosomas artificiales bacterianos que contienen ADNc viral de YFV-17D, fiebre del dengue tipo 2 (DENV2) y fiebre del dengue tipo 4 (Denv4), respectivamente

Los cromosomas artificiales bacterianos que contienen ADNc viral de YFV-17D, fiebre del dengue tipo 2 (DENV2) y fiebre del dengue tipo 4 (Denv4).se prepararon respectivamente como se describe a continuación.

Material y métodos

Construcciones de plásmidos (cromosomas bacterianos artificiales)

Se generaron todos las construcciones de plásmidos mediante técnicas estándar y se confirmaron mediante secuenciación de Sanger. Se generó el vector lanzadera inducible pShuttleBAC/Pme en varias etapas como sigue (Figura 1). Primero, el gen lacZ presente en pBAC/LacZ (plásmido Addgene #13422), un derivado del pBeloBAC/oriV inducible por arabinosa (Wild et al. (2002) Genome Res. 12, 1434-1444), se reemplazó por un casete de ADN sintético que contenía (i) el promotor/origen del virus Simian 40 (SV40) (SEQ ID 1) que impulsa el gen hph que confiere resistencia a la higromicina B, (ii) el ADNc sintético de la ribozima genómica del virus de la hepatitis delta (HDrz) (Chadalavada et al. (2007) RNA 13, 2189-2201) (SEC ID NO 2), y (iii) la Saccharomyces cerevisiae origen del plásmido episomal de 2μ y (iv) gen TRP1 que confiere crecimiento prototrófico para triptófano. El bloque de construcción (i) se amplificó por PCR a partir de pBABE-hygro (Morgenstern et al. (1990) Nucleic Acids Res. 18, 3587-3996; plásmido Addgene #1765) utilizando los cebadores #334 y #425. Se amplificó el bloque de construcción (ii-iv) por PCR a partir de pJet(-)/Trp1_2micron-YF3'_HDrz_BstE utilizando los cebadores #426 y #231. El plásmido pJet(-)/Trp1_2micron-YF3'_HDrz_BstE es un derivado de pJet1.2/blunt (CloneJET PCR cloning kit, Fermentas) que contiene una fusión del extremo 3' del ADNc de YFV-17D (que comprende los nt virales 9466 a 10862) a (ii) el HDrz (ensamblado a partir de los nucleótidos de ADN #109, 110 y 111) y las secuencias 2μ-TRP1 (iii+iv) que originalmente se derivaron de pRE637 (Esteban & Fujimura, (2003) Proc. Natl Acad Sci. EE.UU. 100, 2568-2573) que utiliza los cebadores de PCR #194 y #195. El bloque de construcción (i) se fusionó a (ii-iv) por PCR de extensión solapada antes de la clonación en los sitios SalI de pBAC/LacZ para dar lugar a la construcción intermedia pShuttleBAC/SV40_Hygro_HDrz. Posteriormente, el elemento de relleno de genes hph se reemplazó a partir de pShuttleBAC/SV40_Hygro_HDrz para un sitio de clonación múltiple (Sliyo-Pmel-PrimerEII) en el vector lanzadera final pShuttleBAC/Pme (Figura 1A) mediante una PCR invertida que abarca el plásmido completo utilizando los cebadores #474 y #475 y la recircularización mediante la ADN ligasa de T4 antes de la transformación y clonación en E. coli.

Las construcciones de expresión de los virus pShuttle/YF17D, pShuttle/DV2 y pShuttle/DV4 se generaron al pegar los ADNc de YFV-17D (SEQ ID NO 3), la cepa Nueva Guinea-C del DENV2 (NGC) y la cepa Dominica del DENV4, respectivamente, en pShuttleBAC/Pme por recombinación homóloga en S. cerevisiae (Figura 1B). Con ese fin, los ADNc virales se amplificaron mediante tres rondas de PCR que introducían extensiones terminales que contenían los -76 pb del promotor/origen SV40 (Ghosh et al. (1981) Proc. Natl Acad Sci. EE.UU. 78, 100-104) en sus extremos 5' y la secuencia HDrz de 86 nt (Chadalavada et al., (2007) RNA 13, 2189-2201) en sus extremos 3'. La primera PCR (10 ciclos) utilizó combinaciones de cebadores específicos para virus #454 más #457, #455 más #458 y #856 más #857, respectivamente, seguidos de 10 ciclos cada uno utilizando el SV40 y HDrz específico #453 más #456, y finalmente los cebadores #453 más #111. Los respectivos moldes de ADNc viral fueron pACNR-FLYF1DII (Bredenbeek). et al. (2003) citado anteriormente), pACNR-DENV2 y p4 (Durbin et al. (2001) Am J Trop Med Hyg. 65, 405-413). El plásmido pACNR-DENV2 es un derivado de pACNR-FLYF17D en donde la secuencia YFV-17D se reemplazó por el ADNc de NGC del DENV2 derivado del pDVWS601 (Gualano et al. (1998) Gen. Virol. 79, 437-446), sin embargo contiene sitios Age y BstEII de traducción silenciosa extras en las posiciones nt 7537 y 10232 del genoma viral, respectivamente. La parte del vector linealizado necesaria para la recombinación se realizó mediante una PCR invertida en pShuttleBAC/Pme que se prelinealizó con Pmel utilizando los cebadores #552 más #553. Los vectores amplicones se trataron con DpnI antes de la purificación en gel y la transformación en levadura YPH500 para reducir la transferencia de la forma de fondo un molde de plásmido posiblemente sin cortar. Se cultivaron los clones de levadura en ausencia de triptófano para seleccionar plásmidos lanzadera recombinantes. Los ADN plasmídicos recuperados de las minipreparaciones de levadura se transfirieron a las células de E. coli Epi300-T (Epicenter) y se amplificaron, como se describe (Wild et al. (2000) citado anteriormente), mediante la adición de 0,1% (p/v) de L-arabinosa a los cultivos durante la noche diluidos 6 veces en medio LB fresco (complementado con cloruro de magnesio 20mM) y crecimiento durante 6 horas a 37°C con agitación vigorosa.

Se generó por recombinación homóloga una variante de YFV-17D que contenía una mutación letal no convertible en su ORF NS5 (RdRp ΔGDD) de una longitud de 3,6kb, BglII-PstI, fragmento de restricción I derivado del plásmido episomal de levadura (YEpl) p404Gal1/HA-NS5ΔGDD_ura3 que comprendía un ADNc de YFV-17D mutado de forma apropiada nt 9294 cadena abajo en pShuttle/YF17D linealizado por Clal (nt 9656 cadena abajo de YFV-17D) y KasI (cadena arriba del HDrz, posición nt +27) para producir pShuttle/YF17DAGDD.

Resultados

Una serie de construcciones de ADN sintético (serie pShuttleBAC) se ha ensamblado a partir de varios bloques de construcción de ADN para servir como plásmidos de expresión de virus de ARN (Figura 1). La construcción vectorial común pShuttleBAC/Pme es un cromosoma artificial bacteriano que contiene un segundo origen (oriV) para la amplificación condicional en *E. coli*, y un origen de levadura de 2 μ y un marcador auxotrópico TRP1 para la replicación episomal en *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 1A). Se insertó el ADNc de la vacuna contra YFV-17D para producir pShuttle/YF17D mediante homólogo entre el promotor de SV40 y la ribozima del HDV presente en pShuttleBAC/Pme (Figura 1B). Se muestra el mapa de pShuttle/YF17D en la Figura 8 (SEQ ID NO 4). Se han insertado también los ADNc de otros flavivirus. En contraste con los clones de ADNc flaviviral de la técnica anterior, tales como pACNR-FLYF17DII, pShuttle/YF17D muestran una estabilidad genética superior en *E. coli* (Figura 2), sin embargo, se puede inducir a producir altos rendimientos de ADN plasmídico.

Ejemplo 3: Caracterización in vitro e in vivo del cromosoma artificial bacteriano que comprende el ADNc de la vacuna contra YFV-17D

Se encontró que las características de YFV-17D expresadas a partir de un cromosoma artificial bacteriano son idénticas a las del virus de la vacuna original (tal como la eficacia de la replicación, el rendimiento del virus y el fenotipo de la placa). Además, cuando este ADN de plásmido de YFV-17D desnudo se injectó i.p. en ratones AG129, dió como resultado la misma patología, morbilidad y mortalidad que el virus parental. Este sistema conveniente, robusto y reproducible proporciona una vacuna de ADN para YFV a bajos costos sin la necesidad de cultivos de células eucariotas o huevos de gallina embrionados. Ya no requerirá una cadena de frío y se puede administrar sin agujas.

20 Material y métodos

Transcripción in vitro, bloqueo terminal in vitro y electroporación

El plásmido pACNR-FLYF17DII (Bredenbeek et al. (2003) J. Gen. Virol. 84, 1261-1268) que contenía el ADNc de YFV-17D de longitud completa se linealizó con Afill y se purificó por digestión con proteinasa K, extracción con fenol-cloroformo y precipitación con etanol. Alternativamente, se realizaron los moldes de ADNc de longitud completa para la transcripción in vitro (IVT) por PCR de pACNR-FLYF17DII utilizando los cebadores #173 y #55 y la ADN polimerasa de alta fidelidad KAPA para superar los rendimientos limitados de plásmidos. Se produjeron transcriptos de ARN carrera (run-off) in vitro mediante el uso de la ARN polimerasa Sp6 (kit de producción de ARN de gran escala Ribomax, Promega). Los transcriptos se bloquearon terminalmente utilizando la transferasa de la 7-metilguanosina del virus vaccinia purificado (sistema de bloqueo terminal, Scriptcap 7mG, Epicenter) y se usaron para la electroporación de células BHK-21 que utiliza un exceso de ARN total extraído de células BHK-21 como ARN portador. El medio de cultivo celular se recolectó en el momento en que las células transfectadas mostraron una citopatogenicidad casi completa. El medio se eliminó de los residuos de la célula mediante centrifugación y posteriormente se utilizó para preparar reservas de virus en células BHK-21.

Transfección de plásmidos

Las células Vero-B se sembraron en un medio que contenía un 10% de suero de ternera fetal en placas de 6 pocillos hasta una confluencia del 70% y se transfecaron al día siguiente con 2,5 μ g de ADN plasmídico utilizando el reactivio Transit-LT1 (Mirus) en una relación ADN-a-vehículo de 1:3. El plásmido pmRFP1 se cotransfектó en una relación de 1:10 para servir como un control visual para garantizar eficiencias de transfección iguales. Para el mantenimiento a largo plazo y la producción de reservas de virus, se cambió el medio después de la incubación durante la noche para contener solo 2% de suero.

Mapeo de los extremos del ARN viral

El procesamiento apropiado del ARN viral derivado del vector pShuttleBAC se analizó mediante amplificación rápida de los extremos del ADNc (RACE). Después de 5' RACE se ha publicado con gran detalle un nuevo protocolo de ligación inversa/amplificación (Dallmeier & Neyts (2013) Anal. Biochem. 434, 1-3). La 3' RACE del ARN genómico de YFV-17D no poliadenilado se realizó esencialmente como se describe antes. En resumen, 5 μ l de ARN total tratado con ADNasa I de células Vero transfecadas con pShuttle/YF17D (aproximadamente 1 μ g de ARN) se ligaron al enzalador modificado #393 5'-adenilado y 3'-didesoxicitosina (ddC) (miRNA Cloning Linker 1, IDT DNA Technologies) por la actividad del mutante K227Q de la ARN ligasa 2 de T4 (New England Biolabs) en presencia del 15% de polietilenglicol (PEG)-8000 en un volumen total de reacción de 10 μ L durante la noche a 16°C. Los productos de ligación se amplificaron mediante RT-PCR en una sola etapa (Qiagen) utilizando los cebadores específicos de enzalador #391 y #394 de YFV-17D, respectivamente. Los amplicones de 265 pb se purificaron en gel y se clonaron en pJet1.2/blunt (kit de clonación PCR CloneJet, Fermentas) después de pulir los extremos 3' salientes de adenina generado por la ADN polimerasa Taq y se analizaron mediante secuenciación de Sanger.

Detección de formas de ARN replicativo viral intracelular

La transferencia Northern y la detección de intermedios replicativos víricos después de la desnaturización por electroforesis en gel de agarosa se realizó esencialmente como se describe (Dallmeier et al. (2008) PLoS Pathog. 4,

e1000230) con ligeras modificaciones con respecto al sistema de gel y el diseño de la sonda empleado. Brevemente, se desnaturalizaron por calor 3µg de ARN total y se separaron a través de un gel de agarosa al 1% en ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico 20mM, pH 7,0, acetato de sodio 5mM y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 2mM que contenía formamida al 1% y 0,01 µg mL⁻¹ de bromuro de etidio seguido por transferencia capilar en membranas de nailon con carga positiva (Roche Diagnostics) en 20x SSC (cloruro de sodio 3M, citrato de sodio 300 mM, pH 7,0). Se generaron sondas de ADN complementario de cadena sencilla marcadas con DIG de cadena específica al extremo 5' de la región NS5 de YFV-17D (nt 7637-8136) según Knuchel et al. (2000) J. Histochem. Cytochem. 48, 285-294, utilizando los cebadores #947 y #948. Las hibridaciones y la immunodetección se realizaron según el manual de aplicación de DIG para hibridación de filtros (Roche Diagnostics).

10 Cuantificación del virus por ensayo de placa y RT-qPCR

Se cuantificó 7 días d.i. el virus infeccioso liberado de las células transfectadas mediante un ensayo de placa viral de monocapas confluentes de células BHK-21 que utilizan una capa de celulosa microcristalina al 1% (Avicell) en medio de mantenimiento 0,5x como se describe antes (Kaptein et al. (2010) Antimicrob Agents Chemother. 54, 5269-8520). Para la cuantificación de las cargas de ARN viral en tejidos de ratón infectados, se deshicieron trozos de necropsias 15 congeladas en un molino de bolas Precellys en tampón RLT (RNeasy, Qiagen), y posteriormente se extrajo el ARN total según las instrucciones del fabricante. La PCR cuantitativa con transcriptasa inversa (RT-qPCR) para el ARN de YFV-17D se realizó exactamente como se describe (Kaptein et al. (2010) citado anteriormente) utilizando cebadores y sondas dirigidas a un tramo de aproximadamente 150 nt del gen NS3 y diluciones en serie del mismo fragmento de ADNc de YFV-17D clonado como estándares.

20 Ensayo de inmunofluorescencia

Los sobrenadantes eliminados de células BHK-21 transfectadas con pShuttle/DV2 7d d.t. se utilizaron para inocular cultivos de Vero-B subconfluente que se fijaron después de 5 días en paraformaldehído al 4% y se inmunotiñeron esencialmente como se describió anteriormente (De Burghgraeve et al. (2012) PLoS ONE 7, e37244). La expresión de la proteína E intracelular se detectó mediante el anticuerpo monoclonal específico para el serotipo DENV2 (mAb) 25 3H5.1 (Millipore) y un Ab secundario marcado con Alexa Fluor-488 (Millipore). Después de la tinción con DAPI, se visualizaron las células utilizando una estación de imágenes de células FLoid (Life Technologies).

Transfección in vivo de ratones

Se mezcló de 10 a 20µg de ADN plasmídico con 20µg de microflores de carbonato de calcio como portador (Fumoto et al. (2012) Mol. Pharm. 9, 1962-1970) en propilenglicol al 33% e inyectado por vía intraperitoneal en ratones AG129 30 adultos (aproximadamente 20g). Alternativamente, se inyectó por vía intraperitoneal media dosis de vacuna viva atenuada contra YFV-17D (Stamaril®, Sanofi Pasteur MSD, Bruselas). Se monitorearon el peso y el comportamiento diariamente.

Resultados

Si se transfecta en células de mamífero, la transcripción del ARN de YFV-17D adecuadamente procesado se pone en 35 marcha desde pShuttle/YF17D (Figura 3B) que inicia la replicación del virus autosostenida intracelular (Figura 3A). Las células transfectadas con pShuttle/YF17D secretan finalmente viriones infecciosos que no se pueden distinguir fenotípicamente del virus YFV-17D parental con respecto a su capacidad para inducir un efecto citopático en el cultivo de tejidos (Figura 4A-C), el rendimiento del virus y el fenotipo de la placa (Figura 4D + E). Los virus recombinantes así generados se pueden por lo tanto considerar biológicamente idénticos (cuantitativamente y cualitativamente). Del 40 mismo modo, las células transfectadas con pShuttle/DV2 producen la cepa recombinante infecciosa Nueva Guinea C del DENV2 (Figura 5).

La transfección intraperitoneal de pShuttle/YF17D en ratones AG129, un modelo in vivo de ratón letal establecido de la infección por YFV-17D (Meier et al. (2009) PLoS Pathog. 5, e1000614; Thibodeaux et al. (2012) Vaccine 30, 3180-3187), causa una mortalidad similar inducida por el virus (Figura 6) y morbilidad (Figura 7) como la vacuna Stamaril® genuina contra el YFV. En conclusión, su sistema conveniente, robusto y reproducible puede permitir el desarrollo de una vacuna de ADN para YFV a bajos costos sin la necesidad de cultivos de células eucariotas o huevos de gallina embrionados. Ya no requerirá una cadena de frío y se podría administrar sin agujas.

Ejemplo 4: Morbilidad y mortalidad inducida por pShuttle/YF17D (DNA-YFVax) en ratones AG129 infectados por vía subcutánea, y por inyección a chorro sin aguja de ADN plasmídico desnudo

50 Para determinar la viabilidad de otras vías para la aplicación de pShuttle/YF17D (DNA-YFVax) además de la vía intraperitoneal, se inyectaron grupos (n = 3) de ratones AG129 machos de 9 semanas de edad (machos, peso 22 a 25 g) con 25µg de DNA-YFVax en 100 µL de solución salina tamponada con fosfato (PBS), o (i) por vía subcutánea (s.c.) utilizando una jeringa y una aguja G27, o (ii) transdérmicamente (t.d.) mediante un inyector a chorro sin aguja (Injex-30, Injex Pharma GmbH, Berlín, Alemania) aprobado para uso clínico en humanos por aplicación t.d. de, por ejemplo, insulina o anestésicos. El AG129 inyectado i.p. con 25µg de DNA-YFVax formulado con microcristales de carbonato de calcio en 200 µL de propilenglicol al 33%, servía como antes como grupo control. La morbilidad y la mortalidad se anotaron como antes, el experimento finalizó después de 30 días (veáse tabla 2).

Tabla 2: Mortalidad en ratones AG129 machos inyectados con ADN-YFVax a través de diferentes vías

grupo	mortalidad	día a la muerte	MDD
intraperitoneal (con CaCO ₃)	0/3	n.a.	n.a.
subcutáneo	1/3	13, n.a., n.a.	n.a.
inyección a chorro	3/3	16, 16, 19	17±2
MDD (en inglés, mean day to death)-día medio a la muerte; n.a.-no aplica			

Al menos algunos de los ratones AG129 inyectados con ADN-YFVax por la vía s.c. y t.d. desarrollaron signos de enfermedad inducida por YFV-17D (pérdida de peso, ondulamiento del pelaje, espalda encorvada, parálisis de las extremidades posteriores) y tuvieron que ser sacrificados. Lo más importante, todos los ratones inyectados mediante inyección a chorro sin aguja murieron sistemáticamente a causa de la encefalitis inducida por YFV-17D dentro de los 17±2 días, mientras que todos los ratones control inyectados i.p. sobrevivieron a lo largo del transcurso del tiempo del experimento (30 días). La falta de mortalidad en el grupo control durante el curso de la inspección (en comparación con un MDD de 13±2 presentado en el ejemplo 3) se puede explicar fácilmente por el peso mayor y el sexo masculino de los animales utilizados.

Es de destacar que el uso de carbonato de calcio como portador de DNA-YFVax no es necesariamente óptimo para la administración de vacunas; concretamente en ocasiones incluso se observó algún efecto inhibitorio en los hámsters (véase ejemplo 5) dependiendo de ambos, la vía de inyección y la variabilidad entre los diferentes lotes de microflores de carbonato de calcio. En conclusión, el DNA-YFVax se puede administrar con éxito en diferentes formulaciones y por diferentes vías de inyección, que incluye por inyección a chorro sin aguja.

Ejemplo 5: Seroconversión de hámsters dorados sirios después de la inmunización con pShuttle/YF17D (DNA-YFVax)

Para determinar la inducción de la inmunidad protectora a YFV por el ADN-YFVax, se utilizó el modelo preclínico de los hámsters dorados sirios (*Mesocricetus auratus*) (Tesh et al. (2001) J Infect Dis. 183, 1431-1436). Con ese fin, se inmunicaron grupos de hámsters hembra (de 8 a 10 semanas, 90-100 g) por inyección intraperitoneal (i.p.) o de una 1/5 dosis de Stamaril® (100µL), o 20µg de pShuttle/YF17D (ADN-YFVax) formulado con microcristales de carbonato de calcio en 200µL de propilenglicol al 33% como antes. En una repetición, se aplicaron en cambio 10µg de DNA-YFVax. Se extrajo la sangre semanalmente mediante punción cardíaca bajo anestesia quirúrgica completa, se recolectaron los sueros mediante centrifugación y se almacenaron congelados a -80°C. Dos hámsters no tratados sirvieron como donantes para los sueros normales. Para anotar las correlaciones inmunológicas de protección adecuadas, se analizaron los sueros (i) mediante un ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IIFA) y (ii) mediante un ensayo de neutralización por reducción de placas (PRNT).

Ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IIFA). Los anticuerpos IgG específicos de YFV-17D (Stamaril® y DNA-YFVax) en suero de hámster inmunizado se determinaron utilizando un kit comercial de IIFA de YFV (EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck, Alemania, número de catálogo FI-2665-1005G y FI-2665-1010G) validado para uso clínico en humanos (Niedrig et al. (2008) Clin Vaccine Immunol. 15, 177-81) De acuerdo con las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones. El suero de hámster se diluyó a 20, 66, 200, 660 y 2000 veces en tampón de muestra y se aplicaron 30µl de dilución de suero en los portaobjetos de YFV-IIFA. Los portaobjetos se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y luego se lavaron en PBS que contenía Tween-20 al 0,2% durante 5 minutos. Para la detección de anticuerpos inducidos en *Mesocricetus* el anticuerpo secundario IgG antihámster marcado con FITC (Jackson Immuno Research Laboratories Inc., número de catálogo 307-095-003) se diluyó 1:50 en PBS que contenía BSA al 2% y se utilizó en lugar del anticuerpo secundario antihumano proporcionado en el kit . Las diapositivas se contrastaron con DAPI y los títulos de punto final se determinaron mediante microscopía de fluorescencia.

Ensayo de neutralización por reducción de placas (PRNT). Se determinaron los títulos de anticuerpos neutralizantes en sueros de hámster vacunados contra la fiebre amarilla utilizando PRNT. En resumen, se colocaron 0,5x10⁶ células BHK/pocillo, se sembraron en placas de 12 pocillos durante la noche en medio de crecimiento (MEM, medio complementado con FCS al 10%, bicarbonato de sodio al 1% y glutamina al 1%). Todos los sueros se analizaron en triplete en diluciones en serie 1:20, 1:66, 1:200, 1:660, 1:2000 y 1:6600. Se mezclaron 30µL de dilución de suero con 30µL de medio de ensayo (idéntico al medio de crecimiento pero que contenía solo FCS al 2%) que contenía 40 placas que formaban el virus YFV-17D (Stamaril®, lote G5400P1, se sometieron a pasos una vez sobre células Vero-B). Después de esta adsorción previa durante 1 hora a 37°C, se añadieron 440µL de medio de ensayo y se añadieron 500µL de cada mezcla a las células BHK. Después de 1h de incubación a temperatura ambiente, se lavaron las células y se cubrieron con medio de ensayo complementado con agarosa LMP (Invitrogen) a una concentración final del 0,5%. Posteriormente, se cultivaron las células durante 5 días a 37°C, se fijaron con formaldehído al 8% durante 2 horas y se tiñeron con tinción de Giemsa. Se contaron las placas y los títulos de neutralización del 50% se calcularon según

Reed y Munch (Reed & Muench (1938) Am. J. Hyg. 27, 493-497).

En general, la detección de anticuerpos de reacción cruzada por IIFA (tabla 3) y de anticuerpos neutralizantes por PRNT fue consistente (tabla 4). Con respecto a la eficacia de la vacuna, la ADN-YFVax no mostró inferioridad a Stamaril®; en ambos grupos de prueba, 2 de cada 3 individuos (1/5 de Stamaril® vs. 20 μ g de ADN-YFVax) y 4 de cada 5 en comparación con 2 de cada 4 individuos (1/5 de Stamaril® vs. 10 μ g de ADN-YFVax) seroconvirtieron a títulos altos de anticuerpos reactivos cruzados y neutralizantes de YFV (veáse tabla 3 y 4). Se puede considerar que estos valores representan una inmunidad protectora total (correlatos inmunes de protección), con títulos de PRNT de >40 que son protectores en un modelo de hámster de desafío de YFV letal (Julander et al. (2011) Vaccine 29, 6008-6016). Lo más importante es que la OMS establece un índice de neutralización logarítmica (LNI) de >0,7 ya que se correlaciona con la protección inmunológica después de la vacunación en primates, y esto se aplica a los humanos (Documento de posición de la OMS (2013) Wkly. Epidemiol. Rec. 88, 269-283.). Este índice de referencia de títulos PRNT Log10 >0,7 es superado por DNA-YFVax en hámsters en varios órdenes de magnitud, en más de 150 veces (consulte la Tabla 4).

Además, la respuesta inmune fue más homogénea en individuos vacunados con ADN-YFVax en comparación con Stamaril®, con la seroconversión a títulos altos de PRNT detectados de manera constante en 3 semanas, en lugar de solo 4 semanas después, es decir, 3 semanas más tarde que el otro seroconvertidor del grupo Stamaril®.

Tabla 3: Respuestas de anticuerpos de reacción cruzada de YFV en hámsters dorados sirios inmunizados con Stamaril® y DNA-YFVax

Grupo	Log10 del título medio geométrico de IIFA *				
	d28	d21	d14	d7	d3/D0
8-10 semanas ♀♀ hámster	ND				
8-10 semanas ♀♀ hámster + Stamaril® (1/5)	2,3 (2/3)	2,3 (2/3)	2,3 (1/3)	1,3 (1/3)	ND
8-10 semanas ♀♀ hámster + Stamaril® (1/5)	1,9 (4/5)				
8-10 semanas ♀♀ hámster + ADN-YFVax (20 μ g)	2,3 (2/3)	2,3 (2/3)	2,3 (1/3)	ND	ND
8-10 semanas ♀♀ hámster + ADN-YFVax (10 μ g)	2,3 (2/4)	2,3 (2/3)	2,8 (2/4)	ND	ND
ND=sin detección; * (x/x) = n.º individuos seroconvertidos de n.º de individuos evaluados					

20 Tabla 4. Respuestas de anticuerpos neutralizantes en hámsters dorados sirios inmunizados con Stamaril® y DNA-YFVax

	Animales	Título medio geométrico de PRNT, día 28 d.i.
No inmunizado	H001	ND
	H002	ND
8-10 semanas ♀♀ hámster + Stamaril® (1/5)	H012	405±57
	H013	ND
	H014	947±98
8-10 semanas ♀♀ hámster + ADN-YFVax (20 μ g)	H015	ND
	H016	928±45
	H017	822±151
ND=sin detección		

Ejemplo 6: Determinación de la inestabilidad genética de los ADNc de YFV-17D clonados

(a) Material de partida: Se realizaron preparaciones de plásmidos a gran escala de pACNR-FLYF17DII (Bredenbeek) et al. (2003) anteriormente y pShuttle/YFV-17D utilizando técnicas estándar. Con ese fin, se transformó pACNR-

5 FLYF17DII en una cepa derivada estándar de *E. coli* K12, se sembró en placas de agar LB que contenían 100 µg/mL de ampicilina y se cultivó durante la noche a 28°C (en lugar de 37°C) para favorecer la estabilidad del plásmido. Se incrementó secuencialmente una pequeña colonia y se cultivó en LB que contenía 100 µg/ml a 28°C bajo agitación vigorosa en dos cultivos consecutivos durante la noche, para finalmente alcanzar un cultivo discontinuo de 1L. Este lote se cultivó durante la noche a 28°C y se amplificó finalmente por adición de cloranfenicol a una concentración final de 20 µg/mL durante otras 8 horas a 28°C. De manera similar, se transformó pShuttle/YFV-17D en células de la cepa *E. coli* EPI300-T (Epicentre), se sembró en placas de agar LB que contenían 20 µg/ml de cloranfenicol, pero se cultivaron durante la noche a 37°C. Se incrementó secuencialmente el último plásmido, por lo tanto, pero todo el crecimiento fue en presencia de 20 µg/ml de cloranfenicol y a 37°C. Se diluyó el último cultivo discontinuo durante la noche, uno en seis en medio LB fresco que contenía 20 µg/ml de cloranfenicol y L-arabinosa al 0,01%, y se cultivó durante no más de 6h. Se purificaron los plásmidos utilizando una columna estándar de purificación de afinidad (Qiagen), se disolvieron en TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) hasta una concentración final de 1 µg/mL y se almacenaron congelados a -20°C.

10 (b) Crecimiento y tamaño de la colonia. Se transformaron ambos plásmidos en *E. coli* EPI300-T y se estriaron sobre agar MacConkey (2% de peptona, 0,5% de NaCl, 1% de lactosa, 0,15% de sales biliares, 0,003% de rojo neutro, 20 0,0001% de cristal violeta, 1,35% de agar) que contenía el antibiótico adecuado como medio selectivo. Se embebieron perlas de zirconia estériles (diámetro 2,5mm) en el agar para servir como calibradores para mediciones de tamaño absoluto. Para una alícuota de bacterias transformadas con pShuttle/YFV-17D, el agar contenía L-arabinosa adicional al 0,01%. Después de la incubación durante 16 horas a 37°C, se tomaron fotografías utilizando una cámara digital habitual (Canon Powershot SX10IS) y se almacenaron como archivos JPEG (véase la Figura 9). Las imágenes se enviaron a OpenCFU versión 3.8.11 para el análisis de imágenes con respecto al recuento y tamaño de colonias, Geissman (2013) PLoS One. 8, e54072.

25 Los clones *E. coli* que albergan a pShuttle/YFV-17D crecieron a tamaños mucho más grandes y poblaciones mucho más homogéneas (Figura 9B) que los clones que contenían pACNR-FLYF17DII (Figura 9A). Inesperadamente, esta toxicidad aparentemente menor de pShuttle/YFV-17D permanece incluso en el estado inducido por arabinosa (Figura 9C). Las colonias más grandes presentes en la población transformante pACNR-FLYF17DII (Figura 9A) contienen más probablemente plásmidos con mutaciones que eliminan la expresión crítica de proteínas virales tóxicas (véase Ejemplo 6).

30 El análisis de la imagen reveló una homogeneidad significativamente mayor en los clones que contenían pShuttle/YFV-17D en comparación con el pACNR-FLYF17DII (Tabla 5). De hecho, los transformantes pACNR-FLYF17D se pueden dividir, obviamente, en al menos dos subpoblaciones de medias de diferentes tamaños, dando como resultado (i) una gran desviación estándar de la media (Tabla 5), una distribución de tamaños no gaussiana (Figura 10A) y (iii) una gran diferencia, por ejemplo, entre las medias aritméticas calculadas y el tamaño medio de las colonias (Tabla 5). Por el contrario, los transformantes que albergan pShuttle/YFV-17D muestran un tamaño de colonia más homogéneo (Tabla 40 5) y una distribución de tamaño de Gauss en forma de campana (Figura 10B). Inesperadamente, esto último se aplica también completamente al estado inducido por arabinosa de pShuttle/YFV-17D (Tabla 5, Figura 10C).

Tabla 5. Estadística descriptiva que puntuá los tamaños de colonias transformantes (en mm)

Estadística descriptiva	pACNR-FLYF17DII	pShuttle/YFV-17D	pShuttle/YFV-17D + ara
Media	0,265832815	0,583330396	0,462981572
Error estándar	0,002723111	0,003093512	0,002016904
Mediana	0,2	0,616	0,477
Modo	0,15	0,616	0,477
Desviación estándar	0,154475074	0,123314407	0,086633004
Varianza de la muestra	0,023862548	0,015206443	0,007505277
Curtosis	1,265566671	0,005301521	0,450188526
Asimetría	1,50038333	-0,216414415	0,070062482

Intervalo	1	0,728	0,583
Mínimo	0,1	0,224	0,212
Máximo	1,1	0,952	0,795
Suma	855,45	926,912	854,201
Recuento	3218	1589	1845

Ejemplo 7 Patrón y frecuencia de mutación durante la propagación de los ADNc de YFV-17D clonados en *E. coli*

- Con el fin de abordar la estabilidad genética clonal de los plásmidos que contienen ADNc de YFV-17D, ambos plásmidos como se describe en el Ejemplo 6 se transformaron en *E. coli* EPI300-T y se estriaron sobre agar 5 MacConkey que contenía el antibiótico apropiado como un medio selectivo como antes (veáse Ejemplo 6b). Los clones pACNR-FLYF17DII se incubaron a 28°C durante 24h, mientras que los clones pShuttle/YF17D se incubaron a 37°C durante 16h.
- De cada plásmido, se escogieron dos series de cada 24 a 48 colonias para el crecimiento del plásmido en 200 µl de medio líquido (LB que contenía el antibiótico apropiado suplementado con MgCl₂ 20mM). Se eligió para empezar una serie pACNR-FLYF17DII de colonias pequeñas (serie pAS) y una de colonias grandes (serie pAL), respectivamente. Para pShuttle/YF17D donde no se pudieron observar mayores diferencias de tamaño (veáse Ejemplo 6b), las colonias con diferencias de tamaño razonables se eligieron como dos series de cultivos partiendo de colonias más pequeñas (serie pSS) y más grandes (serie pSL), respectivamente. 10
- Se incubaron las bacterias que contenían el plásmido pACNR durante 24 horas a 28°C, mientras que las colonias pShuttle se incubaron durante la noche a 37°C y, posteriormente, durante 6 horas en 600 µl de LB que contenía cloranfenicol y arabinosa al 0,01%. Parte de estos cultivos [considerados como plásmidos de pase 0 (P0)] donde se sometieron directamente a PCR para la amplificación (GoTaq Green Mastermix, Promega) utilizando los cebadores #208 y #94 (que corresponde a YFV-17D de nt 1-940 y #953 y #954 que corresponde a YFV-17D de nt 2500-3600, respectivamente. 15
- Los amplicones se purificaron por afinidad (Qiagen) y se secuenciaron directamente (Bigdye, Applied Biosystems) utilizando los cebadores #208 y #953, respectivamente. Se esperaba que las regiones de ADNc analizadas contuvieran ADNc con determinantes de toxicidad conocidos previamente, concretamente, promotores crípticos para la transcripción y traducción ilegítimas en *E. coli* en la región viral no traducida 5' (Li et al. (2011) citado anteriormente; Pu et al. (2011) citado anteriormente) y una extensión de proteínas especialmente hidrófobas dentro de las regiones virales E-NS1 (Yamshchikov et al. (2001) Virology 281, 272-280.), respectivamente. 20
- Se diluyó 1/100 otra parte de cada clon cultivado en medio fresco y se cultivó como antes para dar lugar al siguiente pase (P1). El último se repitió hasta 10 pases (P10). Los plásmidos de P1, P3 y P3 donde se analizaron mediante PCR y secuenciación como antes. Para P10, el plásmido se cultivó en un volumen mayor de 5 ml de medio y los plásmidos se aislaron mediante un procedimiento estándar de minipreparación de plásmidos alcalinos. Estas minipreparaciones de plásmidos se sometieron a (i) análisis de PCR (dirigido a las regiones de nt 1-940 y 2500-3600) seguido de inspección electroforética en gel de agarosa, (ii) secuenciación directa (si se pudieron detectar los amplicones de la PCR) y (iii) mediante análisis de restricción utilizando PstI. El resultado de la secuenciación de P0, P1, P3 y P10 se resume en la Tabla 6 y 7. Los resultados de la PCR y los análisis de restricción de P10 se resumen en la Tabla 8. 25
- Mutaciones encontradas en pases tempranos 35
- La secuenciación directa de plásmidos de pases tempranos (números de pases bajos P0 a P3) de las series pAS y pAL (Tabla 6) reveló una frecuencia de mutación bastante alta de hasta un 13% en una preparación de plásmidos originalmente clonal (veáse Ejemplo 6a). Casi todas las mutaciones encontradas fueron mutaciones sin sentido o por desplazamiento del marco (FS) debido a la introducción de codones de parada prematuros (PMSt) y delecciones/inserciones de un solo nucleótido, respectivamente. Estas mutaciones obviamente eliminan completamente la expresión del marco de lectura abierto (ORF) de YFV-17D de longitud completa. En la serie pSL se encontraron mutaciones similares en P1, aunque con menos frecuencia. En la serie pSS en P0, se encontraron mutaciones de sentido erróneo que no anularon la expresión del ORF viral. 40
- En conclusión, las preparaciones a gran escala de plásmidos originalmente clonales (veáse Ejemplo 6a) que llevan el ADNc de YFV-17D contienen cantidades fácilmente detectables de variantes de plásmidos mutantes. En el caso de pACNR-FLYF17DII, la mayoría de las mutaciones eliminan la expresión de la poliproteína viral de longitud completa, obviamente hacen que el ARN viral se genere a partir de la replicación de los respectivos ADNc mutantes es incompetente. Este es el caso de más del 10% de todos los clones de plásmidos. En el caso de pShuttle/YF17D, la 45

frecuencia de mutación es menor (menos del 10%), y lo más importante, una fracción más pequeña de mutantes constituirá por lo tanto a priori replicación de virus incompetentes.

Mutaciones encontradas en el pase p10

Cuando se analizaron los plásmidos de las series pAL y pAS en el pase P10, la mayoría de los plásmidos contenían grandes reorganizaciones estructurales que condujo a 10 de 48 (21%) y 44 de 48 (92%) clones de plásmidos, respectivamente, a un fracaso completo para amplificar la región de nt 2500-3600 (Tabla 8). Esto fue acompañado por un patrón de restricción anormal de los últimos plásmidos mutantes con hasta varias kilobases de ADN perdido de los plásmidos. Es de destacar que todos los clones mutantes analizados todavía contenían la región de nt 1-940 (Tabla 6) y, donde por lo tanto eran más probablemente descendientes de la pACNR-FLYF17DII original (Tabla 8) en lugar de contaminantes irrelevantes. Se espera la delección de dichos fragmentos de ADNc tóxicos y se describe de la técnica anterior (Yamshchikov et al. (2001) citada anteriormente).

Por el contrario, las reorganizaciones y delecciones similares donde nunca se encontraron en la serie pShuttle-YFV17D. Aquí, solo 2 de 48 (4%) mostraron una mutación de sentido erróneo que obviamente cambia un posible codón de iniciación en el marco de ATG (nt 2957-2959) en la región de codificación E-NS1. Esto no anularía la expresión del ORF viral.

En conclusión, pasos repetidos de pACNR-FLYF17DII originalmente clonal (veáse ejemplo 6a) conduce a grandes delecciones en el ADNc viral y, por lo tanto, la pérdida de ADNc funcional en hasta un 90% y más de todos los clones de plásmidos, de manera más obvia, hacen que el ARN viral se genere a partir de los respectivos ADNc mutantes totalmente no funcionales. En el caso de pShuttle/YFV-17D, la frecuencia de mutación es mucho menor (menos del 5%) y, lo más importante, no se pueden observar mutantes que constituyan a priori virus de replicación incompetentes que sería imposible su uso como, por ejemplo, vacunas vivas atenuadas de ADN.

Tabla 6: Mutaciones que ocurren en el ADNc de YFV-17D clonado durante los pasos en E. coli (pasos tempranos)

serie de clones	pases	región	frecuencia mutante Clones mutantes de todos los clones analizados (%)	tipo de mutación introducida
pAL	P1	1-940	0/38 (0)	n.a.
	P0	2500-3600	3/24 (13)	1 x PMSt 2x FS
pAS	P1	1-940	0/48 (0)	n.a.
	P3	1-940	2/91 (2)	2x FS*
pSL	P0	2500-3600	1/23 (4)	1x S**
	P1	1-940	0/34 (0)	n.a.
pSS	P3	1-940	0/34 (0)	n.a.
	P0	2500-3600	2/24 (8)	2x FS
n.a.-no aplica; PMSt: codón de parada prematuro generado (mutación sin sentido); FS-desplazamiento del marco debido a la inserción o delección de un solo nucleótido; MS-mutación sin sentido que cambia el codón; S-cambio de codón sinónimo silencioso				
* un FS observado en la región no codificante inmediatamente arriba del codón de inicio				
** población mixta de los tres codones alternativos, pero no el codón sinónimo de tipo silvestre				

Tabla 7: Mutaciones que ocurren en el ADNc de YFV-17D clonado durante el pase en E. coli (pase tardío P10)

serie de clones	pase	región	frecuencia mutante Clones mutantes de todos los clones analizados (%)	tipo de mutación introducida
pAL	P10	1-940	0/48 (0)	n.a.
	P10	2500-3600	10/48 (21)	DEL
pAS	P10	1-940	0/47 (0)	n.a.
	P10	2500-3600	44/48 (92)	DEL
pSL*	P10	2500-3600	2/48 (4)	2x MSI

n.a.-no aplica; DEL-grandes delecciones (rango de kilobases), para más detalles, veáse la Tabla 8; MSI-possible cambio de mutación sin sentido en el marco del codón de inicio ATG

* Cuando los cultivos durante la noche derivados del pase P0 se sembraron en placas, los clones pSS y pSL crecieron hasta el mismo tamaño de las colonias y, por lo tanto, ya no se consideraron por separado en P10.

Tabla 8: Grandes cambios estructurales en los plásmidos que llevan el ADNc de YFV-17D clonado durante el pase en E. coli (pase P10)

Serie de clones	Pase	Fallo para amplificar la región 1-940 por PCR Clones mutantes de todos los clones analizados (%)	Fallo para amplificar la región 1-940 por PCR Clones mutantes de todos los clones analizados (%)	Patrón de restricción anormal Clones mutantes de todos los clones analizados (%)
pAL	P10	0/48 (0%)	10/48 (21%)	n.d.
pAS	P10	0/48 (0%)	44/48 (94%)	46/48 (96%)
pSL*	P10	n.d.	0/48 (0%)	n.d.

n.d.-no determinado

* Cuando los cultivos durante la noche derivados del pase P0 se sembraron en placas, los clones pSS y pSL crecieron hasta el mismo tamaño de las colonias y, por lo tanto, ya no se consideraron por separado en P10.

5 Ejemplo 8: Construcción de pShuttle/YFV-JE, pShuttle/YFV-WN, y pShuttle/YFV-USU como vectores de expresión para vacunas químéricas de flavivirus

Los derivados químéricos recombinantes de YFV-17D se desarrollan y se utilizan como vacunas en las que el YFV-17D sirve como un vector para antígenos heterólogos (Guy et al. (2010) Vaccine 28, 632-49; solicitud de la patente de EE.UU. 20100278773), por ejemplo, para las glicoproteínas de superficie de otros antígenos patógenos de flavivirus tal como las proteínas prM y E del virus de la encefalitis japonesa (JEV) y el virus del Nilo Occidental (WNV), desarrollado como ChimeriVax-JE (Imojev® Sanofi Pasteur-MSD) y ChimeriVax-WN20, respectivamente. El pShuttle/YFV-17D (DNA-YFVax) se puede modificar como tal que puede poner en marcha estos virus de la vacuna ChimeriVax antes mencionados directamente desde el ADN plasmídico transfectado y, por lo tanto, puede sustituir completamente a dichas vacunas vivas atenuadas ChimeriVax-JE (Imojev®) y ChimeriVax-WN20 que contienen virus vivos.

El BAC que expresa ChimeriVax-JE, pShuttle/ChimeriVax-JE (Figura 11a), se genera sustituyendo nt 482-2451 de YFV-17D, en pShuttle/YFV17D por nt 477-2477 de la vacuna de la cepa neuroatenuada SA14-14-2 del JEV (Chambers (1999) J. Virol. 73 (4), 3095-3101; Arroyo et al. (2001) J. Virol. 75, 934-942.) más dos mutaciones adaptativas en los

genes NS2A y NS4B del esqueleto YFV-17D (Pugachev et al. (2004) J. Virol. 78, 1032-1038). Esto se logra mediante la recombinación homóloga y la unión de tres fragmentos de plásmidos; dos amplicones de PCR de pShuttle/YFV17D (nt 7228-481 y nt 3966-7342) y un fragmento de ADNc de YFV-JEV quimérico preparado mediante la síntesis personalizada de ADN (IDT Integrated DNA Technologies, Haasrode, Bélgica). El último comprende nt 359-4105 de ChimeriVax-JE (Figura 11a). La construcción final tiene una secuencia como se especifica en la SEC ID NO: 5.

El BAC que expresa ChimeriVax-WN02, pShuttle/ChimeriVax-WN02 (Figura 11b), se genera sustituyendo la región del gen prM-E de pShuttle/ChimeriVax-JE por la región WNV (cepa NY99) que contiene tres mutaciones neuroatenuadas en la proteína E según Monath et al. (2006) (Proc Natl Acad Sci USA. 103, 6694-6699), a saber, L107F, A316V y K440R. Con ese fin, se prepara un fragmento de ADNc de YFV-WNV quimérico mediante síntesis de ADN personalizada (IDT Integrated DNA Technologies, Haasrode, Bélgica) y se recombinan en los sitios Xhol (nt 406) y KasI (nt 2477) de pShuttle/ChimeriVax-JE. La construcción final tiene una secuencia como se especifica en la SEC ID NO: 6.

Ejemplo 9: Construcción de pShuttle/EV71 como vectores de expresión para diferentes picornavirus

Los enterovirus son virus de ARN(+) que pertenecen a la familia de los picornavirus de virus pequeños no envueltos con un genoma de ARN en la orientación de sentido. Normalmente, el genoma de los picornavirus no está bloqueado terminalmente, pero en su lugar lleva una proteína VPg unida covalentemente en el extremo 5'. En ausencia de una estructura cap, un sitio interno de entrada ribosomal (IRES) recluta la maquinaria de traducción celular al ARN viral para la expresión de proteínas virales. En principio, la replicación picornaviral y la producción de la progenie del virus infecciosos se pueden poner en marcha intracelularmente después de la transcripción heteróloga del genoma viral. En la técnica anterior, el genoma viral se expresa a partir de un ADNc que está bajo el control de un promotor fago y se transcribe solo si la polimerasa de ARN del fago semejante se cotransfecta y se expresa en una célula productora (sistema de dos plásmidos). Del mismo modo, dicha polimerasa del fago se puede expresar intracelularmente mediante la transducción de los ADNc respectivos utilizando un helpervirus tal como un baculovirus recombinante (Yap et al. (1997) Virology. 231, 192-200).

En lugar del enfoque más complicado de la técnica anterior, el ADNc picornaviral se puede expresar intracelularmente a partir de un derivado de pShuttle-BAC (sistema de un plásmido) para la puesta en marcha directa de la replicación viral, como se ejemplifica en la siguiente para el enterovirus humano 71 (EV71). Con ese fin, el genoma de EV71 se clona como un casete de expresión en pShuttle-BAC con un promotor SV40 en 5' y una cola de polyA en el extremo 3' seguida por una ribozima del virus de la hepatitis delta. Esto se logra amplificando el ADNc de EV71 por PCR utilizando los cebadores #991 y #992, y la reamplificación con los cebadores #453 y #990 para generar un casete de expresión respectivo. Se pueden utilizar diferentes fuentes de ácido nucleico como molde para esta PCR para amplificar adecuadamente el ADNc de EV71 de aproximadamente 7,4 kb de longitud; (i) un ADNc de EV71 ya clonado, tal como el descrito por Chua et al. (2008) J. Gen. Virol. 89, 1622-1632) y Zhang et al. (2013) Virus Genes. 47, 235-243), o (ii) el producto de la transcripción inversa de cualquier cultivo de tejido, o ARN genómico de longitud completa derivado de tejido humano o animal de EV71. Alternativamente, (iii) el ADNc de EV71 se puede preparar mediante síntesis genética personalizada. Independientemente de la fuente de ADNc, el casete de expresión así generado se insertará en pShuttle/BAC-Pme que se ha linealizado mediante digestión con endonucleasas de restricción utilizando Pmel, preferiblemente por recombinación en levadura. Tal construcción tiene una secuencia como se especifica en la SEC ID NO: 7 para la cepa BrCr-TR de EV71 (Arita et al. (2005) J. Gen. Virol. 86, 1391-401).

Se puede seguir una estrategia similar para la clonación de otros enterovirus tal como, por ejemplo, el rinovirus humano 14 (hRV14), cambiando solo el primer conjunto de cebadores para la amplificación inicial del ADNc viral. Los cebadores adecuados para hRV14 son #988 y #989.

Los virus infecciosos EV71 y hRV14 se generarán por transfección de los plásmidos pShuttle/EV71 y pShuttle/hRV14, respectivamente, en células de mamífero cultivadas tales como células de carcinoma de cérvix humano (HeLa) o por transfección in vivo. Las variantes atenuadas de las mismas se pueden generar de manera similar y utilizarse como vacunas vivas atenuadas.

Listado de secuencias

<110> Katholieke Universiteit Leuven

Dallmeier, Kai

Neyts, Johan

<120> cromosomas artificiales bacterianos

<130> KUL1457PCT

<140> aún no conocido

<141> 25-04-2014

<150> GB1307528.8

<151> 26-04-2013

<160> 51

5 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
 <211> 283
 10 <212> ADN
 <213> viral

<400> 1
 cctgtggaat gtgtgtcagt tagggtgtgg aaagtccccca ggctcccccag caggcagaag 60
 tatgcaaagc atgcatctca attagtcagc aaccagggtgt ggaaagtccc caggctcccc 120
 agcaggcaga agtatgcaaa gcatgcatct caattagtca gcaaccatag tcccgccct 180
 aactccgccc atcccgcccc taactccgcc cagttccgccc cattctccgc cccatggctg 240
 actaattttt tttatttatg cagaggccga gccgcctcg gcc 283

15 <210> 2
 <211> 85
 <212> ADN
 <213> viral

20 <400> 2
 tggccggcat ggtcccagcc tcctcgctgg cgccggctgg gcaacattcc gaggggaccg 60
 tccctcggt aatggcgaat gggac 85

<210> 3
 <211> 10862
 25 <212> ADN
 <213> viral

<400> 3
 agtaaaatcct gtgtgcta at tgaggtgcat tggctgcaa atcgagttgc taggaataa 60
 acacatttgg attaatttta atcgatcgat gagcgattag cagagaactg accagaacat 120
 gtctggtcgt aaagctcagg gaaaaaccct gggcgtcaat atggtagcgt gaggagttcg 180
 ctctttgtca aacaaaataa aacaaaaaac aaaacaaaatt ggaaacagac ctggaccc 240
 aagaggtgtt caaggattta tcttttctt tttgtcaac attttgactg gaaaaaagat 300

ES 2 718 187 T3

cacagccccac ctaaaagagg t tgtggaaaat gctggacc ca agacaagg ct tggctgtt ct	360
aaggaaagtc a aagagagtgg tggccagttt gatgagagga ttgtcctcaa ggaaacgc cg	420
ttccccatgtat gttctgactg tgcaattcct a a ttttggga atgctgtga tgacgggtgg	480
agtgaccttg gtgcggaaaa acagatggtt gctccta aat gtgacatctg aggacctcg	540
gaaaacattc tctgtggca caggcaactg cacaacaaac a ttttggaa ag ccaagtactg	600
gtgcccagac tcaatggaa acaactgtcc caatctc a g t c a g t c a g t c c a a g a g a g g a g c c a g a g a t g a	660
cattgattgc tgggtctat g g g t g g a a a a c g t t a g a g t c g c a t a g g t a a g t g t a c t c	720
agcaggcagg tctaggaggt caagaaggc cattgacttgc cctacgc a t g a g a g a g g a g g a g g a t g a	780
tttgaagacc cggcaagaaa aatggatgac t g g a a g a a t g g t g a a a g g c a a c t c c a a a a	840
gattgagaga tggttcgtga ggaaccctt tttgc a g t g c a g t g a c c g c t c t g a c c a t t g c c t a	900
ccttgcgg a g c a a c a t g a c g a a c a c a t g a c g a g a t g t g a t t g c t g t t g g	960
tccggcctac tc a g c t c a c t g a t t g g a a t t g a c a g g g a t t t c a t t g a g g g g t g c a	1020
tggaggaact tgggtttcag ctaccctgga gcaagacaag t g t g t c a c t g a t t g c c c c	1080
tgacaaggc t c a t t g g a c a t c t c a c t a g a g a c a g a t g a c c a t g a c t g a g g t	1140
gaggaaagt g t g t a c a a t g a c g t t c a c t a g t g a a g a t t a a t g a c a a g t g c c c c a g	1200
cactggagag g c c c a c c t a g c t g a a g a g a a c g a g g g g a c a t g c g t g c a g c g c a c t t a	1260
t t c t g a t a g a g g c t g g g g a a t g g c t g t g g c t t a t t t g g g a a a g g g a g c a t g g c a t g	1320
c g c c a a a t t c a c t t g t g c a a t c c a t g a g a t t t g t t g a g g t g a t c a g a c a t t c a	1380
g t a t g t c a t c a g a c a c a a t t g c a t g a g g a t t g c a g a c a g a t g g a a t a c c g a c a t	1440
t a a g a c t c t c a g t t t g a t g a c c t g t c a g g a t t t g t t g a g g a t t g g g t a t g g	1500
a a a a g c t a c a c t g g a a t t g g a a t t g g a a t t g g a a t t g g a a t t g g a a t t g g a a	1560
t g a g a t g g a a c a g a g a g c t g g a a g g a t g g a a c a g a c a g t g g a a g c c a g g a c t	1620
a t g g c a g a g t g g a a g g a a g g a t g g a a g g a a g g a a g g a a g g a a g g a a g g a a	1680
t c c g c a t g c c a c t a t c a c a g a t g g c c t t g g a a a c a c a g g g c t t g a a a a a c	1740
a g c t c t a c t g g c a a t g g a a g g a a g g a a g g a a g g a a g g a a g g a a g g a a g g a a	1800
a c a t g g t g g a a t g t t t c t t g c a g a g t g a a t t g t c a g t t g a c a c t c a a g g g a c a t c	1860
c t a c a a a a t a t g c a t g a c a a a t g t t t t t g t c a a g a a a c a c t g a c a c t g g c a t g g	1920
c a c t g t t g t g a a t g c a g g t g a a a t g t c a a a a g g a g c c c c c c c t g c a g g a t t c	1980
a g c t g a t g a t g a t g a t g a t g a t g a t g a t g a t g a t g a t g a t g a t g a t g a t g a t g a t g a t	2040
c t c a a c c a a t g a t g a a g t g a t g a a g g a a c	2100
t a t c g t t g g g a g a g g a g a t g a t g a a g g a a g g a a g g a a g g a a g g a a g g a a g g a a	2160

ES 2 718 187 T3

aggaaaagttt ttcactcaga ccatgaaagg cgtggAACgc ctggccgtca tgggagacac	2220
cgcctggat ttcaGCTCCG ctggggggtt cttaCCTCG gttgggaaag gaattcatac	2280
ggtgtttggc tctgccttcc aggggctatt tggcggttg aactggataa caaaggTCat	2340
catggggcg gtacttatAT gggTGGcat caacacaaga aacatgacAA tgtccatgag	2400
catgatCTTG gtaggagtGA tcatgatgtt tttgtctcta ggagttgggg cggtcaagg	2460
atgcGCCATC aactttggca agagagAGt caagtgcggA gatggtatct tcataTTAG	2520
agactCTGAT gactggCTGA acaagtACTC atactatCCA gaagatCCTG tgaagCTTG	2580
atcaatAGTG aaAGCCTCTT ttGAAGAAGG gaagtGTGGC ctaaATTCAg ttGACTCCCT	2640
tgAGCATGAG atgtggagaa gcaggGCAGA tgAGATCAAt gCcATTtTtG aggAAAACGA	2700
ggTggacatt tctgttGTCg tgcaggatCC aaAGAATGTT taccAGAGAG gaACTCATCC	2760
atTTCCAGA attcgggATG gtctgcAGTA tggttGGAAG acttggggTA agAACCTTGT	2820
gttCTCCCCA gggagGAAGA atGGAAGCTT catCATAGAT ggAAAGTCCA ggAAAGAATG	2880
cccgtttca aaccgggtct ggaattcttt ccAGATAGAG gagTTGGGA CGGGAGTGT	2940
caccACACGc gtgtACATGG acgcAGTCTT tGAATACACC ATAGACTGCG ATGGATCTAT	3000
ctTgggtgca gCGGTGAACG gaaaaaAGAG tgCCCATGGC tCTCCAAACAT tttggatGGG	3060
aAGTCATGAA gtAAATGGGA catggatGAT ccACACCTTG gaggCATTAG attACAAGGA	3120
gtgtgAGTGG ccACTGACAC atACGATTGG AACATCAGTT gaAGAGAGTG AAATGTTCAT	3180
gccgAGATCA atCGGAGGCC cAGTAGCTC tcacaATCAT ATCCCTGGAT acaAGGTTCA	3240
gacgAACGGA CCTTGGATGC aggtAccACT agaAGTGAAG AGAGAAGCTT gCCCAGGGAC	3300
tagcGTGATC attGATGGCA ACTGTGATGG acggggAAAA TCAACCAGAT CCACCACGG	3360
tagcGGGAAA GTTATTCCCTG aatGGTGTG CCGCTCCTGC ACAATGCCGC CTGTGAGCTT	3420
ccATGGTAGT gatGGGTGTT ggtatCCCAT ggAAATTAGG CCAAGGAAAA CGCATGAAAG	3480
ccATCTGGTG CGCTCCTGGG ttACAGCTGG agAAATAACAT GCTGTCCCTT ttGGTTGGT	3540
gagcatGATG atAGCAATGG aAGTGGTCCT aAGGAAAAGA CAGGGACCAA AGCAAATGTT	3600
ggTGGAGGA gtagtgctct tgggagcaat gctggTCGGG caAGTAACtC tcCTTgATT	3660
gctGAAACtC acAGTGGCTG tgggattGCA tttCCATGAG atGAACAAATG gaggAGACGC	3720
catgtatATG GCGTTGATTG CTGCCTTTC AATCAGACCA GGGCTGCTCA tCGGCTTTGG	3780
gctcAGGACC CTAAGGAGCC CTCGGAAACG CCTTGTGCTG ACCCTAGGAG CAGCCATGGT	3840
ggAGATTGCC ttgggtGGCG tgatGGGCGG CCTGTGGAAg tatCTAAATG CAGTTCTCT	3900
ctgcATCCtG acaataAAATG ctGTTGCTTC tagGAAAGCA tcaaataCCa tCTTGCCTCT	3960
catggCTCTG ttGACACCTG tcaCTATGGC tgAGGTGAGA CTTGCCGCAA tGTTCTTTG	4020
tgccGTTGTT atcatAGGGG tcCTTCACCA gaATTCAAG gACACCTCCA tGcAGAAGAC	4080

ES 2 718 187 T3

tataacctctg gtggccctca cactcacatc ttacctggc ttgacacaac ctttttggg	4140
cctgtgtca tttctggcaa cccgcattt tggcgaaagg agtatcccag tgaatgaggc	4200
actcgcagca gctggcttag tggagtgct ggcaggactg gctttcagg agatggagaa	4260
cttccttggt ccgattgcag ttggaggact cctgatgatc ctggtagcg tggctggag	4320
ggtggatggg ctagagctca agaagcttgg tgaagttca tggaaagagg aggccggat	4380
cagccggagt tccgccccgt atgatgtggc actcagtgaa caaggggagt tcaagctgct	4440
ttctgaagag aaagtccat gggaccaggt tgtatgacc tcgctggcct tggctgggc	4500
tgccctccat ccatttgcct ttctgttggt cctgttggg tggctgttc atgtcagggg	4560
agctaggaga agtggggatg tcttgtggta tattccact cctaagatca tcgaggaatg	4620
tgaacatctg gaggatggga tttatggcat attccagtca accttcttgg gggcctccca	4680
gcgaggagtg ggagtggcac agggagggggt gttccacaca atgtggcatg tcacaagagg	4740
agctttcatt gtcaggaatg gcaagaagtt gattccatct tggcattcag taaaggaaga	4800
ccttgcgcc tatggtggtt catggaagtt ggaaggcaga tggatggag aggaagaggt	4860
ccagttgatc gcggctgttc cagggaaagaa cgtggtaaac gtccagacaa aaccgagctt	4920
gttcaaagtg aggaatgggg gagaaatcgg ggctgtcgct cttgactatc cgagtggcac	4980
ttcaggatct cctattgtta acaggaacgg agaggtgatt gggctgtacg gcaatggcat	5040
ccttgcgtt gacaactcct tcgtgtccgc catatcccag actgaggtga aggaagaagg	5100
aaaggaggag ctccaagaga tcccgacaat gctaaagaaa ggaatgacaa ctgtcattga	5160
ttttcatcct ggagctggga agacaagacg tttccatcca cagatcttgg ccgagtgcgc	5220
acggagacgc ttgcgcactc ttgtgttggc cccaccagg gttgttctt ctgaaatgaa	5280
ggaggcttt cacggctgg acgtgaaatt ccacacacag gcttttccg ctcacggcag	5340
cgggagagaa gtcattgatg ccatgtgcca tgccacccta acttacagga tggatggacc	5400
aactagggtt gttaactggg aagtgtatcat tatggatgaa gcccatttt tggatccagc	5460
tagcatagcc gctagaggtt gggcagcgc cagagctagg gcaaatgaaa gtcaacaat	5520
cttgcatacaca gccacaccgc ctggactag tgatgatattt ccacattcaa atggatcaa	5580
agaagatgtt caaacggaca tacccagtga gcccggaaac acagggcatg actggatcct	5640
agctgacaaa agggccacgg catggttctt tccatccatc agagctgcaa atgtcatggc	5700
tgccttttgcgtt gaaagagtgt ggtggctctg aacaggaaaa ctttggagag	5760
agaatacccc acgataaaagc agaagaaaacc tgactttata ttggccactg acatagctga	5820
aatgggagcc aacctttgcg tggagcgagt gctggattgc aggacggctt ttaagcctgt	5880
gcttgcgtt gaaaggagga aggtggcaat aaaaggccca ctgcgtatct ccgcattc	5940

ES 2 718 187 T3

tgctgctcaa aggagggggc gcattggag aaatccaaac agagatggag actcatacta	6000
ctattctgag cctacaagtgc aaaataatgc ccaccacgtc tgctggttgg aggcctcaat	6060
gctttggac aacatggagg tgaggggtgg aatggcgcc ccactctatg gcgttgaagg	6120
aactaaaaca ccagttccc ctggtaaat gagactgagg gatgaccaga ggaaagtctt	6180
cagagaacta gtgaggaatt gtgacctgcc cggttggctt tcgtggcaag tggccaaggc	6240
tggttgaag acgaatgatc gtaagtggtg ttttgaaggc cctgaggaac atgagatctt	6300
gaatgacagc ggtgaaacag tgaagtgcag ggctcctgga ggagcaaaga agcctctgcg	6360
cccaagggtgg tgtgtgaaa gggtgtcatc tgaccagagt gcgtgtctg aatttattaa	6420
tttgcgtaa ggttaggaggg gagctgtga agtgcgttt gtgctgagtg aactccctga	6480
tttcctggct aaaaaaggtg gagaggcaat ggataccatc agtgtgttcc tccactctga	6540
ggaaggctct agggcttacc gcaatgcact atcaatgatc cctgaggcaa tgacaatagt	6600
catgctgttt atactggctg gactactgac atcggaaatg gtcatcttt tcatgtctcc	6660
caaaggcatc agtagaatgt ctatggcgat gggcacaatg gccggctgtg gatatctcat	6720
gttccttggaa ggcgtcaaacc ccactcacat ctccatgtc atgctcatat tctttgtcct	6780
gatggtggtt gtgatccccg agccaggca acaaagggtcc atccaagaca accaagtggc	6840
atacctcatt attggcatcc tgacgctgtt ttcaagcggtg gcaagccaaacg agctaggcat	6900
gctggagaaa accaaagagg acctcttgg gaagaagaac ttaattccat ctatgtttc	6960
accctggagt tggccggatc ttgacctgaa gccaggagct gcctggacag tgtacgttgg	7020
cattgttaca atgctctctc caatgttgc ccactggatc aaagtcgaat atggcaacct	7080
gtctctgtct ggaatagccc agtcagccctc agtcctttt ttcatggaca aggggatacc	7140
attcatgaag atgaatatct cggtcataat gctgtggtc agtggctgga attcaataac	7200
agtgtgcct ctgctctgtg gcatagggtg cgccatgctc cactggcttc tcattttacc	7260
tggaatcaaa ggcgcagcagt caaagcttgc acagagaagg gtgttccatg gcgttgcga	7320
gaaccctgtg gttgatggaa atccaacagt tgacattgag gaagctcctg aaatgcctgc	7380
cctttatgag aagaaactgg ctctatatct cttctttgtt ctcagccttag cttctgttgc	7440
catgtcaga acgccccttt cattggctga aggcatgtc ctatgtcag ctgcctttagg	7500
gccgctcata gagggaaaca ccagccttct ttgaatggc cccatggctg tctccatgac	7560
aggagtcatg agggggaaatc actatgttt tgtggagtc atgtacaatc tatggaaagat	7620
gaaaacttggc cgccggggggc ggcgtatgg aaaaactttt ggtgaagtct ggaagaggaa	7680
actgaatctg ttggacaaggc gacagtttgc gttgtataaa aggaccgaca ttgtggaggt	7740
ggatcgatgat acggcacgca ggcatttggc cgaaggaaag gtggacaccg gggtggcggt	7800
ctccagggggg accgcaaagt taaggtggtt ccatgagcgt ggctatgtca agctggaaagg	7860

taggtgatt gacctgggt gtggccgcgg aggctggtgt tactacgctg ctgcgcaaaa	7920
ggaagtgagt ggggtcaaag gatttactct tggaaagagac ggccatgaga aaccatgaa	7980
tgtcaaagt ctggatgga acatcatcac cttcaaggac aaaactgata tccaccgcct	8040
agaaccagtg aaatgtgaca ccctttgtg tgacattgga gagtcatcat cgtcatcggt	8100
cacagagggg gaaaggaccg tgagagttct tgatactgta gaaaaatggc tggcttgg	8160
ggttgacaac ttctgtgtga aggtgttagc tccatacatg ccagatgttc ttgagaaaact	8220
ggaattgctc caaaggagggt ttggcggAAC agtgatcagg aaccctctt ccaggaattc	8280
cactcatgaa atgtactacg tgtctggagc ccgcagcaat gtcacatttta ctgtgaacca	8340
aacatcccgc ctccgtatga ggagaatgag gcgtccaact gggaaagtga ccctggaggc	8400
tgacgtcattc ctcccaattt ggacacgcag tggagagaca gacaaggac ccctggacaa	8460
agaggccata gaagaaagggt ttgagaggat aaaatctgag tacatgaccc ttgggttta	8520
tgacaatgac aacccttaca ggacctggca ctactgtggc tcctatgtca caaaaacctc	8580
aggaagtgcg gcgagcatgg taaatgggt tattaaattt ctgacatatc catggacag	8640
gatagaggag gtcacaagaa tggcaatgac tgacacaacc cctttggac agcaaagagt	8700
gtttaagaa aaagttgaca ccagagcaaa ggatccacca gcgggaacta ggaagatcat	8760
gaaagtgtc aacaggtggc tggccggca cctggccaga gaaaagaacc ccagactgt	8820
cacaaaggaa gaatttattt caaaagtccg aagtcatgca gccattggag cttacctgga	8880
agaacaagaa cagtggaaatgatgcaatgaa ggctgtccaa gacccaaagt tctggaaact	8940
ggtggatgaa gaaaggaagc tgcaccaaca aggcaggtgt cgacttggat tgcataacat	9000
gatggggaaa agagagaaga agctgtcaga gtttggaaa gcaaaggaa gccgtgccat	9060
atggtatatg tggctggag cgccgttatct tgagttttagt gcccctggat tcctgaatga	9120
ggaccattgg gcttccaggg aaaactcagg aggaggagtg gaaggcattt gcttacaata	9180
cctaggatgtgatcagag acctggctgc aatggatggt ggtggattct acgcggatga	9240
caccgctgga tggcacacgc gcatcacaga ggcagaccc tttatgttacac aggatctt	9300
gaactacatg agccccacatc aaaaaaaaaact ggcacaaagca gtatggaaa tgacatataa	9360
gaacaaagtgt gtgaaagtgt tgagaccagc cccaggaggg aaagcctaca tggatgtcat	9420
aagtgcacga gaccagagag gatccggca ggtgtgtact tatgtctgaa acaccatcac	9480
caacttgaaa gtccaaatgatgcaatggc agaaggcagag atggatgatac atcacaaca	9540
tgttcaagat tgcataatgatgac caggctggag gcatggctca ctgagcacgg	9600
atgtgacaga ctgaagagga tggcggtgag tggagacgac tggatggtcc gcccacatcg	9660
tgacagggttc ggcctggccc tggccatctt caacgcccattt tggatggatgaaaggacat	9720

ES 2 718 187 T3

	atctgaatgg cagccatcaa aagggtggaa tgattggag aatgtgcct tctgttccc	9780
	ccacttccat gaactacagc tgaaggatgg caggaggatt gtggtcctt gcccagaaca	9840
	ggacgagctc attgggagag gaagggtgtc tccaggaaac ggctggatga tcaaggaaac	9900
	agcttgcctc agcaaagcct atgccaacat gtggtcactg atgtatttc aaaaaaggga	9960
	catgaggcta ctgtcattgg ctgtttcctc agctgttccc acctcatggg ttccacaagg	10020
	acgcacaaca tggtcgattc atggaaagg ggagtggatg accacggaag acatgcttga	10080
	ggtgtggAAC agagtatgga taaccaacaa cccacacatg caggacaaga caatggtgaa	10140
	aaaatggaga gatgtccctt atctaaccaa gagacaagac aagctgtgcg gatcactgat	10200
	tggaaatgacc aatagggcca cctgggcctc ccacatccat tttagtcatcc atcgatccg	10260
	aacgctgatt ggacaggaga aatacactga ctacctaaca gtcatggaca ggtattctgt	10320
	ggatgctgac ctgcaactgg gtgagcttat ctgaaacacc atctaacagg aataaccggg	10380
	atacaaacca cgggtggaga accggactcc ccacaacctg aaaccggat ataaaccacg	10440
	gctggagaac cgggctccgc actaaaatg aaacagaaac cggataaaa actacggatg	10500
	gagaaccgga ctccacacat tgagacagaa gaagttgtca gcccagaacc ccacacgagt	10560
	tttgcactg ctaagctgtg aggcaigtca ggctggaca gccgacctcc agttgcgaa	10620
	aaacctggtt tctgggacct cccacccag agtaaaaaga acggacgcctc cgctaccacc	10680
	ctcccacgtg gtggtagaaa gacgggtct agaggtaga ggagaccctc cagggaccaa	10740
	atagtggac catattgacg ccagggaaag accggagtgg ttctctgtt ttcctccaga	10800
	ggtctgtgag cacagttgc tcaagaataa gcagaccttt ggatgacaaa cacaaaacca	10860
	ct	10862
	<210> 4	
	<211> 21061	
5	<212> ADN	
	<213> sintético	
	<400> 4	
	agtaaaatcct gtgtgcta at tgagggtgc at ggtctgca atcgagttgc taggcaataa	60
	acacatttgg attaatttta atcggtcggtt gagcgtttag cagagaactg accagaacat	120
	gtctggcgtt aaagctcagg gaaaaaccct gggcgtca at ggtacgac gaggagttcg	180
	ctccttgc aacaaaataa aacaaaaac aaaacaaatt ggaaacagac ctggaccc	240
	aagagggtttt caaggattt tcttttctt tttgttcaac attttgcactg gaaaaagat	300
	cacagccac ctaaagaggt tgtggaaaat gctggaccca agacaaggct tggctgttct	360
	aaggaaagtc aagagagttgg tggccagttt gatgagagga ttgtcctcaa ggaaacgccc	420
	ttcccatgat gttctgactg tgcaattcct aattttggaa atgctgtga tgacgggtgg	480

10

agtgacacctg gtgcggaaaa acagatggtt gctcctaaat gtgacatctg aggacctcg	540
gaaaacatc tctgtggca caggcaactg cacaacaaac attttggaaag ccaagtactg	600
gtgcccagac tcaatggaaat acaactgtcc caatctcagt ccaagagagg agccagatga	660
cattgattgc tggtgctatg gggtggaaaa cgtagatgc gcataatggta agtgtgactc	720
agcaggcagg tctaggaggt caagaaggc cattgacttg cctacgcattg aaaaccatgg	780
tttgaagacc cggcaagaaa aatggatgac tggaagaatg ggtgaaaggc aactccaaaa	840
gattgagaga tggttcgtga ggaaccctt ttttcgtactg aeggctctga ccattgccta	900
ccttgggaa agcaacatga cgcaacgagt cgtgattgcc ctactggct tggctgttgg	960
tccggcctac tcagctcact gcattggaaat tactgacagg gatttcattg agggggtgca	1020
tggaggaact tgggtttcaag ctaccctgga gcaagacaag tgtgtcactg ttatggcccc	1080
tgacaaggcct tcattggaca tctcactaga gacagtagcc attgatagac ctgctgaggt	1140
gaggaaagtg tgttacaatg cagttctcac tcatgtgaag attaatgaca agtgcggcag	1200
cactggagag gcccacctag ctgaagagaa cgaaggggac aatgcgtgca agcgcactta	1260
ttctgtataga ggctggggca atggctgtgg cctatttggg aaaggagca ttgtggcatg	1320
cgc当地 atttc acttgc当地 aatccatgag tttgtttgag gttgatcaga ccaaaattca	1380
gtatgtc当地 agagcacaat tgc当地tggag ggccaaagcag gaaaatttggaa ataccgacat	1440
taagactctc aagtttggatg ccctgtcagg ctcccaggaa gtc当地gatc ttgggtatgg	1500
aaaagctaca ctggaatgcc aggtgcaaac tgc当地ggac tttggtaaca gttacatcgc	1560
tgagatggaa acagagagct ggatagtgaa cagacagtgg gcccaggact tgaccctgcc	1620
atggcagagt ggaagtgccg ggggtggag agagatgcat catcttgc当地 aatttgaacc	1680
tccgc当地tgc当地 gccactatca gactgtggc cctggaaac caggaaggct cttgaaaac	1740
agctcttact ggc当地atga gggttacaaa ggacacaaat gacaacaacc tttacaact	1800
acatggtggaa catgtttctt gc当地gatgaa attgtcagct ttgacactca agggggacatc	1860
ctacaaaata tgc当地tgc当地 aaatgtttt tgtcaagaac ccaactgaca ctggccatgg	1920
cactgttggatg atgc当地ggatgaa aagtgtcaaa aggagcccc tgc当地ggattc cagtgatgat	1980
agctgtatgat cttacagcgg caatcaataa aggcatgg ttttgc当地tgc当地 accccatcgc	2040
ctcaaccaat gatgtgaaatg tgctgattga ggtgaaaccc ccttttggag acagctacat	2100
tatcgttggg agaggagatt cacgtctcac ttaccagtgg cacaagagg gaagctcaat	2160
aggaaagttg ttc当地ctc当地 ccatgaaagg cgtgaaacgc ctggccgtca tgggagacac	2220
cgc当地tggat ttc当地ctccg ctggggggtt cttcacttc当地 gttgggaaag gaattcatac	2280
ggtgtttggc tctgc当地tttca aggggctatt tggc当地ggctt当地 aactggataa caaagggtcat	2340
catggggc当地 gtagttatataat ggggtggcat caacacaaga aacatgacaa tgc当地catgag	2400

catgatctt gtaggagtga tcatgatgtt tttgtctcta ggagttgggg cggatcaagg	2460
atgcgccatc aactttggca agagagagct caagtgcgga gatggtatct tcataatttag	2520
agactctgat gactggctga acaagtactc atactatcca gaagatcctg tgaagcttgc	2580
atcaatagtg aaagcctctt ttgaagaagg gaagtgtggc ctaaattcag ttgactccct	2640
tgagcatgag atgtggagaa gcagggcaga tgagatcaat gccattttg aggaaaacga	2700
ggtggacatt tctgttgtcg tgcaggatcc aaagaatgtt taccagagag gaactcatcc	2760
atttccaga attcgggatg gtctgcagta tgggttggaa acttggggta agaaccttgc	2820
gttctccccca gggaggaaga atggaagctt catcatagat ggaaagtcca ggaaagaatg	2880
cccgtttca aaccgggtct ggaattcttt ccagatagag gagtttggga cgggagtggtt	2940
caccacacgc gtgtacatgg acgcagtctt tgaatacaccc atagactgcg atggatctat	3000
cttgggtgca gcgggtgaacg gaaaaaaagag tgcccatggc tctccaacat tttggatggg	3060
aagtcatgaa gtaaatggga catggatgat ccacacctt gaggcattag attacaagga	3120
gtgtgagtgg ccactgacac atacgattgg aacatcagtt gaagagagtg aatgttcat	3180
gccgagatca atcggaggcc cagttagctc tcacaatcat atccctggat acaaggttca	3240
gacgaacgga ctttggatgc aggtaccact agaagtgaag agagaagctt gcccaggac	3300
tagcgtgatc attgatggca actgtgatgg acggggaaaa tcaaccagat ccaccacgga	3360
tagcggaaa gttattcctg aatgggttg ccgctcctgc acaatgccgc ctgtgagctt	3420
ccatggtagt gatgggtgtt ggtatccat ggaatttagg ccaaggaaaa cgcatgaaag	3480
ccatctggtg cgctcctggg ttacagctgg agaaatacat gctgtccctt ttggtttgtt	3540
gagcatgatg atagcatgg aagtggctt aaggaaaaga cagggaccaa agcaaatgtt	3600
ggttggagga gtagtgctct tgggagcaat gctggtcggg caagtaactc tccttgattt	3660
gctgaaactc acagtggctg tgggattgca tttccatgag atgaacaatg gaggagacgc	3720
catgtatatg gcgttgattt ctgccttttca aatcagacca gggctgctca tcggctttgg	3780
gctcaggacc ctatggagcc ctggaaacg ctttgcgtc accctaggag cagccatgg	3840
ggagattgcc ttgggtggcg ttagggcgcc cctgtggaaat tatctaaatg cagtttctat	3900
ctgcattcctg acaataaatg ctgttgcttc taggaaagca tcaaataccca tcttgcccct	3960
catggctctg ttgacacctg tcaactatggc tgaggtgaga cttggcccaa ttttttttttgg	4020
tgcgttggtt atcatagggg tccttcacca gaatttcaag gacacctcca tgcagaagac	4080
tataacctctg gtggccctca cactcacatc ttacctggc ttgacacaaac cttttttttgg	4140
cctgtgtgca tttctggcaa cccgcattt tgggcgaagg agtatcccag tgaatgaggc	4200
actcgcagca gctggtctag tgggagtgct ggcaggactg gctttcagg agatggagaa	4260

ES 2 718 187 T3

cttccttggc	ccgattgcag	ttggaggact	cctgatgatg	ctggtagcg	tggctggag	4320
ggtgtggatgg	ctagagctca	agaagcttgg	tgaagttca	tggaaagagg	aggcggagat	4380
cagcgggagt	tccgccccgt	atgatgtggc	actcagtgaa	caaggggagt	tcaagctgct	4440
ttctgaagag	aaagtgccat	gggaccaggt	tgtgatgacc	tcgctggcct	tggttgggc	4500
tgccctccat	ccatggctc	ttctgctggc	ccttgctggg	tggctgttc	atgtcagggg	4560
agctaggaga	agtggggatg	tcttgggaa	tattccact	cctaagatca	tcgaggaatg	4620
tgaacatctg	gaggatgggaa	tttatggcat	attcagtc	acattttgg	gggcctccca	4680
gcgaggagtg	ggagtggcac	agggaggggt	gttccacaca	atgtggcatg	tcacaagagg	4740
agctttccctt	gtcaggaatg	gcaagaatgtt	gattccatct	tgggcttcag	taaaggaaga	4800
ccttgcgc	tatggtggct	catggaaat	ggaaggcaga	tggatggag	aggaagaggt	4860
ccagttgatc	gcggctgttc	cagggaaagaa	cgtggtcaac	gtccagacaa	aaccgagctt	4920
gttcaaagtg	aggaatgggg	gagaaatcgg	ggctgtcgct	cttgactatc	cgagtggcac	4980
ttcaggatct	cctattgtta	acaggaacgg	agaggtgatt	gggctgtacg	gcaatggcat	5040
ccttgcgt	gacaactcct	tcgtgtccgc	catatcccag	actgaggtga	aggaagaagg	5100
aaaggaggag	ctccaagaga	tcccgacaat	gctaaagaaa	ggaatgacaa	ctgtccttga	5160
tttcatcctt	ggagctgggaa	agacaagacg	tttcccttcca	cagatcttgg	ccgagtgcgc	5220
acggagacgc	ttgcgcactc	ttgtgttggc	ccccaccagg	gttgttctt	ctgaaatgaa	5280
ggaggctttt	cacggcctgg	acgtgaaatt	ccacacacag	gtttttccg	ctcacggcag	5340
cgggagagaa	gtcattgtatg	ccatgtgcca	tgccacccta	acttacagga	tgttggaaacc	5400
aactagggtt	gttaactggg	aagtgtatcat	tatggatgaa	gcccattttt	tggatccagc	5460
tagcatagcc	gctagaggtt	gggcagcgca	cagagctagg	gcaaatgaaa	gtgcaacaat	5520
cttgatgaca	gccacaccgc	ctgggactag	tgtatgatattt	ccacattcaa	atggtaaat	5580
agaatgttt	caaacggaca	tacccagtga	gccctggAAC	acagggcatg	actggatcct	5640
agctgacaaa	aggcccacgg	catggttact	tccatccatc	agagctgcaa	atgtcatggc	5700
tgccttttg	cgttaaggctg	gaaagagtgt	ggtggcctg	aacaggaaaa	ccttgagag	5760
agaatacccc	acgataaaagc	agaagaaaacc	tgactttata	ttggccactg	acatagctga	5820
aatgggagcc	aacctttcg	tggagcgagt	gctggattgc	aggacggctt	ttaagcctgt	5880
gcttggtat	gaagggagga	agggtggcaat	aaaaggggca	cttcgtatct	ccgcacccctc	5940
tgctgctcaa	aggagggggc	gcattgggag	aaatcccaac	agagatggag	actcataacta	6000
ctattctgag	cctacaagtg	aaaataatgc	ccaccacgtc	tgctggttgg	aggcctcaat	6060
gctcttggac	aacatggagg	tgaggggtgg	aatggtcgcc	ccactctatg	gcgttgaagg	6120
aactaaaaca	ccagttcccc	ctggtaaat	gagactgagg	gatgaccaga	ggaaagtctt	6180

ES 2 718 187 T3

cagagaacta gtgaggaatt gtgacctgcc cgttggc tt tcgtggcaag tggccaaggc	6240
tggtttgaag acgaatgatc gtaagtggc ttttgaaggc cctgaggaa atgagatctt	6300
aatgacagc ggtgaaacag tgaagtgcag ggctcctgga ggagcaaaga agcctctgcg	6360
cccaagggtgg tgtgatgaaa ggggtgtcatc tgaccagagt gcgctgtctg aatttattaa	6420
gttgctgaa ggttaggaggg gagctgctga agtgcttagtt gtgctgagtg aactccctga	6480
tttcctggct aaaaaagggtg gagaggcaat ggataccatc agtgtgttcc tccactctga	6540
ggaaggctct agggcttacc gcaatgcact atcaatgatc cctgaggcaa tgacaatagt	6600
catgctgttt atactggctg gactactgac atcgggaatg gtcatcttt tcatgtctcc	6660
caaaggcatac agtagaatgt ctatggcgat gggcacaatg gccggctgtg gataatctat	6720
gttccttggaa ggcgtcaaacc ccactcacat ctcctatgtc atgctcatat tctttgtcct	6780
gatgggtggtt gtgatccccg agccaggggca acaaagggtcc atccaagaca accaagtggc	6840
atacctcatt attggcatcc tgacgctggt ttcaagcggtg gcagccaaacg agctaggcat	6900
gctggagaaa accaaagagg acctcttgg gaagaagaac ttaattccat ctatgtttc	6960
accctggagt tggccggatc ttgacactgaa gccaggagct gcctggacag tgtacggttgg	7020
cattgttaca atgctctctc caatgttgca ccactggatc aaagtgcata atggcaacct	7080
gtctctgtct ggaatagccc agtcagccctc agtcctttct ttcatggaca agggataacc	7140
attcatgaag atgaatatct cggtcataat gctgctggc agtggctggaa attcaataac	7200
agtatgcct ctgtctgtg gcatagggtg cgcattgtc cactggcttc tcattttacc	7260
tggaaatcaaa ggcgcagcagt caaagcttgc acagagaagg gtgttccatg gcttgcgcga	7320
gaaccctgtg gttgtggaa atccaacagt tgacattgag gaagctcctg aaatgcctgc	7380
cctttatgag aagaaactgg ctctatatct ctttctgtc ctcagcctag cttctgttgc	7440
catgtgcaga acgcctttt cattggctga aggcatgtc ctgcattcag ctgcctttagg	7500
gccgctcata gaggaaaca ccagcattct ttgaaatgga cccatggctg tctccatgac	7560
aggagtcatg aggggaatc actatgttt tggggagtc atgtacaatc tatgaaagat	7620
gaaaactggc cggcgaaaaa ggcgcgaatgg aaaaactttt ggtgaagtct ggaagaggaa	7680
actgaatctg ttggacaagc gacagttga gttgtataaa aggaccgaca ttgtggaggt	7740
ggatcgtat acggcaccgc ggcattggc cgaaggaaag gtggacaccg gggtggcggt	7800
ctccagggggg accgcaaagt taaggtggtt ccatgagcgt ggctatgtca agctggaaagg	7860
tagggtgatt gacctgggggt gtggccgcgg aggctgggt tactacgctg ctgcgcaaaa	7920
ggaagtgagt ggggtcaaaag gatttactct tggaaagagac ggccatgaga aacccatgaa	7980
tgtgcaaaatg ctgggatgga acatcatcac cttcaaggac aaaactgata tccaccgcct	8040

ES 2 718 187 T3

agaaccagtg aaatgtgaca ccctttgtg tgacatttgg aagtcatcat cgtcatcggt	8100
cacagaggg gaaaggaccg tgagagttct tgcatactgt aaaaaatggc tggcttgtgg	8160
ggttgacaac ttctgtgtga aggtgttagc tccatacatg ccagatgttc ttgagaaaact	8220
ggaattgctc caaaggaggt ttggcggAAC agtgatcagg aaccctctct ccaggaattc	8280
cactcatgaa atgtactacg tgtctggagc ccgcagcaat gtcacattta ctgtgaacca	8340
aacatccccc ctcctgatga ggagaatgag gcgtccaact gaaaaagtga ccctggagGC	8400
tgacgtcatc ctcccattt ggacacgcag tgTTGAGACA gacaaggAAC ccctggacAA	8460
agaggccata gaagaaaggg ttgagaggat aaaatctgag tacatgacct cttggTTTA	8520
tgacaatgac aacccttaca ggacctggca ctactgtggc tcctatgtca caaaaacCTC	8580
aggaagtgcg gcgagcatgg taaaatgggt tattaaaatt ctgacatATC catggacAG	8640
gatagaggag gtcacaagaa tggcaatgac tgacacaACC cctttggAC agcaaAGAGT	8700
gtttaaagaa aaagttgaca ccagagAAA ggatccacCA gcggGAactA ggaAGATCAT	8760
gaaagtgtc aacaggTggc tggccGCCA cctggCCAGA gaaaAGAACC ccAGACTGT	8820
cacaaaggAA gaatttattt caaaAGTCGG aagtcatgca gcccattggAG cttacCTGG	8880
agaacaagAA cagtggAAAGA ctgccaatGA ggctgtccAA gacccAAAGT tctggAAact	8940
ggTggatgAA gaaaggAAAGC tgcaccaACA aggcaGGTGT cggacttGTG tgtacaACAT	9000
gatggggAAA agagagaAGA agctgtcAGA gtttggAAA gcaaaaggAA gccgtGCCAT	9060
atggtatATG tggctggAG cgCGGTatCT tgagTTGAG gcccTggat tcctGAatGA	9120
ggaccattgg gcttccaggG AAAACTCAGG aggaggAGTg gaaggcATTG gcttacaATA	9180
cctaggatAT gtgatcAGAG acctggCTGC aatggatGGT ggtggattCT acgcggatGA	9240
caccgCTGG tgggacacGC gcatcacAGA ggcagacCTT gatgatGAAC aggAGATCT	9300
gaactacATG agcccACATC aaaaaaaaaACT ggcacaAGCA gtgatggAAA tgacataCAA	9360
gaacaaAGTG gtgaaAGTGT tgagaccAGC cccaggAGGG aaAGCCTACA tggatgtCAT	9420
aagtgcacGA gaccAGAGAG gatccGGGCA ggtAGTgACT tatgctCTGA acaccatCAC	9480
caacttgAAA gtccAAATTGA tcagaatGGC agaAGCAGAG atggtgatac atcacaAAAC	9540
tgtcaAGAT tgcataGAT cagttctGAC caggCTGGAG gcatggCTCA ctgagcacGG	9600
atgtgacAGA ctgaAGAGGA tggcggTgAG tggagacGAC tgcgtggTCC ggcccatCGA	9660
tgacaggTTc ggcctggccc tgcctcatCT caacGCCATG tccaaggTTA gaaaggACAT	9720
atctgaatGG cagccatCAA aagggtggAA tgattggAG aatgtGCCCT tctgttCCCA	9780
ccacttCCAT gaactacAGC tgaaggatGG caggaggATT gtggTgcCTT gcccGAGAAC	9840
ggacgagCTC attgggAGAG gaaggGTgTC tccaggAAAC ggctggatGA tcaaggAAAC	9900
agcttgcCTC agcaaAGCCT atgccaACAT gtggTcaCTG atgtatTTc acaaaggGA	9960

cataggcata ctgtcattgg ctgttcctc agctgttccc acctcatggg ttccacaagg	10020
acgcacaaca tggtcgattc atggaaagg ggagtggatg accacggaag acatgctga	10080
ggtgtgaaac agagtatgga taaccaacaa cccacacatg caggacaaga caatggtaa	10140
aaaatggaga gatgtccctt atctaaccaa gagacaagac aagctgtcg gatcactgat	10200
tggaatgacc aatagggcca cctggcctc ccacatccat ttagtcatcc atcgatccg	10260
aacgctgatt ggacaggaga aatacactga ctacctaaca gtcatggaca ggtattctgt	10320
ggatgctgac ctgcaactgg gtgagcttat ctgaaacacc atctaacagg aataaccggg	10380
atacaaacca cgggtggaga accggactcc ccacaacctg aaaccggat ataaaccacg	10440
gctggagaac cgggctccgc acttaaaatg aaacagaaaac cgggataaaa actacggatg	10500
gagaaccgga ctccacacat tgagacagaa gaagttgtca gcccagaacc ccacacgagt	10560
tttgccactg ctaagctgtg aggcaactgca ggctggaca gccgacccctt aggttgcgaa	10620
aaacctggtt tctggaccc cccacccag agtaaaaaga acggacccctc cgctaccacc	10680
ctcccacgtg gtggtagaaa gacgggtct agaggttaga ggagaccctc cagggAACAA	10740
atagtggac catattgacg ccagggaaag accggagtgg ttctctgctt ttccctccaga	10800
ggtctgtgag cacagttgc tcaagaataa gcagacccctt ggatgacaaa cacaaaacca	10860
ctggccggca tggcccagc ctccctcgctg gcggccggctg ggcaacattc cgaggggacc	10920
gtccccctcgtaatggcgaa tggcacaaat tctgaaccag tcctaaaacg agtaaatagg	10980
accggcaatt cttcaagcaa taaacaggaa taccaattat taaaagataa cttagtcaga	11040
tcgtacaata aagcttgaa gaaaaatgcg ccttattcaa tctttgtat aaaaaatggc	11100
ccaaaatctc acattggaaag acatttgatg acctcatttc tttcaatgaa gggcctaacg	11160
gagttgacta atgttgggg aaattggagc gataagcggtg cttctgccgt ggccaggaca	11220
acgtataactc atcagataac agcaataacct gatcactact tcgcactagt ttctcggtac	11280
tatgcatatg atccaatatc aaaggaaatg atagcattga aggatgagac taatccaatt	11340
gaggagtggc agcatataga acagctaaag ggtgtgtcg aaggaagcat acgatacccc	11400
gcataatgcgat ggataatatc acaggaggta ctagactacc tttcatccta cataaaataga	11460
cgcataataag tacgcattta agcataaaca cgcactatgc cggttcttctc atgtatatat	11520
atatacaggc aacacgcaga tataggtgcg acgtgaacag tgagctgtat gtgcgcagct	11580
cgcgttgcattttc tttcgaaagc gctcgatcc ggaaacgcctt tgaagttccctt attccgaagt	11640
tcctattctc tagaaagtat aggaacttca gagcgctttt gaaaacccaa agcgctctga	11700
agacgcactt tcaaaaaacc aaaaacgcac cggactgtaa cgagctacta aaatattgcg	11760
aataccgctt ccacaaacat tgctcaaaag tatctcttgc tctatataatct ctgtgtata	11820

tccctatata acctacccat ccaccttcg ctccctgaac ttgcacatcaa actcgacc	11880
tacattttt atgttatct ctagtattac tctttagaca aaaaaattgt agtaagaact	11940
attcatagag tgaatcgaaa acaatacgaa aatgtaaaca ttcctatac gtagtatata	12000
gagacaaaat agaagaaacc gttcataatt ttctgaccaa tgaagaatca tcaacgctat	12060
cacttctgt tcacaaagta tgcgcaatcc acatcggtat agaatataat cggggatgcc	12120
tttatcttga aaaaatgcac ccgcagcttc gctagtaatc agtaaacgac ggaagtggag	12180
tcaggctttt tttatggaaag agaaaataga caccaaagta gccttcttct aacctaacc	12240
gacctacagt gcaaaaagtt atcaagagac tgcattatag agcgcacaaa ggagaaaaaa	12300
agtaatctaa gatgctttgt tagaaaaata ggcctctcg gatgcatttt tgtagaacaa	12360
aaaagaagta tagattctt gttggtaaaa tagcgccttc gcgttgcatt tctgttctgt	12420
aaaaatgcag ctcagattct ttgttgaaa aattagcgct ctcgcgttgc attttgtt	12480
tacaaaaatg aagcacagat tttcggtgg taaaatagcg ctttcgcgtt gcatttctgt	12540
tctgtaaaaa tgcagctcag attctttgtt tgaaaaatta ggcctctcg gttgcatttt	12600
tgttctacaa aatgaagcac agatgctcg ttaacaaaga tatgctattt aagtgcacaa	12660
tggaaacgca gaaaatgaac cggggatgcg acgtgcaaga ttacctatgc aatagatgca	12720
atagttctc caggaaccga aatacataca ttgtcttcg taaagcgcta gactataat	12780
tattatacag gttcaaataat actatctgtt tcagggaaaa ctcccaggtt cggtgttca	12840
aaattcaatg atgggttaaca agtacgatcg taaatctgta aaacagttt tcggatatta	12900
ggctgtatct cctcaaagcg tattcgaata tcattgagaa gctgcaggca agtgcacaaa	12960
caatacttaa ataaatacta ctcagtaata acctatttct tagcattttt gacgaaattt	13020
gctattttgt tagagtcttt tacaccattt gtctccacac ctccgcattac atcaacacca	13080
ataacgccat ttaatctaag cgcatcacca acatttctg ggcgtcagtcc accagctaac	13140
ataaaaatgta agcttcggg gctctcttcg cttccaaccc agtcagaaat cgagttccaa	13200
tccaaaagtt cacctgtccc acctgcttct gaatcaaaca agggataaaa cgaatgaggt	13260
ttctgtgaag ctgcactgag tagtatgtt cagtttttgc gaaatacgag tcttttaata	13320
actggcaaac cgaggaactc ttggtattct tgccacgact catctccatg cagttggacg	13380
atatcaatgc cgtaatcatt gaccagagcc aaaacatcct ccttaggtt attacgaaac	13440
acgccaacca agtatttcgg agtgcctgaa ctattttat atgctttac aagacttggaa	13500
atttcccttgc caataaccgg gtcaattgtt ctcttctat tgggcacaca tataataccc	13560
agcaagtcag catcggaatc tagagcacat tctgcggcct ctgtgcctcg caagccgaa	13620
actttcacca atggaccaga actacctgtt aaattaataa cagacataact ccaagctgcc	13680
tttgtgtct taatcacgta tactcacgtt ctcataatgc accaatgccc tccctttgg	13740

ES 2 718 187 T3

ccctcctcct tttttttttt cgaccgctag cgtcgacagc gacacacttg catcgatgc	13800
agcccggtta acgtgccggc acggccctggg taaccaggta ttttgcac ataaccgtgc	13860
gcaaaatgtt gtggataagc aggacacagc agcaatccac agcaggcata caaccgcaca	13920
ccgagggtac tccgttctac aggttacgac gacatgtcaa tacttgcct tgacaggcat	13980
tgatggaatc gtagtctcac gctgataagtc tgatcgacaa tacaagtggg accgtggcc	14040
cagaccgata atcagaccga caacacgagt gggatcgtgg tcccagacta ataatcagac	14100
cgacgatacg agtgggaccg tggccaga ctaataatca gaccgacgat acgagtggg	14160
ccgtgggtcc agactaataa tcagaccgac gatacgagtgg ggaccgtggt cccagactaa	14220
taatcagacc gacgatacga gtgggaccat ggtcccgac taataatcag accgacgata	14280
cgagtgggac cgtggtccc gtcgtattat cagaccgacg atacgagtgg gaccgtggc	14340
ccagactaat aatcagaccg acgatacgg tgggaccgtg gtcccgact aataatcaga	14400
ccgacgatac gagtgggacc gtggcccg tctgattatc agaccgacga tacaagtgg	14460
acagtgggcc cagagagaat attcaggcca gttatgcctt ctggcctgta acaaaggaca	14520
ttaagtaaag acagataaac gtagactaaa acgtggtcgc atcagggtgc tggctttca	14580
agttccttaa gaatggcctc aattttctct atacactcag ttggaacacg ggacctgtcc	14640
aggtaagca ccattttatc gcccttatac aatactgtcg ctccaggagc aaactgtatgt	14700
cgtgagctta aactagttct tgatgcagat gacgtttaa gcacagaagt taaaagagt	14760
ataacttctt cagttcaaa tatcacccca gctttttct gctcatgaag gttagatgcc	14820
tgctgcttaa gtaattcctc tttatctgta aaggctttt gaagtgcac gacccgttcc	14880
gcagatagtt cacgggggtg agaaaaaaga gcaacaactg atttaggcaa tttggcggtg	14940
ttgatacagc gggtaataat cttacgtgaa atatttccg catcagccag cgcaaaaaata	15000
tttccagcaa attcattctg caatcggtt gcataacgct gaccacggtc ataagcactt	15060
gttggcgt aatcggttacc caatctggat aatgcagcca tctgctcatc atccagctcg	15120
ccaaaccgaa cacgataatc actttcggt agtgcagcag ctttacgacg ggcactccca	15180
tcggcaattt ctatgacacc agatactttt cgaccgaacg ccgggtgtctg ttgaccagtc	15240
agtagaaaaag aaggatgag atcatccagt gcgtcctcag taagcagctc ctggcacgt	15300
tcattacctg accatacccg agaggcttc tcaacactat caccggag cacttcaaga	15360
gtaaacttca catcccgacc acatacaggc aaagtaatgg cattaccgac agccattact	15420
cctacgcgcg caattaacga atccaccatc gggcagctg gtgtcgataa cgaagtatct	15480
tcaaccgggtt gagtattgag cgtatgtttt ggaataacag ggcacgctt cattatctaa	15540
tctcccgccg tggtttaatc agacgatcga aaatttcatt gcagacaggt tcccaaata	15600

ES 2 718 187 T3

aaagagcatt tctccaggca ccagttgaag agcgttgate aatggcctgt tcaaaaacag	15660
ttctcatccg gatctgacct ttaccaaact catccgttgc acgtacaaca ttttttagaa	15720
ccatgcttcc ccaggcatcc cgaatttgct cctccatcca cggggactga gagccattac	15780
tattgctgta tttggtaagc aaaatacgta catcaggctc gaacccttta agatcaacgt	15840
tcttgagcag atcacgaagc atatcgaaaa actgcagtgc ggaggtgtag tcaaacaact	15900
cagcaggcgt gggacaatac agcacatcg cagcacatac gacattaatc gtgccgatac	15960
ccaggttagg cgccgtgtca ataactatga catcatagtc atgagcaaca gtttcaatgg	16020
ccagtcggag catcagggtgt ggatcggtgg gcagtttacc ttcatcaaatttgc	16080
actcgtttc aatacgggtgc agagccagac aggaaggaat aatgtcaagc cccggccagc	16140
aagtggcatt tattgcataa gtgacatcg cctttcccc aagatagaaa ggcaggagag	16200
tgtcttctgc atgaatatga agatctggta cccatccgt atacatttag gctgttccct	16260
gggggtcggtt accttccacg agcaaaaacac gttagccctt cagagccaga tcctgagcaa	16320
gatgaacaga aactgagggtt ttgtaaacgc cacctttatg ggcagcaacc cgcgtaccgc	16380
gtggaaatac gtcttcagca cgtcgcaatc gcgtacccaa cacaatcacgc atatgattaa	16440
tttgttcaat tgtataacca acacgttgc caacccgtcc tcgaatttcc atatccgggt	16500
gcggtagtgc ccctgcttcc tcggcatctc tgatagcctg agaagaacc ccaactaaat	16560
ccgctgcttc acctattctc cagcgccggg ttatcccct cgcttccggg ctgtcatcat	16620
taaactgtgc aatggcgata gccttcgtca tttcatgacc agcgtttatg cactggtaa	16680
gtgtttccat gagttcatt ctgaacatcc ttaatcatt gctttcggtt tttttattaa	16740
atcttgcattt tactgcacaa gcaacaacaa aatcgcaaaag tcatcaaaaa accgcaaaagt	16800
tgtttaaaat aagagcaaca ctacaaaagg agataagaag agcacatacc tcagtactt	16860
attatcaacta gcgctcgccg cagccgtgtc accgagcata gcgagcgaac tggcgaggaa	16920
gcaaaagaactgttctgt cagatagctc ttacgctcag cgcaagaaga aatatccacc	16980
gtggggaaaaa ctccaggtag aggtacacac gcggatagcc aattcagagt aataaactgt	17040
gataatcaac cctcatcaat gatgacgaac taaccccgta tatcaggta catgacgaag	17100
ggaaagagaa ggaaatcaac tgtgacaaaac tgccctcaaa ttggcttcc ttaaaaattaa	17160
cagttcaaaa agtatgagaa aatccatgca ggctgaagga aacagcaaaa ctgtgacaaa	17220
ttaccctcag taggtcagaa caaatgtgac gaaccaccct caaatctgtc acagataacc	17280
ctcagactat cctgtcgtca tggaaatgtat atcgcggaaag gaaaatacga tatgagtcgt	17340
ctggcgccct ttcttttctt caatgtatgaa gaggcgcatt ggagttctgc tggatctc	17400
attnaacacag acctgcagga agcggcggcg gaagtcaggc atacgctggt aactttgagg	17460
cagctggtaa cgctctatgaa tccagtcgtat tttcagagag acgtgcctg agccatccgg	17520

cttacgatac tgacacaggg attcgatataa acgcatggca tacggattgg tgatttctt	17580
tgtttcacta agccgaaact gcgtaaaccg gttctgtaac ccgataaaaga agggaatgag	17640
atatgggttg atatgtacac tgtaaagccc tctggatgga ctgtgcgcac gtttgataaa	17700
ccaaggaaaa gattcatagc cttttcatc gccggcatcc tcttcagggc gataaaaaac	17760
cacttccttc cccgcgaaac tcttcaatgc ctgccgtata tccttactgg cttccgcaga	17820
ggtcaatccg aatatttcag catatttagc aacatggatc tcgcagatac cgtcatgttc	17880
ctgttagggtg ccatcagatt ttctgtatcg gtcaacgaac agatacagca tacgttttg	17940
atcccgggag agactatatg ccgcctcagt gaggtcggtt gactggacga ttcgcgggct	18000
attttacgt ttcttgtat tgataaccgc tgtttccgcc atgacagatc catgtgaagt	18060
gtgacaagtt ttagattgt cacactaaat aaaaagagt caataagcag ggataacttt	18120
gtgaaaaaaac agcttcttct gagggcaatt tgcacaggg ttaagggcaa tttgtcacag	18180
acaggactgt catttgggg tgatttgtca cactgaaagg gcaatttgc acaacacett	18240
ctctagaacc agcatggata aaggcctaca aggcgctcta aaaaagaaga tctaaaaact	18300
ataaaaaaaaaa taattataaa aatatccccg tggataagtg gataacccca agggaaagttt	18360
tttcaggcat cgtgtgtaa cagaatatat aagtgcgtt ccctgggtct tcctcgctca	18420
ctcgaccggg agggttcgag aagggggggc accccccttc ggcgtgcgcg gtcacgcgc	18480
cagggcgcag ccctggtaa aaacaagggtt tataaatatt ggtttaaaag caggttaaaa	18540
gacaggttag cggtggccga aaaacgggcg gaaaccctt gaaatgcgtt atttctgcc	18600
tgtggacagc ccctcaaatg tcaataggtg cgccctcat ctgtcagcac tctgcccctc	18660
aagtgtcaag gatcgcccc ctcatctgtc agtagtcgcg cccctcaagt gtcaataccg	18720
cagggcactt atccccagge ttgtccacat catctgtggg aaactcgctt aaaaatcaggc	18780
gttttcgccc atttgcgagg ctggccagct ccacgtcgcc ggccgaaatc gagcctgccc	18840
ctcatctgtc aacgcccgcg cgggtgagtc ggcccctcaa gtgtcaacgt ccgcccctca	18900
tctgtcagtg agggcaagt ttcccgcgag gtatccacaa cgccggcgcc cggcccggt	18960
gtctcgaca cggcttcgac ggcgtttctg gcgcgtttgc agggccatag acggccgcca	19020
gcccagcggc gagggcaacc agccgagggc ttgcacctgt cgctcgactg cggcgagcac	19080
tactggctgt aaaaggacag accacatcat ggtctgtgt tcattaggtt gttctgtcca	19140
ttgctgacat aatccgctcc acttcaacgt aacaccgcac gaagatttct attgttcctg	19200
aaggcatatt caaatcgtt tcgttaccgc ttgcaggcat catgacagaa cactacttcc	19260
tataaacgct acacaggctc ctgagattaa taatgcggat ctctacgata atggagatt	19320
ttcccgactg ttctcgatcg ttctcagtttgc ataacagcca gcttctctgt ttaacagaca	19380

aaaacagcat atccactcag ttccacattt ccatataaaag gccaaaggcat ttattctcag	19440
gataatttgtt tcagcatcgc aaccgcataca gactccggca tcgcaaactg caccgggtgc	19500
cgggcagcca catccagcgc aaaaaccttc gtgttagactt ccgttgaact gatggactta	19560
tgtccccatca ggctttcgag aactttcagc ggtataccgg catacagcat gtgcacgcga	19620
taggaatggc ggaacgtatg tggtgtgacc ggaacagaga acgtcacacc gtcagcagca	19680
gcggcggcaa ccgcctcccc aatccaggc tcgaccgttc tgtccgtcac ttcccagatc	19740
cgcgcgttct ctgtccttcc tgtgcacgg ttacgcccct ccatgagctt atcgcgaata	19800
aatacctgtg acggaagatc acttcgcaga ataaataaat cctggtgtcc ctgttgatac	19860
cgggaagccc tgggccaact tttggcgaaa atgagacgtt gatcggcacg taagagggtc	19920
caactttcac cataatgaaa taagatcact accggcgta tttttgagt tatcgagatt	19980
ttcaggagct aaggaagcta aaatggagaa aaaaatcact ggatatacca ccgttgatat	20040
atcccaatgg catcgtaaag aacatttga ggcatttcag tcagttgctc aatgtaccta	20100
taaccagacc gttcagctgg atattacggc ctttttaaag accgtaaaga aaaataagca	20160
caagtttat ccggcctta ttcacattct tgccgcctg atgaatgctc atccgaatt	20220
tcgtatggca atgaaagacg gtgagctggt gatatggat agtggacc cttgttacac	20280
cgtttccat gagcaaactg aaacgtttc atcgctctgg agtgaataacc acgacgattt	20340
ccggcagttt ctacacatata attcgcaga tggcgctgt tacggtaaaa acctggccta	20400
tttccctaaa gggtttattt agaatatgtt tttcgctca gccaatccct gggtagttt	20460
caccagttt gatttaaacg tggccatat ggacaacttc ttgcggccctt tttcaccat	20520
gggcaaataat tatacgcaag gcgacaagggt gctgatgccg ctggcgattc aggttcatca	20580
tgccgtttgt gatggcttcc atgtcgccag aatgcttaat gaattacaac agtactgcga	20640
tgagtggcag ggccggccgt aattttta aggcaattt tggtgccctt aaacgcctgg	20700
ttgctacgcc tgaataagtg ataataagcg gatgaatggc agaaattcga tgataagctg	20760
tcaaacatga gaattggctcg accctgtgga atgtgtgtca gttagggtgt ggaaagtccc	20820
caggctcccc agcaggcaga agtacgcataa gcatgcatac caattagtca gcaaccagg	20880
gtggaaagtc cccaggctcc ccagcaggca gaagtatgca aagcatgcata ctcaatttgc	20940
cagcaaccat agtcccgccc ctaactccgc ccatcccgcc cctaactccg cccagttccg	21000
cccattctcc gccccatggc tgactaattt tttttatata tgcaaggccc gaggccgcct	21060
c	21061

<210> 5
<211> 21091
<212> ADN
<213> sintético

<400> 5

agtaaaatcct gtgtgcta at tgggtgc at tggctgca atcgagtgc taggcaataa	60
acacatttgg attaatttt atcggtcg tt gaggcattt cagagaactg accagaacat	120
gtctggtcgt aaagctcagg gaaaaaccct gggcgtcaat atggtacgac gaggagttcg	180
ctccttgtca aacaaaataa aacaaaaac aaaacaatt ggaaacagac ctggaccc	240
aagagggttt caaggattt tcttttctt tttgttcaac attttgactg gaaaaaagat	300
cacagccac ctaaagaggt tgtggaaat gctggacc aagacaaggct tggctgttct	360
aaggaaagtc aagagagtgg tggccagttt gatgagagga ttgtcctcg acaaaccgg	420
ttcccatgtat gttctgactg tgcaatttctt aattttggaa atgctgttga tgacgggtgg	480
aatgaagttt tcgaatttcc aggggaagct tttgtatgacc atcaacaaca cggacattgc	540
agacgttatac gtgatttcca cctcaaaagg agagaacaga tgctgggtcc gggcaatcg	600
cgtcggctac atgtgtgagg acactatcac gtacgaatgt cctaagctt ccattggca	660
tgtccagag gatgtggatt gctgggtgtca caaccaagaa gtctacgtcc aatatggacg	720
gtgcacgcgg accaggcatt ccaagcgaag caggagatcc gtgtcggtcc aaacacatgg	780
ggagagttca ctagtgaata aaaaagaggc ttggctggat tcaacgaaag ccacacgata	840
tctcatgaaa actgagaact ggtatcataag gaatctggc tatgtttcc tggcggcggt	900
acttggctgg atgcttggca gtaacaacgg tcaacgcgtg gtatccatca tcctcctgct	960
gttggctgct ccggcttaca gtttaatttgc tctggaaatg ggcaatcgatg acttcataga	1020
aggagccagt ggagccactt gggtgactt ggtgcttagaa ggagacagct gttgacaat	1080
catggcaaacc gacaaacccaa cattggacgt ccgcattgatt aacatcgaaat ctagccaaact	1140
tgctgaggtc agaagttact gctatcatgc ttcaatgttact gacatctcg aagggtcg	1200
gtgccccacg actggagaag cccacaacga gaagcgagct gatagtagct atgtgtgaa	1260
acaaggcttc actgaccgtg ggtggggca cggatgttggaa ttttcgggaa agggaaagcat	1320
tgacacatgt gcaaaatttctt cctgcaccag taaagcgatt gggagaacaa tccagccaga	1380
aaacatcaaa tacaaagtttgc gatgtttgtt gcatggaaacc accacttcgg aaaaccatgg	1440
gaattattca gcgcaagttt gggcgccccca ggcggcaaaatg tttacagttaa caccaatgc	1500
tccttcggta gccctcaaaatc ttgggtacta cggagaagtc acactggact gtgagccaa	1560
gagtggactg aacactgaag cgttttacgt catgaccgtg gggtaaagt catttttgtt	1620
ccatagggag tggtttcatg acctcgctt cccctggacg tcccctcgaa gcacagcg	1680
gagaaacaga gaactcctca tggaaatttgc aggggcgcac gccacaaaac agtccgttgc	1740
tgctcttggg tcacaggaag gaggcctcca tcatgcgttgc gaggagccatcgttgc	1800
gtactcaagc tcagtgtatgt taacatcagg ccacctgaaa tgtaggctga aaatggacaa	1860

actggctctg aaaggcacaa cctatggcat gtgtacagaa aaattctcg tcgcgaaaaa	1920
tccggtgac actggtcacg gaacagttgt cattgaactc tcctactctg ggagtgatgg	1980
ccccctgcaaa attccgattt tttccgttgc gagcctcaat gacatgaccc ccgttggcgc	2040
gctggtgaca gtgaaccct tcgtcgac ttccagtgcc aactcaaagg tgctggtcga	2100
gatggaaacc cccttcggag actctacat cgtagttgga aggggagaca agcagatcaa	2160
ccaccattgg cacaagctg gaagcacgct gggcaaggcc tttcaacaa ctttgaaggg	2220
agctcaaaga ctggcagcgt tggcgacac agcctggac tttggctcta ttggaggggt	2280
cttcaactcc ataggaagag ccgttccacca agtgttttgtt ggtgccttca gaacactctt	2340
tggggaatg tcttggatca cacaaggct aatgggtgcc ctactgctct ggatggcgt	2400
caacgcacga gaccgatcaa ttgctttggc cttcttagcc acaggagggtg tgctcggtt	2460
cttagcgacc aatgtggcg ccgatcaagg atgcgccatc aactttggca agagagagct	2520
caagtgcgga gatggtatct tcataatttag agactctgt gactggctga acaagttactc	2580
atactatcca gaagatcctg tgaagcttgc atcaatagtg aaagcctctt ttgaagaagg	2640
gaagtgtggc ctaaattcag ttgactccct tgagcatgag atgtggagaa gcagggcaga	2700
ttagatcaat gccatTTTg aggaaaacga ggtggacatt tctgttgctg tgcaggatcc	2760
aaagaatgtt taccagagag gaactcatcc atttccaga attcgggatg gtctgcagta	2820
tggttggaag acttggggta agaaccttgc gttctccca gggaggaaga atggaagctt	2880
catcatagat gggaaagtcca gggaaagaatg cccgtttca aaccgggtct ggaattctt	2940
ccagatagag gagttggga cgggagtggtt caccacacgc gtgtacatgg acgcagtcct	3000
tgaatacacc atagactgcg atggatctat cttgggtgca gcggtgaacg gaaaaaaagag	3060
tgcTTATggc tctccaacat ttggatggg aagtcatgaa gtaaatggga catggatgat	3120
ccacacccggc gaggcattag attacaagga gtgtgagtgg ccactgacac atacgattgg	3180
aacatcgtt gaagagatg aaatgttcat gcccggatca atcggaggcc cagttagctc	3240
tcacaatcat atccctggat acaagggtca gacgaacgga cttggatgc aggtaccact	3300
agaagtgaag agagaagctt gcccaggac tagcgtgatc attgatggca actgtgatgg	3360
acggggaaaa tcaaccagat ccaccacggta tagcggggaa gttattcctg aatgggtttg	3420
ccgctctgc acaatgcgc ctgtgagtt ccatggtagt gatgggtgtt ggtatccat	3480
ggaaaattagg ccaaggaaaa cgcattgaaag ccatctggc cgctccctggg ttacagctgg	3540
agaaaatcat gctgtccctt ttgggttttgtt gagcatgatg atagcaatgg aagtggcct	3600
aaggaaaaaga cagggaccaa agcaaattttt ggttggagga gtgtgctct tgggagcaat	3660
gctggctggg caagtaactc tccttgatTTt gctgaaactc acagtggctg tgggatttgc	3720

ES 2 718 187 T3

tttccatgag atgaacaatg gaggagacgc catgtatatg gcgttgattt ctgcctttc	3780
aatcagacca gggctgctca tcggcttgg gctcaggacc ctatggagcc ctcggaaacg	3840
ccttgtctg accctaggag cagccatggt ggagattgcc ttgggtggcg tcatggcg	3900
cctgtggaaat tatctaaatg cagttctct ctgcacatcctg acaataaatg ctgttgctc	3960
taggaaagca tcaaatacca tcttgcctt catgctctg ttgacaccgg tcaccatggc	4020
ttaggtgaga cttgccgcaa tgttcttttgc tgccatggtt atcatagggg tccttcacca	4080
gaatttcaag gacaccccca tgcagaagac tatacctctg gtggccctca cactcacatc	4140
ttacctgggc ttgacacaac ctttttggg cctgtgtgca tttctggcaa cccgcattt	4200
tggcgaaagg agtatcccac tgaatgaggc actcgcagca gctggcttag tggagtgct	4260
ggcaggactg gcttttcagg agatggagaa cttccttggt ccgattgcag ttggaggact	4320
cctgtatgtt ctggtagcg tggctggag ggtggatggg cttagagctca agaagcttgg	4380
tgaagttca tgggaagagg aggccggat cagccggagt tccgcggct atgatgtggc	4440
actcagtgaa caaggggagt tcaagctgtt ttctgaagag aaagtgcctt gggaccaggt	4500
tgtgtatgacc tcgctggcc tggctggggc tgccctccat ccatttgctc ttctgtgg	4560
ccttgctggg tggctgtttc atgtcagggg agctaggaga agtggggatg tcttgggaa	4620
tattccact cctaagatca tcgaggaatg tgaacatctg gaggatgggaa ttatggcat	4680
attccagtca accttcttgg gggcccccac gcgaggagt ggagtggcac agggagggt	4740
gttccacaca atgtggcatg tcacaagagg agctttcatt gtcaggaatg gcaagaagtt	4800
gattccatct tggcttcag taaaggaaga ctttgcgcc tatggcttgc catggaaattt	4860
ggaaggcaga tggatggag aggaagagg ccagttgtac gggctgttc caggaaagaa	4920
cgtggtaac gtccagacaa aaccgagctt gttcaaagtg aggaatggg gagaatcg	4980
ggctgtcgct cttgactatc cgagtggcac ttcaaggatct cctattgtta acaggaacgg	5040
agaggtgatt gggctgtacg gcaatggcat ctttgcgggt gacaactcct tcgtgtccgc	5100
catatcccac actgaggtga aggaagaagg aaaggaggag ctccaagaga tccccacaat	5160
gctaaagaaa ggaatgacaa ctgtccttga ttttcatcct ggagctgggaa agacaagacg	5220
tttccctccca cagatcttgg ccgagtgcgc acggagacgc ttgcgcactc ttgtgttggc	5280
ccccaccagg gttgttctt ctgaaatgaa ggaggctttt cacggccctgg acgtgaaattt	5340
ccacacacag gtttttcccg ctcacggcag cgggagagaa gtcattgtatc ccatgtgc	5400
tgccacccta acttacagga tggatccacg aactagggtt gttactggg aagtgtatcat	5460
tatggatgaa gcccatttt tggatccacg tagcatagcc gctagagggtt gggcagcgc	5520
cagagctagg gcaaataaaaaa gtgcaacaat cttgatgaca gccacaccgc ctggactag	5580
tgtatgaaat ccacattcaa atggatgaaat agaagatgtt caaacggaca tacccagtga	5640

gccctggAAC acagggcatg actggatcct agctgacaaa aggcccacgg catggttcct	5700
tccatccatc agagctgcaa atgtcatggc tgctctttg cgtaaggctg gaaagagtgt	5760
ggtggtcctg aacagggaaaa ccttgagag agaatacccc acgataaaagc agaagaaacc	5820
tgactttata ttggccactg acatagctga aatgggagcc aaccttgcg tggagcgagt	5880
gctggattgc aggacggctt ttaagcctgt gcttgtggat gaagggagga aggtggcaat	5940
aaaaggcca cttcgtatct ccgcatactc tgctgctcaa aggagggggc gcattggag	6000
aaatcccaac agagatggag actcatacta ctattctgag cctacaagtg aaaataatgc	6060
ccaccacgtc tgctggttgg aggcctcaat gctcttggac aacatggagg tgaggggtgg	6120
aatggtcgcc ccactctatg gcgttgaagg aactaaaaca ccagttccc ctggtaaat	6180
gagactgagg gatgaccaga ggaaagtctt cagagaacta gtgaggaatt gtgacctgcc	6240
cgtttggctt tcgtggcaag tggccaaggc tggttgaag acgaatgatc gtaagtggtg	6300
ttttgaaggc cctgaggaac atgagatctt gaatgacagc ggtgaaacag tgaagtgcag	6360
ggctcctgga ggagcaaaga agcctctgcg cccaaagggtgg tgtgatgaaa gggtgtcatc	6420
tgaccagagt gcgcgtctg aatttattaa gtttgctgaa ggttaggaggg gagctgctga	6480
agtgcgtttt gtgctgatgt aactccctga tttcctggct aaaaaagggtg gagaggcaat	6540
ggataccatc agtgtgttcc tccactctga ggaaggctct agggcttacc gcaatgcact	6600
atcaatgatc cctgaggcaa tgacaatagt catgctgtt atactggctg gactactgac	6660
atcgggaatg gtcatcttt tcatgtctcc caaaggcatc agtagaatgt ctatggcgat	6720
gggcacaatg gccggctgtg gatatctcat gttccttgg ggcgtcaaacc ccactcacat	6780
ctcctatgtc atgctcatat tctttgtcct gatgggtggtt gtgatccccg agccaggggca	6840
acaaagggtcc atccaagaca accaagtggc atacctcatt attggcatcc tgacgctgg	6900
ttcagcggtg gcagccaacg agctaggcat gctggagaaa accaaagagg acctcttgg	6960
gaagaagaac ttaattccat ctatgtcttc accctggagt tggccggatc ttgacactgaa	7020
gccaggagct gcctggacag tgtacgttgg cattgttaca atgctctctc caatgttca	7080
ccactggatc aaagtcaaat atggcaacct gtctctgtct ggaatagccc agtcagcc	7140
agtcctttct ttcatggaca aggggataacc attcatgaag atgaatatct cggtcataat	7200
gctgctggtc agtggctgga attcaataac agtgatgcct ctgctctgtg gcatagggtg	7260
cggccatgctc cactggcttc tcatgttacc tggaaatcaaa ggcgcagcagt caaagctagc	7320
acagagaagg gtgttccatg gcgttgcga gaaccctgtg gttgatggga atccaacagt	7380
tgacattgag gaagctcctg aaatgcctgc cctttatgag aagaaaactgg ctctatatct	7440
ccttcttgct ctcaagcctag cttctgtgc catgtgcaga acgcccctttt cattggctga	7500

ES 2 718 187 T3

aggcattgtc	ctagcatcg	ctgccttagg	gccgctcata	gaggaaaca	ccagccttct	7560
ttggatgga	cccatggctg	tctccatgac	aggagtcatg	agggggaaatc	actatgcttt	7620
tgtggagtc	atgtacaatc	tatggaatg	aaaaactgga	cgccggggga	gcgcgaatgg	7680
aaaaactttg	ggtgaagtct	ggaagaggga	actgaatctg	ttggacaaggc	gacagtttga	7740
gttgataaaa	aggaccgaca	tttgtggaggt	ggatcgtgat	acggcacgca	ggcatttggc	7800
cgaagggaag	gtggacaccg	gggtggcggt	ctccaggggg	accgcaaagt	taaggtggtt	7860
ccatgagcgt	ggctatgtca	agcttggagg	tagggtgatt	gacctgggtt	gtggccggcgg	7920
aggctggtgt	tactacgctg	ctgcgcaaaa	ggaagtgagt	ggggtcaaag	gatttactct	7980
tggaagagac	ggccatgaga	aacccatgaa	tgtcCAAAGT	ctgggatgga	acatcatcac	8040
cttcaaggac	aaaactgata	tccaccgcct	agaaccagt	aatgtgaca	cccttttgc	8100
tgacatttgg	gagtcatcat	cgtcatcggt	cacagaggg	gaaaggaccg	tgagagttct	8160
tgatactgt	aaaaatggc	tggattgtgg	ggttgacaac	ttctgtgtga	aggtgttagc	8220
tccatacatg	ccagatgttc	ttgagaaact	ggaattgctc	caaaggaggt	ttggcggAAC	8280
agtgtacgg	aaccctctct	ccaggaattc	cactcatgaa	atgtactacg	tgtctggagc	8340
ccgcagcaat	gtcacattta	ctgtgaacca	aacatcccgc	ctctgtatga	ggagaatgag	8400
gcgtccaact	ggaaaagtga	ccctggaggc	tgacgtcatc	ctcccaattt	ggacacgcag	8460
tgttgagaca	gacaagggac	ccctggacaa	agaggccata	gaagaaaggg	ttgagaggat	8520
aaaatctgag	tacatgacct	cttggtttta	tgacaatgac	aacccctaca	ggacctggca	8580
ctactgtggc	tcctatgtca	caaaaacctc	aggaagtgcg	gcgagcatgg	taaatgggt	8640
tattaaaatt	ctgacatatac	catgggacag	gatagaggag	gtcacaagaa	tggcaatgac	8700
tgacacaacc	ccttttggac	agcaaagagt	gtttaagaa	aaagttgaca	ccagagcaaa	8760
ggatccacca	gcgggaacta	ggaagatcat	gaaagttgtc	aacaggtggc	tgtccgcca	8820
cctggccaga	aaaaagaacc	ccagactgtg	cacaaaggaa	gaatttattt	caaaaagtccg	8880
aagtcatgca	gccattggag	cttacctgga	agaacaagaa	cagtggaga	ctgccaatga	8940
ggctgtccaa	gacccaaagt	tctggaaact	ggtggatgaa	gaaaggaaatc	tgcaccaaca	9000
aggcaggtgt	cggacttgc	tgtacaacat	gatggggaaa	agagagaaga	agctgtcaga	9060
gtttggaaa	gcaaaggaa	gccgtccat	atggtatatg	tggctggag	cgcgttatct	9120
ttagtttgc	ggccctggat	tcctgaatga	ggaccattgg	gcttccaggg	aaaactcagg	9180
aggaggagt	gaaggcattt	gcttacaata	cctaggatat	gtgatcagag	acctggctgc	9240
aatggatggt	ggtggattct	acgcggatga	caccgctgga	tggcacacgc	gcatcacaga	9300
ggcagacctt	gatgtgaac	aggagatctt	gaactacatg	agcccacatc	acaaaaaaact	9360
ggcacaagca	gtgtatggaaa	tgacatacaa	gaacaaagt	gtgaaagtgt	tgagaccaggc	9420

ES 2 718 187 T3

cccaggaggg aaaggctaca tggatgtcat aagtgcacga gaccagagag gatccggca	9480
ggtagtact tatgctctga acaccatcac caacttggaa gtccatttgta tcagaatggc	9540
agaagcagag atggtgatac atcaccaaca tgttcaagat tgtgatgaat cagttctgac	9600
caggctggag gcatggctca ctgagcacgg atgtgacaga ctgaagagga tggcggtgag	9660
tggagacgac tgtgtggtcc ggcccatcga tgacaggttc ggcctggccc tgtccatct	9720
caacgccatg tccaagggtt gaaaggacat atctgaatgg cagccatcaa aagggtggaa	9780
tgattggag aatgtccct tctgttccca ccacttccat gaactacagc tgaaggatgg	9840
caggaggatt gtggtcctt gccgagaaca ggacgagctc attgggagag gaagggtgtc	9900
tccaggaaac ggctggatga tcaaggaaac agcttgcctc agcaaagcct atgccaacat	9960
gtggtaactg atgtatccc acaaaaggga catgaggcta ctgtcattgg ctgtttcctc	10020
agctgttccc acctcatggg ttccacaagg acgcacaaca tggtcgattc atgggaaagg	10080
ggagtggatg accacggaag acatgottga ggtgtggAAC agagtatgga taaccaacaa	10140
cccacacatg caggacaaga caatggtaaaaatggaga gatgtccctt atctaaccaa	10200
gagacaagac aagctgtgcg gatcaactgat tggaaatgacc aataggccca cctggcctc	10260
ccacatccat ttagtcatcc atcgatcccg aacgctgatt ggacaggaga aatacactga	10320
ctacctaaca gtcataggaca ggtattctgt ggatgctgac ctgcaactgg gtgagcttat	10380
ctgaaacacc atctaacagg aataaccggg atacaaacca cgggtggaga accggactcc	10440
ccacaacctg aaaccggat ataaaccacg gctggagaac cgggctccgc acttaaatg	10500
aaacagaaac cgggataaaaa actacggatg gagaaccgga ctccacacat tgagacagaa	10560
gaagttgtca gcccagaacc ccacacggat tttgcactg ctaagctgtg aggcaactgca	10620
ggctggaca gcccacccctc aggttgcgaa aaacctgggtt tctggaccc cccaccccg	10680
agtaaaaaga acggagccctc cgctaccacc ctcccacgtg gtggtagaaa gacggggct	10740
agaggttaga ggagaccctc cagggaaacaa atagtggac catattgacg ccagggaaag	10800
accggagtgg ttctctgctt ttccctcaga ggtctgtgag cacagttgc tcaagaataa	10860
gcagacctt ggatgacaaa cacaacca ctggccggca tggcccagc ctcctcgctg	10920
gcggccggctg ggcaacattc cgaggggacc gtcccctgg taatggcgaat tggacgaat	10980
tctgaaccag tcctaaaacg agtaaatagg accggcaatt cttcaagcaa taaacaggaa	11040
taccaattat taaaagataa cttagtcaga tcgtacaata aagctttgaa gaaaatgcg	11100
ccttattcaa tctttgtat aaaaaatggc caaaaatctc acattggaa acatttgatg	11160
acctcatttc tttcaatgaa gggcctaacg gagttgacta atgttgtgg aaattggagc	11220
gataagcgtg cttctgccgt ggccaggaca acgtatactc atcagataac agcaatacct	11280

ES 2 718 187 T3

gatcaactact tcgcactagt ttctcggtac tatgcataatg atccaaatgc aaaggaaatg	11340
atagcattga aggatgagac taatccaatt gaggagtggc agcatataga acagctaaag	11400
ggtagtgctg aaggaagcat acgatacccc gcatggaatg ggataatatc acaggaggta	11460
ctagactacc tttcatccta cataaataga cgcatataag tacgcattt agcataaaca	11520
cgcactatgc cgttttctc atgtatatat atatacaggc aacacgcaga tatagggtcg	11580
acgtgaacag tgagctgtat gtgcgcagct cgcgttgc tttcggaaagc gctcgtttc	11640
ggaaacgctt tgaagttcct attccgaagt tcctattctc tagaaaagtat aggaacttca	11700
gagcgctttt gaaaacccaa agcgctctga agacgcactt tcaaaaaacc aaaaacgcac	11760
cggactgtaa cgagctacta aaatattgcg aataccgctt ccacaaacat tgctcaaaag	11820
tatcttttg ctatatatct ctgtgctata tccctatata acctacccat ccaccttcg	11880
ctccttgaac ttgcacactaa actcgacctc tacatttttt atgttatct ctagtattac	11940
tcttagaca aaaaaattgt agtaagaact attcatagag tgaatcgaaa acaatacgaa	12000
aatgtaaaaca tttcctatac gtagtatata gagacaaaat agaagaaacc gttcataatt	12060
ttctgaccaa tgaagaatca tcaacgctat cacttctgt tcacaaagta tgcgcaatcc	12120
acatcggtat agaatataat cggggatgcc tttatcttga aaaaatgcac ccgcagctc	12180
gcttagtaatc agtaaacgcg ggaagtggag tcaggctttt ttatggaaag agaaaataga	12240
cacccaaagta gccttcttct aacctaaccg gacctacagt gcaaaaagtt atcaagagac	12300
tgcattatag agcgacaaa ggagaaaaaa agtaatctaa gatgcttgt tagaaaaata	12360
gcgccttcgg gatgcatttt tgtagaacaa aaaagaagta tagattctt gttggtaaaa	12420
tagcgctatc gcgttgcatt tctgttctgt aaaaatgcag ctcagattct ttgtttgaaa	12480
aattagcgct ctgcgttgc atttttgttt tacaaaaatg aagcacagat tcttcgttgg	12540
taaaatagcg cttcgcgtt gcatttctgt tctgtaaaaa tgcaagctcag attctttgtt	12600
tgaaaaatta ggcgttcgcg gttcattttt tgttctacaa aatgaagcac agatgcttcg	12660
ttaacaaaga tatgctattt aagtgcaga tggaaacgcg gaaaatgaac cggggatgcg	12720
acgtgcaga ttacctatgc aatagatgc atagttctc caggaaccga aatacataca	12780
ttgtcttcgg taaagcgcta gactatatat tattatacag gttcaaataat actatcttt	12840
tcagggaaaa ctcccaggtt cggatgttca aaattcaatg atgggtaca agtacgatcg	12900
taaatctgtt aAACAGTTT tcggatatta ggctgtatct cctcaaagcg tattcgaata	12960
tcattgagaa gctgcaggca agtgcacaaa caatacttAA ataaatacta ctcagtaata	13020
acctatttct tagcattttt gacggaaattt gctattttgt tagagtcttt tacaccattt	13080
gtctccacac ctccgcttac atcaacacca ataacgcac ttaatctaag cgcatcacca	13140
acatttctg gcgtcagtcc accagctaac ataaaatgtt agctttcggg gctctttgc	13200

cttccaaccc agtcagaaat cgagttccaa tccaaaagtt cacctgtccc acctgcttct	13260
gaatcaaaca aggaaataaa cgaatgaggt ttctgtgaag ctgcactgag tagtatgttg	13320
cagtctttg gaaatacggag tcttttaata actggcaaac cgaggaactc ttggtattct	13380
tgccacgact catctccatg cagttggacg atatcaatgc cgtaatcatt gaccagagcc	13440
aaaacatcct ccttagggtt attacgaaac acgccaacca agtatttcgg agtgcctgaa	13500
ctattttat atgctttac aagacttgaa atttccttg caataaccgg gtcaattgtt	13560
ctcttctat tgggcacaca tataataccc agcaagtcag catcggaaatc tagagcacat	13620
tctgcggcct ctgtgctctg caagccgaa actttcacca atggaccaga actaccgtg	13680
aaattaataa cagacataact ccaagctgcc tttgtgtgct taatcacgta tactcacgtg	13740
ctcaatagtc accaatgccc tccctcttgg ccctcctcct tttcttttt cgaccgctag	13800
cgtcgacagc gacacacttg catcgatgc agccgggtta acgtgccggc acggcctggg	13860
taaccaggta ttttgtccac ataaccgtgc gcaaaatgtt gtggataagc aggacacagc	13920
agcaatccac agcaggcata caaccgcaca ccgagggtac tccgttctac aggttacgac	13980
gacatgtcaa tacttgcctt tgacaggcat tgatggaatc gtatgtctac gctgatagtc	14040
tgatcgacaa tacaagtggg accgtggtcc cagaccgata atcagaccga caacacgagt	14100
gggatcgtgg tcccgacta ataatcagac cgacgatacg agtgggaccg tggcccaga	14160
ctaataatca gaccgacgat acgagtggga ccgtggttcc agactaataa tcagaccgac	14220
gatacgagtgg ggaccgttgtt cccagactaa taatcagacc gacgatacga gtggaccat	14280
ggtcccagac taataatcag accgacgata cgagtggac cgtggccca gtctgattat	14340
cagaccgacg atacgagtgg gaccgtggtc ccagactaat aatcagaccg acgatacgg	14400
tggaccgtg gtcccagact aataatcaga ccgacgatac gagtgggacc gtggcccag	14460
tctgattatc agaccgacga tacaagtggc acagtgggccc cagagagaat attcaggcca	14520
gttatgctt ctggcctgta acaaaggaca ttaagtaaag acagataaac gtagactaaa	14580
acgtggtcgc atcagggtgc tggctttca agttccttaa gaatggcctc aattttctct	14640
ataactctcg ttggAACACG ggacgtgtcc aggttaagca ccattttatc gcccattatac	14700
aatactgtcg ctccaggagc aaactgtatgt cgtgagctta aactagttct tgatgcagat	14760
gacgttttaa gcacagaagt taaaagagtg ataacttctt cagcttcaaa tatcaccccc	14820
gctttttct gctcatgaag gttagatgcc tgctgcttaa gtaattccctc tttatctgta	14880
aaggctttttt gaagtgcac acctgaccgg gcagatagtt caccggggtg agaaaaaaaga	14940
gcaacaactg atttaggcaa tttggcggtg ttgatacagc gggtaataat cttacgtgaa	15000
atattttccg catcagccag cgcagaaata tttccagcaa attcattctg caatcggtt	15060

gcataacgct gaccacgttc ataagcactt gttggcgat aatcggttacc caatctggat	15120
aatgcagcca tctgctcattc atccagctcg ccaaccagaa caccataatc actttcggtt	15180
agtgcagcag cttaacgacg gcgactccca tcggcaattt ctatgacacc agataactctt	15240
cgaccgaacg ccgggtgtctg ttgaccagtc agtagaaaaag aaggatgag atcatccagt	15300
gcgtcctcag taagcagctc ctggcacgt tcattacctg accatacccg agaggtctc	15360
tcaacactat caccggag cactcaaga gtaaacttca catccgacc acatacaggc	15420
aaagtaatgg cattaccgcg agccattact cctacgcgcg caattaacga atccaccatc	15480
ggggcagctg gtgtcgataa cgaagtatct tcaaccgggtt gagtatttag cgtagtgg	15540
gaaataacag ggcgcacgctt cattatctaa tctcccagcg tggttaatc agacgatcga	15600
aaatttcatt gcagacaggt tccaaatag aaagagcatt tctccaggca ccagttgaag	15660
agcggttgc aatggcctgt tcaaaaacag ttctcatccg gatctgacct ttaccaactt	15720
catccgttcc acgtacaaca ttttttagaa ccatgcttcc ccaggcatcc cgaatttgct	15780
cctccatcca cggggactga gagcattac tattgctgta ttggtaagc aaaatacgt	15840
catcaggctc gaacccttta agatcaacgt tcttgagcag atcacgaagc atatcgaaaa	15900
actgcagtgc ggaggtgttag tcaaacaact cagcaggcgt gggacaatc agcacatcag	15960
cacccacatac gacattaatc gtgccgatac ccaggttagg cgcgcgtgtca ataactatga	16020
catcatagtc atgagcaaca gttcaatgg ccagtcggag catcaggtgt ggatcggtgg	16080
gcagtttacc ttcatcaaattt tgccattactcagtttcc aatacgggtc agagccagac	16140
aggaaggaat aatgtcaagc cccggccagc aagtggctt tattgcataa gtgacatcgt	16200
cctttcccc aagatagaaa ggcaggagag tgtctctgc atgaatatga agatctggta	16260
cccatccgtg atacatttag gctgttccct ggggtcggtt accttccacg agcaaaacac	16320
gtagccccctt cagagccaga tcctgagcaa gatgaacaga aactgagggtt ttgtaaacgc	16380
cacccttatg ggcagcaacc ccgatcacccg gtggaaatac gtcttcagca cgtcgcaatc	16440
gcgtacccaa cacatcacgc atatgattaa tttttcaat tgtataacca acacgttgc	16500
caaccgtcc tcgaatttcc atatccgggt gcggtagtcg ccctgcttcc tcggcatctc	16560
tgatagcctg agaagaaacc ccaactaaat ccgcgttcc acctattctc cagcgccggg	16620
ttatttccct cgcttccggg ctgtcatcat taaactgtgc aatggcgata gccttcgtca	16680
tttcatgacc agcggtttag cactggtaa gtgttccat gagtttccatt ctgaacatcc	16740
tttaatcatt gctttcggtt tttttattaa atcttgcatt ttactgcaaa gcaacaacaa	16800
aatcgaaag tcatcaaaaa accgcaaaatg tggttaaaat aagagcaaca ctacaaaagg	16860
agataagaag agcacataacc tcagtcactt attatcacta gcgcgtccg cagccgtgt	16920
accgagcata gcgagcgaac tggcgaggaa gcaaagaaga actgttctgt cagatagctc	16980

ttacgctcag cgcaagaaga aatatccacc gtggaaaaaa ctccaggtag aggtacacac	17040
gcggatagcc aattcagagt aataactgt gataatcaac cctcatcaat gatgacgaac	17100
taacccccga tatkaggtaa catgacgaag ggaaagagaa ggaaatcaac tgtgacaaac	17160
tgcctcaaa ttggcttcc ttaaaaatta cagttcaaaa agtatgagaa aatccatgca	17220
ggctgaagga aacagcaaaa ctgtgacaaa ttaccctcag taggtcagaa caaatgtgac	17280
gaaccaccct caaatctgtg acagataacc ctcagactat cctgtcgtaa tggaagtgtat	17340
atcgccgaag gaaaatacga tatgagtcgt ctggcggcct ttcttttct caatgtatga	17400
gaggcgcatt ggagttctgc tggatctc attaacacag acctgcagga agcggcggcg	17460
gaagtcagggc atacgcttgt aactttgagg cagctggtaa cgctctatga tccagtcgtat	17520
tttcagagag acgtgcctg agccatccgg cttacgatac tgacacaggg attcgtataa	17580
acgcattggca tacggattgg tgattttttt tgtttacta agccgaaact gcgtaaaccg	17640
gttctgttaac ccgataaaaga agggaatgag atatgggtt atatgtacac tgtaaagccc	17700
tctggatgga ctgtgcgcac gtttgataaa ccaaggaaaa gattcatagc ctttttcatc	17760
gccggcatcc tcctcagggc gataaaaaac cacttccttc cccgcgaaac tcttcaatgc	17820
ctgccgtata tccttactgg cttccgcaga ggtcaatccg aatatttcag catatttagc	17880
aacatggatc tcgcagatac cgtcatgttc ctgtagggtg ccattcagatt ttctgtatcg	17940
gtcaacgaac agatacagca tacgttttg atcccgagg agactatatg ccgcctcagt	18000
gaggtcggtt gactggacga ttgcgggct atttttacgt ttcttgcgtat tgataaccgc	18060
tgtttccgcc atgacagatc catgtgaagt gtgacaagtt ttttagattgt cacactaaat	18120
aaaaaagagt caataagcag ggataacttt gtggaaaaac agcttcttct gagggcaatt	18180
tgtcacaggg ttaaggcaa tttgtcacag acaggactgt catttgggg tgatttgc	18240
cactgaaagg gcaatttgc acaacacccctt ctctagaacc agcatggata aaggcctaca	18300
aggcgctcta aaaaagaaga tctaaaaact ataaaaaaaaa taattataaa aatatccccg	18360
tggataagtg gataacccca agggaaagttt ttccaggcat cgtgtgtaa cagaatataat	18420
aagtgcgtt ccctgggtgt tcctcgctca ctgcgggg agggttcgag aagggggggc	18480
acccccccttc ggcgtgcgcg gtcacgcgc cagggcgcag ccctggtaa aaacaagggtt	18540
tataaatatt ggttaaaag caggttaaaa gacaggtagt cggggccga aaaacgggcg	18600
gaaacccttg caaatgtgg atttctgcc tggacagc ccctcaatg tcaataggta	18660
cgcctctcat ctgtcagcac tctgcctc aagtgtcaag gatgcgcgcc ctcatctgtc	18720
agtagtcgcg cccctcaagt gtcaataccg cagggcactt atccccaggc ttgtccacat	18780
catctgtggg aaactcgcgt aaaatcaggc gtttcgcggc atttgcgagg ctggccagct	18840

ES 2 718 187 T3

ccacgtcgcc ggccgaaatc gagectgccc ctcatctgtc aacgcccgcg cgggtgagtc 18900
 ggccccctaa gtgtcaacgt cggcccccta tctgtcagtg agggccaagt ttcccgag 18960
 gtatccacaa cgccggcggc cggccgcggt gtctcgaca cggcttcgac ggcgtttctg 19020
 ggcgcttgc agggccatacg acggccgcca gcccagcggc gagggcaacc agccgaggc 19080
 ttcccccgt cgctcgactg cggcgagcac tactggctgt aaaaggacag accacatcat 19140
 ggttctgtgt tcatttagttt gttctgtcca ttgctgacat aatccgctcc acttcaacgt 19200
 aacaccgcac gaagatttctt attgttcctg aaggcatatt caaatcgaaa tcgttaccgc 19260
 ttgcaggcat catgacagaa cactacttcc tataaacgct acacaggctc ctgagattaa 19320
 taatgcggat ctctacgata atgggagatt ttcccgactg ttctcgac ttctcagtgg 19380
 ataacagcca gcttctctgt ttaacagaca aaaacagcat atccactcag ttccacattt 19440
 ccatataaag gccaaggcat ttattctcag gataattgtt tcagcatcgc aaccgcata 19500
 gactccggca tcgcaaactg caccgggtgc cgggcagcca catccagcgc aaaaaccttc 19560
 gttagactt ccgttgaact gatggactta tgtcccatca ggctttgcag aactttcagc 19620
 ggtataccgg catacagcat gtgcacgcata taggaatggc ggaacgtatg tgggtgtgacc 19680
 ggaacagaga acgtcacacc gtcagcagca gcggcggcaa ccgcctcccc aatccaggc 19740
 ctgaccgttc tgtccgtcac ttcccgatca cgcgccttct ctgtccattcc tggcgacgg 19800
 ttacgcccgtt ccatgagctt atcgcgaata aatacctgtg acggaagatc acttcgcaga 19860
 ataaataaat cctgggtgtcc ctgttgatac cgggaagccc tggccaact tttggcgaaa 19920
 atgagacgtt gatcgacacg taagagggtt caactttcac cataatgaaa taagatcact 19980
 accggggcgtt tttttgagt tatcgagatt ttccaggatc aaggaagctaa aaatggagaa 20040
 aaaaatcaact ggatatacca ccgttgatataatccatgg catcgtaaa aacatittga 20100
 ggcatttcag tcagttgctc aatgtaccta taaccagacc gttcagctgg atattacggc 20160
 cttttaaag accgtaaaga aaaataagca caagtttat cccgccttta ttccatattt 20220
 tgccgcctg atgaatgctc atccggattt tcgtatggca atgaaagacg gtgagcttgt 20280
 gatatggat agtggcacc cttgttacac cgtttccat gagcaaactg aaacgttttc 20340
 atcgcctgg agtgaataacc acgacgattt ccggcagttt ctacacatata attcgcaaga 20400
 tgtggcgtgt tacggtgaaa acctggctt tttccctaaa gggtttattt agaatatgtt 20460
 ttccgtctca gccaatccct gggtgagttt caccagttt gattttaaacg tggccaatat 20520
 ggacaacttc ttgcggccctt tttcaccat gggcaaataat tatacgcaag gcgacaagg 20580
 gctgatgcgg ctggcgatttcc aggttcatca tgccgttgtt gatggcttcc atgtcgccag 20640
 aatgttaat gaattacaac agtactgcga tgagtggcag ggcggggcgt aattttttta 20700
 aggagttat tggtgccctt aaacgcctgg ttgctacgca tgaataagtg ataataagcg 20760
 gatgaatggc agaaattcga tgataagctg tcaaaccatga gaattggctg accctgtgga 20820
 atgtgtgtca gtttagggtgtt ggaaagtccc caggctcccc agcaggcaga agtatgc当地 20880
 gcatgcacatctt caatttagtca gcaaccagggt gtggaaagtc cccaggctcc ccaggcaggca 20940
 gaagtatgca aagcatgcat ctcaatttagt cagcaaccat agtccccccc ctaactccgc 21000
 ccatcccgcc ccttaactccg cccaggccctt cccattctcc gccccatggc tgactaattt 21060
 tttttatttta tgcagaggcc gaggccgcctt c 21091

<210> 6
 <211> 21094
 <212> ADN
 <213> sintético

<400> 6		
agtaaaatcct gtgtgcta at tgaggtgc at ggctcgaa atcgagttgc taggcaataa	60	
acacatttgg attaatttta atcgttcg tt gaggcattag cagaactg accagaacat	120	
gtctggtcgt aaagctcagg gaaaaaccct gggcgtca atggtagc gaggagttcg	180	
ctccttgtca aacaaaataa aacaaaaaac aaaacaaatt ggaaacagac ctggaccc	240	
aagagggttt caaggattt tcttttctt ttgttcaac attttactg gaaaaaagat	300	
cacagccac ctaaagagg tttggaaaat gctggaccca agacaaggct tggctgttct	360	
aaggaaagtc aagagagtgg tggccagttt gatgagagga ttgtcctcga gggaaacgccc	420	
ttccccatgat gttctgactg tgcaattcct aattttggaa atgctgttga tgacgggtgg	480	
agttaaccctc tctaacttcc aaggaaaggt gatgatgacg gtaaatgcta ctgacgtcac	540	
agatgtcatc acgattccaa cagctgctgg aaagaaccta tgcattgtca gagcaatgg	600	
tgtggatac atgtgcgtatg atactatcac ttatgaatgc ccagtgcgtt cggctggtaa	660	
tgatccagaa gacatcgact gttggcgcac aaagtca gtcattgtca ggtatggaa	720	
atgcaccaag acacgccact caagacgcag tcggaggc tgcacagtgc agacacacgg	780	
agaaaggact ctagcgaaca agaagggggc ttggatggac agcaccaagg ccacaaggta	840	
tttggtaaaa acagaatcat ggatcttgag gaaccctgga tatgccctgg tggcagccgt	900	
cattggttgg atgcttggg gcaacaccat gcagagagtt gtgtttgtcg tgctattgct	960	
tttggtggcc ccagcttaca gcttcaactg ccttggaaatg agcaacagag acttcttgg	1020	
aggagtgtct ggagcaacat ggggtggattt ggttctcgaa ggcacagact gcgtgactat	1080	
catgtctaag gacaaggccta ccatcgatgt gaagatgt aatatggagg cggccaacct	1140	
ggcagaggcgc cgcaaggattt gctatttggc taccgtcagc gatctctcca ccaaagctgc	1200	
gtgccccgacc atgggagaag ctcacaatga caaacgtgct gacccagctt ttgtgtgcag	1260	
acaaggagtg gtggacaggg gctggggcaa cgctgcgga ttctttggaa aaggatccat	1320	

ES 2 718 187 T3

tgacacatgc gccaaatttgc cctgctctac caaggcaata ggaagaacca tcttggaaaga	1380
gaatatcaag tacgaagtgg ccattttgtt ccatggacca actactgtgg agtcgcacgg	1440
aaactactcc acacagggtt gagccactca ggcagggaga ttcagcatca ctccctgcggc	1500
gccttcatac acactaaagc ttggagaata tggagaggtt acagtggact gtgaaccacg	1560
gtcagggatt gacaccaatg catactacgt gatgactgtt ggaacaaaaga cgttcttggt	1620
ccatcgtag tggttcatgg acctcaacctt cccttggagc agtgcgtggaa gtactgtgt	1680
gaggaacaga gagacgttaa tggagttga ggaaccacac gccacgaagc agtctgtat	1740
agcattgggc tcacaagagg gagctctgca tcaagcttgc gctggagcca ttccctgtgg	1800
atttcaagc aacactgtca agttgacgtc gggtcatttgc aagtgttagag tgaagatgg	1860
aaaattgcag ttgaaggaa caacctatgg cgtctgttca aaggctttca agtttcttgg	1920
gactcccggtc gacacagggtc acggcactgtt ggtgttggaa ttgcagtaca ctggcacgg	1980
tggaccttgc aaagttccta tctcgtagt ggcttcatttgc aacgacctaa cgccagtg	2040
cagattggtc actgtcaacc ctttgtttc agtggccacg gccaacgcta aggtcctgat	2100
tgaattggaa ccacccttttgc gagactcata catagtgggtt ggcagaggag aacaacagat	2160
caatcaccat tggcacaagt ctggaaacgtc catggcaaa gccttacaa ccaccctcaa	2220
aggagcgcag agactagccc ctctaggaga cacagcttgc gactttggat cagttggagg	2280
ggtgttccacc tcagttgggc gcgctgttca tcaagtgttc ggaggagcat tccgctca	2340
gttcggaggc atgtccttgc taacgcaagg attgctgggg gctctctgt tggatgg	2400
catcaatgtc cgtgataggt ccatacgatc cacgttttc gcagttggag gagttctgt	2460
cttcctctcc gtgaacgtgg ggcggatca aggtgcgc atcaacttttgc aagagaga	2520
gctcaagtgc ggagatggta tcttcatttgc tagactctt gatgactggc tgaacaagta	2580
ctcatactat ccagaagatc ctgtgaagct tgcataataa gtgaaagcctt ttttgaaga	2640
agggaaagtgt ggcctaaattt cagttgactc ctttgagcat gagatgtggaa gaagcagg	2700
agatgagatc aatgccattt ttgaggaaaaa cgaggtggac atttctgttgc tctgtcag	2760
tccaaagaat gttaccaga gaggaactca tccatccatcc agaattcggg atggctgtca	2820
gtatggttgg aagacttggg gtaagaacct tggatgttcc ccaggagggaa agaatggaa	2880
cttcatacata gatggaaagt ccagggaaatc atgcccgttt tcaaaccggg tctggaaattc	2940
tttccagata gaggagtttgg ggcggggat gttcaccaca cgcgtgtaca tggacgcagt	3000
ctttgaatac accatagact gcgatggatc tatcttgggtt gcagcggtga acggaaaaaa	3060
gagtgccttgc ggctctccaa cattttggat gggaaatgtt gaaatggatggatggat	3120
gatccacacc ttggaggcat tagattacaa ggagtgtgag tggccactga cacatacgat	3180

ES 2 718 187 T3

tggAACATCA	gttGAAGAGA	gtgAAATGTT	catGCCGAGA	tcaATCGGAG	gcccAGTTAG	3240
cttcACAAAT	cataTCCCTG	gataCAAGGT	tcagACGAAC	ggacCTTGG	tgcAGGTAC	3300
actAGAAGTG	aAGAGAGAAG	cttgCCCAGG	gactAGCGTG	atcATTGATG	gcaACTGTGA	3360
tggACGGGGA	aaATCAACCA	gatCCACCAc	ggatAGCGGG	aaAGTTATTC	ctgaATGGTG	3420
ttggCCGTCC	tgcACAAATGC	cgccTGTGAG	cttccATGGT	agtGATGGGT	gttGGTATCC	3480
catggAAATT	aggCCAAGGA	aaACGCAATGA	aagCCATCTG	gtgcGCTCCT	gggtTACAGC	3540
tggAGAAATA	catgCTGTCC	ctttGGTTT	ggtGAGCATG	atGATAGCAA	tggAAAGTGGT	3600
cctaAGGAAA	agacAGGGAC	caaAGCAAAT	gttGGTTGG	ggAGTAGTGC	tcttGGGAGC	3660
aatGCTGGTC	gggCAAGTAA	cttcCCTGTA	tttGCTGAAA	ctcacAGTGG	ctgtGGGATT	3720
gcattTCCAT	gagATGAACA	atggAGGAGA	cgccATGTAT	atggCGTTGA	ttgCTGCCTT	3780
ttcaATCAGA	ccaggGCTGC	tcatCGGCTT	tggGCTCAGG	accCTATGGA	gccCTCGGGA	3840
acgcCTTGTG	ctgaccCTAG	gagcAGGCAAT	ggtGGAGATT	gcctTGGGTG	gcgtGATGGG	3900
cggCCTGTGG	aagtATCTAA	atgcAGTTTC	tctCTGCATC	ctgacaATAA	atgcTGTGTC	3960
ttctAGGAAA	gcatCAAATA	ccatCTTGCC	cctCATGGCT	ctgtTGACAC	cggtCACCAT	4020
ggctGAGGTG	agactTGCCG	caatGTTCTT	tttgGCCATG	gttatCATAG	gggtCCTTCA	4080
ccagaATTTC	aaggACACCT	ccatGCAAGAA	gactATAACCT	ctggTGGCCC	tcacACTCAC	4140
atcttACCTG	ggctTGACAC	aacTTTTT	gggcCTGTGT	gcattTCTGG	caacCCGcat	4200
atttGGGCGA	aggAGTATCC	cagtGAATGA	ggcactCGCA	gcagCTGGTC	tagtGGGAGT	4260
gctGGCAGGA	ctggCTTTTC	aggAGATGGA	gaactTCCTT	ggTCGATTG	cagtTGGAGG	4320
actCCTGATG	atgcTGTGTTA	gcgtGGCTGG	gaggGTGGAT	gggcTAGAGC	tcaAGAAAGCT	4380
tgtGAAGTT	tcatGGGAAG	aggAGGCGGA	gatcAGCGGG	agtTCCGCC	gctATGATGT	4440
ggcactCAGT	gaacaAGGGG	agttCAAGCT	gctttCTGAA	gagaAAAGTGC	catGGGACCA	4500
ggTTGTGATG	acctCGCTGG	cttGGTTGG	ggctGCCCTC	catCCATTG	ctttCTGTCT	4560
ggTCCTTGCT	gggtGGCTGT	ttcatGTCAG	gggAGCTAGG	agaAGTGGGG	atgtCTTGTG	4620
ggatATTCCC	actCCTAAGA	tcatCGAGGA	atgtGAACAT	ctggAGGATG	ggatttatGG	4680
catATTCCAG	tcaACCTCT	tggggCCTC	ccAGCGAGGA	gtgggAGTGG	cacAGGGAGG	4740
ggTGTCCAC	acaATGTGGC	atgtCACAAG	aggAGCTTC	cttGTCAGGA	atggCAAGAA	4800
gttGATTCCA	tcttGGGCTT	cagtaAAAGGA	agacCTTGTc	gcctATGGTG	gctCATGGAA	4860
gttGGAAGGC	agatGGGATG	gagAGGAAGA	ggtCCAGTTG	atcGCGGCTG	ttccAGGAAA	4920
gaacGTGGTC	aacGTCCAGA	caaAAACCGAG	cttGTTAAA	gtgAGGAATG	ggggAGAAAT	4980
cggggCTGTc	gtcttGACT	atccGAGTGG	cactTCAGGA	tctCCTATTG	ttaACAGGAA	5040
cggAGAGGTG	attGGGCTGT	acggCAATGG	catcCTGTc	ggtGACAACt	cttcGTGTC	5100

ES 2 718 187 T3

cgccatatcc cagactgagg tgaaggaaga aggaaaggag gagctccaag agatcccgac	5160
aatgctaaag aaaggaatga caactgtcct tgattttcat cctggagctg ggaagacaag	5220
acgtttcctc ccacagatct tggccgagtg cgcacggaga cgcttgcgc a ctcttgttt	5280
ggccccccacc agggttgttc ttctgaaat gaaggaggct tttcacggcc tggacgtgaa	5340
attccacaca caggctttt ccgctcacgg cagcgggaga gaagtcatg atgccatgtg	5400
ccatgccacc ctaacttaca ggatgttgg accaactagg gttgttaact gggaaagtgtat	5460
cattatggat gaagcccatt ttttggatcc agcttagcata gccgctagag gttgggcagc	5520
gcacagagct agggcaaatg aaagtgcac aatcttgcgt acagccacac cgcctggac	5580
tagtgcgtt gttccacatt caaatggtga aatagaagat gttcaaacgg acataccag	5640
ttagccctgg aacacagggc atgactggat cctagctgac aaaaggccca cggcatggtt	5700
cctccatcc atcagagctg caaatgtcat ggctgcctct ttgcgttaagg ctggaaagag	5760
tgtggggc ctgaacagga aaaccttga gagagaatac cccacgataa agcagaagaa	5820
acctgacttt atattggcca ctgacatagc tgaatggga gccaacctt gcgtggagcg	5880
agtgcgtggat tgcaggacgg cttaaagcc tgtgcgttg gatgaaggga ggaagggtggc	5940
aataaaaggg ccacttcgta tctccgcata ctctgcgtct caaaggaggg ggcgcattgg	6000
gagaaaatccc aacagagatg gagactcata ctactattct gaggctacaa gtggaaataa	6060
tgcaccac gtctgcgtt gggaggcctc aatgccttg gacaacatgg aggtgagggg	6120
tggaaatggc gccccactct atggcgttga aggaactaaa acaccagtt cccctggtga	6180
aatgagactg agggatgacc agagggaaatg cttcagagaa ctagtgcggg attgtgaccc	6240
gcccgtttgg ctggcgtggc aagtggccaa ggctggttt aagacgaaatg atcgtaaatg	6300
gtgtttgaa ggccctgagg aacatgagat cttgaatgac agcggtgaaa cagtgaatg	6360
caggcgtcct ggaggagcaa agaaggctct gcccggaaagg tgggtgtatg aaagggtgtc	6420
atctgaccag agtgcgtgt ctgaatttat taagttgtct gaaggttagga ggggagctgc	6480
tgaagtgcata gttgtgttgc gtgaactccc tgatttcctg gctaaaaaag gtggagggc	6540
aatggataacc atcgtgtgt tcctccactc tgaggaaggc tctaggcctt accgcaatgc	6600
actatcaatg atgcctgagg caatgacaat agtcatgctg tttatactgg ctggactact	6660
gacatcgaaa atggcgtatct ttcatgtc tccaaaggc atcagtagaa tgtctatggc	6720
gatggcaca atggccggct gtggatatct catgttcctt ggaggcgtca aacccactca	6780
catctccatat gtcatgtca tattcttgcgtt cctgtatggt gttgtatcc ccgagccagg	6840
gcaacaaagg tccatccaag acaaccaagt ggcatacctc attattggca tcctgacgct	6900
gtttcagcg gtggcagcca acgagctagg catgtggag aaaaccaaag aggaccttt	6960

ES 2 718 187 T3

tgggaagaag aacttaattc catctagtgc ttcaccctgg agttggccgg atcttgacct	7020
gaagccagga gctgcctgga cagtgtacgt tggcattgtt acaatgctct ctccaatgtt	7080
gcaccactgg atcaaagtgc aatatggcaa cctgtctctg tctggaatag cccagtcagc	7140
ctcagtcattt tctttcatgg acaaggggat accattcatg aagatgaata tctcggtcat	7200
aatgctgctg gtcagttggc ggaattcaat aacagtgtatg cctctgctct gtggcatagg	7260
gtgcgccatg ctccactggc ctctcatttt acctggaatc aaagcgcagc agtcaaagct	7320
agcacagaga agggtgttcc atggcgttgc cgagaaccct gtgggtgtatg ggaatccaac	7380
agttgacatt gaggaagctc ctgaaatgcc tgccctttat gagaagaaac tggctctata	7440
tctccttctt gctctcagcc tagttctgt tgccatgtgc agaacgcctt tttcattggc	7500
tgaaggcatt gtccttagcat cagctgcattt agggccgctc atagagggaa acaccagcct	7560
tctttggaat ggacccatgg ctgtctccat gacaggagtc atgaggggaa atcactatgc	7620
ttttgtggaa gtcatgtaca atctatggaa gataaaaact ggacgcgggg ggagcgcgaa	7680
tggaaaaact ttgggtgaag tctgaaagag ggaactgaat ctgttggaca agcgcacagtt	7740
ttagttgtat aaaaggaccg acattgttgc ggtggatcgt gatacggcac gcaggcattt	7800
ggccgaaggg aagggtggaca ccgggggtggc ggtctccagg gggaccgcaa agttaagggt	7860
gttccatgag cgtggctatg tcaagctggc aggtagggtg attgacctgg ggtgtggccg	7920
cggaggctgg ttttactacg ctgctgcgca aaaggaagtg agtggggtca aaggatttac	7980
tcttggaaaga gacggccatg agaaacccat gaatgtgcaa agtctggat ggaacatcat	8040
cacccatcaag gacaaaactg atatccaccc cctagaacca gtgaaatgtg acacccttt	8100
gtgtgacatt ggagagtcat catcgatc ggtcacagag gggaaagga cctgtgagat	8160
tcttgatact gtagaaaaat ggctggcttg tgggttgac aacttctgtg tgaagggttt	8220
agctccatac atgccagatg ttcttgagaa actggaatttgc ctccaaagga ggttggccg	8280
aacagtgtatc aggaacccttc tctccagggaa ttccactcat gaaatgtact acgtgtctgg	8340
agccgcagc aatgtcacat ttactgtgaa ccaaacatcc cgcctcctga tgaggagaat	8400
gaggcgtcca actggaaaag tgaccctggc ggctgacgtc atcccccattt ttgggacacg	8460
cagtttgag acagacaagg gaccctggc caaagaggcc atagaagaaa gggttgagag	8520
gataaaaatct gactacatgc cctttgggtt ttatgacaat gacaacccctt acaggacatg	8580
gcactactgt ggctcctatg tcacaaaaac ctcaggaatg ggccgcagca tggtaatgg	8640
tgttattaaa attctgacat atccatggc caggatagag gaggtcacaa gaatggcaat	8700
gactgacaca acccccttttgc gacagcaaag agtgtttaaa gaaaaagttg acaccagac	8760
aaaggatcca ccagcgggaa ctaggaagat catgaaagtt gtcaacaggt ggctgttccg	8820
ccacccatggcc agagaaaaga accccagact gtgcacaaag gaagaattta ttgcaaaagt	8880

ccgaagtcat gcagccattg gagcttacct ggaagaacaa gaacagtgga agactgccaa	8940
tgaggctgtc caagaccaa agttctggg actgggtggat gaagaaaagga agctgcacca	9000
acaaggcagg tgtcgactt gtgtgtacaa catgatgggg aaaagagaga agaagctgtc	9060
agagtttggg aaagcaaagg gaagccgtgc catatggtat atgtggctgg gagcgcggta	9120
tcttgagttt gaggccctgg gattcctgaa tgaggaccat tggccttcca gggaaaactc	9180
aggaggagga gtggaaggca ttggcttaca ataccttagga tatgtgatca gagacctggc	9240
tgcaatggat ggtgggtggat tctacgcgga tgacaccgct ggatgggaca cgcgcatcac	9300
agaggcagac cttgtatgt aacaggagat cttgaactac atgagcccac atcacaaaaaa	9360
actggcacaa gcagtgtatgg aaatgacata caagaacaaa gtggtaaag tggtagacc	9420
agccccagga gggaaagcct acatggatgt cataagtcga cgagaccaga gaggatccgg	9480
gcaggttagtg acttatgctc tgaacaccat caccacttg aaagtccaat tgatcagaat	9540
ggcagaagca gagatggtga tacatcacca acatgttcaa gattgtgatg aatcagttct	9600
gaccaggctg gaggcatggc tcactgagca cggatgtgac agactgaaga ggatggcggt	9660
gagtggagac gactgtgtgg tccggccat cgatgacagg ttcggcctgg ccctgtccca	9720
tctcaacgcc atgtccaagg ttagaaagga catatctgaa tggcagccat caaaagggtg	9780
gaatgattgg gagaatgtgc cttctgttc ccaccacttc catgaactac agctgaagga	9840
tggcaggagg attgtggtgc cttgcccaga acaggacgag ctcattgggaa gagaaagggt	9900
gtctccagga aacggctgga tcatcaagga aacagcttgc ctcagcaag cctatgcca	9960
catgtgtca ctgtatgttatt ttcacaaaaag ggacatgagg ctactgtcat tggctgtttc	10020
ctcagctgtt cccacactcat gggttccaca aggacgcaca acatggtcga ttcatggaa	10080
aggggagtgg atgaccacgg aagacatgct tgaggtgtgg aacagagtat ggataaccaa	10140
caacccacac atgcaggaca agacaatggt gaaaaatgg agagatgtcc cttatcta	10200
caagagacaa gacaagctgt gcggatcaact gattggaatg accaataggg ccacctggc	10260
ctccccacatc catttagtca tccatcttat ccgaacgctg attggacagg agaaatacac	10320
tgactaccta acagtcatgg acaggtattc tgtggatgt gacactgcaac tgggtgagct	10380
tatctgaaac accatctaac aggaataacc gggataaaaa ccacgggtgg agaaccggac	10440
tccccacaac ctgaaacccgg gatataaacc acggctggag aaccgggctc cgcaactaaa	10500
atgaaacaga aaccgggata aaaactacgg atggagaacc ggactccaca cattgagaca	10560
gaagaagttg tcagcccaga accccacacg agtttgcca ctgctaagct gtgaggcagt	10620
gcaggctggg acagccgacc tccaggttgc gaaaaacctg gtttctggga cctccaccc	10680
cagagtaaaa agaacggagc ctccgctacc accctcccac gtggtggtag aaagacgggg	10740

tcgttaacaa agatatgcta ttgaagtgc a agatggaaac gcagaaaatg aaccggggat	12720
gcgacgtgca agattaccta tgcaata gat gcaatagttt ctccaggaaac cgaaatacat	12780
acattgtctt ccgtaaaagcg ctagactata tattattata caggttcaaa tatactatct	12840
gttcaggga aaactcccag gttcggatgt tcaaaattca atgatggta acaagtgacg	12900
tcgtaaatct gtaaaacagt ttgtcgata ttaggctgta tctcctcaaa gcgtattcga	12960
atatcattga gaagctgcag gcaagtgcac aaacaatact taaataaaata ctactcagta	13020
ataaacctatt tcttagcatt tttgacgaaa tttgcttattt tgtagatc ttttacacca	13080
tttgtctcca cacctccgct tacatcaaca ccaataacgc catttaatct aagcgcacca	13140
ccaacattt ctggcgtcag tccaccagct aacataaaat gtaagcttc ggggctctct	13200
tgccttccaa cccagtcaga aatcgagttc caatccaaaa gttcacctgt cccacctgct	13260
tctgaatcaa acaagggaat aaacgaatga ggtttctgtg aagctgcact gagtagtatg	13320
ttgcagtctt ttggaaatac gagtcattta ataactggca aaccgagggaa ctcttggtat	13380
tcttgccacg actcatctcc atgcagttgg acgatataa tgccgtaatc attgaccaga	13440
gccaaaacat cctcctttagg ttgattacga aacacgcca ccaagtattt cggagtgcc	13500
gaactattt tatatgcttt tacaagactt gaaattttcc ttgcaataac cgggtcaatt	13560
gttcttcc tattgggcac acatataata cccagcaagt cagcatcgga atctagagca	13620
cattctgcgg cctctgtgct ctgcaagccg caaacttca ccaatggacc agaactacct	13680
gtgaaattaa taacagacat actccaagct gcctttgtgt gcttaatcac gtataactcac	13740
gtgctcaata gtcaccaatg ccctccctct tggccctctt cctttcttt ttgcaccgc	13800
tagcgtcgac agcgacacac ttgcacccgga tgcagcccg ttaacgtgcc ggcacggcct	13860
gggtaaccag gtatTTTgtc cacataaccg tgcgaaaaat gttgtggata agcaggacac	13920
agcagcaatc cacagcaggc atacaaccgc acaccgaggt tactccgttc tacaggttac	13980
gacgacatgt caataacttgc cttgacagg cattgatgga atcgtatgtcac cacgctgata	14040
gtctgatcga caatacaagt gggaccgtgg tcccgacccg ataattcagac cgacaacacg	14100
agtggatcg tggcccaga ctaataatca gaccgacgat acgagtgaa ccgtggccc	14160
agactaataa tcagaccgac gatacgatg ggaccgtgg tccagactaa taatcagacc	14220
gacgatacga gtgggaccgt ggtcccagac taataatcag accgacgata cgagtggac	14280
catggtccccca gactaataat cagaccgacg atacgagttgg gaccgtggc ccagtctgat	14340
tatcagaccg acgatacggag tgggaccgtg gtcccagact aataatcaga ccgacgatac	14400
gagtgggacc gtggtcccag actaataatc agaccgacga tacgagtggg accgtggtcc	14460
cagtctgatt atcagaccga cgatacaagt ggaacagtgg gcccagagag aatattcagg	14520

ccagttatgc tttctggcct gtaacaaagg acattaagta aagacagata aacgtagact	14580
aaaacgtggt cgcatcaggg tgctggctt tcaagttcct taagaatggc ctcaatttc	14640
tctatacact cagttgaaac acgggacctg tccaggttaa gcaccattt atcgccctta	14700
tacaatactg tcgctccagg agcaaactga tgtcgtgagc ttaaactagt tcttgatgca	14760
gatgacgttt taagcacaga agttaaaaga gtgataactt cttagcttc aaatatcacc	14820
ccagctttt tctgctcatg aaggttagat gcctgctgct taagtaattc ctctttatct	14880
gtaaaggctt tttgaagtgc atcacctgac cgggcagata gttcacccggg gtgagaaaaa	14940
agagcaacaa ctgattnagg caatttggcg gtgttgatac agcgggtaat aatcttacgt	15000
gaaatatttt ccgcatcagc cagcgcagaa atatttccag caaattcatt ctgcaatcgg	15060
cttgataaac gctgaccacg ttcataagca cttgtggc gataatcggt acccaatctg	15120
gataatgcag ccatctgctc atcatccagc tcgccaacca gaacacgata atcactttcg	15180
gtaagtgcag cagcttacg acggcgactc ccatcgccaa ttcttatgac accagatact	15240
cttcgaccga acgcccgtgt ctgttgacca gtcagtagaa aagaaggat gagatcatcc	15300
agtgcgtcct cagtaagcag ctccctgtca cggttattac ctgaccatac cccgagggtc	15360
ttctcaacac tatcacccccg gagcacttca agagtaaact tcacatcccg accacataca	15420
ggcaaagtaa tggcattacc gcgagccatt actcttacgc ggcgaattaa cgaatccacc	15480
atcggggcag ctgggtgtcgta taacgaagta tcttcaaccg gttgagtatt gagcgtatgt	15540
tttggataaa caggcgcacg cttcattatc taatctccca gctgtgttta atcagacgat	15600
cgaaaatttc attgcagaca gttcccaaa tagaaagagc atttctccag gcaccagttg	15660
aagagcgtt atcaatggcc tggtaaaaaa cagttctcat cggatctga cctttaccaa	15720
cttcatccgt ttcacgtaca acattttaa gaaccatgct tccccaggca tcccgaaattt	15780
gctcctccat ccacggggac tgagagccat tactattgct gtatttgta agcaaaatac	15840
gtacatcagg ctgcgaaccct ttaagatcaa cggttctgag cagatcacga agcatatcga	15900
aaaactgcag tgcggaggtg tagtcaaaca actcagcagg cgtggaaaca atcagcacat	15960
cagcagcaca tacgacatta atcgtgccga taccagggtt aggccgcgtg tcaataacta	16020
tgacatcata gtcacgtaca acagttcaa tggccagtcg gagcatcagg tgtggatcgg	16080
tggcagttt accttcatca aatttgccta ttaactcagt ttcaatacgg tgcagagcca	16140
gacaggaagg aataatgtca agccccggcc agcaagtggg ctttattgca taagtgacat	16200
cgtccttttc cccaaagatac aaaggcagga gagtgtcttc tgcacatgata tgaagatctg	16260
gtacccatcc gtgatacatt gaggctgttc cctgggggtc gttaccttcc acgagcaaaa	16320
cacgtagccc cttcagagcc agatcctgag caagatgaac agaaactgag gttttgtaaa	16380
cgccaccttt atggcagca accccgatca ccggtgaaaa tacgtttca gcacgtcgca	16440

atcgcttacc aaacacatca cgcatatgtat taattttttc aattgtataaa ccaacacgtt	16500
gctcaaccgg tcctcgaatt tccatatccg ggtgcggtag tcgcctgtct ttctcggtat	16560
ctctgatagc ctgagaagaa accccaacta aatccgctgc ttcacctatt ctccagcgcc	16620
gggttatttt cctcgcttcc gggctgtcat cattaaactg tgcaatggcg atagccttcg	16680
tcatttcatg accagcgaaa atgcactggt taagtgtttc catgagtttc attctgaaca	16740
tccttaatc attgctttgc gtttttttat taaatcttgc aatttactgc aaagcaacaa	16800
caaaatcgca aagtcatcaa aaaaccgcaaa agttgtttaa aataagagca acactacaaa	16860
aggagataag aagagcacat acctcagtca cttattatca ctgcgcgtcc ccgcagccgt	16920
gtaccggcgc atagcgagcg aactggcgag gaagcaaaga agaactgttc tgtcagatag	16980
ctcttacgct cagcgcaaga agaaatatcc accgtgggaa aaactccagg tagaggta	17040
cacgcggata gccaattcag agtaataaac ttttgcataatc aacccttcattc aatgtatgcg	17100
aactaaccggc cgatatcagg tcacatgcg aaggaaaga gaaggaaatc aactgtgaca	17160
aactgccctc aaatttggtt tcctaaaaaa ttacagttca aaaagtatga gaaaatccat	17220
gcaggctgaa ggaaacagca aaactgtgac aaattaccct cagtaggtca gaacaaatgt	17280
gacgaaccac cctcaaatct gtacacatca accctcagac tatcctgtcg tcatggaaat	17340
gatatcgccgg aaggaaaata cgatatgagt cgtctggcgcc ccttttttt tctcaatgt	17400
ttagaggcgc attggagttc tgctgttgc ttcattttca cagacctgca ggaagcggcg	17460
gcggaaatca ggcatacgtt ggtactttt aggacgttgg taacgctcta tgatccagtc	17520
gattttcaga gagacgtatgc ctgagccatc cggcttacga tactgacaca gggattcgta	17580
taaacgcattt gcatacggat tgggttttca ttttttttca ctaagccggaa actgcgtaaa	17640
ccggttctgt aacccgataaa agaaggaaat gagatatggg ttgatatgttta cactgtaaag	17700
ccctctggat ggactgtgcg cacgtttgttca aaaccaagga aaagattcat agccttttc	17760
atcgccggca tcctcttcag ggcgataaaaa aaccacttcc ttccccgcga aactcttcaa	17820
tgcctggcgat atatccttac tggcttccgc agaggtcaat ccgaatattt cagcatattt	17880
agcaacatgg atctcgccaga taccgtcatg ttccgttgggttgcgttccatcgttgcgttgc	17940
ctggtaacgc aacagataca gcatacgaaa ttgtatccgg gagagactat atgcccgcctc	18000
agtgggtcg tttgactgga cgatttgcgg gctattttttgcgttgcgttgcgttgcgttgc	18060
cgctgtttcc gccatgacag atccatgtca agtgtgacaa gtttttagat tgccatgttgc	18120
aataaaaaaaat agtcaataag cagggataac tttgtgaaaa aacagcttct tctgagggca	18180
atttgtcaca gggtaaggg caatttgtca cagacaggac ttttgttgc ggggttgcgttgc	18240
tcacactgaa agggcaattt gtcacaacac cttctctaga accagcatgg ataaaggcct	18300

acaaggcgct ctaaaaaaga agatctaaaa actataaaaa aaataattat aaaaatatcc	18360
ccgtggataa gtggataacc ccaagggaaag tttttcagg catcggtgt aagcagaata	18420
tataagtgt gttccctggt gtttcctcgc tcactcgacc gggagggttc gagaaggggg	18480
ggcacccccc ttccggcgtgc ggggtcacgc gcacagggcg cagccctggt taaaaacaag	18540
gttataaat attgggttaa aagcaggtaa aaagacaggt tagcgggtgc cgaaaaacgg	18600
gcggaaaccc ttgcaaattgc tggattttct gcctgtggac agccctcaa atgtcaatag	18660
gtgcgcctt catctgtcaag cactctgccc ctcaagtgtc aaggatcgcg cccctcatct	18720
gtcagtagtc gccccctca agtgtcaata ccgcaggga cttatccccca ggcttgcca	18780
catcatctgt gggaaactcg cgtaaaatca ggcgtttcg cccatggcg aggctggca	18840
gctccacgtc gccggccgaa atcgagcctg cccctcatct gtcaacgccc cgccgggtga	18900
gtcggccctt caagtgtcaa cgtccgcctt tcatctgtca gtgaggggca agtttccgc	18960
gaggatcca caacgcggc gccccggc ggtgtctcgc acacggctt gacggcggtt	19020
ctggcgcgtt tgcaaggccca tagacggccg ccagccagc ggcgaggga accagccag	19080
ggcttcgccc tgtcgctcga ctgcggcgag cactactggc tgtaaaagga cagaccacat	19140
catggttctg tgttcattag gttgttctgt ccattgctga cataatccgc tccactcaa	19200
cgtAACACCG cacgaagatt tctattgttc ctgaaggcat attcaaattcg tttcgttac	19260
cgcttcagg catcatgaca gaacactact tcctataaac gctacacagg ctccgtagat	19320
taataatgcg gatctctacg ataatgggag atttcccgta ctgtttcggt cgcttcacg	19380
tggataacag ccagcttctc tgTTAACAG aaaaaacag catatccact cagttccaca	19440
tttccatata aaggccaagg catttattct caggataatt gttcagcat cgcaaccgca	19500
tcagactccg gcatcgcaaa ctgcacccgg tgccggcag ccacatccag cgcaaaaacc	19560
ttcgtgtaga cttccgttga actgatggac ttatgtccca tcaggcttg cagaactttc	19620
agcgtatac cggcatacag catgtgcac gcataggaat ggcgaaacgt atgtgggtg	19680
accggaacag agaacgtcac accgtcagca gcagcggcgg caaccgcctc cccaatccag	19740
gtcctgaccg ttctgtccgt cacttcccgat atccgcgtt tctctgtcct tcctgtgcga	19800
cggttacgcc gctccatgag cttatcgca ataaataacct gtgacggaaag atcacttcgc	19860
agaataaata aatcctggtg tccctgtga taccggaaag ccctggccca acttttggcg	19920
aaaatgagac gttgatcgac acgttaagagg ttccaaactt caccataatg aaataagatc	19980
actaccgggc gtatTTTTG agttatcgag atttcagga gctaaggaag ctaaaaatgga	20040
gaaaaaaaaatc actggatata ccaccgttga tatatccca tggcatcgta aagaacattt	20100
tgaggcattt cagtcagttg ctcaatgtac ctataaccag accgttcagc tggatattac	20160
ggcctttta aagaccgtaa agaaaaataa gcacaagttt tatcggccct ttattcacat	20220

	tcttgcggc ctgatgaatg ctcatccgga atttcgtatg gcaatgaaag acggtgagct	20280
	ggtgatatagg gatagtgttc acccttgtta caccgtttc catgagcaaa ctgaaacgtt	20340
	ttcatcgctc tggagtgaat accacgacga tttccggcag tttctacaca tatattcgca	20400
	agatgtggcg tgttacggtg aaaacctggc ctatcccct aaagggttta ttgagaatat	20460
	gttttcgtc tcagccaatc cctgggtgag tttcaccagt tttgatttaa acgtggccaa	20520
	tatggacaac ttcttcgccc ccgtttcac catggcaaa tattatacgc aaggcgacaa	20580
	ggtgctgatg ccgctggcga ttcaggttca tcatgccgtt tgtgatggct tccatgtcgg	20640
	cagaatgctt aatgaattac aacagtactg cgatgagtgg cagggcgggg cgtaatttt	20700
	ttaaggcagt tattggtgcctt cttaaacgccc tggttgctac gcctgaataa gtgataataa	20760
	gcggatgaat ggcagaaatt cgatgataag ctgtcaaaca tgagaattgg tcgaccctgt	20820
	ggaatgtgtg tcagtttaggg tggaaaagt ccccaggctc cccagcaggc agaagtatgc	20880
	aaagcatgca tctcaattag tcagcaacca ggtgtggaaa gtccccaggc tccccagcag	20940
	gcagaagtat gcaaaggcatg catctcaatt agtcagcaac catagtcccc cccctaactc	21000
	cgcccatcccc gcccctaact cggccagtt ccggccattc tccgccccat ggctgactaa	21060
	tttttttat ttatgcagag gccgaggccg cctc	21094
	<210> 7	
	<211> 17639	
5	<212> ADN	
	<213> sintético	
	<400> 7	
	ttaaaacagc ctgtgggttg cacccactca cagggcccac tggcgctag tacactggta	60
	tctcggtacc tttgtacgcc tgtttatac cccctccctg atttgcaact tagaagcaac	120
	gcaaaccaga tcaatagtag gtgtgacata ccagtcgcat cttgatcaag cacttctgta	180
	tccccggacc gagtatcaat agactgtgca cacggttgaa ggagaaaacg tccgttaccc	240
	ggctaactac ttcgagaaac ctagtaacgc cattgaagtt gcagagtgtt tcgctcagca	300
	ctccccccgt gtagatcagg tcgatgagtc accgcattcc ccacggcga ccgtggcggt	360
	ggctgcgttg gcggcctgcc tatgggtaa cccataggac gctctaatac ggacatggcg	420
	tgaagagtct attgagctag ttagtagtcc tccggccctt gaatgcgggtt aatctaact	480
	gcggagcaca tacccttaat ccaaaggca gtgtgtcgta acgggcaact ctgcagcggaa	540
	accgactact ttgggtgtcc gtgttcttt ttattctgtt attggctgt tatggtacata	600
	attaaagaat tgttaccata tagtattgg attggccatc cagtgtcaaa cagagctatt	660
	gtatatctct ttgttggatt tacacctctc actcttgaaa cgttacacac cctcaattac	720
	attatactgc tgaacacgaa gcgatggct cccaggtctc cacacagcga tccggctcgc	780

atgagaattc caactcagcc acggaaggct ccactataaa ttacacaacc attaattact	840
acaaagactc gtatgctgcc actgctggaa agcaaagtct caaacaagat cctgacaagt	900
ttgcgaaccc tgtgaaggac atcttactg aaatggcagc gcccttaaag tctccctctg	960
ctgaagcatg tggctatagc gaccgagtgg cacagctac cattggaaat tccaccatta	1020
ctacacaaga agcagcaaac ataatagttt ggtatggtga gtggccttca tactgctctg	1080
ataatgatgc aacagcggtt gacaaaccta cacggcctga tgtctcagta aatagatttt	1140
acacgctaga cactaagcta tgggagaaat catccaaggg gtggacttgg aagttcccag	1200
atgtactgac taaaaccgga gttttggc aaaatgcaca atttcactac ttataccgtt	1260
cagggttctg catccacgtt caatgtaacg cttagcaaatt tcaccaaggg ggcgtactcg	1320
ttgcggattt gccccgttat gtcattggaa cagtggcagg cggtcacaggc acagagaaca	1380
gtcaccctcc ttatatacaa acccaaccccg ggcgtatggg atttgaatta caacatccat	1440
atgttcttga tgctgaaattt ccaatatctc agttgacagt gtgcctcac cagtggatca	1500
atttacgaac caacaattgt gccaccataa tagtgccata catgaacaca ctacctttt	1560
attccgcattt gaaccactgt aatttccggac tattgggtt gcctatcagc ccgtggatt	1620
tcgaccaagg ggcacacccg gtaattcccta tcactatcac gttggctccg atgtgttctg	1680
agtttgcggg tctcaggcag gcagttgcgc agggtttccc cactgaattt aacacgttca	1740
ctaatcgtt cttaaccacg gatgtgggt tgctcagcacc tatattgcca aatttccacc	1800
ccacccctgtt cattcacata cctggggaggg tttagaaactt actagaactg tgccaggtt	1860
aaaccatttt agaagtcaac aatgtgcaca ccaacgcac cagtttgcgtt gaaaggctac	1920
ggtttccagt gtcagccaa gcaaggaaag gtgagttgt tgcaatgttcc agggccgacc	1980
ctggggggg tggccttgg caatccacca tgctaggcca gttgtgttga tattacaccc	2040
aatggtcagg gtctttggaa gtcacttttta tgttcacccg atcccttatg gcaactggta	2100
aaatgcttat agttacaca cccccagggg gccccttgc taaagataga gccacagcta	2160
tgctggggac gcacgtcatc tggactttt gcttgcatac gtccgtcacc ctgtcatac	2220
catggatcag taacactcac tataggcgc atgctcgaga tgggtgttt gattactaca	2280
ccacaggttt ggtagtata tggtagccaa caaattatgt agtccctatt ggagcaccta	2340
atactgccta tataatagcg ttggcagcag cccaaaagaa tttcaactatg aaatttgca	2400
aggacaccag tgacattttt gaaacggcca ctattcaagg ggacagatgt gcagatgtga	2460
ttgagagctc tataaggat agtgtgagta aggccctcac ccaagcttta cctgcaccca	2520
caggccaaaa caccctaaatg agcagtcatac gcttagacac tggaaaagta ccagcacttc	2580
aagccgcccga aatcgagct tcgtcgaatg cttagtgcgtt gagatgtt gactcggt	2640

ES 2 718 187 T3

gtgttcttaa ctcacatagc acagctgaaa ccacccttga tagtttcttc agtagagcag	2700
gcttagttgg ggagatagat cttccctctaa agggcaccac caatccgaac gggtatgcct	2760
actgggacat agacataacc ggttatgcgc agatgcgcag aaaagtggaa ctattcacct	2820
atatgcgcctt tgacgcagag ttcacttttgc tcgcgtgcac acctaccgga gaggtcggtc	2880
cacagctgct tcaatacatg tttgttccac ccggggcccc caaaccagac tccagagact	2940
ctttggcttg gcaaacggcc acgaaccctt cagttttgtt caaattatcc gacccaccag	3000
cacaagtctc agtgcattt atgtcacctg caagcgcata ccaatggttt tatgacggat	3060
accctacatt tggagagcac aagcaagaga aggatctcga gtatggggca tgcccgaata	3120
acatgtggg cacattctca gtgcggactg tggatcgac acagtcaaaa tatcccttag	3180
tcatcagaat atacatgaga atgaagcacg tcagagcgtg gatacctcg gcgatgcgc	3240
atcagaacta tttgttcaaa tccaacccaa actatgctgg taattccatt aaaccaactg	3300
gtaccagccg aacggcaatc actacgctcg ggaaattcgg tcagcagtct gggctattt	3360
atgtggcaa ccttagggta gtaaaacagac acctagccac ccatactgac tggccaaact	3420
tggtgtgggaa agacagctct agagacctcc tagttcttc aactaccgct caagggttg	3480
acaccattgc tcgatgtaaac tgccaaacccg gagtttattt ctgttaactct cgccggaaaac	3540
actatccagt cagttttcg aaaccttagtt tggtgtttgtt agaagcttagt gaggattatc	3600
cagctagata tcagtcctt cttatgcttg ctgagggcca ttcagaacctt ggtgatttg	3660
gcggatttct tagatgccaa cacgggtgtgg tggaaattgtt ctccactggc ggaagtggcc	3720
tttgtggatt tgctgacgtt agagatcttc tgtggctaga tgaggaagcg atggagcagg	3780
gggtatctga ttacatcaaa ggtctcggtg atgccttcgg cacaggtttc actgacgcag	3840
tgtctagggaa agtggaaagcg ttgaagaacc acttaatcgg ctccgaaggg gctgttgaga	3900
agatcttggaa gaacttggtg aagctaattt cagccttagt tatagtcattc agaagtgatt	3960
atgatatggt caccctcaca gccacactag ctctgatcgg gtgccacggg agtccttggg	4020
cgtggatcaa atcaaagaca gcttccatac tgggcattcc catggcacaa aaacagagtg	4080
cctcatggct aaagaagtcc aatgacatgg caaatgctgc aaaaggcattt gagtggattt	4140
ccaacaagat cagtaagtcc attgactggc taaaagagaa gatcattcca gctgccaaag	4200
agaaaagttga gtttttgaac aacctaaaac agctccctt gttggagaac caggtctcca	4260
atcttgaaca gtctgctgcc tcacaagaag acttagaagc tatgtttggt aatgtgtcat	4320
atctggctca cttttgccgc aaattccaaac cactctacgc aactgaggcc aagagagtct	4380
acgctttaga gaaaaggatg aataactaca tgcaagttcaa gagcaaacac cgtattgaac	4440
ctgtatgctt gatcatcaga gttcccccag gaacgggcaa atcgctcgcc acaggcatta	4500
tagctagagc cattgctgac aagtatcgct ctatgttata ctcactcccc ccagaccag	4560

atcactttga tgggtataaag caacagggtgg tcacggtcat ggatgatctc tgccagaacc	4620
cggacggaaa agacatgtcc ctatttgtc aaatggtttc tacagtagat tttataccac	4680
ccatggcatc actagaggag aaaggagtgt cttcacctc taagttgtc attgcatcga	4740
ccaatgctag taacatcata gtccccacag tttcagattc agatgcaatt cgccaggcgat	4800
tctatatgga ctgcgatata gaagtgacag attcttacaa gacagacctc ggtcggctgg	4860
acgcaggtag agctgccaag ctttgtacag aaaataaacac tgctaattc aagagatgca	4920
gcccactggt gtgtggtaag gctattcagc tgagagacag gaagtccaaa gttagatata	4980
gcgtcgacac cgtggtatcg gaactgatca gagagtacaa caatagatct gctattggga	5040
atactataga agcactctt caaggacccc ctaaattcag gcctataaga attagtctcg	5100
aagaaaagcc agccccagat gccattggtg atttgctcgc tagtgcgtat agcgaggagg	5160
tccgacagta ctgcaggaa caagggtggtaatccggaa aacaccaact aatgtggAAC	5220
gtcaccaa tagagcagta ttggtaatgc agtccatcgc cactgtgggt gcagttgtgt	5280
ctcttggta tgcatttat aagctgttg ccgggttcca gggtgcttac tctggagcgc	5340
ccaagcaaat tctcaagaag cccgtgttaa gaacagccac ggtccaaggg cccagcttag	5400
acttcgcctt gtctttttg aggcgcaaca ttagacaagc gcaaactgac caaggacact	5460
tcaccatgct aggagtgcga gatgcctag ccattctgccc ggcactcg caaccaggaa	5520
agaccatctg ggttagagcat aaattaatca atgtactaga tgcagtttag ttagtggatg	5580
agcaagggtgt aaacttggaa ctcacactgg taactttggaa caccaatgaa aaatttaggg	5640
atatcaccaa gtttatccca gaagtgatca ccggggcgag tgacgcaact ctatgcata	5700
acactgagca catgccctca atgtttgtc cgggtgggtga cgttgcag tacgggtttc	5760
tgaaccttag tggtaaaccc acacacagaa ccatgatgta taacttcccc acgaaggcag	5820
gacagtgtgg ggggggtgggtt acctcagttg gtaagatcat tggaaatccac attggcggga	5880
atggacgcca gggctttgc gctggcctaa agaggagtta ttttgcagc gagcaaggag	5940
agatccagt gatgaagcct aacagagaaaa ccggggagggtt gaatattaat ggtccaaaccc	6000
gaactaagct ggaacccagt gtattccatg atgtgtcga gggcaacaag gaaccagcgg	6060
tcctgactag taaggacccc agacttgagg ttgatttga gcaagcttgc ttctccaagt	6120
atgtggtaa caccctgcat gaacctgatg agtacgtgac acaggctgct ctccactacg	6180
caaatcagct gaagcaactg gacatcaaca ccagcaagat gagcatggaa gaagcgtct	6240
atggcacaga atatttagaa gctatagact tgcacaccag tgctggatac ctttatagtg	6300
ctttggcat caagaaaaga gacatcctcg acccagttac cagagacacc tccaggatga	6360
agttatataat ggataagtat ggggtggact tgccttattc cacttatgta aaggatgac	6420

ttagatctct agataagatc agaaaaggga agtctgcct gattgaggct agcagcttaa	6480
atgattctgt ctaccttaga atgactttg gacaccttta tgaagtgttt cacgccaacc	6540
cagggactgt aacaggatct gcagttgggt gcaaccctga tgtatTTGG agcaagttac	6600
caatTTGTT accgggttca ctcttgcat ttgactactc aggatatgat gcaaggctta	6660
gtccTGTGTG gttcagagct ctagagttgg ttctgagaga gatcggttac tcggaggagg	6720
ctgtgtcact catagaaggg atcaatcaca cccaccacgt gtaccgaaac aagacatatt	6780
gtgtacttgg tggaatgccc tcaggctgtc ccggtaCTC cattttcaat tccatgatta	6840
acaacataat catcagaacc ctccgtatta aaacattcaa aggtatagac ttagatgagc	6900
tgaaaatggt agcttatgga gatgacgtgt tggccagcta cccgtttcct attgattgt	6960
tggaattggc taaaacaggg aaagaatatg ggctgactat gactcctgct gataaatcac	7020
cttggTTCAA tgaggTTacc tgggagaatg caaccTTCTT aaaacgcggt tttctaccgg	7080
accatcgtt ccctttctg atccatccccat ctagccccat gaggaaatc catgagtcca	7140
tccgctggac caaggacgacg cgcataactc aagatcatgt ggcgtccctt tgcgtccctgg	7200
catggcataa tgaaaaagag gagtatgaga aatttgttag aataatttgc tcaatttgc	7260
ttggaaaggc tttagcaata ccaaattttg agaacttgag aagaaattgg ctcgagttat	7320
tttaaaactta cagctcaatg ctgaacccccca ccagaaatct ggtcgtgtca atgactggtg	7380
ggggtaaatt ttttataacc agaatagcaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	7440
ggccggcatg gtcccagcct cctcgctggc gccggctggg caacattccg aggggaccgt	7500
ccctcggta atggcgaatg ggacgaattc tgaaccagtc ctaaaacgag taaataggac	7560
cggcaattct tcaagcaata aacaggaata ccaatttata aaagataact tagtcagatc	7620
gtacaataaa gctttgaaga aaaatgcgcc ttattcaatc ttgtctataa aaaatggccc	7680
aaaatctcac attgaaagac atttgatgac ctcatttctt tcaatgaagg gcctaacgga	7740
gttactaat gttgtggaa attggagcga taagcgtgtc tctggcgtgg ccaggacaac	7800
gtataactcat cagataaacag caatacctga tcactacttc gcactagttt ctcggacta	7860
tgcataatgtt ccaatatcaa agggaaatgtt agcattgaag gatgagacta atccattgt	7920
ggagtggcag catatagaac agctaaagg tagtgctgaa ggaagcatac gataccccgc	7980
atggaaatggg ataatatcac aggaggtaact agactacctt tcattcctaca taaatagacg	8040
catataagta cgcatTTAAAG cataaacacg cactatgccg ttcttctcat gtatataat	8100
atacaggcaa cacgcagata taggtgcgac gtgaacagtg agctgtatgt ggcgcgtcg	8160
cgttgcattt tcggaaagcgc tcgtttcgg aaacgctttg aagttcctat tccgaagttc	8220
ctattctcta gaaagtataag gaacttcaga ggcgtttga aaacaaaaag cgctctgaag	8280
acgcactttc aaaaaaccaa aaacgcacccg gactgtaacg agctactaaa atattgcgaa	8340

ES 2 718 187 T3

ES 2 718 187 T3

tttccaccaat ggaccagaac tacctgtgaa attaataaca gacatactcc aagctgcctt 10260
tgtgtgctta atcacgtata ctcacgtgct caatagtac caatgccctc cctcttgccc 10320
ctccctccctt tctttttcg accgctagcg tcgacagcga cacacttgca tcggatgcag 10380
ccccgttaac gtgccggcac ggcctggta accaggtatt ttgtccacat aaccgtgcgc 10440
aaaaatgttgt ggataagcag gacacagcag caatccacag caggcataca accgcacacc 10500
gaggttactc cgttctacag gttacgacga catgtcaata ctgccttgc acaggcattg 10560
atggaatcgt agtctcacgc tgatagtcg atcgacaata caagtggac cgtggtcccc 10620
gaccgataat cagacccgaca acacgagtgg gatcgtggc ccagactaat aatcagaccg 10680
acgatacgg tgggaccgtg gtcccgact aataatcaga ccgacgatac gagtgggacc 10740
gtggttccag actaataatc agacccgacga tacgagtgg accgtggtcc cagactaata 10800
atcagaccga cgatacggat gggaccatgg tcccagacta ataatcagac cgacgatac 10860
agtgggaccg tggtcccagt ctgattatca gaccgacgat acgagtggga ccgtggtccc 10920
agactaataa tcagacccgac gatacggatg ggaccgtggt cccagactaa taatcagacc 10980
gacgatacga gtgggaccgt ggtcccgatc tgattatcag accgacgata caagtggAAC 11040
agtgggccc gagagaatat tcaggccagt tatgcttct ggccgttaac aaaggacatt 11100
aagtaaagac agataaacgt agactaaaac gtggtcgcat cagggtgctg gctttcaag 11160
ttccctaaga atggcctcaa ttttctctat acactcagg ggaacacggg acctgtccag 11220
gttaagcacc attttatcg ctttatacaa tactgtcgct ccaggagcaa actgatgtcg 11280
tgagcttaaa cttagtcttg atgcagatga cgttttaagc acagaagtt aaagagtgtat 11340
aacttcttca gtttcaaata tcaccccgac tttttctgc tcatgaaggt tagatgcctg 11400
ctgcttaagt aattcctctt tatctgtaaa ggcttttga agtgcacatc ctgaccggc 11460
agatagttca cccgggttag aaaaaagagc aacaactgat ttaggcaatt tggcggttt 11520
gatacagcgg gtaataatct tacgtgaaat attttccgca tcagccagcg cagaaatatt 11580
tccagcaaat tcattctgca atcggcttgc ataacgctga ccacgttcat aagcacttgt 11640
tgggcgataa tcgttaccca atctggataa tgcagccatc tgctcatcat ccagctcgcc 11700
aaccagaaca cgataatcac tttcggtaaag tgcagcagct ttacgacggc gactccatc 11760
ggcaatttct atgacaccag atactctcg accgaacgcc ggtgtctgtt gaccagtcag 11820
tagaaaaagaa gggatgagat catccagtgc gtcctcagta agcagctctt ggtcacgttc 11880
attacctgac catacccgag aggtcttctc aacactatca ccccgagca cttaagagt 11940
aaacttcaca tcccgaccac atacaggcaa agtaatggca ttaccggcag ccattactcc 12000
taacgcggca attaacgaat ccacccatcg ggcagctggt gtcgataacg aagtatctc 12060
aaccgggttga gtattgagcg tatgttttgg aataacagcc gcacgcttca ttatctaatt 12120

ES 2 718 187 T3

tccccagcgtg	gtttaatcg	acgatcgaaa	atttcattgc	agacagggttc	ccaaatagaa	12180
agagcatttc	tccaggcacc	agttgaagag	cgttgatcaa	tggctgttc	aaaaacagtt	12240
ctcatccgga	tctgacccccc	accaacttca	tccgtttcac	gtacaacatt	ttttagaacc	12300
atgcttcccc	aggcatcccc	aatttgcctcc	tccatccacg	gggactgaga	gccattacta	12360
ttgctgtatt	tggttaagcaa	aatacgtaca	tcaggctcga	acccttaag	atcaacgttc	12420
ttgagcagat	cacgaagcat	atcgaaaaac	tgcagtgcgg	aggtgtagtc	aaacaactca	12480
gcaggcgtgg	gaacaatcag	cacatcagca	gcacatacga	cattaatcgt	gccgatacc	12540
aggtaggcg	cgctgtcaat	aactatgaca	tcatagtcat	gagcaacagt	ttcaatggcc	12600
agtcggagca	tcaggtgtgg	atcggtggc	agtttacctt	catcaaattt	gcccattaac	12660
tcagttcaa	tacggtgcag	agccagacag	gaaggaataa	tgtcaagccc	cggccagcaa	12720
gtgggctta	ttgcataagt	gacatcgtcc	ttttcccaa	gatagaaagg	caggagagtg	12780
tcttctgcat	gaatatgaag	atctggtacc	catccgtgat	acattgaggc	tgtccctgg	12840
gggtcggtac	cttccacgag	caaaacacgt	agcccctca	gagccagatc	ctgagcaaga	12900
tgaacagaaa	ctgaggtttt	gtaaacgc	cctttatggg	cagcaacccc	gatcaccgg	12960
ggaaatacgt	cttcagcacg	tcgcaatcgc	gtaccaaaca	catcacgcat	atgattaatt	13020
tgttcaattt	tataaccaac	acgttgc	accctgc	gaatttccat	atccgggtgc	13080
ggtagtcgcc	ctgcttctc	ggcatctctg	atagcctgag	aagaaacccc	aactaaatcc	13140
gctgcttcac	ctattctcca	gcgcggg	atttcctcg	cttcggg	gtcatcatta	13200
aactgtgc	aa	ttgcgatagc	cttcgtcatt	tcatgaccag	cgtttatgca	13260
gtttccatga	gtttcattct	gaacatc	tttgcattgc	tttgcgtttt	tttattaaat	13320
cttgcattt	actgcaaagc	aacaacaaaa	tcgcaaagtc	atcaaaaaac	cgcaaagt	13380
tttaaaataa	gagcaacact	acaaaaggag	ataagaagag	cacatac	ctc agtca	13440
tatca	ctagc	gtcgccgca	gccgtgtaac	cgagcatagc	gagcgaactg	13500
aaagaagaac	tgttctgtca	gatagctt	acgctcagcg	caagaagaaa	tatccaccgt	13560
ggggaaaaact	ccaggttagag	gtacacacgc	ggatagccaa	ttcagagtaa	taaactgtga	13620
taatcaaccc	tcatcaatga	tgacgaacta	acccccc	gata tcaggtcaca	tgacgaaggg	13680
aaagagaagg	aatcaactg	tgacaaactg	ccctcaaatt	tggcttc	aaaaattaca	13740
gttcaaaaag	tatgagaaaa	tccatgcagg	ctgaaggaaa	cagcaaaact	gtgacaaatt	13800
accctcagta	ggtcagaaca	aatgtgacga	accaccctca	aatctgtgac	agataacc	13860
cagactatcc	tgtcgcatg	gaagtgtat	cgcggaaagga	aaatacgtata	tgagtcgtct	13920
ggcggcctt	cttttctca	atgtatgaga	ggcgcattgg	agttctgt	ttgatctcat	13980

taacacagac ctgcaggaag cggcgccgga agtcaggcat acgctggtaa ctttgaggca	14040
gctggtaacg ctctatgatc cagtcgattt tcagagagac gatgcctgag ccattccggct	14100
tacgatactg acacagggat tcgtataaac gcatggcata cggattggtg atttctttg	14160
tttcactaag ccgaaactgc gtaaaccggt tctgtAACCC gataaagaag ggaatgagat	14220
atgggttgc atgtacactg taaAGCCCTC tggatggact gtgcgcacgt ttgataaacc	14280
aaggaaaaga ttcatagcct tttcatcgc cggcatcctc ttcaaggcga taaaaaaacca	14340
cttcctcccc cgcgaaactc ttcaatgcct gccgtatatac ttactggct tccgcagagg	14400
tcaatccgaa tatttcagca tatttagcaa catggatctc gcagataccg tcatgttcct	14460
gtagggtgcc atcagatttt ctgatctggt caacaacag atacagcata cgtttttgc	14520
cccgaggag actatatgcc gcctcagtga ggtcgTTGA ctggacgatt cgcggctat	14580
tttacgttt cttgtgattt ataaccgctg tttccGCCAT gacagatcca tgtgaagtgt	14640
gacaagtttt tagattgtca cactaaataa aaaagagtca ataaggcaggg ataactttgt	14700
aaaaaaacag cttcttctga gggcaatttg tcacagggtt aaggcaatt tgtcacagac	14760
aggactgtca tttgagggtt atttgtcaca ctgaaaggc aatttgtcac aacaccitct	14820
ctagaaccag catggataaa ggcctacaag ggcctctaaa aaagaagatc taaaaactat	14880
aaaaaaaaata attataaaaa tatccccgtg gataagtggta taaccccaag ggaagtttt	14940
tcaggcatcg tgtgtAAAGCA gaatatataa gtgcgttcc ctggtgcttc ctgcgtcact	15000
cgaccggag gttcgagaa gggggggcac ccccctcgg cgtgcgcggc cacgcgcaca	15060
gggcgcagcc ctggttaaaa acaaggTTTA taaatattgg ttAAAAGCA ggtttaaaaga	15120
cagtttagcg gtggccgaaa aacggccgga aacccttgca aatgcgtggat ttctgcctg	15180
tggacagccc ctcaaATGTC aataggTGC G cccctcatct gtcagcactc tgccccCAA	15240
gtgtcaagga tcgcgcCcCt catctgtcag tagtcgcGCC CCTCAAGTGT caataccgca	15300
gggcacttat ccccaggcgtt gtccacatca tctgtggaa actcgctaa aatcaggcgt	15360
tttcgcgcgtt ttgcgaggct ggccagctcc acgtcgccgg cggaaatcga gcctgcCcCt	15420
catctgtcaa cggcgcccg ggtgagtccgg cccctcaagt gtcaacgtcc gcccctcatc	15480
tgtcagtgc gccaagttt tccgcgagggt atccacaACG CCGGCGGCCG gccgcgggtgt	15540
ctcgacacgc gttcgacgg cgTTTCTGGC gcgtttgcag ggccatagac ggccgcCAGC	15600
ccagcgccga gggcaaccag ccgagggtttt cggccctgtcg ctgcactgcg gcgagacta	15660
ctggctgtaa aaggacagac cacatcatgg ttctgtgttc attaggttgt tctgtccatt	15720
gctgacataa tccgctccac ttcaacgtaa caccgcacga agatttctat tggccctgaa	15780
ggcatattca aatcgTTTC gttaccgtt gcaggcatca tgacagaaca ctactcccta	15840
taaacgctac acaggctcct gagattaata atgcggatct ctacgataat gggagatttt	15900

cccgactgtt tcgttcgctt ctcagtggat aacagccagc ttctctgttt aacagacaaa	15960
aacagcatat ccactcagg ccacatttcc atataaaaggc caaggcattt attctcagga	16020
taattgtttc agcatcgcaa ccgcatacaga ctccggcattc gcaaaactgca cccggtgccg	16080
ggcagccaca tccagcgcaa aaacccctcggt gttagacttcc gttgaactga tggacttatg	16140
tcccatcagg ctgtcgagaa ctttcagcgg tataccggca tacagcatgt gcatcgata	16200
ggaatggcgg aacgtatgtg gtgtgaccgg aacagagaac gtcacaccgt cagcagcagc	16260
ggccgcaacc gcctccccaa tccaggctctt gaccgttctg tccgtcactt cccagatccg	16320
cgccttctct gtcccttcctg tgcgacgggtt acgcccgtcc atgagcttat cgcaataaaa	16380
tacctgtgac ggaagatcac ttgcgagaat aaataaatcc tggtgtccct gttgataccg	16440
ggaagccctg ggccaacttt tggcgaaaat gagacgttga tcggcacgta agaggttcca	16500
actttcacca taatgaaata agatcaactac cgggcgtatt ttttgaggtt tcgagatTTT	16560
caggagctaa ggaagctaaa atggagaaaaaa aaatcaactgg atataccacc gttgatatat	16620
cccaatggca tcgtaaagaa cattttgagg catttcagtc agttgctcaa tgtacctata	16680
accagaccgt tcagctggat attacggctt ttttaaagac cgtaaagaaaa aataagcaca	16740
agtttatcc ggccttattt cacattcttgc cccgcctgat gaatgctcat ccggaaatttc	16800
gtatggcaat gaaagacggt gagctgggtga tatgggatag tgttcacccct tgttacaccg	16860
ttttccatga gcaaactgaa acgtttcat cgctctggag tgaataccac gacgattcc	16920
ggcagttctt acacatataat tcgcaagatg tggcggttga cggtaaaaac ctggcctatt	16980
tccctaaagg gtttattttag aatatgttt tcgtctcagc caatccctgg gtgagttca	17040
ccagtttga tttaaacgtg gccaatatgg acaacttctt cgccccgtt ttcaccatgg	17100
gcaaataatta tacgcaaggc gacaagggtgc tgatgccgct ggcgattcag gttcatcatg	17160
ccgtttgtga tggcttccat gtcggcagaa tgcttaatga attacaacag tactgcgtat	17220
agtggcaggc cggggcgtaa ttttttaag gcagttattt gtcgcctttaa acgcctgggtt	17280
gctacgcctg aataagtgtat aataagcggta tgaatggcag aaattcgatg ataagctgtc	17340
aaacatgaga attggtcgac cctgtggaat gtgtgtcagt taggggtgtgg aaagtccccca	17400
ggctccccag caggcagaag tatgcaaagc atgcattctca attagtcagc aaccagggtgt	17460
ggaaagtccc caggctcccc agcaggcaga agtatgcaaa gcatgcattt caattagtca	17520
gcaaccatag tcccggccctt aactccgcccc atccccccccca taactccgccc cagttccgccc	17580
cattctccgc cccatggctg actaattttt tttatTTTatg cagaggccga ggccgcctc	17639

5
 <210> 8
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> artificial

10
 <220>
 <223> cebador sintético

<400> 8
 atccaccggt ccacaaccat ggccctctcc gaggac 36

<210> 9

5 <211> 39
 <212> ADN
 <213> artificial
 10 <220>
 <223> cebador sintético
 15 <400> 9
 tgatctagag tcgcggccgc tttaggcgcc ggtggagtg 39
 <210> 10
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> artificial
 20 <220>
 <223> cebador sintético
 25 <400> 10
 agtggtttg tgggtcat cc 22
 <210> 11
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> artificial
 30 <220>
 <223> cebador sintético
 35 <400> 11
 ggatgacaaa cacaaaacca ctggccggca tggcccagc ctcctcgctg g 51
 <210> 12
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> artificial
 40 <220>
 <223> cebador sintético
 45 <400> 12
 ggtcccagcc tcctcgctgg cgccggctgg gcaacattcc gagggg 46
 <210> 13
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> artificial
 50 <220>
 <223> cebador sintético
 55 <400> 13
 gtccccattcg ccattaccga ggggacggtc ccctcgaaat gttgcc 47
 <210> 14
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> artificial
 60 <220>
 <223> cebador sintético
 65 <400> 14
 cccggggcggc cgcgatacg atttaggtga cactatagag taaatcctgt gtgctaattg 60
 <210> 15

5 <211> 40
 <212> ADN
 <213> artificial
 10 <220>
 <223> cebador sintético
 15 <400> 15
 atgcatgcgg ccgcgtcgac ggtcgaaaaaa agaaaaggag 40
 20 <210> 16
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> artificial
 25 <220>
 <223> cebador sintético
 30 <400> 16
 atgcatgccc gcgaattctg aaccagtcc 38
 35 <210> 17
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> artificial
 40 <220>
 <223> cebador sintético
 45 <400> 17
 cccgggcggc cgctaatacg actcaactata gggagttgtt agtctacgtg g 51
 <210> 18
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> artificial
 50 <220>
 <223> cebador sintético
 55 <400> 18
 accccgcctc aatccctc 17
 <210> 19
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> artificial
 60 <220>
 <223> cebador sintético
 65 <400> 19
 ggtttctggg acctcccacc ccagagt 27
 <210> 20
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador sintético
 <400> 20
 ctgttaggcac catcaat 17
 <210> 21

5 <211> 30
 <212> ADN
 <213> artificial
 10 <220>
 <223> cebador sintético
 15 <400> 21
 gtcgacgcta gcgattgatg gtgcctacag 30
 <210> 22
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> artificial
 20 <220>
 <223> cebador sintético
 25 <400> 22
 ggaggctggg accatgccgg ccaggtcacc ggtagcttt gatccggca 49
 <210> 23
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> artificial
 30 <220>
 <223> cebador sintético
 35 <400> 23
 tgccggatca agagcttaccg gtgacctggc cgccatggc ccagctcc 49
 <210> 24
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> artificial
 40 <220>
 <223> cebador sintético
 45 <400> 24
 ctccggccag ttccggccat tctccggcccc atggctgact aaaaaaaaaaatttatgcag 60
 <210> 25
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> artificial
 50 <220>
 <223> cebador sintético
 55 <400> 25
 gactaatttt ttttattttt gcagaggccg aggccgcctc agtaaatcct gtgtgtaat 60
 <210> 26
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> artificial
 60 <220>
 <223> cebador sintético
 65 <400> 26
 gactaatttt ttttattttt gcagaggccg aggccgcctc agtttgttagt ctacgtggac 60
 <210> 27

5 <211> 55
 <212> ADN
 <213> artificial
 10 <220>
 <223> cebador sintético
 15 <400> 27
 ccctcgaaat gttgcccccagc cgccgcaggc gaggaggctg ggaccatgcc ggcca 55
 20 <210> 28
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> artificial
 25 <220>
 <223> cebador sintético
 30 <400> 28
 gaggctggga ccatgccggc cagtggttt gtgttgtca tcc 43
 35 <210> 29
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> artificial
 40 <220>
 <223> cebador sintético
 45 <400> 29
 gaggctggga ccatgccggc cagaacctgt tgattcaaca gcacc 45
 50 <210> 30
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> artificial
 55 <220>
 <223> cebador sintético
 60 <400> 30
 cgaggaggct gggaccatgc cggccaggct accgttaaaa cggccgaggc ggcctcggcc 60
 65 <210> 31
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> artificial
 70 <220>
 <223> cebador sintético
 75 <400> 31
 ttatgcaga ggccgaggcc gcctcggccg tttaaacggt gacctggccg gcatggtccc 60
 80 <210> 32
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> artificial
 85 <220>
 <223> cebador sintético
 90 <400> 32
 gagggggcct cggcctctgc a 21
 95 <210> 33

5 <211> 21
 <212> ADN
 <213> artificial
 10 <220>
 <223> cebador sintético
 15 <400> 33
 tggccggcat ggtcccagcc t 21
 <210> 34
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> artificial
 20 <220>
 <223> cebador sintético
 <400> 34
 gactaatttt ttttatttat gcagaggccg aggccgcctc agttgttagt ctgtgtggac 60
 <210> 35
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> artificial
 25 <220>
 <223> cebador sintético
 30 <400> 35
 gaggtggga ccatgccggc cagaacctgt tggatcaaca acacc 45
 <210> 36
 <211> 36
 35 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador sintético
 40 <400> 36
 ttatgcatacg tcaggcacgt catatggata ggatcc 36
 <210> 37
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> artificial
 45 <220>
 <223> cebador sintético
 50 <400> 37
 tcgactaata cgactcacta tagggggagc gcgaatggaa aaac 44
 <210> 38
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> artificial
 55 <220>
 <223> cebador sintético
 <400> 38
 60 <220>
 <223> cebador sintético
 <400> 38
 65 cgcgcatacg atttaggtga cactataggt atcaagaact ctcacgg 47
 <210> 39

5 <211> 21
 <212> ADN
 <213> artificial
 10 <220>
 <223> cebador sintético
 15 <400> 39
 agtaaatcct gtgtgctaatt 21
 <210> 40
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> artificial
 20 <220>
 <223> cebador sintético
 25 <400> 40
 ggcaatcacg actcggtgcg 20
 <210> 41
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> artificial
 30 <220>
 <223> cebador sintético
 35 <400> 41
 agatggatac ttcatatata gag 23
 <210> 42
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> artificial
 40 <220>
 <223> cebador sintético
 45 <400> 42
 acatttgctt tggccctgt ct 22
 <210> 43
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> artificial
 50 <220>
 <223> cebador sintético
 55 <400> 43
 ctccgccccag ttccgccccat tctccgcccc atggctgact aattttttttt atttatgcag 60
 <210> 44
 <211> 58
 <212> ADN
 <213> artificial
 60 <220>
 <223> cebador sintético
 65 <400> 44
 gactaattttt ttttattttt gcagaggccg aggccgcctt taaaaacagc ggatgggt 58
 <210> 45

5 <211> 60
 <212> ADN
 <213> artificial
 10 <220>
 <223> cebador sintético
 15 <400> 45
 gaggctggga ccatgccggc ctttttttt tttttttttt tttttttttataaaactcc 60
 20 <210> 46
 <211> 58
 <212> ADN
 <213> artificial
 25 <220>
 <223> cebador sintético
 30 <400> 46
 gactaatttt ttttatttat gcagaggccg aggccgcctc taaaaacagc ctgtgggt 58
 35 <210> 47
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> artificial
 40 <220>
 <223> cebador sintético
 45 <400> 47
 gaggctggga ccatgccggc ctttttttt tttttttttt ttttttttttgctattctg 60
 <210> 48
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> artificial
 50 <220>
 <223> cebador sintético
 55 <400> 48
 ccctcgaaat gttgcccagc cggcgccagc gaggaggctg ggaccatgcc ggcc 54
 <210> 49
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> artificial
 60 <220>
 <223> cebador sintético
 65 <400> 49
 agaggccgag gccgcctcgg ccgttaaac ggtgacctgg cccgcatt 48
 <210> 50
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador sintético
 <400> 50
 cggatatcag taaaatcctg 19
 <210> 51

<211> 19
<212> ADN
<213> artificial

5 <220>
 <223> cebador sintético

<400> 51
cacaaaacca ctctgttagg 19

10

REIVINDICACIONES

1. Un cromosoma artificial bacteriano (BAC) para uso como vacuna, en donde el BAC comprende:

- una secuencia de ori bacteriana inducible para la amplificación de dicho BAC a más de 10 copias por célula bacteriana, y

5 - un casete de expresión viral que comprende un ADNc de un genoma de virus de ARN atenuado y que comprende elementos reguladores en cis para la transcripción de dicho ADNc viral en células de mamífero y para el procesamiento del ARN transcripto en un virus de ARN infeccioso.

10 2. El BAC según la reivindicación 1 para uso como vacuna, en donde dicho ADNc de un genoma de virus de ARN atenuado es una construcción de ADNc viral químico de un genoma de virus de ARN, en donde se ha insertado una secuencia de ADN heteróloga o en donde se ha eliminado, truncado o mutado una secuencia viral nativa.

15 3. El BAC según la reivindicación 1 para uso como vacuna, en donde dicho casete de expresión viral comprende:

- un ADNc de un genoma de virus de ARN de cadena positiva

- un promotor dirigido por ARN polimerasa que precede al extremo 5' de dicho ADNc para iniciar la transcripción de dicho ADNc, y

15 un elemento para la autoescisión del ARN después del extremo 3' de dicho ADNc para escindir el transcripto de ARN de dicho ADNc viral en una posición establecida.

- , preferiblemente el ADNc de la ribozima genómica del virus de la hepatitis delta.

20 4. El BAC según la reivindicación 3 para uso como vacuna, en donde dicho virus de ARN de cadena positiva se selecciona del grupo que consiste en flavivirus, hepacivirus, pestivirus, togavirus, picornavirus, coronavirus, hepevirus y calicivirus.

25 5. El BAC según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para uso como vacuna, en donde dicho casete de expresión viral comprende un ADNc de un virus de fiebre amarilla, preferiblemente el ADNc de la vacuna viva atenuada contra el virus de la fiebre amarilla YFV-17D.

30 6. El BAC según la reivindicación 1 para uso como vacuna contra virus de ARN, en donde dicho casete de expresión viral comprende un ADNc de un virus que pertenece al grupo de virus de ARN de cadena negativa, virus de ARN de doble cadena o virus de ARN ambisentido.

35 7. El BAC según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para uso como vacuna, en donde dicho cromosoma artificial bacteriano comprende además una secuencia de replicación de manera autónoma en levadura para transportar y mantener dicho cromosoma artificial bacteriano en levadura, preferiblemente el origen de plásmido de 2μ o el ARS1 (Secuencia de replicación de manera autónoma 1).

40 8. El BAC según la reivindicación 3 para uso como vacuna, en donde dicho promotor dirigido por ARN polimerasa es un promotor de ARN polimerasa II, preferiblemente seleccionado del promotor temprano inmediato de Citomegalovirus (CMV-IE), el promotor del virus Simian 40, o en donde dicho promotor de ARN polimerasa es un promotor de ARN polimerasa I o III.

45 9. El BAC según la reivindicación 5 para uso como vacuna, en donde dicho casete de expresión viral comprende un ADNc de la vacuna viva atenuada contra YFV-17D, en donde una o más de las secuencias de ADNc que codifican las proteínas superficiales del virión están eliminadas, truncadas, o mutadas, de modo que dicha proteína superficial del virión funcional de YFV-17D no se expresa y en donde se inserta una secuencia de ADNc que codifica una proteína heteróloga en el ADNc de YFV-17D.

10. El BAC según la reivindicación 9 para uso como vacuna, en donde dicha proteína heteróloga es una proteína superficial del virión de un flavivirus.

45 11. El BAC según la reivindicación 9 o 10 para uso como vacuna, en donde dicho casete de expresión viral comprende un ADNc de la vacuna viva atenuada contra YFV-17D, en donde una o más secuencias de ADNc no relacionadas se insertan para expresarse como una o más proteínas heterólogas dentro de la poliproteína viral o en donde dicho casete de expresión viral comprende un ADNc viral en donde se insertan secuencias de ADNc extrañas para ser expresadas de forma heteróloga por dichos virus recombinantes.

12. Un método para preparar una vacuna contra virus de ARN que comprende las etapas de:

- a) proporcionar un huésped bacteriano transfectedo con un BAC que comprende:

50 - una secuencia de ori bacteriana inducible para la amplificación de dicho BAC a más de 10 copias por célula bacteriana, y

- un casete de expresión viral que comprende un ADNc de un genoma de virus de ARN atenuado y que comprende elementos reguladores en cis para la transcripción de dicho ADNc viral en células de mamífero y para el procesamiento del ARN transcripto en ARN viral infeccioso,

b) amplificar el BAC añadiendo un compuesto que activa dicho ori inducible,

5 c) aislar el BAC amplificado,

d) formular el BAC en una vacuna.

13. Un cromosoma artificial bacteriano (BAC) que comprende:

- una secuencia de ori bacteriana inducible para la amplificación de dicho BAC a más de 10 copias por célula bacteriana, y

10 - un casete de expresión viral que comprende un ADNc de un genoma de virus de ARN atenuado, o

- un casete de expresión viral que comprende un ADNc de un genoma de virus de ARN atenuado y que comprende elementos reguladores en cis para la transcripción de dicho ADNc viral en células de mamífero y para el procesamiento del ARN transcripto en ARN viral infeccioso,

para uso en la prevención de una infección por virus ARN.

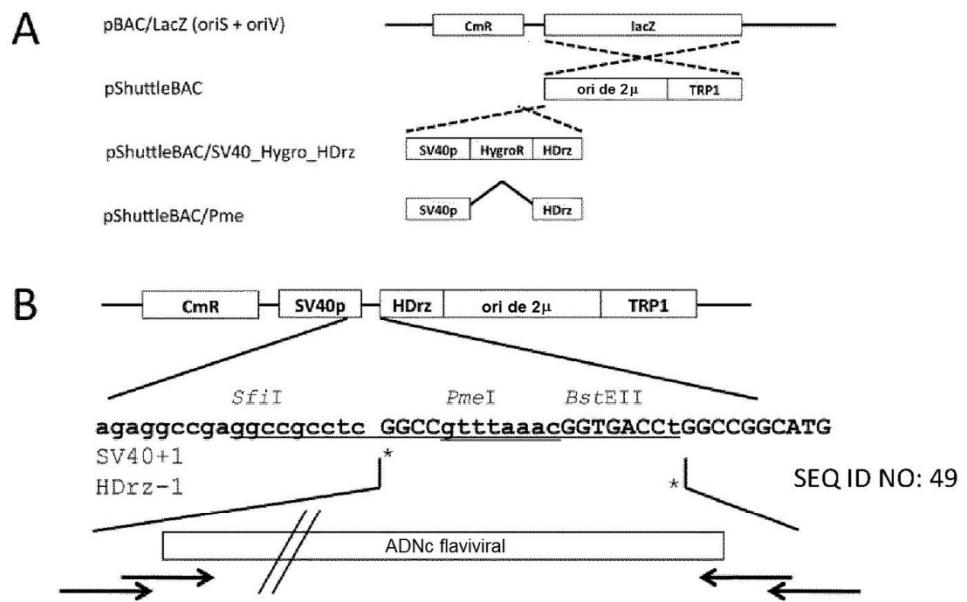


Figura 1

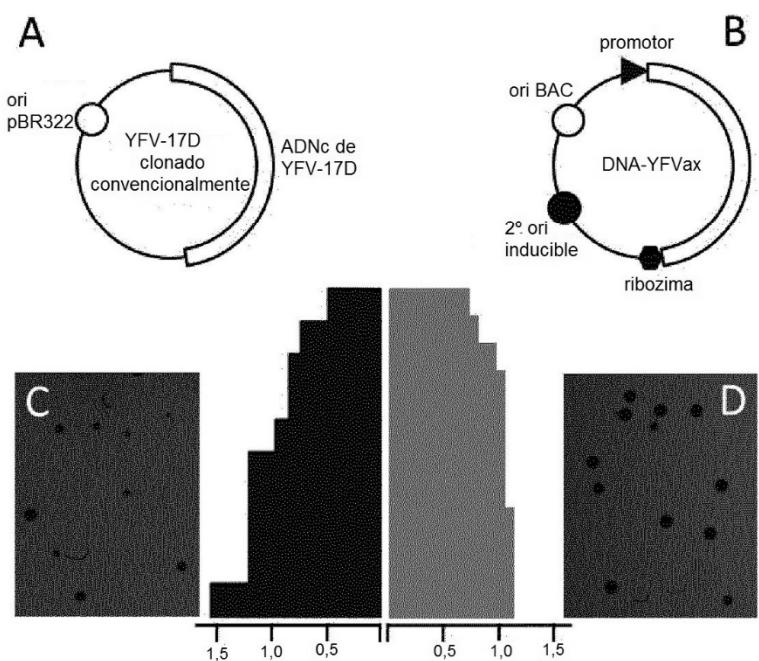
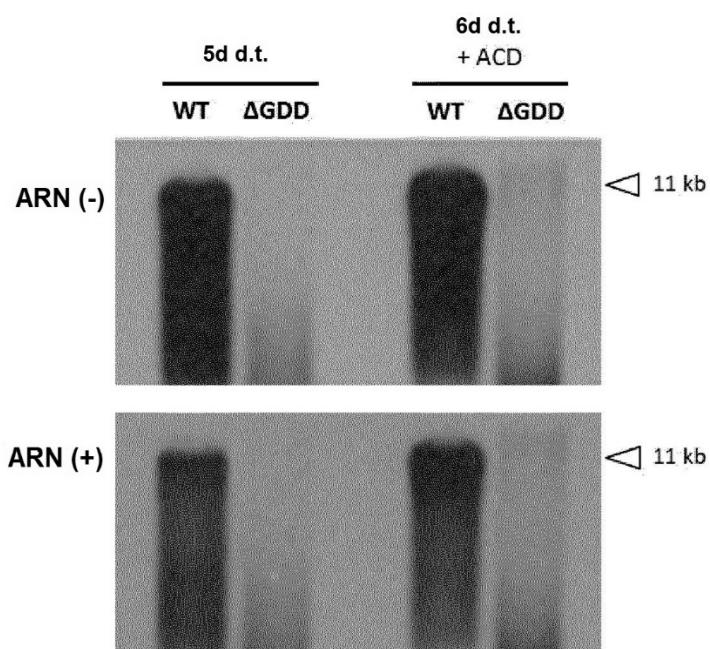
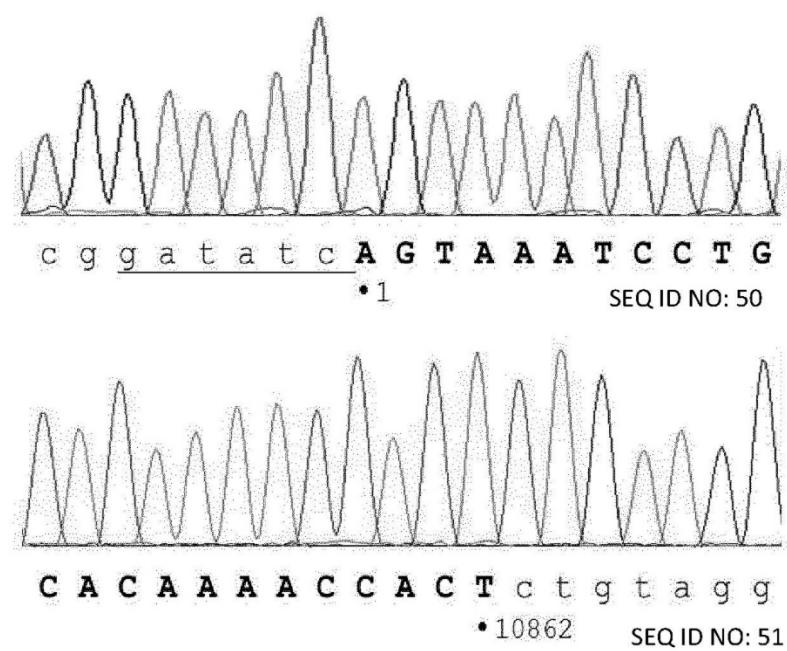


Figura 2

**Figura 3 A****Figura 3B**

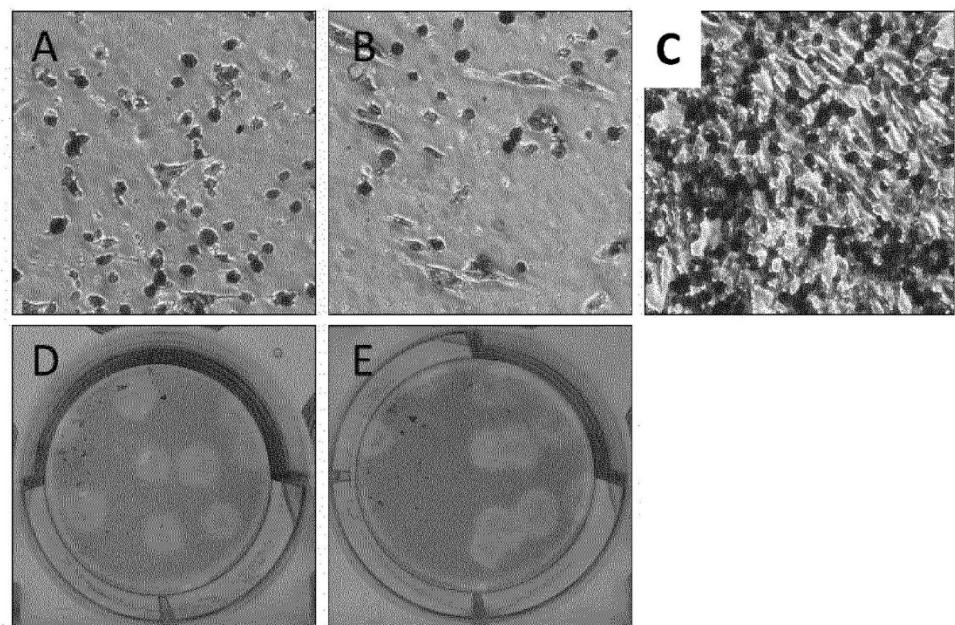


Figura 4

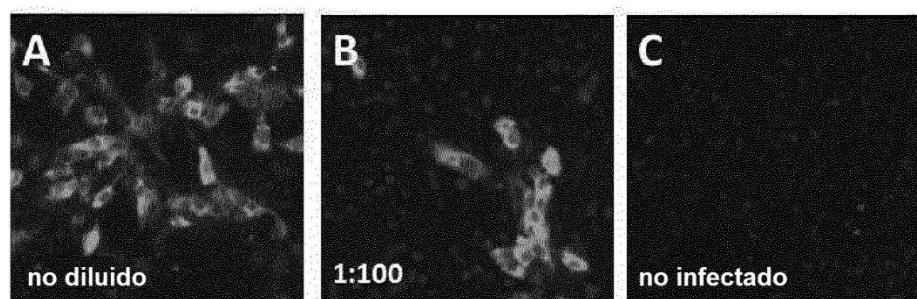
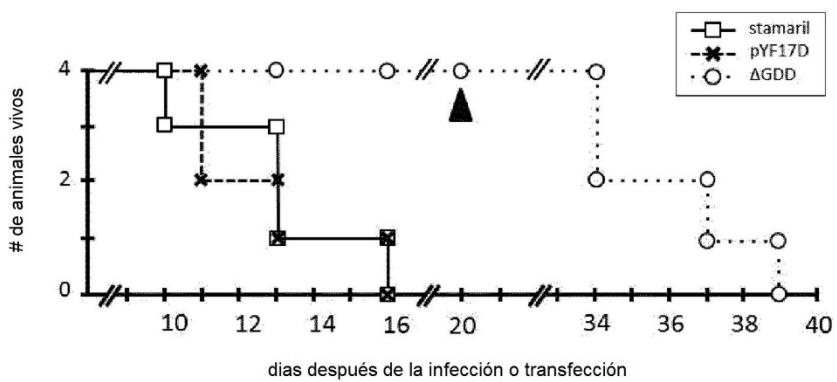
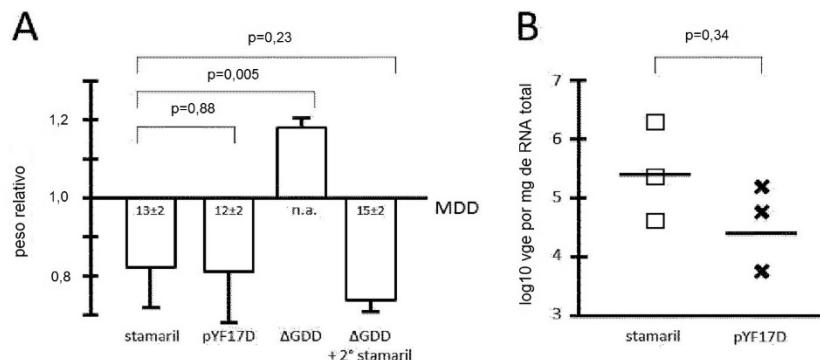


Figura 5

**Figura 6****Figura 7**

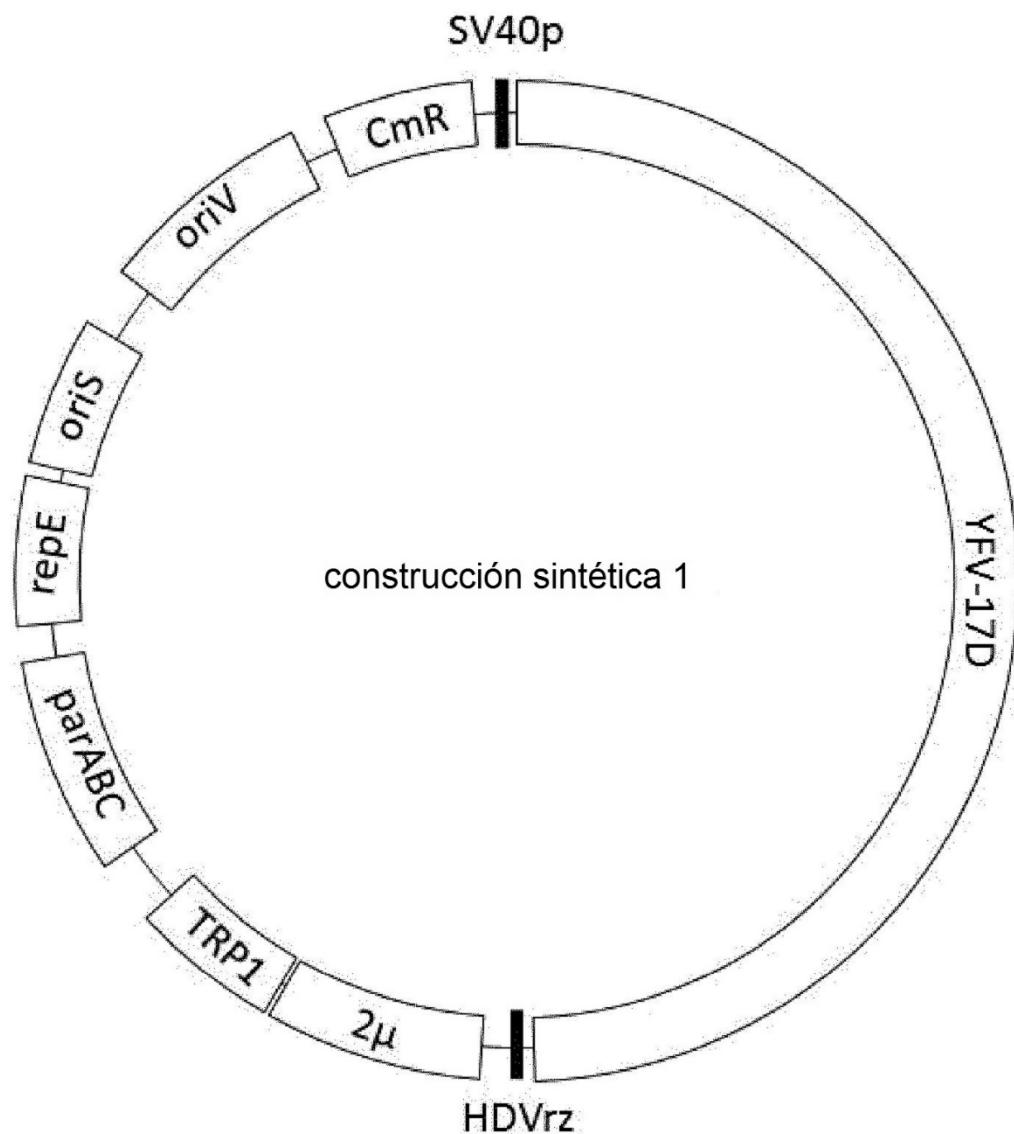


Figura 8

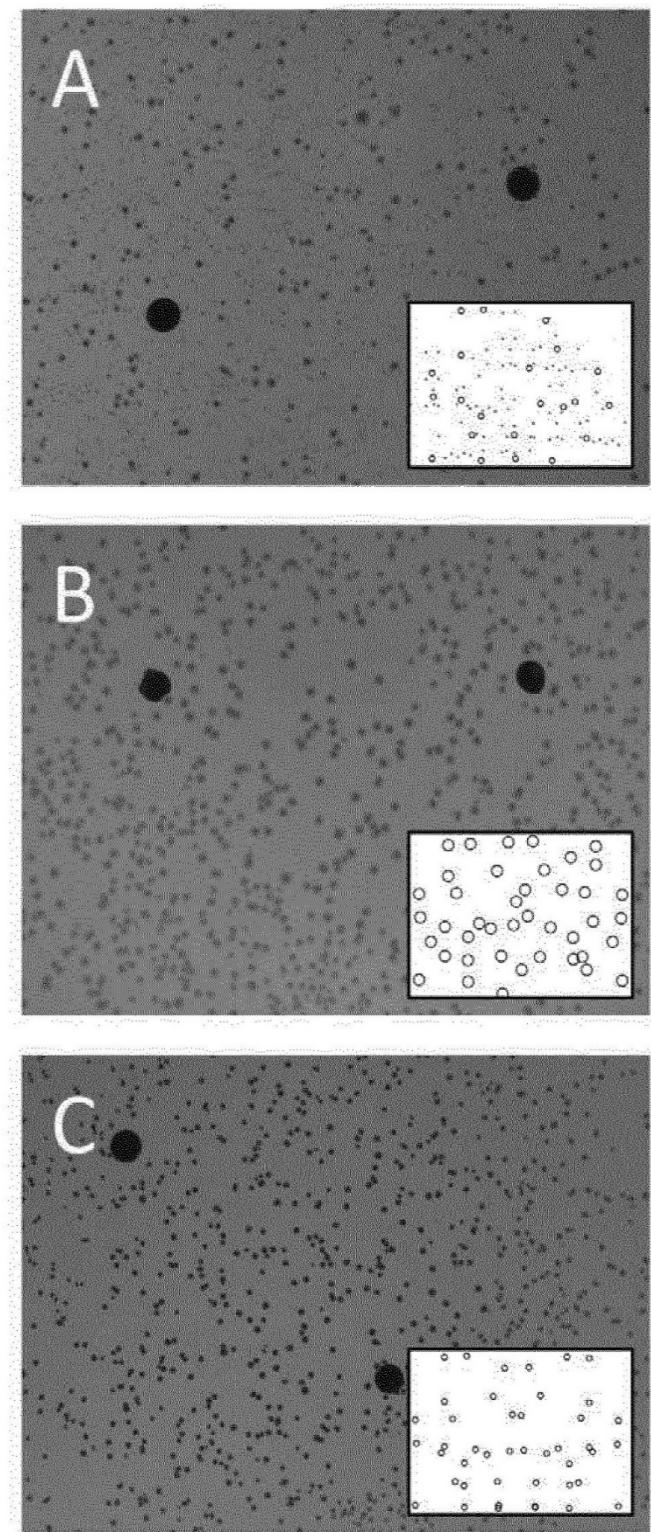
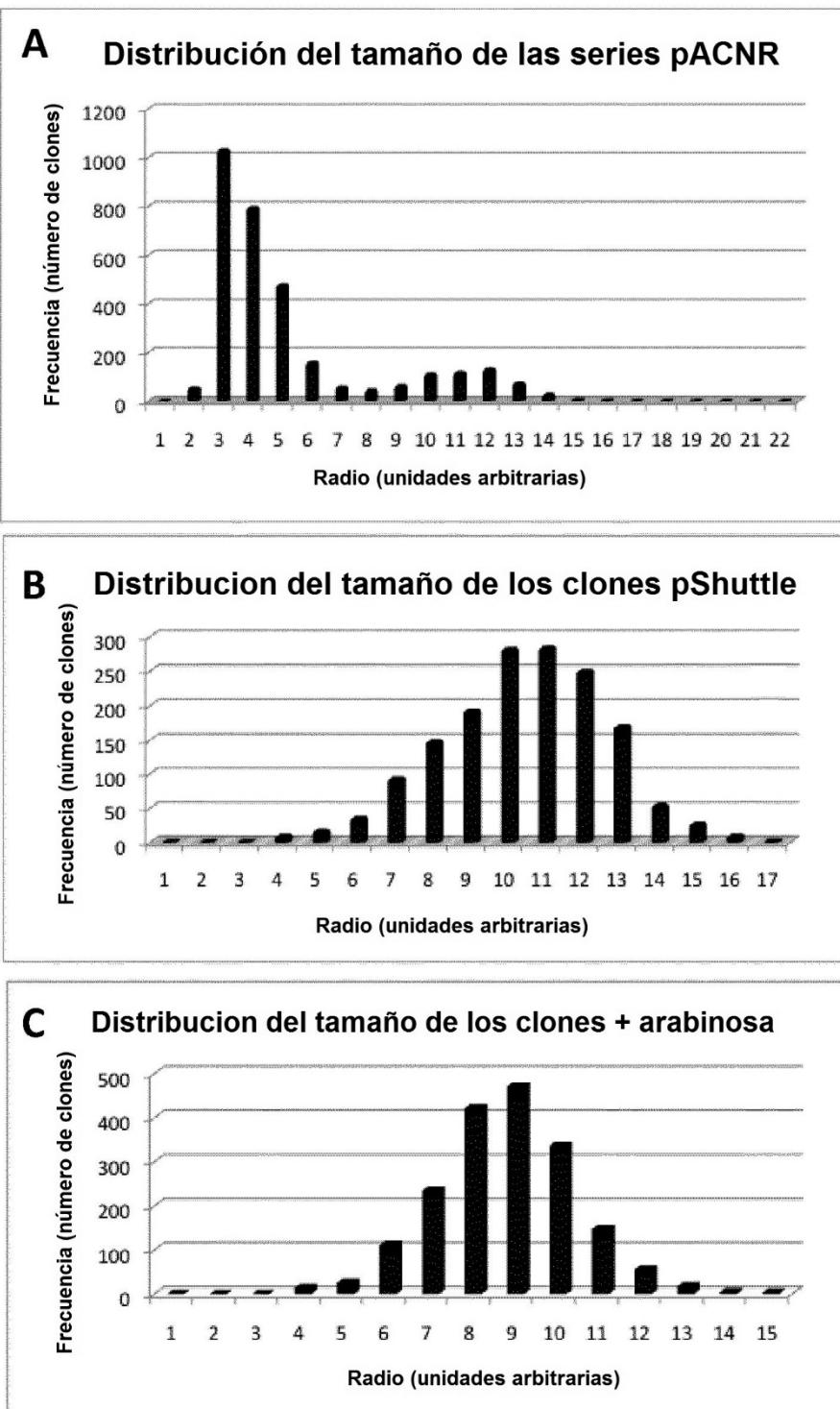


Figura 9

**Figura 10**

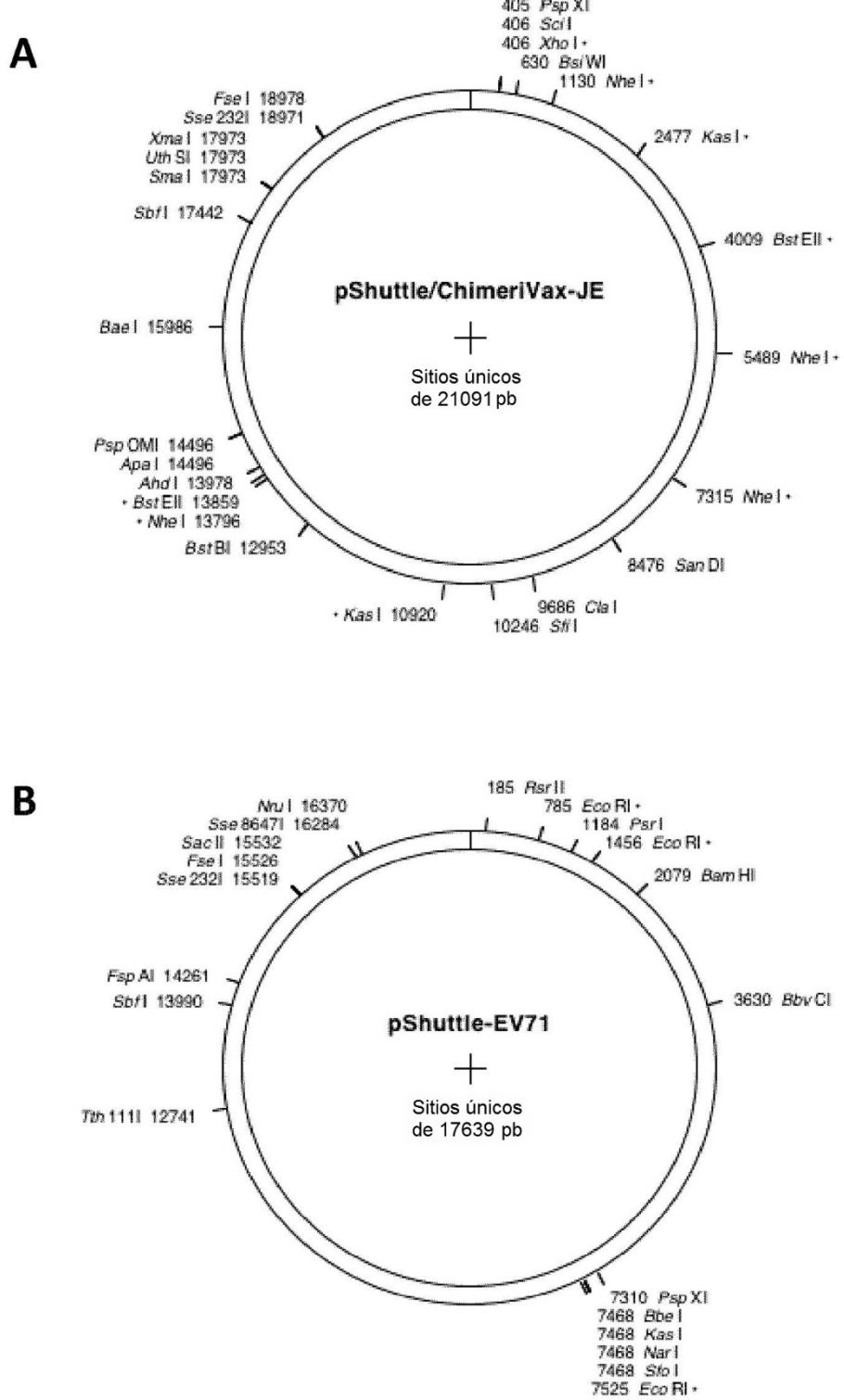


Figura 11

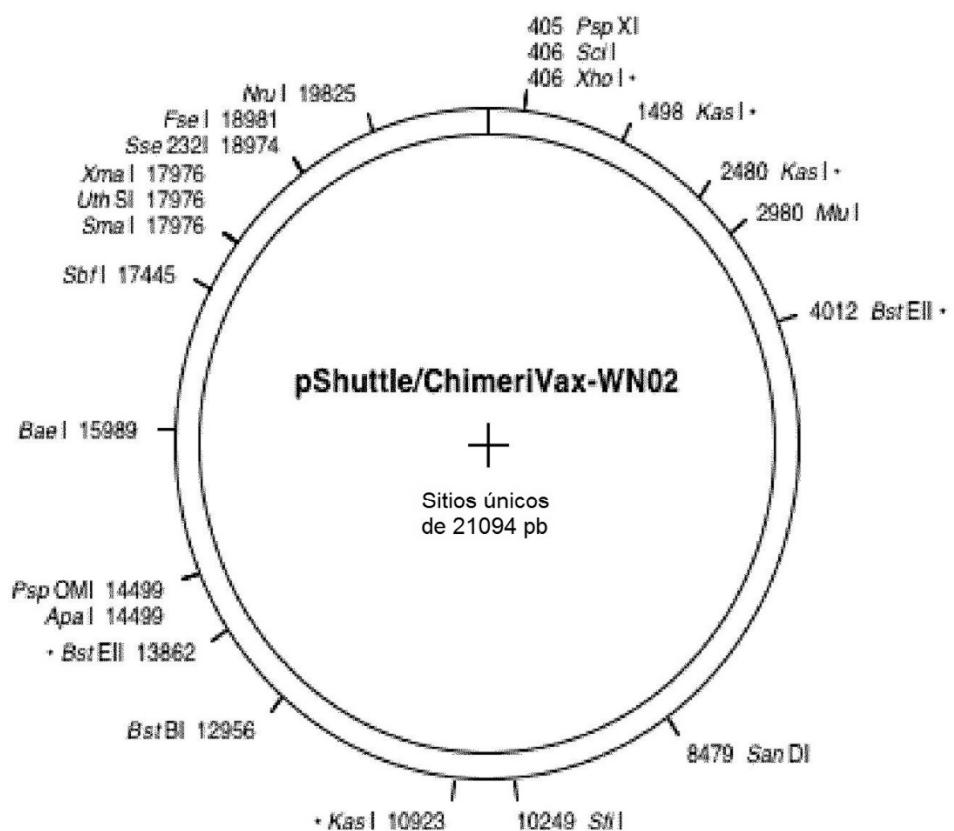
**Figura 12**

FIGURA 13 : secuencias con SEQ ID NO 1 a 7

SEQ ID NO 1: promotor de SV40 (Ghosh et al. (1981) citado anteriormente)

CCTGTGGAATGTGTCAAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATG
CATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGC
ATCTCAATTAGTCAGCAACCATACTCCGCCATCCGCCACTCCGCCAGTCCGC
CCATTCTCCGCCATGGCTGACTAATTTTATTGAGAGGCCAGGCCCTCGGCC

SEQ ID NO 2: HDV de 85nt (+) ribozima (Chaladavda 2007 citado anteriormente)

TGGCCGGCATGGTCCCAGCCTCTCGCTGGCGCCGGCTGGCAACATTCCGAGGGACCGTCCCCTCGTAAT
GGCGAATGGGAC

SEQ ID NO 3: YFV-17D (Bredenbeek et al. (2003) citado anteriormente)

AGTAAATCCTGTGCTAATTGAGGTGCATTGGCTGCAAATCGAGTTGCTAGGCAATAAACACATTGGATT
AATTTAATCGTTCGTTGAGCGATTAGCAGAGAACTGACCAGAACATGTCGGTCAAAGCTCAGGGAAAAA
CCCTGGGCGTCAATATGGTACGACGAGGAGTTGCTCCTTGTCAAACAAAATAACAAAACAAAACAAAT
TGGAAACAGACCTGGACCTTCAAGAGGTGTTCAAGGATTATCTTTTCTTTGTTCAACATTGACTGGA
AAAAAGATCACAGCCCACCTAAAGAGGTGTTGAAAATGCTGGACCCAAGACAAGGCTGGCTTTCTAAGGA
AAGTCAAGAGAGTGGTGGCCAGTTGATGAGAGGATTGTCCTCAAGGAAACGCCGTTCCATGATGTTCTGAC
TGTGCAATTCTAATTGGGAATGCTGTTGATGACGGGTGGAGTGACCTGGTGCAGGAAACAGATGGTTG
CTCCTAAATGTGACATCTGAGGACCTCGGGAAAACATTCTCTGTTGACAGGCAACTGCACAACAAACATT
TGGAAAGCCAAGTACTGGTGCCAGACTCAATGGAATACAACGTCTCAGTCAAGAGAGGAGGCCAGA
TGACATTGATTGCTGGTGTATGGGTGAAAACGTTAGAGTCGATATGTAAGTGTGACTCAGCAGGCAGG
TCTAGGAGGTCAAGAAGGCCATTGACTTGCCTACGCATGAAAACATGGTTGAAGACCCGGCAAGAAAAT
GGATGACTGGAAGAATGGGTGAAAGGCAACTCCAAAAGATTGAGAGATGGTCTGTGAGGAACCCCTTTG
AGTGACGGCTCTGACCATTCGCTACCTGTGGGAAGCAACATGACGCAACGAGTCGTGATTGCCACTGGTC
TTGGCTGTTGGTCCGCCACTCAGCTCACTGCATTGAAATTACTGACAGGGATTTCATTGAGGGGGTGCATG
GAGGAACCTGGTTTCAGCTACCCCTGGAGCAAGACAAGTGTCACTGTTATGCCCTGACAAGCCTTCATT
GGACATCTCACTAGAGACAGTAGCCATTGATAGACCTGCTGAGGTGAGGAACGTTACAATGCAGTTCTC
ACTCATGTAAGATTAATGACAAGTCCCCAGCACTGGAGAGGCCACCTAGCTGAAGAGAACGAGGGGACA
ATGCGTCAAGCGCACTTATTCTGATAGAGGCTGGGCAATGGCTGTTGACAGGAAACGGGAGCATTG
GGCATGCCAAATTCACTTGTGCCAAATCCATGAGTTGTTGAGGTTGATCAGACAAAATTCACTGTT
ATCAGAGCACATTGATGTAGGGCCAAGCAGGAAAATTGGAATACCGACATTAAGACTCTCAAGTTGATG
CCCTGTCAGGCTCCAGGAAGTCGAGTTCACTGGGTATGGAAAAGCTACACTGGAATGCCAGGTGCAA
GGTGGACTTGGTAACAGTTACATCGCTGAGATGGAAACAGAGAGCTGGATAGTGGACAGACAGTGG
GACTTGACCCCTGCCATGGCAGAGTGGAAAGTGGCGGGGTGAGGAGAGATGCATCATGGTCAATTG
CTCCGCATGCCCACTATCAGAGTACTGCCCTGGGAAACCAGGAAGGCTCCTGGAAAACAGCTTACTGG
CGCAATGAGGGTTACAAAGGACACAAATGACAACAACTTACAAACTACATGGTGGACATGTTCTTGCAGA
GTGAAATTGTCAGCTTGACACTCAAGGGACATCCTACAAATATGCACTGACAAAATGTTTTG
ACCCAAGTACACTGCCATGGCACTGTTGATGCAGGTGAAAGTGTCAAAGGAGGCCCTGCAGGATTCC
AGTGATAGTAGCTGATGATCTTACAGCGGCAATCAATAAGGCATTGGTTACAGTTAACCCATGCC
ACCAATGATGATGAAGTGTGATTGAGGTGAAACCCACCTTGGAGAGACAGTACATTATGTTGGAGAGGAG
ATTACGCTCACTTACCAAGTGGCACAAAGAGGAAAGCTAATAGGAAAGTGTCACTCAGACCATGAAAGG

FIGURA 13 (CONTINÚA) - SEQ ID NO 3 (CONTINÚA)

CGTGGAACGCCTGCCGTATGGGAGACACCGCCTGGGATTTCAGCTCCGCTGGAGGGTTCTCACTTCGGTT
 GGGAAAGGAATTCATACGGTGGCTCTGCCTTCAGGGCTATTGGCGCTTGAACTGGATAACAAAGG
 TCATCATGGGGCGGTACTTATATGGGTGGCATCAACACAAGAAACATGACAATGTCCATGAGCATGATCTT
 GGTAGGAGTGATCATGATGTTTGTCTTAGGAGTTGGGGCGATCAAGGATGCCATCAACTTGGCAAG
 AGAGAGCTCAAGTGCAGGAGATGGTATCTCATATTAGAGACTCTGATGACTGGCTGAACAAGTACTCATACT
 ATCCAGAAGATCCTGTGAAGCTGCATCAATAGTGAAGACCTCTTGAAGAAGGAAAGTGTGGCTAAATT
 AGTTGACTCCCTGAGCATGAGATGTGGAGAAGCAGGGCAGATGAGATCAATGCCATTGGAGAAAACGAG
 GTGGACATTCTGTTGTCGTGCAGGATCCAAAGAATGTTACCAGAGAGGAACATCCATTCCAGAATT
 GGGATGGCTGAGTATGGTGGAGACTTGGGTAAGAACCTTGTCTCCCCAGGGAGGAAGAATGAAAG
 CTTCATCATAGATGGAAAGTCCAGGAAGAACATGCCCTTTCAAACCGGGTCTGGAATTCTTCCAGATAGAG
 GAGTTGGGACGGGAGTGTTCACCACACGCGTGTACATGGACGCAGTCTTGAATACACCATAGACTGCGATG
 GATCTATCTTGGGTGAGCGGTGAACGAAAAAGAGTGCCATGGCTCTCCAACATTGGATGGGAAGTCA
 TGAAGTAAATGGACATGGATGATCCACACCTGGAGGCATTAGATTACAAGGAGTGTGAGTGGCCACTGACA
 CATACTGAAACATCAGTTGAAGAGAGTGAAATGTTCATGCCAGATCAATGGAGGCCAGTTAGCTCTC
 ACAATCATATCCCTGGATAACAAGGTTCAGACGAACGGACCTGGATGCCAGTACACTAGAAGTGAAGAGAGA
 AGCTTGGCCAGGGACTAGCGTGATCATGATGGCAACTGTGATGGACGGGAAATCAACCAGATCCACCA
 GATAGCGGGAAAGTTATTCTGAATGGTGTGCCCTCTGCACAATGCCCTGTGAGCTTCATGGTAGTG
 ATGGGTGTTGGTATCCCAGGAAATTAGGCCAGGAAACGCATGAAAGCCATCTGGTGCCTGGTTAC
 AGCTGGAGAAATACATGCTGCCCTTGGTTGGTGTGAGCATGATGATAGCAATGAAAGTGGCTTAAGGAAA
 AGACAGGGACCAAAAGCAAATGTTGGTGGAGGAGTAGTGCTTGGGAGCAATGCTGGTGGCAAGTAAC
 TCCCTGATTGCTGAAACTCACAGTGGCTGTGGATTGCATTCCATGAGATGAAACAATGGAGGAGACGCC
 ATGTATGGCGTTGATTGCTGCCCTTCAATCAGACCAGGGCTGCTCATGGCTTGGCTCAGGACCCATGG
 AGCCCTGGGAACGCCCTGTGCTGACCCCTAGGAGCAGCCATGGTGGAGATTGCCCTGGGTGGCTGATGGCG
 GCCTGTGGAAGTATCTAAATGCAGTTCTCTGCATCCTGACAATAATGCTGTGCTTAGGAAAGCATC
 AAATACCACCTTGGCCCTCATGGCTGTTGACACCTGTCACTATGGCTGAGGTGAGACTTGGCGCAATGTC
 TTTTGTGCCGTGGTTATCATAGGGCTTCAACAGAAATTCAAGGACACCTCCATGCAAGAAGACTATACCTC
 TGGTGGCCCTCACACTCACATCTTACCTGGCTTGACACAACCTTTTGGGCCTGTGTCATTCTGGCAAC
 CCGCATATTGGCGAAGGAGTATCCAGTGAATGAGGCACTCGCAGCAGCTGGCTAGTGGAGTGTGGCA
 GGACTGGCTTTCAGGAGATGGAGAACCTCCCTGGTCCGATTGCAAGTTGGAGGACTCCTGATGATGCTGGT
 GCGTGGCTGGGAGGGTGGATGGCTAGAGCTCAAGAAGCTTGGTGAAGTTCATGGGAAGAGGAGGCGAGAT
 CAGCGGGAGTTCCGCCGCTATGATGGCAGTCAGTGAACAAGGGAGTTCAAGCTGCTTCTGAAGAGAAA
 GTGCCATGGGACCAGGTGTGATGACCTCGCTGGCTTGGTGGGGCTGCCCTCATCCATTGCTCTTGC
 TGGCCTTGTGGCTGTTCATGTCAGGGAGCTAGGAGAAGTGGGGATGTCTGTGGATATTCCAC
 TCCTAAGATCATCGAGGAATGTGAACATCTGGAGGATGGGATTATGGCATATTCACTGTCACACCTTCTGG
 GCCTCCAGCGAGGAGTGGAGTGGCACAGGGAGGGTGTCCACACAATGTGGCATGTCACAAGAGGAGCTT
 TCCTTGTCAAGGAATGGCAAGAAGTTGATTCCATCTGGCTTCAGTAAGGAAGACCTTGTGCCCTATGGT
 CTCATGGAAGTGGAAAGGAGATGGGAGTGGAGAGGAAGAGGCTCAGTGTGATCGCGCTGTTCCAGGAAAGAAC
 GTGGTCAACGTCCAGACAAAACCGAGCTTGTCAAGGAGTGGGAGAAATCGGGCTGTGCTCTTG
 ACTATCCAGTGGCACTTCAGGATCTCTATTGTTAACAGGAACGGAGAGGTGATGGCTGTACGGCAATGG
 CATCCTTGTGCGTGACAACCTCTCGTGTCCGCCATATCCAGACTGAGGTGAAGGAAGAAGGAAAGGAGGAG
 CTCCAAGAGATCCGACAATGCTAAAGAAAGGAATGACAACGTCCTGATTTCATCTGGAGCTGGGAAGA
 CAAGACGTTCTCCCACAGATCTGGCGAGTGCAGCGCAGGGAGACGCTGCGCACTCTGTGTTGGCCCCAC
 CAGGGTGTCTTCTGAATGAAGGAGGCTTTCAGGCCGGTGAAGGAAATTCCACACACAGGCTTTCC
 GCTCACGGCAGCGGGAGAGAAGTCATTGATGCCATGTGCCACCCACTAACCTACAGGATGTTGGAACCAA
 CTAGGGTTGTTAAGTGGGAAGTGTGATATTGGATGAAAGCCATTGGATCCAGCTAGCATAGGCCCTAG
 AGGTTGGGAGCGCACAGAGCTAGGGCAAATGAAAGTGAACAATCTGATGACAGCCACACCGCCTGGGACT

FIGURA 13 (CONTINÚA) - SEQ ID NO 3 (CONTINÚA)

AGTGATGAATTCCACATTCAAATGGTAAAGATGTTCAAACGGACATACCCAGTGAGCCCTGGAACA
 CAGGGCATGACTGGATCCTAGCTGACAAAAGGCCACGGCATGGTCCTCATCCATCAGAGCTGCAAATGT
 CATGGCTGCCTCTTGCATAAGGCTGGAAAGAGTGTGGTGGCTGAACAGGAAACCTTGAGAGAGAAC
 CCCACGATAAAGCAGAAGAACCTGACTTATATTGCCACTGACATAGCTGAAATGGGAGCCAACCTTGCG
 TGGAGCGAGTGCTGGATTGCAGGACGGCTTTAACGCTGTGCTGTGGATGAAGGGAGGAAGGTGGCAATA
 AGGGCCACTCGTATCTCCGCATCCTCGCTGCTCAAAGGAGGGGCGCATGGGAGAAATCCAACAGAGAT
 GGAGACTCATACTACTATTCTGAGCCTACAAGTAAAATGCCCACACGTCTGCTGGTGGAGGCCTCAA
 TGCTCTGGACAAACATGGAGGTGAGGGTGGATGGTGCCTTACTCTATGGCGTTGAAGGAACAAAAACACC
 AGTTCCCCTGGTAAATGAGACTGAGGGATGACCAGAGGAAAGTCTCAGAGAACTAGTGAGGAATTGTGAC
 CTGCCCCGTTGGCTTCTGCTGCAAGGCTGGTTGAAGACGAATGATCGTAAGTGGTGTGTTGAAG
 GCCCTGAGGAACATGAGATCTTGAATGACAGCGGTGAAACAGTGAAGTGCAGGGCTCTGGAGGGAGCAA
 GCCTCTGGGCCAAGGTGGTGTGATGAAAGGGTGTCACTGACCAAGTGGCTGTCTGAATTATTAAAGTT
 GCTGAAGGTAGGAGGGAGCTGCTGAAAGTGTAGTTGTGCTGAGTGAACCTCCCTGATTTCTGGCTAAAAAAG
 GTGGAGAGGCAATGGATACCATCAGTGTGTTCCACTCTGAGGAAGGCTCTAGGGCTTACCGCAATGCACT
 ATCAATGATGCCAGGGCAATGACAATAGTCATGCTGTTTAACTGGCTGGACTACTGACATCGGAATGGTC
 ATCTTTTCATGTCCTCAAAGGCATCAGTAGAAATGCTATGGCGATGGCACAAATGGCGGTGTGGATATC
 TCATGTCCTTGGAGGCCTCAAACCCACTCACATCCTATGCTCATATTCTTGTCTGATGGTGGT
 TGTGATCCCCGAGGCCAGGGCAACAAAGTCCATCCAAGACAACCAAGTGGCATACCTCATTATTGGCATCCTG
 ACGCTGGTTCAGCGGTGGCAGCCAACGAGCTAGGCATGCTGGAGAAAACCAAAGAGGACCTTGGGAAGA
 AGAACTTAATTCCATCTAGTGCTCACCCCTGGAGTTGGCCGATCTGACCTGAAGCCAGGAGCTGCCCTGGAC
 AGTGTACGTTGGCATTGTTACAATGCTCTCTCAAATGTTGACCAACTGGATCAAAGTCGAATATGGCAACCTG
 TCTCTGCTGAAATAGCCCAGTCAGCCTCAGTCCTTCTTCATGGACAAGGGGATACCATTGAGATGA
 ATATCTCGGTATAATGCTGCTGGTCAGTGGCTGAAATTCAATAACAGTGAATGCCCTGCTCTGCTGGCATAGG
 GTGCGCCATGCTCCACTGGCTCTCATTTACCTGGAATCAAAGCGCAGCAGTCAAAGCTTGACAGAGAAGG
 GTGTTCCATGGCGTTGCCAGAACCCCTGTGGTTGATGGGAATCCAACAGTGAACATTGAGGAAGCTCTGAAA
 TGCCTGCCCTTATGAGAAGAAACTGGCTCTATATCTCCTTCTGCTCTCAGCCTAGCTCTGTTGCCATGTG
 CAGAACGCCCTTCAATTGGCTGAAGGCATTGTCTAGCATCAGCTGCCCTAGGGCGCTCATAGAGGGAAAC
 ACCAGCCTCTTGAATGGACCCATGGCTCTCATGACAGGAGTCATGAGGGGAATCACTATGCTTTG
 TGGGAGTCATGACAATCTATGGAAGATGAAAACGGACGCCGGGGAGCGCGAATGGAAAACCTTGGGTGA
 AGTCTGGAAGAGGAACTGAATCTGTTGGACAAGCGACAGTTGAGTTGATAAAAGGACCGACATTGGAG
 GTGGATCGTGTACGGCACGCAGGCATTGGCGAAGGGAAAGGTGGACACCGGGGTGGCGGTCTCAGGGGAA
 CCGCAAAGTTAAGGTGGTCCATGAGCGTGGCTATGTCAGCTGGAAAGGTAGGGTATTGACCTGGGTGTGG
 CCGCGGAGGCTGGTGTACTACGCTGTCGCGAAAAGGAAGTGAGTGGGTCAAAGGATTACTCTTGGAAAGA
 GACGCCATGAGAACCCATGAATGTCAGTCAGCTGGGATGGAACATCATCACCTCAAGGACAAAAGTGT
 TCCACCCCTAGAACCAACTGAAATGTGACACCCCTTGTGACATTGGAGAGTCATCATCGTCATCGTCAC
 AGAGGGGAAAGGACCGTGAGAGTTCTGATACTGTAGAAAATGGCTGGCTGTGGGGTTGACAACCTCTGT
 GTGAAGGTGTTAGCTCCATACATGCCAGATGTTCTGAGAAACTGGAATTGCTCAAAGGAGGTTGGCGGAA
 CAGTGTACGGAACCCCTCTCCAGGAATTCCACTCATGAAATGTTACTACGTTGCTGGAGGCCGAGCAATGT
 CACATTACTGTGAAACAAACATCCGCCCTCTGATGAGGAAATGAGGCGTCAAACGGAAAGTGAACCTG
 GAGGCTGACGTCTCCCAATTGGACACGCACTGGTGTGAGACAGACAAGGGACCCCTGGACAAAGAGGCCA
 TAGAAGAAAGGGTTGAGAGGATAAAACTGAGTACATGACCTCTGGTTTATGACAATGACAACCCCTACAG
 GACCTGGCACTACTGTGGCTCTATGTCACAAAACCTCAGGAAGTGCGCGAGCATGGTAAATGGTGTATT
 AAAATTCTGACATATCCATGGGACAGGGATAGAGGAGGTCAAAGAAATGGCAATGACTGACACAAACCCCTTTG
 GACAGCAAAGAGTGTAAAGAAAAAGTTGACACCAGAGCAAAGGATCCACCAGGGAAACTAGGAAGATCAT
 GAAAGTGTCAACAGGTGGCTTCCGCCACCTGCCAGAGAAAAGAACCCAGACTGTGCACAAAGGAAGAA
 TTTATTGCAAAGTCGAAGTCATGCAAGCCATTGGAGCTTACCTGGAAGAACAAAGTGGAAAGACTGCCA

FIGURA 13 (CONTINÚA) - SEQ ID NO 3 (CONTINÚA)

ATGAGGCTGTCCAAGACCAAAGTTCTGGAACTGGTGGATGAAGAAAGGAAGCTGCACCAACAAGGCAGGTG
 TCGGACTTGTGTACAACATGATGGGAAAAGAGAAGAAGAACGCTGTAGAGTTGGAAAGCAAAGGGAAAGC
 CGTGCATATGGTATATGTGGCTGGAGCGCGGTATCTGAGTTGAGGCCCTGGGATTCTGAATGAGGACC
 ATTGGCTTCAGGGAAAACTCAGGAGGAGTGGAGGCATTGGCTACAATAACCTAGGATATGTGATCAG
 AGACCTGGCTGCAATGGATGGTGGATTCTACCGGGATGACACCGCTGGATGGACACGCCATCACAGAG
 GCAGACCTTGATGATGAACAGGAGATCTGAACATGAGCCCACATCACAAAAAACTGGCACAAGCAGTGA
 TGGAAATGACATACAAGAACAAAGTGGTGAAGTGTGAGACCAGCCCCAGGAGGGAAAGCCTACATGGATGT
 CATAAGTCGACGAGACCAGAGAGGATCCGGCAGGTAGTGACTTATGCTCTGAACACCATACCAACTTGAAA
 GTCCAATTGATCAGAATGGCAGAACGAGATGGTGTACATCACCAACATGTTCAAGATTGTGATGAATCAG
 TTCTGACCAGGCTGGAGGCATGGCTACTGAGCACGGATGTGACAGACTGAAGAGGATGGCGGTGAGTGGAGA
 CGACTGTGTGGTCCGGCCATCGATGACAGGTTGGCCTGGCCCTGTCCCCTCAACGCCATGTCCAAGGTT
 AGAAAGGACATATCTGAATGGCAGCCATCAAAAGGGTGGATGATTGGGAGAATGTGCCCTCTGTCCCACC
 ACTTCCATGAACTACAGCTGAAGGATGGCAGGAGGATTGTGGTGCCTTGCCGAGAACAGGACGAGCTATTGG
 GAGAGGAAGGGTGTCTCCAGGAAACGGCTGGATGATCAAGGAAACAGCTGCCTCAGCAAAGCCTATGCCAAC
 ATGTGGTCACTGATGTATTCACAAAAGGGACATGAGGCTACTGTCATTGGCTGTTCTCAGCTGTTCCA
 CCTCATGGGTTCCACAAGGACGCACAACATGGTCAATTGAGGAAACGGGAGTGGATGACCACGGAAAGACAT
 GCTTGAGGTGTGGAACAGAGTATGGATAACCAACAACCCACACATGCAGGACAAGACAATGGTAAAAAATGG
 AGAGATGTCCTTATCTAACCAAGAGACAAGACAAGCTGTGGGATCACTGATTGGAATGACCAATAGGGCA
 CCTGGGCTCCCACATCCATTAGTCATCCATCGTATCCGAACGCTGATTGGACAGGAGAAATACACTGACTA
 CCTAACAGTCATGGACAGGTATTCTGTGGATGTCAGCTGCAACTGGTGAGCTTATCTGAAACACCATCTAA
 CAGGAATAACCGGGATACAAACCACGGGTGGAGAACCGGACTCCCCACAACCTGAAACCGGGATATAACCAC
 GGCTGGAGAACCGGGCTCCGACTTAAAGAACAGAACCGGGATAAAACTACGGATGGAGAACCGGACT
 CCACACATTGAGACAGAACAGAGTTGTCAGCCCAGAACCCACAGTGGTCTGCAACTGCTAAGCTGTGAGGCA
 GTGCAGGCTGGACAGCCGACCTCCAGGTTGCGAAAAACCTGGTTCTGGACCTCCACCCAGAGTAAAAA
 GAACGGAGCCTCCGCTACCACCCCTCCACGTGGTAGAAAGACGGGTCTAGAGGTTAGAGGAGACCCCTCC
 AGGGAAACAAATAGTGGGACCATATTGACGCCAGGAAAGACGGAGTGGTCTCTGCTTTCTCCAGAGGTC
 TGTGAGCACAGTTGCTCAAGAATAAGCAGACCTTGGATGACAAACACAAACACT

SEQ ID NO. 4 : pShuttle/YF17D (constructo #1)

AGTAAATCCTGTGTGCTAATTGAGGTGCATTGGCTGCAAATCGAGTTGCTAGGCAATAAACACATTGGATT
 AATTTTAATCGTCGTTGAGCGATTAGCAGAGAACGACCGAACATGTCCTGGCTGAAAGCTCAGGGAAAAAA
 CCCTGGCGTCAATATGGTACGACGAGGAGTTCGCTCCTGTCAAACAAAATAAAACAAAACAAAT
 TGGAAACAGACCTGGACCTCAAGAGGTGTTCAAGGATTATCTTTCTTTGTTCAACATTTGACTGGA
 AAAAGATCACAGCCACCTAAAGAGGTGTGGAAAATGCTGGACCCAAGACAAGGCTGGCTTCTAAGGA
 AAGTCAGAGAGTGGTGGCAGTTGATGAGAGGATTGTCTCAAGGAAACGCCGTTCCATGATGTTCTGAC
 TGTGCAATTCTAATTTGGAATGCTGTTGATGACGGGTGGAGTGACCTGGTGCAGAAAACAGATGGTTG
 CTCTAAATGTGACATCTGAGGACCTCGGAAAACATTCTGTGGCACAGGCAACTGCACAACAAACATT
 TGGAAAGCCAAGTACTGGTGCCTCAATGGAATACAACGTCCTCAAGGAAAGAGGAGCCAGA
 TGACATTGATTGCTGGTGCTATGGGGTGGAAAACGTTAGAGTCGCATATGGTAAGTGTGACTCAGCAGGCAGG
 TCTAGGAGGTCAAGAAGGGCATTGACTTGCCTACGCATGAAACCATGGTTGAAGACCCGGCAAGAAAAT
 GGATGACTGGAAGAATGGGTGAAAGGCAACTCCAAAAGATTGAGAGATGGTCTGAGGAACCCCTTTTGC
 AGTGCAGGCTCTGACCATTGCCTACCTGTGGAGCAACATGACGCAACGAGTCGTGATTGCCCTACTGGTC
 TTGGCTGTTGGTCCGGCTACTCAGCTCACTGCAATTGGAATTACTGACAGGGATTTCATTGAGGGGGTGCATG
 GAGGAACCTGGGTTTCAGCTACCCCTGGAGCAAGACAAGTGTGTCAGTTATGGCCCTGACAAGCCTCATT
 GGACATCTCACTAGAGACAGTAGCCATTGATAGACCTGCTGAGGTGAGGAAAGTGTGTTACAATGCAGTTCTC

FIGURA 13 (CONTINÚA)

ACTCATGTGAAGATTAATGACAAGTCCCCAGCAGCTGGAGAGGCCACCTAGCTGAAGAGAACGAAGGGACA
 ATCGTGCAGCGACTTATTCTGATAGAGGCTGGGCAATGGCTGTGCCCTATTGGAAAGGGGACATTGT
 GGCATGCGCAAATTCACTTGCCAAATCCATGAGTTGAGGTTGATCAGACAAAATTCACTGTCAGTTGATG
 ATCAGAGCACATTGCATGTAGGGCCAAGCAGGAAATTGAATACCGACATTAAGACTCTCAAGTTGATG
 CCTGTCAGGCTCCAGGAAGTCGAGTCATTGGTATGGAAAAGCTACACTGGAATGCCAGGTGCAAACACTGC
 GGTGGACTTGGTAACAGTTACATCGCTGAGATGGAAACAGAGAGCTGGATAGTGGACAGACAGTGGGCCAG
 GACTTGACCCCTGCCATGGCAGAGTGGAAAGTGGCAGGGTGTGGAGAGAGATGCATCATTTGTCGAATTGAAC
 CTCCGCATGCCGCCACTATCAGACTGGCCCTGGAAACCAGGAAGGCTCCTGAAAACAGCTTACTGG
 CGCAATGAGGGTACAAAGGACACAAATGACAACAACCTTACAAACTACATGGGGACATGTTCTGCAGA
 GTGAAATTGTCAGCTTGACACTCAAGGGACATCCTACAAAATATGCACATGACAAAATGTTTTGTCAGA
 ACCCAACTGACACTGCCATGGCACTGTTGATGCAGGTGAAAGTGTCAAAAGGAGCCCCCTGCAGGATTCC
 AGTGATAGTAGCTGATGATCTACAGCGCAATCAATAAGGCATTTGGTACAGTTAACCCCATGCCCTCA
 ACCAATGATGATGAAGTGTGATTGAGGTGAAACCCACCTTGGAGACAGCTACATTATGTTGGAGAGGAG
 ATTACGCTCACTTACAGTGGCACAAGAGGGAAAGCTCAATAGGAAGTTGTCACTCAGACCATGAAAGG
 CGTGGACGCCTGGCGTATGGAGACACGCCCTGGGATTTCAGCTCCGCTGGAGGGTTCTCACTTGGTT
 GGGAAAGGAATTACACGGTGTGCTGGCTTGCCCTTCAGGGCTATTGGCGCTGAACTGGATAACAAAGG
 TCATCATGGGGCGGTACTTATATGGGTGGCATCAACACAAGAAACATGACAATGTCATGAGCATGATCTT
 GGTAGGAGTGTGATGATGTTGTCAGGAGTGGGGCGGATCAAGGATGCCATCAACTTGGCAAG
 AGAGAGCTCAAGTGGGAGATGGTATCTCATATTAGAGACTCTGATGACTGGCTGAACAAGTACTCATACT
 ATCCAGAAGATCCTGTGAAGCTGCATCAATAGTGAAGCCTTTGAAGAAGGGAAAGTGTGGCCTAAATTC
 AGTTGACTCCCTGAGCATGAGATGTGGAGAACGGCAGATGAGATCAATGCCATTGAGGAAACGAG
 GTGGACATTCTGTCGTCAGGATCCAAAGAATGTTACAGAGAGGAACCTCATCCATTCCAGAATT
 GGGATGGCTGCAGTATGGTGGAAAGACTTGGGTAAGAACCTTGTGTTCTCCCAGGGAGGAAGATGGAAG
 CTTCATCATAGATGAAAGTCCAGGAAAGAATGCCGTTTCAAACCGGGCTGGAATTCTTCAGATAGAG
 GAGTTGGACGGAGTGTACCCACACCGTGTACATGGACGCAGTCTTGAATACACCATAGACTGCGATG
 GATCTATCTGGGTCAGCGGTGAACGAAAAAGAGTGCCTCTCCAAACATTGGATGGAAAGTCA
 TGAAGTAAATGGACATGGATGATCCACACCTGGAGGCTTAGATTACAAGGAGTGTGAGTGGCACTGACA
 CATACTGAAACATCAGTTGAAGAGAGTGAATGTTCATGCCAGATCAATGGAGGCCAGTTAGCTCTC
 ACAATCATATCCCTGGATACAAGGTCAGACGAACGGACCTGGATGCAGGTACCAACTAGAAGTGAAGAGAGA
 AGCTTGGCCAGGGACTAGCGTGTGATGGCAACTGTGATGGACGGGAAATCAACAGATCCACACG
 GATAGCGGGAAAGTTATTCTGAATGGTGTGCTGGCCTCTGCACAATGCCCTGTGAGCTCATGGTAGTG
 ATGGGTGGTGGTATCCATGAAATTAGGCCAAGGAAACGATGAAAGCCATCTGGTGCCTGGTTAC
 AGCTGGAGAAATACATGCTGTCCTTTGGTTGGAGCATGATGATAGCAATGGAAGTGGCTTAAGGAAA
 AGACAGGGACAAAGCAAATGTTGGTGGAGGAGTAGTGTCTGGAGCAATGCTGGTGGCAAGTAAC
 TCCTTGATTGCTGAAACTCACAGTGGCTGTTGATGCATTCCATGAGATGAACAATGGAGGAGACGCCAT
 GTATATGGCGTTGATTGCTGCCATTCAATCAGACAGGGCTGCTCATGGCTTGGCTCAGGACCTATGG
 AGCCCTCGGAAACGCCCTGTGCTGACCCCTAGGAGCAGCCATGGTGGAGATTGCCCTGGTGGCTGATGGCG
 GCCTGTGGAAGTATCTAAATGCAGTTCTCTGACATCCTGACAATAATGCTGTTCTAGGAAAGCATC
 AAATACCATCTTGGCCCTCATGGCTCTGTTGACACCTGTCACATGGCTGAGGTGAGACTTGGCAATGTC
 TTTGTGCCGTGGTTATCATAGGGCTTCAACCAGAATTCAAGGACACCTCCATGCAGAAGACTATACCTC
 TGGTGGCCCTCACACTCACATCTACCTGGCTGACACAACCTTTGGGCTGTGCTATTCTGCCAAC
 CCGCATATTGGCGAAGGAGTATCCAGTGAATGAGGCACTCGCAGCAGCTGGCTAGTGGAGTGTGGCA
 GGACTGGCTTTCAAGGAGATGGAGAACTCCTGGTGGCTGAGTTGGAGGACTCCTGATGATGCTGGT
 CGTGGCTGGAGGGTGGATGGCTAGAGCTCAAGAAGCTTGGTAAGTTCATGGAAAGAGGAGGCGGAGAT
 CAGCGGGAGTCCGCCGCTATGATGTCAGTGAACAAAGGGAGTCAAGCTGCTTTCTGAAGAGAAA

FIGURA 13 (CONTINÚA) - SEQ ID NO 4 (CONTINÚA)

GTGCCATGGGACCAGGTTGTATGACCTCGCTGGCCTGGTGGGGCTGCCCTCCATCCATTGCTCTCTGC
 TGGCCTGCTGGCTGTTCATGTCAGGGAGCTAGGAGAAGTGGGATGTCTTGGAATTCCAC
 TCCTAACATCGAGGAATGTGAACATCTGGAGGATGGGATTATGGCATATTCCAGTCACACTCTTGGG
 GCCTCCCAGCAGGGAGTGGGAGTGGCACAGGGAGGGGTGTTCCACACAATGTGGCATGTACAAGAGGAGCTT
 TCCTTGTCAAGGAATGGCAAGAAGTGTGATTCATCTGGGCTTCAGTAAAGGAAGACCTGTGCCTATGGTGG
 CTCATGGAAGTGGAGGCAGATGGGATGGAGAGGAAGAGGTCAGTTGATCGGGCTGTTCCAGGAAAGAAC
 GTGGTCAACGTCCAGACAAAACCGAGCTGTTCAAAGTGAGGAATGGGGAGAAATGGGGCTGTCCTG
 ACTATCCGAGTGGCACTTCAGGATCTCCTATTGTTAACAGGAACGGAGAGGTGATTGGCTGTACGGCAATGG
 CATCCTTGTGGTACAACCTCTCGTGTCCGCCATATCCCAGACTGAGGTGAAGGAAGAGGAAAGGAGGAG
 CTCCAAGAGATCCCGACAATGCTAAAGAAAGGAATGACAACGTGCTTGAATTTCATCCTGGAGCTGGAGA
 CAAGACGTTCTCCCACAGATCTGGCCGAGTGCACGGAGACGCTGCGCACTCTGTGTTGGCCCCAC
 CAGGGTGTCTTCTGAAATGAAGGAGGCTTCAACGGCTGGACGTGAAATTCCACACACAGGCTTTCC
 GCTCACGGCAGCGGGAGAGAAGTCATTGATGCCATGTGCCATGCCACCCACTTACAGGATGTTGGAACCAA
 CTAGGGTGTAACTGGGAAGTGATCATTATGGATGAAGCCCATTGGATCCAGCTAGCATAGCCGTAG
 AGGTGGGCAGGGCACAGAGCTAGGGCAATGAAAGTCAACATCTGATGACAGCCACACCCCTGGGACT
 AGTGATGAATTCCACATTCAAATGGTGAATAGAAGATGTTCAAACGGACATACCCAGTGAGCCCTGGAAACA
 CAGGGCATGACTGGATCCTAGCTGACAAAAGGCCACGGCATGGTCTCCATCCATCAGAGCTGCAAATGT
 CATGGCTGCCTCTTGCAGGGCTGGAAAGAGTGTTGGCTCTGAACAGGAAACCTTGAGAGAGAAC
 CCCACGATAAAGCAGAAGAAACCTGACTTATATTGGCACTGACATAGCTGAAATGGGAGCCAACCTTGC
 TGGAGCGAGTGCTGGATTGCAGGACGGCTTTAACGCTGTGCTGGATGAAGGGAGGAAGGTGGCAATAAA
 AAGGCCACTCGTATCTCGCATCCTGCTCAAAGGAGGGGCGCATTGGAGAAATCCAACAGAGAT
 GGAGACTCATACTACTATTCTGAGCCTACAAGTGAAAATAATGCCACACGTCTGCTGGTGGAGGCCTCAA
 TGCTCTGGACAACATGGAGGTGAGGGTGGAAATGGTGCCTTCACTCTATGGCGTGAAGGAACCTAAACACC
 AGTTCCCTGGTGAATGAGACTGAGGGATGACCAGAGGAAGTCTCAGAGAACTAGTGGAGAATTGTGAC
 CTGCCCGTTGGCTTGTGCAAGTGGCAAGGCTGGTTGAAGAGCAATGATGTAAGTGGTGTGAG
 GCCCTGAGGAACATGAGATCTGAATGACAGCGGTGAAACAGTGAAGTGCAAGGCTCTGGAGGAGCAAAGAA
 GCCTCTGCGCCAAGGTGGTGTGATGAAAGGGTGTCACTGACCAGAGTGCCTGCTGAATTATTAAAGTT
 GCTGAAGGTAGGAGGGAGCTGCTGAAGTCTAGTTGCTGAGTGAACCTCCCTGATTCTGGCTAAAAAAG
 GTGGAGAGGCAATGGATACCATCAGTGTGTTCTCCACTCTGAGGAAGGCTTAGGGCTTACCGCAATGCACT
 ATCAATGATGCCTGAGGCAATGACAATAGTCATGCTGTTATACTGGCTGGACTACTGACATGGGAATGGTC
 ATCTTTTCTGTCCTTAAAGGCATCAGTAGAATGTCTATGGCGATGGCACAATGGCGGCTGTGGATATC
 TCATGTTCTGGAGGCCTAAACCCACTCACATCTCTATGTCATGCTCATATTCTTGTCTGATGGTGGT
 TGTGATCCCCGAGCCAGGGCAACAAAGGTCATCCAAGACAACCAAGTGGCATACCTCATTATTGGCATCTG
 ACGCTGGTTCAGCGGTGGCAGCCAACGAGCTAGGCATGCTGGAGAAACCAAAGAGGACCTTTGGGAGA
 AGAACTTAATTCCATCTAGTGCTCACCTGGAGTGGCGGATCTGACCTGAAGCCAGGAGCTGCCCTGGAC
 AGTGTACGTTGGCATTGTTACAATGCTCTCCAATGTTGCAACACTGGATCAAAGTCAATATGGCAACCTG
 TCTCTGCTGGAATAGCCCAGTCAGCCTCAGTCCTTCTTCACTGGACAAGGGATACCATGATGAAGATGA
 ATATCTGGTCATAATGCTGGTCAGGGCTGGAAATTCAATAACAGTGTGATGCCCTGCTGTGGCATAGG
 GTGCCCATGCTCCACTGGTCTCTCATTTACCTGGAATCAAAGCGCAGCAGTCAAAGCTGACAGAGAAGG
 GTGTTCCATGGCGTGGCCGAGAACCCCTGGITGATGGGAATCCAACAGTTGACATTGAGGAAGCTCTGAAA
 TGCCTGCCCTTATGAGAAGAAACTGGCTCTATCTCTTGTCTCAGCCTAGCTCTGGCATGTC
 CAGAACGCCCTTCTGAGGCAAGGCATTGCTCTAGCATCAGCTGCCCTAGGGCCGCTCATAGAGGGAAAC
 ACCAGCCTTCTTGGAAATGGACCCATGGCTGTCCATGACAGGAGTCATGAGGGGAAATCACTATGCTTTG
 TGGGAGTCATGTACAATCTATGGAAGATGAAAAGTGGACGCCGGGGAGCGCGAATGGAAAAACTTGGGTGA
 AGTCTGGAAGAGGAACTGAATCTGTTGGACAAGCGACAGTTGAGTTGATATAAAAGGACCGACATTGTGGAG
 GTGGATCGTGATAAGGCACGCAGGCATTGGCGAAGGAAGGTGGACACCAGGGTGGCGGTCTCCAGGGGGA

FIGURA 13 (CONTINÚA) – SEQ ID NO 4 (CONTINÚA)

CCGCAAAGTTAAGGTGGTCCATGAGCGTGGCTATGTCAAGCTGGAAGGTAGGGTATTGACCTGGGTGTGG
 CCGCGGAGGCTGGTGTACTACGCTGCGCAAAGGAAGTGAGTGGGTCAAAGGATTACTCTTGAAGA
 GACGGCCATGAGAAACCATGAATGTCAAAGTCGGATGGAACATCATCACCTCAAGGACAAACTGATA
 TCCACCGCCTAGAACCAAGTGAATGTGACACCCTTTGTGTGACATTGGAGAGTCATCATCGTCATCGTCAC
 AGAGGGGAAAGGACCGTGAGAGTTCTGATACTGTAGAAAAATGGCTGGTTGTGGGTGACAACCTCTGT
 GTGAAGGTGTTAGCTCCATACATGCCAGATGTTCTGAGAACTGGAATTGCTCCAAGGAGGTTGGCGAA
 CAGTGATCAGGAACCCCTCTCCAGGAATTCCACTCATGAAATGTAACGTGCTGGAGGCCGCAGCAATGT
 CACATTACTGTGAACCAAACATCCGCCTCTGATGAGGAGAATGAGGCGTCAACTGGAAAAGTGACCCCTG
 GAGGCTGACGTCATCCTCCAATTGGACACCGCAGTGTGAGACAGACAAGGGACCCCTGGACAAAGAGGCCA
 TAGAAGAAAGGGTGTAGAGGATAAAATCTGAGTACATGACCTCTGGTTTATGACAATGACAACCCCTACAG
 GACCTGGCACTACTGTGGCTCTATGTACAAAAACCTCAGGAAGTGCGCGAGCATGGTAAATGGTGTATT
 AAAATTCTGACATATCCATGGACAGGATAGAGGAGGTACAAGAATGCAATGACTGACACAACCCCTTTG
 GACAGCAAAGAGTGTAAAGAAAAGTTGACACCAGAGCAAAGGATCCACCAGCGGGACTAGGAAGATCAT
 GAAAGTTGTCACAGGTGGCTTCCGCCACCTGGCAGAGAAAAGAACCCAGACTGTGCACAAAGGAAGAA
 TTTATTGCAAAAGTCCGAAGTCATGCAGCCATTGGAGCTTACCTGGAAGAACAGTGAAGACTGCCA
 ATGAGGCTGTCCAAGACCCAAAGTCTGGGAACTGGTGGATGAAGAAAGGAAGCTGCACCAACAAGGCAGGTG
 TCGGACTTGTGTACAACATGATGGGAAAAGAGAGAAGAAGCTGTCAAGGTTGGAAAGCAAAGGGAAAGC
 CGTGCATATGGTATATGGCTGGAGCGCGTATCTGAGTTGAGGCCCTGGATTCTGAATGAGGACC
 ATTGGGCTTCAGGGAAAACCTCAGGAGGAGGTGGAGGCATTGGCTTACAATACTAGGATATGTGATCAG
 AGACCTGGCTGAATGGATGGTGGATTCTACGGGATGACACCGCTGGATGGACACGCGCATCACAGAG
 GCAGACCTTGATGATGAACAGGAGATCTGAACTACATGAGCCCACATCACAAAAACTGGCACAAGCAGTGA
 TGGAAATGACATACAAGAACAAAGTGGTAAAGTGTGAGACCAGCCCCAGGAGGGAAAGCCTACATGGATGT
 CATAAGTCGACGAGACCAGAGGATCCGGCAGGTAGTCACTTATGCTCTGAACACCATCACCAACTGAAA
 GTCCAATTGATCAGAATGGCAGAACAGATGGTACATCACCAACATGTTCAAGATTGTGATGAATCAG
 TTCTGACCAGGCTGGAGGCATGGCTACTGAGCACGGATGTGACAGACTGAAGAGGATGGCGGTAGTGGAGA
 CGACTGTGGTCCGGCCATCGATGACAGGTTGGCTGGCTGGCCATCTCAACGCCATGTCAAGGTT
 AGAAAGGACATATCTGAATGGCAGCCATCAAAGGGTGAATGATTGGAGAATGTGCCCTGTGTCACC
 ACTTCCATGAACTACAGCTGAAGGATGGCAGGAGGATTGTGGCTTGCGAGAACAGGAGCTCATTGG
 GAGAGGAAGGGTGTCTCCAGGAAACGGCTGGATGATCAAGGAAACAGCTTGCTCAGCAAAGCTATGCCAAC
 ATGTGGTCACTGATGTATTTCAAAAAGGGACATGAGGCTACTGTCATTGGCTTCTCAGCTGTGTC
 CCTCATGGGTTCCACAAGGACGCACACATGGTCATTGATGGAAAGGGAGTGGATGACCACGGAAAGACAT
 GCTTGAGGTGTGGAACAGAGTATGGATAACCAACACATGCAGGACAAGACAATGGTAAAAATGG
 AGAGATGTCCTATCTAACCAAGAGACAAGACAAGCTGTGCGGATCACTGATTGGAATGACCAATAGGGCA
 CCTGGGCTCCCACATCCATTAGTCATCCATGTCATCCGAACGCTGATTGGACAGGAGAAATACACTGACTA
 CCTAACAGTCATGGACAGGTATTCTGTTGATGCTGACCTGCAACTGGTGAGCTTATCTGAAACACCATCTAA
 CAGGAATAACCGGGATACAAACCACGGTGGAGAACCGGACTCCCCACAACCTGAAACCGGGATATAACCAC
 GGCTGGAGAACCGGGCTCCGCACTTAAATGAAACAGAAACCGGATAAAACTACGGATGGAGAACCGGACT
 CCACACATTGAGACAGAACAGTGTCAAGCCAGAACCCACAGAGTTTGCCACTGCTAAGCTGTGAGGCA
 GTGCAGGCTGGGACAGCCGACCTCCAGGTTGCGAAAAACCTGGTTCTGGGACCTCCACCCAGAGTAAAAA
 GAACGGAGCCTCGCTACCAACCCCTCCACGTGGTGTAGAAAGACGGGTCTAGAGGTTAGAGGAGACCC
 AGGGAAACAAATAGTGGGACCATATTGACGCCAGGGAAAGACCGGAGTGGTTCTGCTTTCTCCAGAGGTC
 TGTGAGCACAGTTGCTCAAGAATAAGCAGACCTTGGATGACAACACAAACACCAGTGGCCGGCATGGTCCC
 AGCCTCCTCGCTGGCGCCGGCTGGCAACATTCCAGGGGACCGTCCCTCGTAATGGCAATGGGACGAAT
 TCTGAACCAGTCATAAAACGAGTAAATAGGACCGCAATTCTCAAGCAATAACAGGAATACCAATTATTA
 AAGATAACTTAGTCAGATCGTACAATAAGCTTGAAGAAAATGCGCCTTATTCAATCTTGTATAAAAAA
 TGGCCAAAATCTCACATTGAAGACATTGATGACCTCATTCTTCAATGAAGGGCTAACGGAGTTGACT

FIGURA 13 (CONTINÚA) - SEQ ID NO 4 (CONTINÚA)

AATGTTGGAAATTGGAGCGATAAGCGTGCTCTGCCGTGCCAGGACAACGTATACTCATCAGATAACAG
 CAATACCTGATCACTACTTCGCACTAGTTCTCGGTACTATGCATATGATCCAATATCAAAGGAAATGATAGC
 ATTGAAGGATGAGACTAATCCAATTGAGGAGTGGCAGCATAATAGAACAGCTAAAGGGTAGTGTGAAGGAAGC
 ATACGATAACCCGCATGGAATGGATAATATCACAGGAGGTACTAGACTACCTTCATCCTACATAATAGAC
 GCATATAAGTACGCATTAAAGCATAAACACGCACTATGCCGTCTTCATGTATATATATACAGGCAACA
 CGCAGATATAGGTGCGACGTGAACAGTGAGCTGTATGTGCGCAGCTCGCGTGCATTTCGGAAGCGCTCGTT
 TTCGAAACGCTTGAAGTCTTATTCCGAAGTCTTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACCTCAGAGCGCTTT
 GAAAACAAAAGCGCTCTGAAGACGCACCTCAAAAACCAAAACGCAACGGACTGTAACGAGCTACTAAA
 TATTGCGAATACCGCTTCCACAAACATTGCTCAAAGTATCTTGTCTATATATCTGTGTATATCCCTA
 TATAACCTACCCATCCACCTTCGCTCTGAACCTGCATCTAAACTCGACCTCTACATTTTATGTTATC
 TCTAGTATTACTCTTAGACAAAAAAATTGAGTAAAGACTATTCTAGAGTGAATCGAAAACAATACGAAAA
 TGTAACATTCCTATACGTAGTATAGAGACAAAATAGAAGAAACCGTCTATAATTCTGACCAATGAAG
 AATCATCAACGCTATCACTTCTGTTCACAAAGTATGCGCAATCCACATCGGTATAGAATATAATCGGGGATG
 CCTTTATCTGAAAAAAATGCACCCGCAGCTCGCTAGTAATCAGTAAACGCGGAAAGTGGAGTCAGGCTTT
 TTATGGAAGAGAAAATAGACACCAAAGTAGCCTCTTAACCTAACGGACCTACAGTGCAAAAGTTATCA
 AGAGACTGCATTATAGAGCGACAAAGGAGAAAAAAAGTAATCTAAGATGCTTGTAGAAAATAGCGCTCT
 CGGGATGCATTTGTAGAACAAAAAAGAAGTATAGATTCTTGTGGTAAAATAGCGCTCTCGCGTGCATT
 TCTGTTCTGAAAAATGCAGCTCAGATTCTTGTGGTAAAAATTAGCGCTCTCGCGTGCATTTGTTAC
 AAAAATGAAGCACAGATTCTCGTTGGTAAAATAGCGCTTCGCGTGCATTTCTGTTCTGTAAGGATGAGC
 TCAGATTCTTGTGAAAATTAGCGCTCTCGCGTGCATTTGTTACAAAATGAAGCACAGATGCTC
 GTTAACAAAGATATGCTATTGAAAGTGCAGATGAAAGTCAAGATGGAACACGCAAGAAATGAACCGGGGATGCGACGTGCAAGATT
 ACCTATGCAATAGATGCAATAGTTCTCAGGAACCGAAATACATACATTGCTCCGTAAGCGCTAGACTA
 TATATTATTATACAGGTTCAAATATACTATCTGTTAGGGAAAACCTCCAGGTTGGATGTTCAAATTCAA
 TGATGGTAACAAGTACGATCGTAAACAGTTGCGATATTAGGCTGTATCTCTCAAAGCGT
 ATTGCAATATCATTGAGAACAGCTGCAGGCAAGTGCACAAACAATACTTAAATAACTACTCAGTAATAACCT
 ATTCTTAGCATTGAGAACATTGCTATTGTTAGAGTCTTACACCATTGCTCCACACCTCCGCT
 TACATCAACACCAATAACGCCATTAACTCTAAGCGCATCACCACATTCTGGCGTCACTCCACAGCTAAC
 ATAAAATGTAAGCTTCGGGCTCTTGCCTCCACCCAGTCAGAAATCGAGTCCAATCAAAGTCAC
 CTGTCACCTGCTCTGAATCAAACAAGGAAATAACGAATGAGGTTCTGTGAAGCTGCACTGAGTAGTAT
 GTTGCAGTCTTGGAAATACGAGTCTTAAACTGGCAAACCGAGGAACCTTGGTATTCTGCCACGAC
 TCATCTCCATGCAGTGGACGATATCAATGCCGTAACTTGAACGAGGCCAACATCCTCTTAGGTTGAT
 TACGAAACACCCCAACCAACTATTGGACTCCCTGAACATTGTTATGCTTACAGACTTAAAGACTGAAATT
 CCTTGCAATAACCGGGTCAATTGTTCTTCTATTGGCACACATATAACCCAGCAAGTCAGCATCGGAA
 TCTAGAGCACATTGCGGCCTCTGTGCTCTGAAGCGCAAACCTTACCAATGGACCAGAACTACCTGTA
 AATTAAATAACAGACATACTCCAAGCTGCCATTGTTGCTTAATCAGTATACTCAGTGCTCAATAGTCACCA
 ATGCCCTCCCTTGGCCCTCTCCTTTGACCGCTAGCGTCAGCGACACACTTGCACTCGGA
 TGCAGCCCGGTTACGTGCCGGCACGGCCTGGTAACCGAGGTATTGTCACATAACCGTGCACAAAGTGT
 GTGGATAAGCAGGACACAGCAGCAATCCACAGCAGGCATAACACCGCACACCGAGGTTACTCCGTTACAGG
 TTACGACGACATGTCATACTGCCCTTGACAGGCATTGATGGAATCGTAGTCTCAGCTGATAGTCTGATCG
 ACAATACAAGTGGGACCGTGGCCCAGACCGATAATCAGACCGACAACACGAGTGGGATGTGGTCCCAGACT
 AATAATCAGACCGACGATACGAGTGGGACCGTGGTCCCAGACTAATAATCAGACCGACGATACGAGTGGGACC
 GTGGTTCCAGACTAATAATCAGACCGACGATACGAGTGGGACCGTGGTCCCAGACTAATAATCAGACCGACGA
 TACGAGTGGGACCATGGTCCCAGACTAATAATCAGACCGACGATACGAGTGGGACCGTGGTCCCAGTCTGATT
 ATCAGACCGACGATACGAGTGGGACCGTGGTCCCAGACTAATAATCAGACCGACGATACGAGTGGGACCGTGG
 TCCCAGACTAATAATCAGACCGACGATACGAGTGGGACCGTGGTCCCAGTCTGATTATCAGACCGACGATACA
 AGTGGAAACAGTGGGCCAGAGAGAATATTAGGCCAGTTATGCTTCTGGCCTGTAACAAAGGACATTAAGTA

FIGURA 13 (CONTINÚA) - SEQ ID NO 4 (CONTINÚA)

AAGACAGATAAACGTAGACTAAAACGTGGTCGCATCAGGGTGCCTGGCTTTCAAGTCCCTAAGAATGGCCTC
 AATTCTCTATACACTCAGTGGAACACGGGACCTGTCCAGGTTAAGCACCATTATGCCCTATACAAT
 ACTGTCGCTCCAGGAGCAAACGTGAGCTAAACTAGTTCTGATGCAGATGACGTTTAAGCACAG
 AAGTAAAGAGTGTAACTTCTCAGCTCAAATATCACCCCAGCTTTCTGCTCATGAAGGTTAGATGC
 CTGCTGCTTAAGTAATTCTCTTATCTGAAAGGCTTTGAAGTGCATCACCTGACCGGGCAGATAGTCA
 CCGGGTGAGAAAAAGAGCAACAACGTGATTAGGCAATTGGCGGTGTTGATACAGCAGGTAATAATCTTAC
 GTGAAATATTTCCGCATCAGCCAGCGAGAAATATTCCAGCAAATTCTGCAATCGGTTGCTACAGCAGG
 CTGACCACGTTATAAGCACTTGTGGCGATAATCGTTACCCAATCTGGATAATGCAGCCATCTGCTCATCA
 TCCAGCTGCCAACAGAACAGATAATCACTTCGGTAAGTGCAGCAGCTTACGACGGCAGTCCCACCG
 CAATTCTATGACACCAGATACTCTCGACCGAACGCCGGTGTCTGTTGACCAGTCAGTAGAAAAGAAGGGAT
 GAGATCATCCAGTGCCTCAGTAAGCAGCTCTGGTCACGTTACCTGACCATACCCGAGAGGTCTC
 TCAACACTATCACCCGGAGCACTCAAGAGTAAACTTCACATCCGACCATACAGGCAAAGTAATGGCAT
 TACCGCAGCCATTACTCCTACGCGCGAATTAGAATCCACCATCGGGCAGCTGGTGTGATAACGAAGT
 ATCTCAACCGGTTGAGTATTGAGCTATGTTGAAATAACAGGCGCACGCTCATTATCTAATCTCCAGC
 GTGGTTAATCAGACGATGAAAATTTCATTGACAGACAGGTTCCAAATAGAAAGAGCATTCTCAGGCACC
 AGTTGAAGAGCGTTGATCAATGGCCTGTTCAAAAACAGTTCTCATCCGGATCTGACCTTACCAACTTCATCC
 GTTTCACGTACAACATTAGAACCATGCTCCCCAGGCATCCGAATTGCTCCTCCATCCACGGGACT
 GAGGCCATTACTATTGCTGTATTGGTAAGCAAATACGTACATCAGGCTCGAACCTTAAGATCAACGTT
 CTTGAGCAGATCAGCAAGCATCGAAACTGCAAGGTTCAATGCCAGTCGGAGCATCAGGTGTGGATCGGTGGCAGTTACC
 TGACATCATAGTCATGAGCAACAGTTCAATGCCAGTCGGAGCATCAGGTGTGGATCGGTGGCAGTTACC
 TTCATCAAATTGCCATTAACTCAGTTCAATACGGTGCAGAGCCAGACAGGAAGGAATAATGTCAAGCCCC
 GGCCAGCAAGTGGCTTATTGCTATAAGTGCACATCGCTTTCCCAAGATAGAAAGGCAGGAGAGTGTCTT
 CTGCATGAATATGAAGATCTGGTACCCATCGTGTACATTGAGGCTGTTCCCTGGGGTCGTTACCTCCAC
 GAGCAAACACGTAGCCCTCAGGCCAGATCCTGAGCAAGATGAACAGAAACTGAGGTTTGTAACGCCA
 CCTTATGGCAGCAACCCGATCACCGTGGAAATACGTCTCAGCAGTCGAATCGCTACCAAACACAT
 CACGCATATGATTAAATTGTTCAATTGATAACCAACACGTTGCTCAACCGTCTCGAATTCCATATCCGG
 GTGCGGTAGTCGCCCTGTTCTCGGCATCTGTAGCCTGAGAAGAAACCCAACTAAATCCGCTGCTCA
 CCTATTCTCCAGGCCGGTTATTCTCGCTCCGGCTGTCATCATTAAACTGTGCAATGGCATAAGCCT
 TCGTCATTTCATGACCAGCGTTATGCACTGGTTAAGTGTTCATGAGTTCTGAACATCCTTAATC
 ATTGCTTGCTTTTATTAAATCTGCAATTACTGCAAAGCAACAAACATCGCAAAGTCATCAAAAA
 ACCGCAAAGTTAAAATAGAGCAACACTACAAAGGAGATAAGAAGAGCACACATACCTCAGTCACCTT
 ATCACTAGCGCTCGCCGCAGCGTGTAAACGAGCATAGCGAGCGAACTGGCGAGGAAGCAAAGAAACTGTT
 CTGTCAGATAGCTTACGCTCAGCGCAAGAAGAAATATCCACCGTGGAAAAACTCCAGGTAGAGGTACACA
 CGCGGATAGCCAATTAGAGTAATAACTGTGATAATCAACCCCTCATCAATGATGACGAACTACCCCGATA
 TCAGGTACATGACGAAGGGAAAGAGAAGGAAATCAACTGTGACAAACTGCCCTCAAATTGCTCCTTAA
 AATTACAGTTCAAAAAGTATGAGAAAATCCATGCAAGGCTGAAGGAAACAGCAAACACTGTGACAAATTACCTC
 AGTAGGTAGAACAAATGTGACGAACCACCTCAAATCTGTGACAGATAACCCCTCAGACTATCCTGCTCAT
 GGAAGTGATATCGCGAAGGAAATACGATATGAGTCGTCGGCGCCTTCTTTCTCAATGTATGAGAGG
 CGCATTGGAGTTCTGCTGTGATCTCATTAACACAGACCTGCAAGGAAGCGCGGGCGGAAGTCAGGCATACGCT
 GGTAACCTTGAGGAGCTGGTAACGCTCATGATCCAGTCAGTTCAAGAGAGACGATGCGTGGCCATCCGG
 CTTACGATACTGACACAGGGATTGTTAAACGATGGCATACGGATTGGTATTCTTTGTTCAACTAAGC
 CGAAACTGCGTAAACCGGTTCTGTAACCCGATAAAAGAAGGGAAATGAGATATGGGTTGATATGTACACTGTAAA
 GCCCTCTGGATGGACTGTGCCACGTTGATAAAACCAAGGAAAAGATTGATAGCCTTTCATGCCGGCATC
 CTCTCAGGGCGATAAAAACCACTTCCTCCCCGCAACTCTCAATGCCCTGCGTATATCCTACTGGCT

FIGURA 13 (CONTINÚA) - SEQ ID NO 4 (CONTINÚA)

TCCGCAGAGGTCAATCGAATATTCAGCATATTAGCAACATGGATCTGCAGATACCGTCATGTTCTGTA
 GGGTGCCATCAGATTTCTGATCTGGCAACGAACAGATAACGCATACTGTTTGTATCCCAGGAGAGACTATA
 TGCCGCCAGTGGCTGTTGACTGGACGATTGGGGCTATTTACGTTCTGTGATTGATAACCGCT
 GTTCCGCCATGACAGATCCATGTGAAGTGTACAAGTTAGATTGTCACACTAAATAAAAAAGAGTCAT
 AAGCAGGGATAACTTGTGAAAAAACAGCTTCTGAGGGCAATTGTCACAGGGTTAAGGGCAATTGTCA
 CAGACAGGACTGTCAATTGAGGGTATTGTCACACTGAAAGGGCAATTGTCACAACACCTCTAGAAC
 AGCATGGATAAAGGCCACAAGGCCTCTAAAAGAGATCTAAAACATAAAAAAAATAATTATAAAAAT
 ATCCCCGTGGATAAGTGGATAACCCAAGGGAGTTTCAAGGCATCGTGTGAAGCAGAATATATAAGTGC
 TGTTCCTGGTGTCTCCTCGCTCACTGACCGGGAGGGTCAGAAGGGGGGCACCCCCCTCGCGTGC
 GGTACCGCACAGGGCGAGCCCTGGTAAAAACAGGTTATAATATTGGTTAAAAGCAGGTTAAAAGA
 CAGGTTAGCGGTGGCGAAAAACGGCGGAAACCCCTGCAAATGCTGGATTTCGCTGTGACAGCCCTC
 AAATGTCAATAGGTGCGCCCTCATCTGTCAGCACTCTGCCCTCAAGTGTCAAGGATCGGCCCTCATCTG
 TCAGTAGTCGCCCTCAAGTGTCAATACCGCAGGGACTTATCCCAGGCTGTCCACATCATCTGGGA
 AACTCGCGTAAAATCAGGCCTTCGCCGATTGCGAGGCTGCCAGCTCCACGTCGCCGGCGAAATCGAGC
 CTGCCCTCATCTGCAACGCCGCCGGTGAAGTGGCCCTCAAGTGTCAACGTCGCCCTCATCTGCA
 GTGAGGGCAAGTTCCCGAGGTATCCACAACGCCGGCGGCCGGTGTCTGCACACGGCTTCGAC
 GGCGTTCTGGCGCTTGCAGGGCATAGACGGCCAGCCCAGCGCGAGGGCAACCAGCGAGGGCTC
 GCCCTGTCGCTGACTGCCGGAGCACTACTGGCTGAAAAGGACAGACCATCATGGTCTGTGTTCTTA
 GGTGTTCTGTCATTGTCACATAATCCGCTCACTTCAACGTAACACCGCACGAAGATTCTATTGTC
 GAAGGCATATTCAAATCGTTTCTGCTACCGCTTGAGGCATCATGACAGAACACTACTTCTATAACGCTAC
 ACAGGCTCTGAGATAATAATCGGATCTACCGATAATGGGAGATTTCGGACTGTTCTGCTCTC
 AGTGGATAACAGCCAGCTCTGTTAACAGACAAAAACAGCATATCCACTCAGTCCACATTCCATATAA
 AGGCCAAGGCATTATTCTCAGGATAATTGTTTCAGCATCGAACCGCATCAGACTCCGGATCGCAAACGTC
 ACCCGGTGCCGGCAGCCACATCCAGCGAAAAACCTCGTAGACTCCGGTAACGTGATGGACTATGTC
 CCATCAGGCTTGCAGAACTTCAGCGTATACCGCATACAGCATGTCATCGCATAGGAATGGCGAACGT
 ATGTGGGTGACCGGAACAGAGAACGTACACCGTCAGCAGCGGGCAACCGCTCCCAATCCAGGTC
 CTGACCGTTCTGTCGTCACTCCAGATCCGCGTTCTGCTCTGTGACGGTTACGCCGCTCCA
 TGAGCTTATCGCAATAAACCTGTGACGGAAAGACTTCAGCGATACTCGCAGAATAAAATCCTGGTGTCCCTG
 ATACCGGGAAAGCCCTGGCCAACTTTGGGAAAGACGTTGATCGGCACGTAAGAGGTCCAACATTCA
 CCATAATGAAATAAGATCACTACCGGGCGTATTTGAGTTATCGAGATTTCAGGAGCTAAGGAAGCTAAA
 ATGGAGAAAAAAATCACTGGATATACCAACCGTTGATATATCCAATGGCATCGTAAAGAACATTGAGGCAT
 TTCAGTCAGTTGCTCAATGTACCTATAACCAACAGACCGTTAGCTGGATATTACGGCTTTAAAGACCGTAAA
 GAAAATAAGCACAGTTTATCCGGCTTATTACACATTCTGCCCTGATGAATGCTCATCCGGATT
 CGTATGGCAATGAAAGACGGTAGCTGGTAGATGGATAGTGGTACCCCTGTTACACGTTTCCATGAGC
 AAAACTGAAACGTTTACGCTCTGGAGTGAATACCGACGATTCGGCAGTTCTACACATATTCGCA
 AGATGTGGCGTTACGGTAGAAACCTGGCTATTCCCTAAAGGGTTATTGAGAAATATGTTTCTGCTCA
 GCCAATCCCTGGGTGAGTTACCGAGTTGATTAAACGTCGCAATATGGACAACCTTCGCCCGT
 TCACCATGGCAAATATTACGCAAGGCAGACAGGTGCTGATGCCGCTGGCAGTTGTCAGGTT
 TTGATGGCTTCCATGTCGGCAGATGCTTAATGAATTACACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCG
 TAATTTTTAAGGCAGTTATGGTGCCTTAAACGCTGGTGTACGCCGTAATAAGTGATAATAAGCGGA
 TGAATGGCAGAAATCGATGATAAGCTGCAACACATGAGAATTGGTCGACCTGGAATGTGTGTCAGTTAG
 GGTGTGGAAAGTCCCAGGCTCCAGCAGGCAGAGTATGCAAAGCATGCAATTAGTCAGCAACCAG
 GTGTGGAAAGTCCCAGGCTCCAGCAGGCAGAGTATGCAAAGCATGCAATTAGTCAGCAACCAG
 GTCCCGCCCTAACTCCGCCATCCGCCCTAACCTCCGCCAGTTCCGCCATTCTCCGCCATGGCTGAC
 TAATTTTTATTATGCAGAGGCCAGGCCGCTC

FIGURA 13 (CONTINÚA) - SEQ ID NO 4 (CONTINÚA)

SECUENCIA SEQ ID NO:5

CONSTRUCTO SINTÉTICO: PSHUTTLE/CHIMERIVAX-JE (21091 PB)

AGTAAATCCTGTGCTAATTGAGGTGCATTGGCTCGCAAATCGAGTTGCTAGGCATAAACACATTGGATT
 AATTTAATCGTTGCTTGAGCGATTAGCAGAGAACGACTGACCAGAACATGTCGGTCGAAAGCTCAGGGAAAAA
 CCCTGGCGTCAATATGGTACGACGAGGAGTCGCTCCTGTCAAACAAAATAAAACAAAACAAAACAAAT
 TGGAAACAGACCTGGACCTCAAGAGGTGTTCAAGGATTATCTTTCTTTGTTAACATTTGACTGGA
 AAAAAGATCACAGCCCACCTAAAGAGGTGTTGAAAATGCTGGACCCAAAGACAAGGCTTGGCTGTTCTAAGGA
 AAGTCAAGAGAGTGGTGGCCAGTTGATGAGAGGATTGTCCTCGAGGAAACGCCCTCCATGATGTTCTGAC
 TGTGCAATTCTAATTTGGGATGCTGTTGATGACGGGTGGAATGAAGTTGTCGAATTCCAGGGAAAGCTT
 TTGATGACCATCAACAACACGGACATTGACAGCTTATGTCAGTCAATTCCACCTCAAAGGAGAGAACAGATGCT
 GGGTCCGGGCAATCGACGTCGGCTACATGTGAGGACACTATCACGTACGAATGCTTAAGCTTACCATGGG
 CAATGATCCAGAGGATGTGGATTGCTGGTGTGACAACCAAGAAGTCTACGTCCTAATGGACGGTGCACGCG
 ACCAGGCATTCCAAGCGAACGAGGAGATCCGTGTCGGTCAAACACATGGGAGAGTTCACTAGTGAATAAAA
 AAGAGGCTTGGCTGGATTCAACGAAAGCCACACGATATCTCATGAAAATGAGAACACTGGATCATAAGGAATCC
 TGGCTATGCTTCTGGCGCGGTACTTGGCTGGATGCTGGCAGTAACAACGGTCAACGCGTGGTATTTCAC
 ATCCCTCGCTGTTGGTCGCTCCGGCTTACAGTTTAATTGTCGGGAATGGCAATCGTACTTCATAGAAG
 GAGCCAGTGGAGCCACTTGGGTGGACTTGGTCTAGAAGGAGACAGCTGCTTGACAATCATGGCAAACGACAA
 ACCAACATTGGACGTCGCATGATTAACATCGAACGCTAGCCAACCTGCTGAGGTCAGAACGTTACTGCTATCAT
 GCTTCAGTCACTGACATCTGACGGTGGCTCGGTCCCCACGACTGGAGAACGCCACAACGAGAACGAGCTG
 ATAGTAGCTATGTTGCAAAACAGGCTTCACTGACCGTGGGTGGGCAACGGATGTTGATTTTCGGGAGGG
 AACGATTGACACATGTGCAAATTCTCTGCACCAGTAAAGCGATTGGGAGAACAAATCCAGCCAGAAACATC
 AAATACAAAGTTGGCATTGGCATGGAACCACCACTTGGAAAACCATGGGAAATTATTCAAGCGCAAGTTG
 GGGCGTCCCAGGCAGGCAAAGTTACAGTAACACCCAAATGCTCTCGGTAGCCCTCAAACCTGGTACTACGG
 AGAAGTCACACTGGACTGTGAGCCAAGGAGTGGACTGAACACTGAAGCGTTTACGTATGACCGTGGGTCA
 AAGTCATTCTGGCCATAGGGAGTGGTTCATGACCTCGCTCCCCCTGGACGTCCCCCTCGAGCACAGCGT
 GGAGAACAGAGAACCTCATGGAATTGAAGGGCGCACAAACAGTCGGTGTGACTTGGTC
 ACAGGAAGGAGGCCATCATGCGTTGGCAGGAGCCATCGGGTGGAGTACTCAAGCTCAGTGATGTTAAC
 TCAGGCCACCTGAAATGTAGGCTGAAAATGGACAAACTGGCTCTGAAAGGCACAACCTATGGCATGTTACAG
 AAAAATTCTCGTTCGCAAAATCCGGTGGACACTGGTCACGGAACAGTTGTCATTGAACTCTCTACTCTGG
 GAGTGATGGCCCCCTGCAAATTGGATTGTTCCGTTGCGAGCCTCAATGACATGACCCCCGGTGGCGCTG
 GTGACAGTGAACCCCTTCGTCGCACTTCCAGTGCCTACTCAAAGGTGCTGGTCGAGATGGAACCCCCCTCG
 GAGACTCCTACATCGTAGTTGGAAGGGAGACAAGCAGATCAACCACCATGGCACAAAGCTGGAAGCAGC
 GGGCAAGGCCTTTCAACAACTTGAAGGGAGCTAAAGACTGGCAGCGTGGGCGACACAGCCTGGACTTT
 GGCTCTATTGGAGGGTCTCAACTCCATAGGAAGAGCCGTTCACCAAGTGGTGGCTGGCCTTCAGAACAC
 TCTTGGGGAAATGCTTGGATCACACAAGGGCTAATGGGTGCCCTACTGCTCTGATGGCGTCAACGCACG
 AGACCGATCAATTGCTTTGGCCTTCTAGCCACAGGAGGTGCTGCTGTTAGCGACCAATGTGGCGCC
 GATCAAGGATGCCATCAACTTGGCAAGAGAGGCTCAAGTGCAGGAGATGGTATCTCATATTAGAGACT
 CTGATGACTGGCTGAACAAGTACTCATACTATCCAGAACGATCCTGTGAAGCTTGCATCAATAGTGAAGCCTC
 TTTGAAAGAGGGAAAGTGTGGCTAAATTCAAGTTGACTCCCTGAGCATGAGATGTGGAGAACGAGGGCAGAT
 GAGATCAATGCCATTGGAGGAAACGAGGTGGACATTCTGTTGTCGTCAGGATCCAAAGAACATGTTAC
 AGAGAGGAACATCCATTCCAGAATTGGGATGGCTGCAGTATGGTGGAAAGACTTGGGTAAGAACCT
 TGTGTTCTCCCAGGGAGGAAGAACATGGAGCTTCACTCATAGATGGAAAGTCCAGGAAAGAACATGCC
 AACCGGGCTGGAATTCTTCAGATAGAGGAGTTGGGACGGGAGTGGTCAACCACACGCGTGTACATGGAC
 CAGTCCTTGAATACACCATAGACTGCGATGGATCTTGGGTGCAAGCGTGAACGGAAAAAGAGTGCCCA

FIGURA 13 (CONTINÚA) - SEQ ID NO 5

TGGCTCTCAAACATTTGGATGGGAAGTCATGAAGTAAATGGGACATGGATGATCCACACCTGGAGGCATTA
 GATTACAAGGAGTGTGAGTGCCACTGACACATACTGATTGAAACATCAGTTGAAGAGAGTGAAATGTTCATGC
 CGAGATCAATCGGAGGCCAGTTAGCTCTCACAAATCATATCCCTGGATACAAGGTTAGACGAACGGACCTG
 GATGCAGGTACCACTAGAAGTGAAGAGAGAAGCTGCCAGGGACTAGCGTATCATTGATGCCACTGTGAT
 GGACGGGAAAATCAACCAGATCCACCGACGGATAGCGGAAAGTTATTCTGAATGGTGTGCGCTCTGCA
 CAATGCCGCTGTGAGCTTCATGGTAGTGTGGTGTGGTATCCCAGTGGAAATTAGGCCAAGGAAAACGCA
 TGAAAGCCATCTGGTGCCTGGTTACAGCTGGAGAAATACATGCTGTCCTTGGTTGGTGGAGCATG
 ATGATAGCAATGGAAGTGGTCTAAGGAAAAGACAGGGACCAAAGCAATGTTGGTTGGAGGAGTAGTGCCT
 TGGGAGCAATGCTGGTCCGGCAAGTAACCTCCTTGATTGCTGAAACTCACAGTGGCTGTGGATTGCATT
 CCATGAGATGAACAATGGAGGAGACGCCATGTATATGGCGTTGATTGCTGCCCTTCATCAGACCAGGGCTG
 CTCATCGGCTTGGCTCAGGACCCATGGAGCCCTGGGAACGCCCTGTGCTGACCCCTAGGAGCAGCCATGG
 TGGAGATTGCCCTGGGTGGCGTGTGGCGCCTGTGGAGTATCTAAATGCAGTTCTCTGCATCCTGAC
 AATAATGCTGTTGCTCTAGGAAAGCATCAAATACCATCTGCCCTCATGGCTCTGGTACACCGGTCA
 ATGGCTGAGGTGAGACTTGCGCAATGTTCTTGCCATGGTTATCATAGGGCTCTCACCAGAATTCA
 AGGACACCTCCATGCAGAAGACTATACCTCTGGTGGCCCTCACACTCACATCTTACCTGGCTTGACACAACC
 TTTTTGGCCTGTGCATTCTGCCAACCCGATATTGGCCAAGGAGTATCCAGTGAATGAGGCAC
 GCAGCAGCTGGCTAGTGGAGTGCTGCCAGGACTGGCTTTCAGGAGATGGAGAACCTCCTGGCTCGATTG
 CAGTTGGAGGACTCTGATGATGCTGGTAGCGTGGCTGGAGGGTGGATGGCTAGAGCTAAGAAGCTGG
 TGAAGTTCATGGGAAGAGGAGGCGAGATCAGCGGAGTTCCGCCGCTATGATGTTGGCACTCAGTGAACAA
 GGGGAGTTCAAGCTGCTTCATGAAGAGAAAAGTGCATGGGACCAGGTTGTGATGACCTCGCTGCCCTGGT
 GGGCTGCCCTCCATCCATTGCTCTGCTGGCCTTGCTGGGTGGCTGTTCATGTCAGGGAGCTAGGAG
 AAGTGGGATGTCCTGGATATTCCACTCTAAGATCATGAGGAATGTGAACATCTGGAGGATGGGATT
 TATGGCATATTCCAGTCACCTCTGGGGCCTCCAGCGAGGAGTGGGAGTGGCACAGGGAGGGTGTCC
 ACACAATGTGGCATGTCACAAGAGGAGCTTCCTTGTCAGGAATGGCAAGAAGTTGATTCCATCTGGGCTTC
 AGTAAAGGAAGACCTGTCGCTATGGGCTCATGGAAAGTGGAGGAGATGGGATGGAGAGGAAGAGGTC
 CAGTTGATCGCGGCTGTTCCAGGAAAGAACGTTGCTAACGTCAGACAAAACCGAGCTGTTCAAAGTGG
 ATGGGGAGAAATGGGGCTGTCGCTCTGACTATCCAGTGGCACCTCAGGATCTCTATTGTTAACAGGAA
 CGGAGAGGTGATTGGCTGTACGGCAATGGCATCCTGTCGGTGACAACCTCCTCGTGTGCCATATCCCAG
 ACTGAGGTGAAGGAAGGAAGGAGGAGCTCAAGAGATCCGACAATGCTAAAGAAAGGAATGACAAC
 TCCTGATTTCATCCTGGAGCTGGGAAGACAAGACGTTCCCTCCCACAGATCTGGCCGAGTGGCAC
 ACGCTTGCACACTTGTGTTGGCCCCCACCAGGTTGTTCTGAAATGAAGGAGGCTTTCACGGCTG
 GACGTGAAATTCCACACACAGGCTTTCCGCTCACGGCAGGGAGAGAAAGTCAATTGATGCCATGTGCC
 CCACCCCTAACCTACAGGATGTTGAACCAACTAGGGTTGTTAAGTGGAGTGTGATCATTATGGATGA
 TTTTTGGATCCAGCTAGCATAGCCCTAGAGGTTGGCAGCGCACAGAGCTAGGGAAATGAAAGTGAACA
 ATCTTGATGACAGCCACACGGCTGGGACTAGTGTGATGAATTCCACATTCAAATGGTAAAGATGTT
 AAACGGACATACCCAGTGAGCCCTGGAACACAGGGCATGACTGGATCCTAGCTGACAAAAGGCCACGG
 GTTCCTCCATCCATCAGAGCTGAAATGTCATGGCTGCCCTTGCGTAAGGCTGGAAAGAGTGTGGT
 CTGAACAGGAAAACCTTGGAGAGAGAATACCCACGATAAAGCAGAAGAAACCTGACTTATATTGCC
 ACATAGCTGAAATGGGAGCCAACCTTGCCTGGAGCGAGTGTGGATTGCAAGGACGCCCTTAAGCCTG
 TGTGGATGAAGGGAGGAAGGTGGCAATAAAAGGGCCACTTCGATCTCCGATCCTCTGCTGCTCAAAGG
 GGGCGATTGGGAGAAATCCAACAGAGATGGAGACTCATACTACTATTCTGAGCCTACAAGTGA
 CCCACCACTGCTGGTTGGAGGCCCTCAATGCTCTGGACAACATGGAGGTGAGGGTGGAAATGG
 ACTCTATGGCGTTGAAGGAACATAAAACACCAGTTCCCTGGTAAATGAGACTGAGGGATGACCAGAG
 GTCTTCAGAGAAACTAGTGAGGAATTGTGACCTGCCGTTGGCTTGTGGCAAGTGGCAAGGCTGG
 AGACGAATGATCGTAAGTGGTGTGTTGAAGGCCCTGAGGAACATGAGATCTGAAATGACAGCG
 GAAGTGCAGGGCTCTGGAGGAGCAAAGAAGCCTGCGCCCAAGGTGGTGTGATGAAAGGGTGT
 CATCTGAC

FIGURA 13 (CONTINÚA) - SEQ ID NO 5 (CONTINÚA)

CAGAGTGGCCTGCTGAATTATTAAGTTGCTGAAGGTAGGAGGGAGCTGCTGAAGTGCTAGTTGTGCTGA
 GTGAACCTCCCTGATTCCTGGCTAAAAAAAGGTGGAGAGGCAATGGATACCATCAGTGTGTTCTCCACTCTGA
 GGAAGGCCTAGGGCTTACCGCAATGCACTATCAATGATGCCCTGAGGCAATGACAATAGTCATGCTGTTATA
 CTGGCTGGACTACTGACATGGGAATGGTCATCTTTCATGTCTCCCAAAGGCATCAGTAGAATGTCTATGG
 CGATGGGCACAATGGCCGGCTGGATATCTCATGTTCTGGAGGCCTCAAACCCACTCACATCTCCTATGT
 CATGCTCATATTCTTGCTCTGATGGTGGTTGTGATCCCCGAGCCAGGGCAACAAAGGTCCATCCAAGACAAC
 CAAGTGGCATACTCATTATTGGCATCCTGACGCTGGTTCAGCGGTGGCAGCCAACGAGCTAGGCATGCTGG
 AGAAAACCAAAGAGGACCTTGGGAAGAAGAACCTAATCCATCTAGTGCTTCACCTGGAGTTGGCCGGA
 TCTTGACCTGAAGCCAGGAGCTGCCAGTGTACGTTGCCATTGTTACAATGCTCTCTCAATGTTGCAC
 CACTGGATCAAAGTCGAATATGGCAACCTGTCTGTGGAATAGCCCAGTCAGCCTCAGTCCTTCTTCA
 TGGACAAGGGATACCATTGATGAAGATGAATATCTCGGTATAATGCTGCTGGTCAGTGCTGGAATTCAAT
 AACAGTGATGCCCTGCTCTGTCATAGGGTGCCTGCAGCCTCTCATTTCACCTGGATGGAATCAA
 GCGCAGCAGTCAAAGCTAGCACAGAGAAGGGTCTCATGGCGTGGCAGAACCCCTGTGGTTGATGGGAATC
 CAACAGTTGACATTGAGGAAGCTCTGAAATGCCCTTATGAGAAGAAACTGGCTCTATATCTCCTCT
 TGCTCTCAGCCTAGCTTCTGTCATGTGAGAAGCCTTTCATTGGCTGAAGGCATTGCTCTAGCAGTC
 GCTGCCCTAGGGCGCTCATAGAGGAAACACCAGCCTCTTGAATGGACCCATGGCTGCTCCATGACAG
 GAGTCATGAGGGGAATCACTATGCTTTGTGGAGTCATGTACAATCTATGGAAGATGAAAACGGACGCC
 GGGGAGCCGAATGGAAAACCTTGGGTGAAGTCAGGAAAGAGGAACCTGAATCTGTTGGACAAGCGACAGTT
 GAGTTGTATAAAAGGACCGACATTGTGGAGGTGGATCGTACAGGCACGCAGGCATTGGCGAAGGGAG
 TGGACACCGGGTGGCGGTCTCCAGGGGACCGCAAAGTTAAGGTGGTCCATGAGCGTGGCTATGTCAAGCT
 GGAAGGTAGGGTATTGACCTGGGTGTCGGCGGGAGGCTGGTACTACGCTGCTGCGCAAAAGGAAGTG
 AGTGGGGTCAAAGGATTACTCTGGAAGAGACGCCATGAGAACCCATGAATGTGCAAAGTCTGGATGGA
 ACATCATCACCTCAAGGACAAAACGATATCCACCGCCTAGAACCGAGTCACCCCTTGTGTGA
 CATTGGAGAGTCATCGTCATCGTCACAGAGGGGAAGGGACCGTGAGAGTTCTGTGATACTGTAGAAAAA
 TGGCTGGCTTGTGGGTTGACAACCTCTGTCAGGAGGTGTTAGCTCCATACATGCCAGATGTTCTGAGAAC
 TGGATTGCTCAAAGGAGGTTGGCGAACAGTGATCAGGAACCCCTCTCCAGGAATTCCACTCATGAAAT
 GTACTACGTGCTGGAGCCCGCAGCAATGTCACATTACTGTGAAACAAACATCCGCCCTGTGAGGAGA
 ATGAGGGTCCAACGGAAAAGTGAACCTGGAGGTGACGTACCTCCAAATTGGGACACGCAGTGTGAGA
 CAGACAAGGGACCCCTGGACAAAGAGGCCATAGAAGAAAGGGTGAGAGGATAAAATCTGAGTACATGACCTC
 TTGGTTTATGACAATGACAACCCCTACAGGACCTGGCACTACTGTGGCTCTATGTGACAAAAACCTCAGGA
 AGTGCAGGAGCATGGTAAATGGTTATTAAAATTCTGACATATCCATGGACAGGATAGAGGAGGTACAA
 GAATGGCAATGACTGACACAACCCCTTGGACAGCAAAGAGTGTAAAGAAAAGTTGACACCAGAGCAA
 GGATCCACCGAGGGAACTAGGAAGATCATGAAAGTTGTCACAGGTGGCTGTTCCGCCACCTGGCAGAGAA
 AAGAACCCAGACTGTGCACAAAGGAAGAATTATTGCAAAGTCGAAGTCATGCCAGGCATTGGAGCTTAC
 TGGAGAACAAGAACAGTGGAAAGACTGCCATGAGGCTGTCAAGACCCAAAGTTCTGGGAACTGGTGGATGA
 AGAAAGGAAGCTGCACCAACAAGGCAGGTGTCGGACTTGTGTGACAAATGATGGGAAAAGAGAGAAGAAG
 CTGTCAGAGTTGGGAAAGCAAAGGGAGCCGTGCCATATGGTATATGTCAGGAGCTGGGAGCGCGGTATCTGAGT
 TTGAGGCCCTGGGATTCTGAATGAGGACCATGGCTCCAGGGAAAACCTCAGGAGGAGGAGTGGAGGCAT
 TGGCTTACAATACCTAGGATATGTGATCAGAGACCTGGCTGCAATGGATGGTGGTGGATTCTACGCGGATGAC
 ACCGCTGGATGGACACGCGCATCACAGAGGCAGACCTTGATGATGAAACAGGAGATCTGAACTACATGAGCC
 CACATCACAAAAAACTGGCACAAGCAGTGATGGAAATGACATACAAGAACAAAGTGGTAAAGTGTGAGACC
 AGCCCCAGGAGGGAAAGCCTACATGGATGTCATAAGTCGACGGAGACCAAGAGGAGGATCCGGCAGGTAGTGA
 TATGCTCTGAAACACCATCACCAACTGAAAGTCCAATTGATGACAGAATGGCAGAAGCAGAGATGGTGTACATC
 ACCAACATGTTCAAGATTGTGATGAACTAGTTCTGACCAAGGCTGGAGGAGCAGTGTGGTCCGGCCATGATGACAGGTTGGCCTGGCC

FIGURA 13 (CONTINÚA) - SEQ ID NO 5 (CONTINÚA)

CTGTCCCATCTCAACGCCATGTCCAAGGTTAGAAAGGACATATCTGAATGGCAGCCATAAAAGGGTGGAAATG
 ATTGGGAGAATGTGCCCTTGTGCCCCACCACTTCCATGAACTACAGCTGAAGGATGGCAGGAGGATTGTGGT
 GCCTTGGCGAGAACAGGACGAGCTATTGGGAGAGGAAGGGTGTCTCCAGGAAACGGCTGGATGATCAAGGAA
 ACAGCTTGCCCTCAGCAAAGCCTATGCCAACATGTGGTCACTGTGATGTATTTCACAAAAGGGACATGAGGCTAC
 TGTGATGGCTGTTCTCAGCTGTGCCCCACCTCATGGGTTCCACAAGGACGCACAACATGGTCGATTGATGG
 GAAAGGGAGTGGATGACCACGGAAGACATGCTTGAGGTGTTGAAACAGAGTATGGATAACCAACAACCCACAC
 ATGCAGGACAAGACAATGGTAAAAAAATGGAGAGATGTCCCTATCTAACCAAGAGACAAGACAAGCTGTGCG
 GATCACTGATTGGAATGACCAATAGGGCACCTGGGCTCCACATCCATTAGTCATCCATCGTATCCGAAAC
 GCTGATTGGACAGGAGAAATACACTGACTACCTAACAGTCATGGACAGGTATTCTGTGGATGCTGACCTGCAA
 CTGGGTGAGCTTATCTGAAACACCATCTAACAGGAATAACCGGGATACAAACCACGGGTGGAGAACCGGACTC
 CCCACAACCTGAAACCGGGATATAAACACGGCTGGAGAACCGGGCTCGCACTTAAATGAAACAGAAACCG
 GGATAAAAACACTACGGATGGAGAACCGGACTCCACACATTGAGACAGAAGAAGTTGTCAGCCCAGAACCCACA
 CGAGTTTGCCACTGCTAACGCTGTGAGGCAGTGCAGGCTGGACAGCCGACCTCAGGTTGCGAAAAACCTGG
 TTTCTGGGACCTCCACCCACAGAGTAAAAGAACCGGAGCCTCCAGGGAAACAAATAGTGGACCATATTGACGCCAGGGAAAGACCG
 GAGTGGTTCTGCTGCTTCTCCAGAGGTCTGTGAGCACAGTTGCTCAAGAATAAGCAGACCTTGGATGAC
 AAACACAAAACACTGGCCGGCATGGTCCAGGCTCCAGGCTCGCTGGCGCCGGCTGGCAACATTCCGAGGGGACC
 GTCCCCCTCGGTAATGGCAATGGGACGAATTCTGAACCAGTCTAAAACGAGTAAATAGGACCGGCAATTCTT
 CAAGCAATAAACAGGAATACCAATTATAAGATAACTTAGTCAGATCGTACAATAAGCTTGAAGAAAAAA
 TGCGCCTTATTCAATCTTGCTATAAAAATGGCCAAAATCTCACATTGAAAGACATTGATGACCTCATT
 CTTCAATGAAGGGCCTAACGGAGTTGACTAATGTTGTGGAAATTGGAGCGATAAGCGTCTGCTTGTGG
 CCAGGACAACGTATACTCATCAGATAACAGCAATACCTGATCACTACTTCGCACTAGTTCTCGGTACTATGC
 ATATGATCCAATATCAAAGGAATGATAGCATTGAAGGGATGAGACTAATCCAATTGAGGAGTGGCAGCATATA
 GAACAGCTAAAGGGTAGTGTGAAGGAAGCATACTGGATGGGATAATATCACAGGAGGTAC
 TAGACTACCTTCATCCTACATAATAGACGCATATAAGTACGCATTAAAGCATAAACACGCACATGCCGTT
 CTTCTCATGTATATATACAGGCAACACGCAGATATAGGTGCGACGTGAACAGTGAGCTGTATGTGCGCA
 GCTCGCGTTGCATTTCGGAAGCGCTCGTTGAAACGCTTGAAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTATTCTC
 TAGAAAGTATAGGAACCTCAGAGCGTTTGAAAACAAAAGCGCTCTGAAGACGCACTTCAAAAAGTATCTC
 TTTGCTATATATCTGTCTGCTATATCCCTATATAACCTACCCATCCACCTTCGCTCCTTGAACCTGCATCTA
 AACTCGACCTCTACATTTTATGTTATCTCTAGTATTACTCTTTAGACAAAAAAATTGTAAGAAGACTAT
 TCATAGAGTGAATCGAAAACAATACGAAAATGTAACATTCTACAGTACTATAGAGACACAAATAGAAG
 AAACCGTTCATATTTCTGACCAATGAAGAATCATCAACGCTATCACTTCTGTTCACAAAGTATGCGCAAT
 CCACATCGGTATAGAATATACTGGGATGCCTTATCTGAAAAAAATGCACCCGCAGCTCGCTAGTAACTCA
 GTAAACCGGGGAAGTGGAGTCAGGCTTTTTATGGAAGAGAAAATAGACACCAAAGTAGCCTTCTTAACC
 TTAACGGACCTACAGTGCACAAAGTTATCAAGAGACTGCATTAGAGCGCACAAAGGAGAAAAAAAGTAATC
 TAAGATGCTTGTAGAAAATAGCGCTCTGGGATGCATTGTTGAGAACAAAAAGAAGTATAGATTCTT
 GTTGGTAAAATAGCGCTCTCGCGTTGCATTCTGTTGTTGAAAATGCAAGCTCAGATTCTTGTGTTGAAAAT
 TAGCGCTCTCGCGTTGCATTCTGTTGTTGAAAATGCAAGCAGATTCTCGTGGTAAAATAGCGCTCTCG
 CGTTGCATTCTGTTGTTGAAAATGCAAGCTCAGATTCTTGTGTTGAAAATAGCGCTCTCGCGTTGCATT
 TTGTTCTACAAAATGAGCACAGATGCTTCGTTAACAAAGATATGCTATTGAGTGAAGATGGAAACCGAGA
 AAATGAACCGGGGATGCGACGTGCAAGATTACCTATGCAATAGATGCAATAGTTCTCCAGGAACCGAAATAC
 ATACATTGTCTTCCGTAAGCGTAGACTATATATTATACAGGTTCAAATACTATCTGTTCAAGGAA
 AACTCCAGGTTCGGATGTTCAAAATTCAATGATGGGTAACAAAGTACGATCGTAAATCTGAAAAGTGT
 CGGATATTAGGCTGTATCTCTCAAAGCGTATTGAAATATCATTGAGAAGCTGCAGGCAAGTGCACAAACAAAT

FIGURA 13 (CONTINÚA) - SEQ ID NO 5 (CONTINÚA)

ACTTAAATAAATACTACTCAGTAATAACCTATTTCTAGCATTTGACGAAATTGCTATTTGTTAGAGTC
 TTTTACACCATTGTCTCCACACCTCCGCTTACATCAACACCAATAACGCCATTAACTAAGCGCATCACCA
 ACATTTCTGGCGTCAGTCCACCAAGCTAACATAAAATGTAAGCTTCGGGGCTCTTGCCCTCCAACCCAGT
 CAGAAATCGAGTCCAATCCAAAAGTTCACCTGTCCCACCTGCTTCTGAATCAAACAAGGAAATAACGAATG
 AGGTTCTGTGAAGCTGCAGTGAGTAGTATGTTGAGTCTTTGGAAATACGAGTCTTTAATAACTGGCAAA
 CCGAGGAACCTTGGTATTCTGCCACGACTCATCTCCATGCAGTTGGACGATATCAATGCCGTAACTCATTGA
 CCAGAGCCAAAACATCCTCCTAGGTTATTACGAAACACGCCAACCAAGTATTCGGAGTGCCTGAACATT
 TTTATATGCTTTACAAGACTTGAATTTCTTGCATAACCGGGTCAATTGTTCTCTTCTATTGGGCACA
 CATATAATACCCAGCAAGTCAGCATCGAATCTAGAGCACATTCTGCCCTCTGTGCTCTGCAAGCCGCAAA
 CTTTCACCAATGGACCAAGACTACCTGTGAAATTAAATAACAGACATACTCCAAGCTGCCCTTGTGCTTAAT
 CACGTATACTCACGTGCTCAATAGTCACCAATGCCCTCCCTTGGCCCTCCCTTTCTTTGACACC
 TAGCGTCGACAGCACACACTGCATCGGATGCAGCCCGTTAACGTGCCGGCACGGCTGGTAACCAGGTA
 TTTTGTCCACATAACCGTGCACAAATGTTGAGATAAGCAGGACACAGCAGCAATCCACAGCAGGATACAA
 CCGCACACCGAGGTTACTCCGTTCTACAGGTTACGACGACATGTCATAACTTGCCTTGACAGGCATTGATGG
 AATCGTAGTCTCACGCTGATAGTCTGATCGACAATAACAGTGGGACCGTGGTCCCAGACGATAATCAGACCG
 ACAACACGAGTGGGATCGTGGTCCCAGACTAATAATCAGACCGACGATACGAGTGGGACCGTGGTCCCAGACT
 AATAATCAGACCGACGATACGAGTGGGACCGTGGTCCCAGACTAATAATCAGACCGACGATACGAGTGGGAC
 GTGGTCCCAGACTAATAATCAGACCGACGATACGAGTGGGACCATGGTCCCAGACTAATAATCAGACCGACG
 TACGAGTGGGACCGTGGTCCCAGTCTGATTATCAGACCGACGATACGAGTGGGACCGTGGTCCCAGACTAATA
 ATCAGACCGACGATACGAGTGGGACCGTGGTCCCAGACTAATAATCAGACCGACGATACGAGTGGGACCGTGG
 TCCCAGTCTGATTATCAGACCGACGATACAAGTGAACAGTGGGCCCAGAGAGAAATTCAAGGCCAGTTATGC
 TTTCTGCCCTGTAACAAAGGACATTAAGTAAAGACAGATAAACGATAGACTAAACGTTGGTGCATCAGGGTGC
 TGGCTTTCAAGTTCTTAAGAATGGCTCAATTCTCTATACACTCAGTTGAAACACGGGACCTGTCAGG
 TTAAGCACCATTATGCCCTTACAAACTGTGCTCCAGGAGCAAACGTGATGTCGTGAGCTTAAACTAG
 TTCTTGATGCAGATGACTTAAGCACAGAAGTAAAAGAGTATAACTCTTCAGCTTCAAATATCACCCCC
 AGCTTTTCTGCTCATGAAGGTTAGATGCCGCTGCTTAAGTAATTCTCTTATCTGTAAGGTTGGT
 AGTGCATCACCTGACGGGACAGATAGTCACCGGGGTGAGAAAAAGAGCAACAACGATGATTAGGCAATTGG
 CGGTGTTGATACAGCGGGTAATAATCTACGTGAAATATTCCGCATCAGCCAGCGCAGAAATATTCCAGC
 AAATTCAATTCTGCAATCGGCTTGCATAACGCTGACCCAGTTCAAGCAGTGTGGCGATAATCGTTACCC
 AATCTGGATAATGCAGCCATCTGCTCATCCAGCTGCCAACAGAACACGATAATCACTTCTGGTAAGTG
 CAGCAGCTTACGACGGCAGCTCCATCGGAAATTCTATGACACCAAGATACTCTCGACCGAACGCCGGTGT
 CTGTTGACCAAGTCAGTAGAAAAGAAGGGATGAGATCATCCAGTGCCTCTCAGTAAGCAGCTCCTGGTCACGT
 TCATTACCTGACCATACCGAGAGGTCTCTCAACACTATCACCCGGAGCACTCAAGAGTAAACTCACAT
 CCCGACACATACAGGAAAGTAATGGCATTACCGCAGCCATTACTCCTACGCGCGCAATTACGAATCCAC
 CATGGGGCAGCTGGTGCATAACGAAGTATCTCAACCGTTGAGTATTGAGCGTATGTTGGAAATAACA
 GGCACGCTTCATTATCTAACCTCCAGCGTGGTTAATCAGACGATCGAAATTCATTGCAAGACAGGTT
 CCAAATAGAAAGAGCATTCTCCAGGCACAGTTGAAGAGCGTTGATCAATGGCTGTTCAAAACAGTTCTC
 ATCCGGATCTGACCTTACCAACTCATCCGTTACGTACAACATTGAGAACCATGCTCCCCAGGCAT
 CCCGAATTGCTCCTCCATCCACGGGACTGAGAGCCATTACTATTGCTGTATTGGTAAGCAAAATACGTAC
 ATCAGGCTCGAACCTTAAGATCAACGTTCTGAGCAGATCACGAAGCATATCGAAAAACTGCAGTGGGAG
 GTGTAGCAAACAACGAGCAGCGTGGGACAAATCAGCACATCAGCAGCACATACGACATTAATCGTGCCGA
 TACCCAGGTTAGCGCGCTGCAATAACTATGACATCATAGTCAGGAGCAACAGTTCAATGCCAGTGGAG
 CATCAGGTGTGGATCGGTGGCAGTTACCTTACATCAAATTGCCATTAACTCAGTTCAATACGGTGCAGA
 GCCAGACAGGAAGGAATAATGTCAGGCCCCGGCCAGCAAGTGGCTTATTGCAAGTGAAGATCTGGTACCC
 CCCAAGATAGAAAGGCAGGAGAGTGTCTCTGCATGAATATGAAGATCTGGTACCCATCCGTGATACATTGA
 GGCTGTTCCCTGGGGTGTACCTTCCACGAGCAAACAGTAGGCCCTCAGAGGCCAGATCCTGAGCAAGA

FIGURA 13 (CONTINÚA) - SEQ ID NO 5 (CONTINÚA)

TGAACAGAAAATGAGGTTTGTAAACGCCACTTATGGGCAGCAACCCGATCACCGGTGAAATACGTCTT
 CAGCACGTCGAATCGCGTACCAAACACATCACGCATATGATTAATTGTTCAATTGTATAACCAACACGTTG
 CTCAACCGTCTCGAATTCATATCCGGTAGCCTGCTTCACCTATTCTCAGCGCCGGTTATTTCTCGCTCCGGCTGT
 CATCATTAACACTGTGCAATGGCAGACCGCTCGTACATGACCAGCGTTATGCACTGGTTAAGTGTTC
 CATGAGTTCATTCTGAACATCCTTAATCATTGCTTGCGTTTTTATTAAATCTGCAATTACTGCAA
 GCAACAACAAAATCGAAAGTCATCAAAAAACCGAAAGTTAAATAAGAGCAACACTACAAAAGGAGA
 TAAGAAGAGCACATACCTCAGTCACTTATTACTAGCGCTGCCGAGCCGTGAACCGAGCATAGCGAGC
 GAACTGGCAGGAAGCAAAGAAAGAAACTGTTCTGTCAGATAGCTTACGCTCAGCGAAGAAGAAATATCCAC
 CGTGGGAAAAACTCCAGGTAGAGGTACACACGCGATAGCCAATTCAAGAGTAATAAAACTGTGATAATCAACCC
 TCATCAATGATGACGAACTAACCCCCGATATCAGGTCACATGACGAAGGGAAAGAGAAGGAAATCAACTGTGA
 CAAACTGCCCTCAAATTGGCTCCTTAAAAATTACAGTTCAAAAGTATGAGAAAATCCATGCAGGCTGAAG
 GAAACAGCAAACACTGTGACAAATTACCCCTAGTAGGTCAAGAACAAATGTGACGAACCACCCCAAATCTGTGA
 CAGATAACCCCTCAGACTATCCTGTCGTATGGAAGTGTATCGCGGAAGGAAATACGATATGAGTCGTCCTGG
 CGGCCTTCTTTCTCAATGTATGAGAGGCGCATGGAGTTCTGCTGTGATCTCATTAACACAGACCTGCA
 GGAAGCGGCGCGGAAGTCAGGCATACCGCTGAACTTGAGGCACTGGCTGAAACGCTATGATCCAGTCGAT
 TTTCAGAGAGACGATGCCTGAGCCATCCGGCTACGATACTGACACAGGGATTGCTATAAACCGCATGGCATA
 GGATTGGTATTCTTGTTCACTAAGCGAAACTGCGTAAACCGTTCTGTAACCGATAAAAGAAGGGAA
 TGAGATATGGGTGATATGTACACTGTAAAGCCCTCTGGACTGTGCGCACGTTGATAAAACCAAGGAAA
 AGATTCACTAGCCTTTTCTCGCCGGCATCCTCTTCAAGGGCAAAAAAAACACTTCCTCCCGCAGAAACTC
 TTCAATGCCTGCCGTATATCCTACTGGCTCCGAGAGGTCAATCGAATATTCAAGCATATTAGCAACAT
 GGATCTCGCAGATACCGTATGTTCTGTAGGGTGCATCAGATTCTGATCTGTCACAGAACAGATAACAG
 CATACTTTTGATCCCAGGAGAGACTATATGCCCTCAGTGAGGCTTGTACTGGACGATTGCGGGCTA
 TTTTACGTTCTGTGATTGATAACCGCTGTTCCGCATGACAGATCCATGTGAAGTGTGACAAGTTTTA
 GATTGTACACTAAATAAAAGAGTCATAAGCAGGGATAACTTGTAAAAACAGCTTCTGAGGGCA
 ATTTGTACAGGGTAAGGCAATTGTCACAGACAGGACTGTCAATTGAGGGTATTGTCACACTGAAAG
 GCAATTGTCACAACACCTCTAGAACAGCATGGATAAAGGCTACAAGCGCTCTAAAGAGATCT
 AAAACTATAAAAAAAATAATTATAAAATCCCCGTGGATAAGTGGATAACCCCAAGGGAGTTTCAG
 GCATCGTGTGTAAGCAGAATATATAAGTGTGTTCCCTGGCTTCTCGCTACTCGACCGGGAGGGTTCGA
 GAAGGGGGGGCACCCCCCTCGCGTGCAGCGTACAGCGCACAGGGCGCAGCCCTGGTAAAAACAAGGTTTA
 TAAATATTGGTTAAAGCAGGTTAAAGACAGGTTAGCGTGGCCGAAAACGGCGGAAACCTTGCAAAAT
 GCTGGATTTCTGCCGTGGACAGCCCTCAAATGTCATACTGTGCGCCCTCATCTGTCAGCACTCTGCC
 TCAAGTGTCAAGGATCGCCCTCATCTGTCAGTAGTCGCCCCCTCAAGTGTCAATACCGCAGGGCCTTA
 TCCCCAGGCTGTCCACATCATCTGTGGAAACTCGCTAAATCAGGCTTTCGCCGATTGCGAGGCTGG
 CCAGCTCCACGTCGCCGGCAAATCGAGCCTGCCCTCATCTGTCACAGCGCAGCCGGTGAAGTCGCC
 CAAGTGTCAACGTCGCCCTCATCTGTCAGTGAGGGCAAGTTTCCCGAGGTATCCACAACGCCGGCG
 CGGCCGGGTGTCTGCACACGGCTTCGACGGCGTTCTGGCGCGTTGCAGGGCCATAGACGGCGCCAGCC
 CAGCGGGAGGGCAACCAGCGAGGGCTGCCCTGCGCTGACTGCCGGAGCACTACTGGCTGAAAAGG
 ACAGACACACATCATGGTTCTGTGTTCAATTAGGTTGTTCTGTCATTGCTGACATAATCGCTCCACTTCAACG
 TAACACCGACGAAGATTCTATTGTTCTGAAGGCATATTCAAATGTTCTGTTACCGCTTGCAGGCATCA
 TGACAGAACACTACTTCTATAAACGCTACACAGGCTCTGAGGTTAAATAATGCGGATCTCTACGATAATGGG
 AGATTTCCGACTGTTCTGCTTCAGTGGATAACAGCCAGCTCTGTTAACAGACAAAAACAGC
 ATATCCACTCAGTCCACATTCCATATAAAAGGCCAAGGCATTATTCTCAGGATAATTGTTCAGCATCGCA
 ACCGCATCAGACTCCGGCATCGCAAACACTGCACCCGGTCCGGCAGCCACATCCAGCGAAAAACCTCGTGT
 AGACTTCCGTTGAACGTGACTTATGCCCCATCAGGCTTGCAGAACCTTCAGCGGTACCCGCATACAG
 CATGTGCATCGCATAGGAATGGCGAACGTATGTTGTGACCGGAACAGAGAACGTACACCGTCAGCAGCA

FIGURA 13 (CONTINÚA) - SEQ ID NO 5 (CONTINÚA)

GCGGCGGCAACCGCCTCCCCAATCCAGGTCTGACCGTTCTGTCCGTCACTTCCCAGATCCGCGCTTCCTCTG
TCCTTCCTGTGCGACGGTTACGCCGCTCCATGAGCTTATCGGAATAAAATACCTGTGACGGAAGATCACTTCG
CAGAATAAAATAATCCTGGTCTGGCTTGATACCGGAAGCCCTGGGCCACTTTGGCAAATGAGACGTT
TGATCGGCACGTAAGAGGTTCAACTTCAACCATAATGAAATAAGATCACTACCGGGCTATTGGAGTTA
TCGAGATTTCAAGGAGCTAAGGAAGCTAAATGGAGAAAAAAATCACTGGATATACCACCGTTGATATATCCC
AATGGCATCGTAAAGAACATTGAGGCATTCACTGAGCTCAATGTACCTATAACCAGACCGTCAGCT
GGATATTACGGCCTTTAAAGACCGTAAAGAAAAATAAGCACAAGTTATCCGGCCTTATTACATTCTT
GCCCGCCTGATGAATGCTCATCCGAATTCTGTATGGCAATGAAAGACGGTGAGCTGGTGTATGGGATAGTG
TTCACCCCTGTTACACGTTTCCATGAGCAAATGAAACGTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGA
TTTCCGGCAGTTCTACACATATATTGCAAGATGTTGCGTGTACGGTGAACCTGGCCTATTCCCTAAA
GGGTTATTGAGAATATGTTTCTGTCTAGCCAATCCCTGGGTGAGTTCAACCAGTTGATTAAACGTGG
CCAATATGGACAACCTCTCGCCCCCGTTTACCATGGCAAATATTACGCAAGGCACAAGGTGCTGAT
GCCGCTGGCGATTCAAGGTCATCATGCCGTTGTGATGGCTTCCATGTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAA
CAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGCGTAATTGTTAAGGCAGTTATTGGTGCCTTAAACGCTGGTT
GCTACGCCGAATAAGTGATAATAAGCGGATGAATGGCAGAAATTGATGATAAGCTGTCAAACATGAGAATT
GGTCGACCCCTGTGGAATGTGTCAGTTAGGGTGTGAAAGTCCCAGGCTCCAGCAGGCAGAAGTATGCA
AAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGAAAGTCCCAGGCTCCAGCAGGCAGAAGTATGCAA
AGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGAAAGTCCCAGGCTCCAGCAGGCAGAAGTATGCAA
GTTCCGCCATTCTCGCCCCATGGCTGACTAATTGTTTATTGAGGCCAGGGCGCCTC

SEQ ID NO 5 (CONTINÚA)

SECUENCIA ID NO:6

CONSTRUCTO SINTÉTICO: PSHUTTLE/CHIMERIVAX-WN (21094 PB)

AGTAAATCCTGTGCTAATTGAGGTGCATTGGCTGCAAATCGAGTTGCTAGGCAATAAACACATTGGATT
AATTTAATCGTTGTTGAGCGATTAGCAGAGAACTGACCAGAACATGTCGGTCAAAGCTCAGGGAAAAAA
CCCTGGCGTCAATATGGTACGACGAGGAGTCGCTCCTGTCAAACAAAATAACAAAACAAAACAAAT
TGGAAACAGACCTGGACCTCAAGAGGTGTTCAAGGATTATCTTTCTTTGTTCAAACATTGACTGGA
AAAAAGATCACAGCCCACCTAAAGAGGTGTGAAATGCTGGACCCAAGACAAGGCTGGCTGTTCTAAGGA
AAAGTCAAGAGAGTGGTGGCCAGTTGATGAGAGGATTGTCCTCGAGGAAACGCCGTTCCATGATGTTCTGAC
TGTGCAATTCTAATTGGAAATGCTGTTGATGACGGGTGGAGTTACCCCTCTAACTTCAAGGGAAAGGTG
ATGATGACGGTAAATGCTACTGACGTCACAGATGTCATCACGATTCCAACAGCTGCTGGAAAGAACCTATGCA
TTGTCAGAGCAATGGATGTTGAGGATACATGTGCGATGATACTATCACTTATGAAATGCCAGTGCTGTCGGCTGG
TAATGATCCAGAACATCGACTGTTGGCACAAGTCAGCAGTCTACGTCAGGTATGAAAGATGCAACAG
ACACGCCACTCAAGACGCAGTCGGAGGTCACTGACAGTGCAGACACACGGAGAAAGCACTTAGCGAACAAAG
AGGGGGCTGGATGGACAGCACCAAGGCCACAAGGTATTGGTAAAAACAGAACATGGATCTGGAGGAACCC
TGGATATGCCCTGGTGGCAGCCGTATTGGTGGATGCTGGAGCAACACCATGCAAGAGAGTTGTGTTGTC
GTGCTATTGCTTGGTGGCCCCAGCTTACAGCTCAACTGCTTGGAAATGAGCAACAGAGACTTCTGGAAAG
GAGTGTCTGGAGCAACATGGGTGGATTGGTCTCGAAGGCAGCTGCGTACTATCATGCTAAGGACAA
GCCTACCATGATGTGAAGATGATGAATATGGAGGCCAACCTGGCAGAGGTCCCGAGTTATTGCTATTG
GCTACCGTCAGCGATCTCCACCAAAGCTGCGTGGCGACCATGGAGAAAGCTCACAAATGACAAACGTGCTG
ACCCAGCTTGTGTCAGACAAGGAGTGGTGACAGGGCTGGGCAACGGCTGCGGATTCTGGAAAAGG
ATCCATTGACACATGCGCAAATTGCTGCTCTACCAAGGCAATAGGAAGAACATCTTGAAAGAGAATATC
AAAGTACGAAGTGGCATTGGTCCATGGACCAACTACTGTGGAGTCGCACGGAAACTACTCCACACAGGTG
GAGCCACTCAGGCAGGGAGATTCAAGCATCACTCCTGCGGCCCTCATACACACTAAAGCTGGAGAATATGG

FIGURA 13 (CONTINÚA) - SEQ ID NO 6

AGAGGTGACAGTGGACTGTGAACCACGGTCAGGGATTGACACCAATGCATACTACGTGATGACTGTTGGAACA
 AAGACGTTCTGGTCCATCGAGTGGTCATGGACCTCAACCTCCCTGGAGCAGTGCTGGAAGTACTGTGT
 GGAGGAACAGAGAGACGTTAATGGAGTTGAGGAACCACGCCACGAAGCAGTCTGTGATAGCATGGGCTC
 ACAAGAGGGAGCTGCATCAAGCTTGGCTGGAGCCATTCCGTGGAATTTCAGCAACACTGTCAAGTTG
 ACGTCGGGTCAATTGAAAGTAGAGTGAAGATGGAAAAATTGAGTGAAGGAAACAACCTATGGCGTCTGTT
 CAAAGGCTTCAGTTCTGGACTCCCCTGACACAGGTACGGCAGTGTGGTGGAAATTGAGTACAC
 TGGCACGGATGGACCTTGCAAAGTCCATCTCGTCAGTGGCTTATTGAAACGACCTAACGCCAGTGGCAGA
 TTGGTCACTGTCAACCCTTGTTCAAGTGGCCACGGCAACGCTAAGGCTGTGATTGAATTGAAACCACCT
 TTGGAGACTCATACATAGTGGTGGGAGAGGAGAACACAGATCAATCACCATTGGCACAAGTCTGGAAGCAG
 CATTGGCAAAGCCTTACAACCAACCCCTAAAGGAGCGCAGAGACTAGCCGCTCTAGGAGACACAGCTGGGAC
 TTTGGATCAGTTGGAGGGTGTTCACCTCAGTTGGCGCCTGTCCATCAAGTGTTCGGAGGAGCATTCCGCT
 CACTGTCGGAGGCATGTCCTGGATAACGCAAGGATTGCTGGGGCTCTCCTGTTGTGGATGGCATCAATGC
 TCGTGTAGGTCCATAGCTCAGTTCTCGCAGTTGGAGGAGTTCTGCTCTCCCTCCGTGAACGTTGGC
 GCCGATCAAGGATGCCATCAACTTGGCAAGAGAGAGCTCAAGTGGGAGATGGTATCTCATATTAGAG
 ACTCTGATGACTGGCTGAACAAGTACTCATACTATCCAGAAGATCCTGTGAAGCTGTCATCAATAGTGAAGC
 CTCTTTGAAGAAGGGAAAGTGTGGCTAAATTCAAGTTGACTCCCTTGAGCATGAGATGTGGAGAACAGGGCA
 GATGAGATCAATGCCATTGGAGGAAACGAGGTTGGACATTCTGTTGTGTCAGGATCCAAGAATGTT
 ACCAGAGAGGAACATCCATTGGAGGAACTCAGTGGGATGGCTGCAAGTGGTGGAAAGACTGGGTAAGAA
 CCTTGTGTTCTCCCAGGGAGGAAGAATGGAAGCTTCATCATAGATGAAAGTCCAGGAAAGAATGCCGTT
 TCAAACGGGTCTGGAATTCTTCCAGATAGGAGTTGGGACGGGAGTGTTCACCACACGGCTGTACATGG
 ACGCAGTCTTGAATACACCATACTGGGATGGCTGCAAGTGGTGGGAGTGGTGGAAAGACTGGGTAAGAA
 CCATGGCTCTCCAAACATTGGATGGGAAAGTCATGAAGTAAATGGGACATGGATGATCCACACCTTGGAGGCA
 TTAGATTACAAGGAGTGTGAGTGGCCACTGACACATACGATTGAAACATCAGTTGAAGAGAGTGAATGTTCA
 TGCCGAGATCAATCGGAGGCCAGTTAGCTCTCACATCATATCCCTGGATACAAGGTTCAAGCAGAACGGACC
 TTGGATGCAAGTACCAACTAGAAGTGAAGAGAGAACAGCTGCCAGGGACTAGCGTGTGATTGATGGCAACTGT
 GATGGACGGGAAATCAACCAAGATCCACCACGGATAGCGGGAAAGTTATTCTGAAATGGTGTGCGCTCCT
 GCACAAATGCCGCTGTGAGCTTCATGGTAGTGTGGTGTGGTATCCATGAAATTAGGCCAAGGAAAC
 GCATGAAAGCCATCTGGTGGCTCTGGTTACAGCTGGAGAAATACATGCTGTCCTTTGGTTGGAGC
 ATGATGATAGCAATGGAAGTGGCTTAAGGAAAGACAGGGACCAAAGCAAATGTTGGTGGAGGAGTAGTGC
 TCTTGGGAGCAATGTTGGCTGGCAAGTAACCTCCTGATTGCTGAAACTCACAGTGGCTGTGGGATTGCA
 TTTCCATGAGATGAAACATGGAGGAGACGCCATGTATATGGCGTTGATTGCTGCTGCCCTTCAATCAGACCAGGG
 CTGCTCATGGCTTGGCTCAGGACCCATGGAGCCCTGGGAACGCCCTGTGCTGACCTAGGAGCAGCCA
 TGGTGGAGATTGCTTGGGTGGCGTGTGGAGTATCTAAATGCAAGTTCTCTGCTGACCCAT
 GACAATAATGCTGTTCTAGGAAAGCATCAAATACCATCTGGCCCTCATGGCTCTGTTGACACCGGTC
 ACCATGGCTGAGGTGAGACTGCCGCAATGTTCTTGTGCCATGGTATCATAGGGCTTCACCAGAATT
 TCAAGGACACCTCCATGCAAGAAGACTATACCTCTGGTGGCCCTCACACTCACATCTTACCTGGCTGACACA
 ACCTTTTTGGGCTGTGCAATTGGCAACCCGCAATTGGCGAAGGGAGTATCCCAGTGAATGAGGCA
 CTCGAGCAGCTGGTAGTGGAGTGTGGCAGGACTGGCTTTCAGGAGATGGAGAACCTCCTGGTCCGA
 TTGCGAGTTGGAGGACTCCTGATGATGCTGGTAGCGTGGCTGGAGGGATGGCTAGAGCTCAAGAAGCT
 TGGTGAAGTTCTGGGAAGAGGAGGGAGATCAGCGGGAGTTCCGCCGCTATGATGTTGCACTCAGTGA
 CAAGGGAGTTCAAGCTGTTCTGAAGAGAAAGTCCATGGGACCAAGGGTGTGATGACCTCGCTGGCCTTGG
 TTGGGGCTGCCCTCATCCATTGCTCTGCTGGCCTTGCTGGTGGCTGTTCATGTCAGGGAGGCTAG
 GAGAAGTGGGAGTGTCTGGGATATTCCACTCTGAGGAAATGTGAACATCTGGAGGATGG
 ATTATGGCATATTCCAGTCACCTCTGGGGGCCCTCCAGCGAGGAGTGGAGTGGCACAGGGAGGGTGT
 TCCACACAATGTGCATGTCACAAGAGGAGCTTCCCTGTCAGGAATGGCAAGAAGTTGATTCCATCTGGGC
 TTCAGTAAAGGAAGACCTTGTGCGCTATGGTGGCTATGGAAGTGGAGGAGATGGGATGGAGGAGAAGAG

FIGURA 13 (CONTINÚA) - SEQ ID NO 6 (CONTINÚA)

GTCCAGTTGATCGCGGCTGTTCCAGGAAAGAACGTGGTCAACGTCCAGACAAAACCGAGCTTGTCAAAGTGA
 GGAATGGGGGAGAAATCGGGCTGTCGCTCTGACTATCCGAGTGGCAGTCAGGATCTCCTATTGTTAACAG
 GAACGGAGGGTGAAGGAAAGGAAAGGAGGAGCTCAAGAGATCCCACAATGCTAAAGAAAGGAATGACAA
 CAGACTGAGGTGAAGGAAGGAAAGGAGGAGCTCAAGAGATCCCACAATGCTAAAGAAAGGAATGACAA
 CTGTCCTGATTTCATCCTGGAGCTGGGAAGACAAGACGTTCCACAGATCTGGCCAGTGCAGCAG
 GAGACGCTTGCAGCAGCTTGTTGGCCCCCACCAGGGTTGTTCTTGAAATGAAGGAGGCTTTCACGGC
 CTGGACGTGAAATTCCACACACAGGCTTTCCGCTCACGGAGCAGGGAGAGAAGTCATTGATGCCATGTGCC
 ATGCCACCTAAGTACAGGATGTTGAAACCAACTAGGGTTTAAGTGGAAAGTGTGATCATTATGGATGAAAGC
 CCATTTGGATCCAGCTAGCATAGCCCTAGAGGTTGGCAGCGCACAGAGCTAGGGCAAATGAAAGTGCA
 ACAATCTGATGACAGCCACACCGCCTGGACTAGTGTGAAATTCCACATTCAAATGGTAAATAGAAGATG
 TTCAAACGGACATACCCAGTGAACACAGGGCATGACTGGATCCTAGCTGACAAAAGGCCACGGC
 ATGGTTCTCCATCCATCAGAGCTGCAAATGTCATGGCTGCCCTTGTGTAAGGCTGGAAAGAGTGTGGTG
 GTCTGAACAGGAAACCTTGAGAGAGAATACCCACGATAAAGCAGAAAGAACCTGACTTTATATTGGCA
 CTGACATAGCTGAAATGGGAGCCAACCTTGCGTGGAGCGAGTGTGATTGCAGGACGGCTTTAAGCCTGT
 GCTTGTGGATGAAGGGAGGAAGGTGGCAATAAGGGCCACTTCGTATCTCCGATCCTCTGCTGCTCAAAGG
 AGGGGGCCATTGGGAGAAATCCAAACAGAGATGGAGACTCATACTACTATTCTGAGCCTACAAGTGAAAATA
 ATGCCACACCGCTGCTGGTTGGAGGCTCAATGCTCTGGACAACATGGAGGTGAGGGGTGGAATGGTCGC
 CCCACTCTATGGCGTTGAAGGAACATAAAACACCAGTTCCCTGGTAAATGAGACTGAGGGATGACAGAGG
 AAAGTCTCAGAGAACTAGTGAAGGAAATTGTGACCTGCCGTTGGCTTGTGCAAGTGGCAAGGCTGGTT
 TGAAAGACAATGATCGTAAGTGGTGTGGAGGGCCCTGAGGAACATGAGATCTTGAATGACAGCGGTGAAAC
 AGTGAAGTGCAGGGCTCCTGGAGGAGCAAAGAACGCTCTGCCAACGGTGGTGTGAAAGGGTGTGATCT
 GACCAGAGTGCCTGCTGAAATTATTAAAGTTGCTGAAGGTAGGAGGGAGCTGCTGAAGTGTAGTTGTG
 TGAGTGAACTCCCTGATTCTGGCTAAAAAGGTGGAGGGCAATGGATACCATCAGTGTGTTCCACTC
 TGAGGAAGGCTCTAGGGCTACCGCAATGCACTATCAATGATGCCCTGAGGCAATGACAATAGTCATG
 ATACTGGCTGGACTACTGACATCGGAATGGTCATCTTTCATGTCCTCCAAAGGCATCAGTAGAATGTCTA
 TGGCGATGGGACAATGCCGGCTGGATATCTCATGTTCTGGAGGCCTCAAACCCACTCACATCTCTA
 TGTGATGCTCATATTCTTGCTGATGGTGGTTGTGATCCCCGAGCCAGGGCAACAAAGGTCATCCAAGAC
 AACCAAGTGCATACCTCATTATTGCCATCCTGACGCTGGTTAGCGGTGGCAGCAACGAGCTAGGCATGC
 TGGAGAAAACCAAAGAGGACCTCTTGGGAGAAAGAACCTTAATTCCATCTAGTGTGCTCACCCCTGGAGTGGC
 GGATCTTGACCTGAAGCCAGGAGCTGCCCTGGACAGTGTACGTTGGCATTGTTACAATGCTCTGGCAATGTT
 CACCACTGGATCAAAGTCGAATATGGCAACCTGTCCTGTCGGAAATAGCCAGTCAGCCTCAGTCCTTCTT
 TCATGGACAAGGGGATACCATTGATGAAAGATGAATATCTCGTCATAATGCTGCTGGTCAAGTGGCTGGAAATTC
 AATAACAGTGTGATGCCCTGCTGTGGCATAGGGTGCCTGCTCCACTGGTCTCTCATTTACCTGGAAATC
 AAAGCGCAGCAGTCAGGACTAGCACAGAGAAGGGTGTCCATGGCGTTGCCAGAACCCCTGGTTGATGGGA
 ATCCAACAGTTGACATTGAGGAAGCTCTGAAATGCCCTTATGAGAAGAAACTGGCTCTATATCTCCT
 TCTTGCTCTCAGCCTAGCTGTTGCCATGTCAGAACGCCCTTTCATTGGCTGAAGGCATTGCTTAGCA
 TCAGCTGCCCTAGGGCGCTCATAGAGGGAAACACCAGCCTCTTGGAAATGGACCCATGGCTGCTCCATGA
 CAGGAGTCATGAGGGGAATCACTATGCTTGTGGAGTCATGTCAGAACCTATGGAAGATGAAAAGTGGAC
 CGGGGGAGCGGAATGGAAAAACTTGGGTGAAGTCTGGAAAGAGGGAACTGAATCTGGGACAAGCGACAG
 TTTGAGTTGTATAAAAGGACCGACATTGTGGAGGTGGATGTCATGGCACGCGAGGCAATTGGCCGAAGGG
 AGGTGGACACCGGGGTCGGCTCCAGGGGACCGCAAAGTAAAGTGGTCCATGAGCGTGGCTATGTC
 GCTGGAAAGGTAGGGTATTGACCTGGGTGTGGCCGGAGGCTGGTGTACTACGCTGCTGCGCAAAGGAA
 GTGAGTGGGTCAAAGGATTACTCTTGGAAAGAGACGGCATGAGAACCCATGAATGTGCAAAGTCTGGAT
 GGAACATCATCACCTCAAGGACAAAATGATATCCACCGCTAGAACCAAGTGAATGTGACACCCCTTGTG
 TGACATTGGAGAGTCATCATCGTCATCGGTACAGAGGGGAAAGGACCGTGAGAGTTCTGATACTGTAGAA
 AAATGGCTGGTTGGGGTTGACAACCTCTGTCAGGTTAGCTCCATACATGCCAGATGTTCTGAGA

FIGURA 13 (CONTINÚA) - SEQ ID NO 6 (CONTINÚA)

AACTGGAAATTGCTCAAAGGAGGTTGGCGGAACAGTGATCAGGAACCCTCTCCAGGAATTCCACTCATGA
 AATGTACTACGTGTCGGAGCCCGCAGCAATGTACATTTACTGTGAACCAAACATCCCCTGCCTGATGAGG
 AGAATGAGGCCTCAACTGGAAAAGTGAACCTGGAGGCTGACGTATCCCTCCAAATTGGACACGCAGTGTG
 AGACAGACAAGGGACCCCTGGACAAAGAGGCCATAGAAGAAAGGGTTGAGAGGATAAAATCTGAGTACATGAC
 CTCTGGTTTATGACAATGACAACCCCTACAGGACCTGGCACTACTGTGGCTCTATGTCAACAAAACCTCA
 GGAAGTGCAGCGAGCAGGGTAAATGGTGTATTAAAATTCTGACATATCCATGGGACAGGATAGAGGAGGTCA
 CAAGAATGGCAATGACTGACACAACCCCTTGGACAGCAAAGAGTGTAAAGAAAAGTTGACACCCAGAGC
 AAAGGATCCACCAGCGGGAACTAGGAAGATCATGAAAGTGTCAACAGGGCTGGTCCGCCACCTGGCCAGA
 GAAAAGAACCCAGACTGTGACAAAGGAAGAATTATTGCAAAAGTCCGAAGTCATGCAGCCATTGGAGCTT
 ACCTGGAAGAACAAAGAACAGTGGAAAGACTGCCAATGAGGCTGTCCAAGACCCAAAGTCTGGAAACTGGTGG
 TGAAGAAAGGAAGCTGCACCAACAAGGCAGGTGTCGGACTTGTGTACAACATGATGGGAAAAGAGAGAAG
 AAGCTGTCAAGAGTTGGAAAGCAAAGGAAAGCCGTGCCATATGGTATATGTGGCTGGAGCGCGGTATCTG
 AGTTTGAGGCCCTGGGATTCTGAATGAGGACCATGGCTCCAGGGAAAACTCAGGAGGAGGTGGAAAG
 CATTGGCTTACAATACCTAGGATATGTGATCAGAGACCTGGCTGCAATGGATGGTGGTGGATTCTACGGGAT
 GACACCGCTGGATGGACACCGGCATCACAGAGGAGACCTGATGATGAAACAGGAGATCTGAACATGAA
 GCCCACATCACAAAAACTGGCACAAGCAGTGTGGAAATGACATACAAGAACAAAGTGGTGGAAAGTGTGAG
 ACCAGCCCCAGGAGGGAAAGCCTACATGGATGTCAAACTGGGAGACCCAGAGAGGATCCGGGCAGGTAGT
 ACTTATGCTCTGAACACCATCACCAACTGAAAGTCCAATTGATCAGAATGGCAGAACAGGAGATGGTGTAC
 ATCACCAACATGTTCAAGATTGTGATGAAATCAGTCTGACCAAGGCTGGAGGCATGGCTCACTGAGCACGGAT
 TGACAGACTGAAGAGGATGGCGGTGAGTGGAGACGACTGTGTGGTCCGGCCATCGATGACAGGTTGGCCTG
 GCCCTGTCCCCTCAACGCCATGTCAAGGTTAGAAAGGACATATCTGAATGGCAGGCATCAAAAGGGTGG
 ATGATTGGGAGAATGTGCCCTCTGTTCCCACCACTCCATGAACATACAGCTGAAGGATGGCAGGAGGATTGT
 GGTGCCTTGCGAGAACAGGACGACTTGTGGAGAGGAGGATCTCCAGGAAACGGCTGGATGATCAAG
 GAAACAGCTTGCGCTCAGCAAAGCTATGCCAACATGTGGTCACTGATGTATTTCACAAAAGGGACATGAGG
 TACTGTCATTGGCTGTTCCCTCAGCTGTTCCACCTCATGGGTTCCACAAGGACGACAACATGGTCATTCA
 TGGGAAAGGGAGTGGATGACCACGGAAAGACATGCTGAGGTGAGGACAGACTATGGATAACCAACAACCC
 CACATGCAGGACAAGACAATGGTAAAAAAATGGAGAGATGTCCCTTATCTAACCAAGAGAACAGCTGT
 CGGGATCACTGATTGGAAATGACCAATAGGGCACCTGGGCTCCCACATCCATTAGTCATCCATCGTATCCG
 AACGCTGATTGGACAGGAGAAATACACTGACTACCTAACAGTCATGGACAGGTATTCTGTGGATGTCAGCTG
 CAACTGGGTGAGCTTATCTGAAACACCATCTAACAGGAATAACCGGGATACAAACCACGGGTGGAGAACCG
 CTCCCCAACCTGAAACCGGGATATAACCACGGCTGGAGAACCGGGCTCCGACTTAAATGAAACAGAAA
 CCGGGATAAAAACACGGGACTCCAGGAGTAAAGAACCGGACTCCACACATTGAGACAGAAGAAGTGT
 CAGCCAGAACCCCCACACGGGTGGGACAGCCGACCTCCAGGTTGCAGGGAAAC
 TGGTTCTGGGACCTCCACCCAGAGTAAAAGAACCGGAGGACCTCCGCTACCACCCCTCCACGTGGTGG
 AAGACGGGTCTAGAGGTTAGAGGAGACCCCTCAGGGAAACAAATAGTGGACCATATTGACGCCAGGGAAAGA
 CCGGAGTGGTTCTGCTTCCAGGGTCTGTGAGCACAGTTGCTCAAGAATAAGCAGACCTTGGAT
 GACAAACACAAAACACTGGCGGATGGTCCCAGCCTCTCGTGGCCGGCTGGCAACATTCCGAGGGGG
 ACCGTCCTCGGTAAATGGCAATGGGACGAATTCTGAACCAAGCTAAACAGGATAATAGGACCGGCAATT
 CTTCAAGCAATAAACAGGAATACCAATTATTAAGATAACTTAGTCAGATCGTACAATAAGCTTGAAGAA
 AAATGCGCTTATTCAATCTTGCTATAAAAATGCCAAATCTCACATTGAGACATTGATGACCTCA
 TTTCTTCAATGAAGGGCTAACGGAGTTGACTAATGTTGGAAATTGGAGCGATAAGCGTCTGCTGCC
 TGGCCAGGACAACGTATACTCATGATAACAGCAATACCTGATCACTACTTCGCACTAGTTCTCGGTACTA
 TGCATATGATCCAATCAAAGGAATGATAGCATTGAAGGATGAGACTAATCCAATTGAGGAGTGGCAGCAG
 ATAGAACAGCTAAAGGGTAGTGCTGAAGGAAGCATCGATAACCCGATGGAATGGATAATATCACAGGAGG
 TACTAGACTACCTTCATCCTACATAAAATAGACGCATATAAGTACGCATTAAAGCATAAACACGC
 AACTATGCC
 GTTCTCTCATGTATATATACAGGCAACACCGAGATATAGGTGGCAGCTGAACAGTGAGCTGTATGTGC

FIGURA 13 (CONTINÚA) - SEQ ID NO 6 (CONTINÚA)

GCAGCTCGCGTTGCATTTCGGAAGCGCTCGTTCGAAACGCTTGAAGTCCTATTCCGAAGTCCTATT
 CTCTAGAAAAGTATAGGAACCTCAGAGCGCTTGTAAAACCAAAAGCGCTCTGAAGACGCACCTTCAAAAAACC
 AAAAACGCACCGGACTGTAACGAGCTACTAAATATTGCGAATACCGCTTCCACAAACATTGCTCAAAGTAT
 CTCTTGCTATATCTCTGTCTATATCCCTATATAACCTACCCATCCACCTTCGCTCTTGAACTTGCAT
 CTAAACTCGACCTCTACATTTTATGTTATCTCTAGTATTACTCTTAGACAAAAAAATTGTAGTAAGAAC
 TATTATAGAGTGAATCGAAAACAATACGAAAATGTAACACATTCCCTACAGTAGTATAGAGACAAAATAG
 AAGAAACCGTTCATAATTTCTGACCAATGAAGAATCATCAACGCTATCCTACCTTCTGTTCAAAAGTATGCGC
 AATCCACATCGGTATAGAATATAATCGGGATGCCTTATCTTGAAAAAAATGCACCCGCAGCTCGCTAGTAA
 TCAGTAAACGCCGGAAAGTGGAGTCAGGCTTTTTATGGAAGAGAAAATAGACACCAAAAGTAGCCTTCTTCTA
 ACCTTAACGGACCTACAGTGCAAAAGTTATCAAGAGACTGCATTATAGAGCGCACAAAGGAGAAAAAAAGTA
 ATCTAAAGATGCTTGTAGAAAAATAGCGCTCTCGCGTTGCATTTCTGTGTTGAGACAAAAAAGAAGTATAGATT
 TTTGTTGTAAAATAGCGCTCTCGCGTTGCATTTGTTACAAAATGAAGCACAGATTCTCGTTGAAATAGCGCTT
 TCGCGTTGCATTTCTGTGTTGAGACAAAAATGCAGCTCAGATTCTTGTTGAAATAGCGCTCTCGCGTTGCA
 TTTTGTCTACAAAATGAAGCACAGATGCTCGTAACAAAGATATGCTATTGAAGTGCAAGATGGAAACGC
 AGAAAATGAACCGGGATGCCACGTCAAGATTACCTATGCAATAGATCCAATAGTTCTCCAGGAACCGAAA
 TACATACATTGTCTCCGTAAAGCGCTAGACTATATATTATACAGGTTCAAATATACTATCTGTTCAAG
 GAAAATCCCAGGTTGGATGTTCAAAATTCAATGATGGTAACAAGTACGATCGTAAATCTGTTGAGACAGTT
 TGTCGGATATTAGGCTGTATCTCTCAAAGCGTATTGCAATATCATTGAGAAGCTGCAGGCAAGTGCACAAAC
 AATACTTAAATAACTACTCAGTAATAACCTATTCTTAGCATTGAGACATTGAGAAATTGCTATTGTTAGA
 GTCTTTACACCATTGTCTCCACACCTCCGCTTACATCAACACCAATAACGCCATTAACTAAGCGCATCA
 CCAACATTCTGGCGTCAGTCCACCAAGCTAACATAAAATGTAAGCTTGGGGCTCTTGCCTTCAACCC
 AGTCAGAAAATCGAGTCCAATCCAAAAGTTCACCTGTCCCACCTGCTTGAATCAAACAAGGAAATAACGA
 ATGAGGTTCTGTGAAGCTGCACTGAGTAGTATGTTGCAAGTCTTGGAAATACGAGTCTTTAATAACTGGC
 AAACCGAGGAACCTTGGTATTCTGCCACGACTATCTCCATGCAAGTGGACGATATCAATGCCGTAACTCAT
 TGACCAGGCCAAAACATCTCCTTAGGTTGATTACGAAACGCCAACCAAGTATTGAGTCCTGCTGAACCT
 ATTGTTATATGCTTTACAAGACTTGAAATTCTTGCAATAACCGGGCAATTGTTCTTCTATTGGGC
 ACACATATAATACCCAGCAAGTCAGCATCGGAATCTAGAGCACATTCTGCCCTCTGTGCTCTGCAAGCCGC
 AAACATTCAACATGGACCGAGAACTACCTGTGAAATTAAATAACAGACATACTCAAGCTGCCATTGTC
 AATCACGTATACTCACGTGCTCAATAGTCACCAATGCCCTCCCTTGGCCCTCCTCTTTCTTTC
 CGCTAGCGTCGACAGCACAATTGCACTGGATGCAGCCCCGTTAACGTGCCGGCACGGCCTGGTAACCAG
 GTATTGTCACATAACCGTGGCAAAATGTTGATAAGCAGGACACAGCAGCAATCCACAGCAGGATA
 CAACCGCACACCGAGGTTACTCGTTACAGGTTACGACGACATGTCAATACTGCCCTTGACAGGCATTGA
 TGGATCGTAGTCACGCTGATAGTCAGACAAATACAAGTGGGACCGTGGTCCAGACCGATAATCAGA
 CCGACAAACACGAGTGGGATCGTGGTCCAGACTAATAATCAGACCGACGATACGAGTGGGACCGTGGTCCAG
 ACTAATAATCAGACCGACGATACGAGTGGGACCGTGGTCCAGACTAATAATCAGACCGACGATACGAGTGGG
 ACCGTGGTCCAGACTAATAATCAGACCGACGATACGAGTGGGACCATGGTCCAGACTAATAATCAGACCGA
 CGATACCGAGTGGGACCGTGGTCCAGCTGATTATCAGACCGACGATACGAGTGGGACCGTGGTCCAGACTA
 ATAATCAGACCGACGATACGAGTGGGACCGTGGTCCAGACTAATAATCAGACCGACGATACGAGTGGGACCG
 TGGTCCAGTCTGATTATCAGACCGACGATACAAGTGGAACAGTGGGCCCAGAGAGAAATATTCAAGGCCAGTTA
 TGCTTCTGCCCTGTAACAAAGACATTAAGTAAAGACAGATAACGTAGACTAAACGTGGTGCATCAGGG
 TGCTGGCTTTCAAGTCTTAAGAATGGCCTCAATTCTATACACTCAGTGGAACACGGGACCTGTG
 AGGTTAAGCACCATTATGCCCTTATACAATAACTGTCGCTCCAGGAGCAAACGTGATGTCGTGAGCTTAAAC
 TAGTTCTTGATGCAAGATGACGTTAAGCAGAGTAAAGAGTGTATAACTCTCAGCTTCAAATATCAC
 CCCAGCTTTCTGCTCATGAAGGTTAGATGCCCTGCTTAAGTAATTCTCTTATCTGAAAGGCTTT
 TGAAGTGCATCACCTGACCGGGCAGATAGTCACCGGGTGAAGAAAAAGAGCAACAACTGATTAGGCAATT

FIGURA 13 (CONTINÚA) - SEQ ID NO 6 (CONTINÚA)

TGGCGGTGTTGATACAGCGGTAATAATCTTACGTGAAATATTTCCGCATCAGCCAGCGCAGAAATATTCC
 AGCAAATTCTGCAATCGGCTTGCAACGCTGACCACGTTCATAAAGCACTTGTGGGCATAATCGTTA
 CCCAATCTGGATAATGCAGCCATCTGCTCATCATCCAGCTGCCAACAGAACACGATAATCACTTCGGTAA
 GTGCAGCAGCTTACGACGGGACTCCCACGGCAATTCTATGACACCGAGATACTCTCGACCGAACGCCGG
 TGTCTGTTGACCAGTCAGTAGAAAAGAAGGGATGAGATCATCCAGTGCCTCAGTAAGCAGCTCCTGGTCA
 CGTTATTACCTGACCACATACCGAGAGGGTCTTCAACACTATCACCCGGAGCACTCAAGAGTAAACCTCA
 CATCCCGACCACATACAGGCAAAGTAATGGCATTACCGCAGGCCATTACTCCTACCGCGCAATTACGAATC
 CACCATCGGGGAGCTGGTGCATAACGAAGTATCTCAACCGTTGAGTATTGAGCGTATGTTGGATA
 ACAGGGCAGCCTCATTATCTAATCTCCAGCGTGGTTAATCAGACGATCGAAAATTTCATTGCAGACAGG
 TTCCCAAATAGAAAGAGCATTCTCAGGCAACAGTGAAGAGCGTTGATCAATGCCGTTCAAAACAGTT
 CTCATCCGGATCTGACCTTACCAACTCATCCGTTACGTACAACATTGTTAGAACATGCTCCCCAGG
 CATCCCGAATTGCTCCTCCATCCACGGGACTGAGAGCCATTACTATTGCTGATTGGTAAGCAAATACG
 TACATCAGGCTCGAACCCCTTAAGATCAACGTTCTGAGCAGATCACGAAGCATACTGAAAACACTGCAGTGC
 GAGGTGAGTCAAACAACTCAGCAGGCGTGGAAACATCAGCACATCAGCAGCACATAGCACATTAATCGTGC
 CGATACCCAGGTAGGCGCGTGTCAATAACTATGACATCATAGTATGAGCAACAGTTCAATGCCAGTC
 GAGCATCAGGTGGATCGTGGCAGTTACCTCATCAAATTGCCATTAACTCAGTTCAATACGGTGC
 AGAGCCAGACAGGAAGGAATAATGTCAAGCCCCGCCAGCAAGTGGCTTATTGATAAGTACATCGCCT
 TTTCCCAAGATAGAAAGGCAGGAGAGTGTCTCTGCATGAATATGAAGATCTGGTACCCATCCGTGATACAT
 TGAGGCTGTTCCCTGGGGTCGTTACCTTACGAGCAAACACGTTAGCCCTTCAGAGCCAGTCCTGAGCA
 AGATGAACAGAAACTGAGGTTTGTAAACGCCACCTTATGGCAGCAACCCGATCACCGGTGGAAATACGT
 CTTCAGCACGTCGAATCGGTACCAAACACATCACGATATGATTAATTGTTCAATTGTATAACCAACACG
 TTGCTCAACCCGTCCTCGAATTCCATATCCGGGTGCGTAGTCGCCCTGTTCTCGGATCTGATAGCC
 TGAGAAGAAACCCAACCAAATCCGCTGCTCACCTATTCTCAGGCCGGTTATTTCTCGCTCCGGC
 TGTGATCATCATTAAACTGTGCAATGGCATTAGCCTCGTCAATTGACCAAGCGTTATGACTGGTTAAGTGT
 TTCCATGAGTTTCAATTCTGAACATCCTTAATCATTGCTTGCCTTTTATTAAATCTTCAATTACTGC
 AAAGCAACAACAAATCGCAAAGTCATCAAAACCGCAAAGTTGTTAAAATAAGAGCAACACTACAAAGG
 AGATAAGAAGAGCACATACCTCAGTCACTTATTACTAGCGCTCGCCAGCCGTAAACCGAGCATAGCG
 AGCGAACTGGCGAGGAAGCAAAGAAGAACTGTTCTGTCAGATAGCTTACGCTCAGCGCAAGAAGAAATATC
 CACCGTGGAAAAACTCCAGGTAGAGGTACACACCGGATAGCCAATTAGCTAATAAAACTGTGATAATCAA
 CCCTCATCAATGATGACGAACAAACCCGATATCAGGTACATGACGAAGGGAAAGAGAAGGAAATCAACTG
 TGACAAACTGCCCTCAAATTGGCTTCTTAAACATTACAGTTCAAAAGTATGAGAAAATCCATGAGGCTG
 AAGGAAACAGCAAACCTGACAAATTACCCCTCAGTAGGTACAGAACAAATGTGACCAACCCCTCAAATCTG
 TGACAGATAACCCCTCAGACTATCCTGTCGTACGGTAACCTTGAGGCGACTGGTGTGATCTCATTAACACAGCT
 GCAGGAAGCGCGCGGAAGTCAGGCATACGCTGGTAACCTTGAGGCGACTGGTGTGATCTCATGATCCAGTC
 GATTTTCAGAGAGACGATGCTGAGCCATCCGGCTACGATACTGACACAGGGATTGATCAAACGATGAGTC
 TACGGATTGGTATTCTTGTGTTACTAACGCCAAACTGGTAAACCGGTTCTGTAACCCGATAAGAAGG
 GAATGAGATATGGGTGATATGTACACTGTAAGGCCCTCTGGATGGACTGTGCGCACGTTGATAAACCAAGG
 AAAAGATTCAAGCCTTTCATGCCGGCATCCTCTCAGGGCGATAAAAACACTTCCTCCCCGGAAA
 CTCTTCAATGCCGCTGCGTATATCCTTACTGGCTTCCGAGAGGTCAATCGAATATTCAGCATATTTAGCAA
 CATGGATCTCGCAGATACCGTACGGTGTAGGGTGCATCAGATTCTGATCTGGTCAACGAACAGATA
 CAGCATACTGGTTTGATCCGGAGAGACTATATGCGCCTCAGTGAGGTCGTTGACTGGACGATTGCGGG
 CTATTTTACGTTCTGTGATTGATAACCGCTGTTCCGCATGACAGATCCATGTGAAAGTGTGACAAGTT
 TTAGATTGTCACACTAAATAAAAAGAGTCATAAGCAGGGATAACTTGTGAAAAAACAGCTTCTCTGAGG
 GCAATTGTCACAGGGTTAAGGGCAATTGTCACAGACAGGACTGTCAATTGAGGGTATTGTCACACTGAA
 AGGGCAATTGTCACAACACCTCTAGAACCGAGCATGGATAAAGGCCCTACAAGCGCTCTAAAAAGAAGA

FIGURA 13 (CONTINÚA) - SEQ ID NO 6 (CONTINÚA)

TCTAAAAACTATAAAAAATAATTATAAAAATATCCCCTGGATAAGTGGATAACCCAAGGGAAGTTTT
 CAGGCATCGTGTGAAGCAGAATATATAAGTGTGTTCCCTGGTGCTTCCTCGCTACTCGACCGGGAGGGTT
 CGAGAAGGGGGGCACCCCCCTCGGCGTGCACGGCACAGGGCGAGCCCTGGTAAACAAAGGT
 TTATAAATATTGGTTAAAGCAGGTTAAAGACAGGTTAGCGGTGGCGAAAACGGGCGAAACCCTGCA
 AATGCTGGATTTCTGCCTGTGGACAGCCCCTAAATGTCAATAGGTGCGCCCTCATCTGTCACTCTGC
 CCCTCAAGTGTCAAGGATCGGCCCTCATCTGTCAAGTGTCAATACCGCAGGGCAC
 TTATCCCCAGGCTTGTCCACATCATCTGTGGAAACTCGGTAAAATCAGGCGTTTCGCCGATTGCGAGGC
 TGGCCAGCTCCACGTCGCCGGCGAAATCGAGCCTGCCCTCATCTGTCAACGCCGCCGGTGAGTGGCC
 CCTCAAGTGTCAACGTCCGCCCTCATCTGTCAAGTGTGGAGGGCAAGTTTCCCGAGGTATCCACAACGCCCGC
 GGCGGCCGCCGGTGTCTCGACACGGCTTCGACGGCTTCTGGCGCGTTGCAGGGCATAGACGGCCGCA
 GCCCAGCGCGAGGGCAACCAAGCCGAGGGCTTCGCCCTGTGCGTCACTGCGCGAGCACTACTGGCTGTAAA
 AGGACAGACCAACATCATGGTCTGTGTCATTAGGTTGTCATTGCTGACATAATCCGCTCCACCTCA
 ACGTAACACCGCACGAAGATTCTATTGTCCTGAAGGCATATTCAAATCGTTTGTGTTACCGCTTGAGGCA
 TCATGACAGAACACTACTTCCCTATAAACGCTACACAGGCTCTGAGATTAATAATGCGGATCTACGATAAT
 GGGAGATTTCCCGACTGTTGCTCGCTCTCAGTGGATAACAGCCAGCTCTGTTAACAGACAAAAAC
 AGCATATCCACTCAGTCCACATTCCATATAAAGGCCAAGGCATTTATTCTCAGGATAATTGTTTCAGCATC
 GCAACCGCATCAGACTCCGGCATCGCAAACACTGCACCCGGGCCAGCCACATCCAGCGAAAAACCTCG
 TGTAGACTTCCGTTGAAC TGACTGATGGACTTATGTCCTCATCAGGCTTGCAGAACCTTCAGCGGTATACGGCATA
 CAGCATGTGCATCGCATAGGAATGGCGAACGTATGTGGTGTGACCGGAACAGAGAACGTCACACCGTCAGCA
 GCAGCGCGGCCAACGCCCTCCCAATCCAGGCTCTGACCGTTCTGTCCGTACTTCCAGATCCGCGTTCT
 CTGTCCTCTGTGCGACGGTTACGCCCTCCATGAGCTTATCGCAATAAAACCTGTGACGGAAAGATCACT
 TCGCAGAATAAAATAAATCCTGGTGTCCCTGTTGATACCGGGAAAGCCCTGGCCAACCTTGGGAAATGAGA
 CGTTGATCGGCACGTAAGAGGTTCAAACCTTCACCATATAAGAAATAAGATCACTACCGGGCGTATTTTGAG
 TTATCGAGATTTCAGGAGCTAAGGAAGCTAAATGGAGAAAAAAACTACTGGATATACCAACCGTTGATATAT
 CCCAATGGCATCGTAAAGAACATTGAGGCAATTTCAGTCAGTGTGCTCAATGTACCTATAACCAAGACCGTTCA
 GCTGGATATTACGGCTTTAAAGACCGTAAAGAAAAATAAGCACAGTTTATCCGGCTTATTACATT
 CTTGCCGCTGATGAATGCTCATCCGAAATTGCTATGGCAATGAAAGACGGTGTGAGCTGGTGTATGGATA
 GTGTTACCCCTGTTACACCGTTTCCATGAGCAAACGTTTACCGCTCTGGAGTGAATACCA
 CGATTCCGGCAGTTCTACACATATACTGGCAAGATGTGGCTGTTACGGTGAACCTGGCTATTCCCT
 AAAGGGTTATTGAGAATATGTTTCTGCTCAGCAATCCCTGGGTGAGTTTACCGTTGATTTAAACG
 TGGCCAATATGGACAACCTCTCGCCCCGGTTTCACCATGGCAAATATTACCGCAAGGCACAAGGTGCT
 GATGCCGCTGGGATTCAGGTTCATCTGGCTTGTGATGGCTTCCATGCGGAGAATGCTTAATGAATTA
 CAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGGGGGCGTAATTGTTAAGGCAGTTAGGTGCCCCCTAAACGCC
 GTTGCTACGCCGTGATAAGTGTGAGTGAATGGCAGAAATTGCGATGATAAGCTGTCAAACATGAGA
 ATTGGTCACCCCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTAT
 GCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATG
 CAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGTCCCCGCCCTAACTCCGCCATCCGCCCTAACTCCGC
 CCAGTCCGCCATTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTGTTATGAGAGGCCGAGGCCGCTC

SEQ ID NO 6 (CONTINÚA)

FIGURA 13 (CONTINÚA)

SECUENCIA ID N:7

CONSTRUCTO SINTÉTICO: PSHUTTLE/EV71 (17368 PB)

TTAAAACAGCCTGTGGTTGCACCCACTCACAGGGCCCCTGGCGCTAGTACACTGGTATCTCGGTACCTTT
 GTACGCCTGTTTATACCCCTCCCTGATTGCAACTTAGAAGCAACGCCAACAGATCAATAGTAGGTGTGA
 CATACCAGTCGCATCTTGATCAAGCAGTCTGTATCCCCGGACCGAGTATCAATAGACTGTGACACGGTTGA
 AGGAGAAAACGTCCGTTACCCGGCTAACTACTTCGAGAAACCTAGTAACGCCATTGAAGTTGCAGAGTGTTC
 GCTCAGCAGTCCCCCGTGTAGATCAGTCGATGAGTCACCCGATTCCCCACGGCGACCGTGGCGGTGGCTG
 CGTTGGCGGCCTGCCATGGGTAACCCATAGGACGCTCTAATACGGACATGGCGTGAAGAGTCTATTGAGCT
 AGTTAGTAGTCCTCCGGCCCCCTGAATGCGGTTAACCTTAACCTGCGGAGCACATACCCCTAACCAAAGGGCAG
 TGTGCGTAACGGCAACTCTGAGCGAACCGACTACTTGGGTGTCCGTGTTCTTTATTCTGTATTG
 GCTGCTATGGTGACAATTAAAGAATTGTTACCATATAGCTATTGGATTGCCATCCAGTGTCAAACAGAGCT
 ATTGTATATCTTTGGATTACACCTCTCACTCTGAAACGTTACACACCCCTAACATTACATTACTGC
 TGAACACGAAGCGATGGCTCCAGGTCTCCACACAGCGATCCGGCTCCATGAGAATTCCAACCTAGCCACG
 GAAGGCCTCACTATAAATTACACAACCATTAATTACTACAAAGACTCGTATGCTGCCACTGCTGGAAAGCAAA
 GTCTCAAACAAGATCCTGACAAGTTGCGAACCCCTGTGAAGGACATCTTACTGAAATGGCAGGCCCTTAAA
 GTCTCCCTCTGCTGAAGCATGGCTATAGCGACCGAGTGGCACAGCTTACCTGGAAATTCCACCATTACT
 ACACAAAGCAGCAAACATAATAGTTGGGTATGGTGAGTGGCTTCACTGCTCTGATAATGATGCAACAG
 CGGTAGACAAACCTACACGGCTGATGTCAGTAAATAGATTTACACGCTAGACACTAAGCTATGGAGAA
 ATCATCCAAGGGGGTGGTACTGGAAGTCCCAGATGTACTGACTGAAACCGGAGTTTGGTCAAATGCAAA
 TTTCACACTTACCGTTCAAGGTTCTGCATCCACGTTCAATGTAACCGTAGCAAATTCAACCAAGGGCGC
 TACTCGTTGGTATTGCCAGTATGCAATTGGAACAGTGGCAGGGCACAGGACAGAGAACAGTCACCC
 TCCTTATATACAAACCCAAACCGCGCTGATGGATTGAAATTACAACATCCATATGTTCTGATGCTGGAAATT
 CCAATATCTCAGTGACAGTGTGCCCTCACCAGGGATCAATTACGAACCAACATTGTCACCCATAATAG
 TGCCATACATGAACACACTACCTTTGATTCCGATTGAACCACTGTAATTTCGGACTATTGGTGGTGCCTAT
 CAGCCCGCTGGATTCGACCAAGGGCGACACCGTAATTCTATCAGTTGGCTCCGATGTGTTCT
 GAGTTGGGGCTCAGGCAGGGCAGTTGCGCAGGGTTCCCCACTGAATTGAAACCTGGCACTAATCAGTTCT
 TAACCACGGATGATGGTGTGTCAGCACCTATATTGCCAATTCCACCCACCCCGTGCATTACACATACCTGG
 CGAGGTTAGAAACTACTAGAACTGTGCCAGGTAGAAACCAATTAGAAGTCACAAATGTGCCACCAACGCA
 ACCAGTTGATGGAAGGCTACGGTTCCAGTGTCAAGCCCAAGCAGGGAAAGGTGAGTTGTGCAGTGTCA
 GGGCCGACCCCTGGGAGGGATGGCTTGGCAATCACCAGTCAAGGCCAGTGTGAGAGCTCTAGGAGATAG
 GTCAGGGCTTGGAAAGTCACTTTATGTCACCCGATCCTTATGGCAACTGGTAAATGCTTATAGCTTAC
 ACACCCCCAGGGGGCCCTTGCCTAAAGATAGAGCCACAGCTATGCTGGGACGCACGTCTGGACTTTG
 GCTTGCAATCGTCCGTACCCCTGTCATACCATGGATCAGTAACACTCACTATAGGGCGATGCTCGAGATGG
 GGTGTTGATTACTACACCACAGGTTGGTAGTATATGGTACCAACAAATTATGTTAGTCCCTATTGGAGCA
 CCTAATACTGCCTATATAATAGCGTTGGCAGCAGCCAAAAGAATTCACTATGAAATTGTCAGGACACCA
 GTGACATTTGCAAACGCCACTATTCAAGGGGACAGAGTGGCAGATGTGATTGAGAGCTCTAGGAGATAG
 TGTGAGTAAGGCCCTACCCAAAGCTTACCTGCACCCACAGGCCAAAACACCCAAAGTGAGCAGTCATCGCTTA
 GACACTGGAAAAGTACCAAGCACTTCAGGCCGAAATCGGAGCTCGTCAATGCTAGTGTGAGAGTATGA
 TTGAGACTCGGTGTTCTTAACATAGCACAGCTGAAACCACCCCTGATAGTTCTCAGTAGAGCAGG
 CTTAGTTGGGAGAGATAGATCTTCTCTAAAGGGCACCACCAATCCGAACGGGTATGCCAAGTGGACATAGAC
 ATAACCGGTTATGCGCAGATGCGCAGAAAAGTGGAACTATTACCTATATGCGTTTGACGCAGAGTTCACCT
 TTGTCGCGTGCACACCTACCGGAGAGGTGTTCCACAGCTGCTCAATACATGTTGTTCCACCCGGGGCCCC
 CAAACCAAGACTCCAGAGACTCTTGGCTTGGCAAACGCCACGAACCCCTGATTTGTCAAATTATCCGAC
 CCACCAAGCACAAGTCTCAGTGCATTATGTCACCTGCAAGCGCATACCAATGGTTTATGACGGATACCTA
 CATTGGAGAGCACAAGCAAGAGAAGGATCTCGAGTATGGGCATGCCGAATAACATGATGGGCACATTCTC

FIGURA 13 (CONTINÚA) - SEQ ID NO 7

AGTGCGGACTGTGGATCGTCACAGTCAAAATATCCCTAGTCATCAGAATATACTGAGAACGACGTC
 AGAGCGTGGATACCTCGGCCATGCCAATCAGAACTATTGTCAAATCCAACCCAAACTATGCTGGTAATT
 CCATTAACCAACTGGTACCGCCGAACGGCAATCACTACGCTCGGGAAATCGGTCAAGCAGTCTGGGCTAT
 TTATGTGGCAACCTTAGGGTAGTAAACAGACACCTAGCCACCCATACTGACTGGCCAATGGTGTGGAA
 GACAGCTCTAGAGACCTCTAGTTCTCAACTACCGCTCAAGGTGTGACACCATTGCTGATGTAACTGCC
 AAACCGGAGTGTATTACTGTAACCTCTCGCAGAAAACACTATCCAGTCAGTTTCGAAACCTAGTTGGTGT
 TGTAGAAGCTAGTGAGTATTATCCAGCTAGATATCAGTCCCCTTATGCTTGCTGAGGGCCATTAGAACCT
 GGTGATTGTGGCGTATTCTAGATGCAACACGGTGTGGTGGAAATTGTCCTCACTGGCGGAAGTGGCTTG
 TGGGATTGCTGACGTTAGAGATCTCTGTGGCTAGATGAGGAAGCGATGGGACAGGGGTATCTGATTACAT
 CAAAGGTCTCGGTATGCCCTCGCACAGGTTCACTGACGCACTGTCAGGGAAGTGGAAAGCGTTGAAAGAAC
 CACTTAATCGGCTCCGAAGGGCTGTTGAGAAGATCTGAAGAACCTGGTGAAGCTAATTCAACCTAGTTA
 TAGTCATCAGAAGTGAATTGATATGGTCACCCCTCACAGCCACACTAGCTCTGATCGGGTGCACGGGAGTCC
 TTGGCGTGGATCAAATCAAAGACAGCTTCCATACTGGCATTCCATGGCACAAAAACAGAGTGCCTCATGG
 CTAAAGAAGTTCAATGACATGGCAAATGTCGAAAAGGGCTTGAGTGGATTCCAACAAGATCAGTAAGTCA
 TTGACTGGCTTAAAGAGAAGATCATTCCAGCTGCCAAAGAGAAAAGTTGAGTTTGAAACAACCTAAACAGCT
 CCCCTTGGAGAACCCAGGTCTCCAATCTTGAAACAGTCTGTCCTCACAGAACAGACTTAGAAGCTATGTT
 GGTAATGTGTCATATCTGGCTCACTTGTGGCAATTCCAACCACTCTACGCAACTGAGGCCAAGAGAGTCT
 ACGCTTGTAGAGAAAAGGATGAATAACTACATGCAAGAGCAAACACCGTATTGAAACCTGTATGCTTGAT
 CATCAGAGGTTCCCCAGGAACGGCAAATCGCTGCCACAGGCATTATAGCTAGAGCATTGCTGACAAGTAT
 CGCTCTAGTGTATACTCACTCCCCCAGACCCAGATCATTGATGGTATAAGCAACAGGTGGTCACGGTCA
 TGGATGATCTCTGCCAGAACCGGACGAAAAGACATGTCCTATTGTCATGGTCAAATGGTTCTACAGTAGATT
 TATACCACCCATGGCATCACTAGAGGAGAAAAGGAGTGTCTTCACCTCAAGTTGTCATTGCTGACAAGTCA
 GCTAGTAACATCATAGTCCCCACAGTTCAAGATTGAGTCAGATGCAATTGCAAGGGGTTCCAGGGTGTCTTA
 TAGAAGTGACAGATTCTTACAAGACAGACCTCGGCTGGCTGGCAGCAGGTAGAGCTGCCAAGCTTGTACAGA
 AAATAACACTGCTAATTCAAGAGATGCAAGCCCACGGTGTGGTAAGGCTATTGAGTCAGAGACAGGAAG
 TCCAAAGTGAGATATAGCGTCGACACCGTGGTACGGAACTGATCAGAGAGTACAACAATAGATCTGCTATTG
 GGAATACTATAGAAGCACTCTTCAAGGACCCCCCTAAATTCAAGGCTATAAGAATTAGTCTGAAAGAAAAGCC
 AGCCCCAGATGCCATTGGTATTGCTCGTAGTGTGATAGCGAGGAGGTCCGACAGTACTGCAAGGGAAACAA
 GGGTGGATAATCCGGAAACACCAACTAATGAGAACGTCACCTCAATAGAGCAGTATTGTAATGCACTGCA
 TCGCCACTGTGGTGCAGTTGTCTCTGTTATGTCATTATAAGCTGTTGCCGGGTTCCAGGGTGTCTTA
 CTCTGGAGCGCCAAGCAAATTCTCAAGAAGCCCGTGTAAAGAACAGCCACGGTCCAAGGGCCAGCTTAGAC
 TTCGCCCTGTCTCTTGTGGCAACATTAGACAAGCGAAACTGACCAAGGACACTTCACCATGCTAGGAG
 TGCGAGATGCCCTAGCCATCTGCCGCCACTCGCAACCAGGGAAAGACCATCTGGTAGAGCATAAATTAAAT
 CAATGTAAGATGCAAGTTGAGTTGGTGGATGAGCAAGGTGAAACTTGGAACTCACACTGGTAACCTGGAC
 ACCAATGAAAATTAGGGATATCACCAAGTTATCCCAGAAGTGTACCGGGGGGAGTGACGCAACTCTAG
 TCATCAACACTGAGCACATGCCCTCAATGTTGTGCCGGTGGTACGTTGTGCACTACGGGTTCTGAAACCT
 TAGTGGTAAACCCACACAGAACCATGATGTATAACTCCCCACGAAGGCAGGACAGTGTGGGGGGGGTGGTT
 ACCTCAGTTGGTAAGATCATTGAAATCCACATTGCCGGGAAATGGACGCCAGGGTTTGCCTGGCCTAAAGA
 GGAGTTATTGCAAGCGAGCAAGGAGAGATCCAGTGGATGAGCCTAACAGAGAAACCGGGAGGTTGAATAT
 TAATGGTCCAACCGAACTAAGCTGGAAACCCAGTGTATTGAGCAAGCTTGTCTCAAGTATGTGGTAACA
 GTCTGACTAGTAAGGACCCAGACTTGAGGTTGATTTGAGCAAGCTTGTCTCAAGTATGTGGTAACA
 CCCTGCATGAACCTGATGAGTACGTGACACAGGCTGCTCTCAACTACGCAAATCAGCTGAAGCAACTGGACAT
 CAACACCGCAAGATGAGCATGGAAGAAGCGTGTATGGCACAGAATATTAGAAGCTATAGACTTGCACACC
 AGTGCTGGATACCCCTATAGTGTCTGGCATCAAGAAAAGAGACATCCTCGACCCAGTTACAGAGACACCT
 CCAGGATGAAAGTTATATGGATAAGTATGGGGTGGACTTGCCTTATTCAACTTATGAAAGGATGAGCTTAG
 ATCTCTAGATAAGATCAGAAAAGGGAAAGTCTCGCCTGATTGAGGCTAGCAGCTTAAATGATTCTGTCTACCTT

FIGURA 13 (CONTINÚA) - SEQ ID NO 7 (CONTINÚA)

AGAATGACTTTGGACACCTTATGAAGTGTTCACGCCAACCCAGGGACTGTAACAGGATCTGCAGTTGGGT
 GCAACCCCTGATGTATTTGGAGCAAGTACCAATTGGTACCGGGTCACTCTTGATTTGACTACTCAGG
 ATATGATGCAAGCCTTAGTCCTGTGTGGTCAAGGCTAGAGTTGGTCTGAGAGAGATCGTTACTCGGAG
 GAGGCTGTGTCACTCATAGAAGGGATCAATCACACCCACCGTGTACCGAAACAAGACATATTGTACTTG
 GTGGATGCCCTCAGGCTCCGGTACTTCCATTTCATTCATGATTAACAACATAATCAGAACCCCT
 CCTGATTAACATTCAAAGGTATAGACTTAGATGAGCTGAAAATGGTAGCTATGGAGATGACGTGTTGGCC
 AGCTACCCGTTCTATTGATTGCTTGAATTGGCTAAAACAGGAAAGAATATGGGCTGACTATGACTCCTG
 CTGATAATCACCTTGTCAATGAGGTTACCTGGGAGAATGCAACCTCTTAAACGCGGTTTCTACCGGA
 CCATCAGTTCCCTTTCTGATCCATCCACTATGCCATGAGGGAAATCCATGAGTCCATCCGCTGGACCAAG
 GACGCGCAGAATACTCAAGATCATGTGGCTCCCTTGTCTCTGGCATGGCATAATGAAAAGAGGAGTATG
 AGAAAATTGTGAGTACAATTAGATCAGTCCCCATTGGAAGGGCTTTAGCAATACCAAATTGAGAACTTGAG
 AAGAAAATTGGCTCGAGTTATTTAAACTTACAGCTCAATGCTGAACCCACCAGAAATCTGGTGTCAATG
 ACTGGTGGGGTAAATTGTTATAACCAAGAATAGCAAAAAAAAAAAAAAAAGGCCGG
 CATGGTCCCAGCCTCCTCGCTGGCGCCGGCTGGCAACATTCCGAGGGGACCGTCCCTCGGTATGGCAAT
 GGGACGAATTCTGAACCAGTCTAAACGAGTAAATAGGACCGCAATTCTCAAGCAATAACAGGAATACC
 AATTATTAACAGATAACTTAGTCAGATCGTACAATAAGCTTGAAGAAAAATGCCCTTATTCAATCTTGC
 TATAAAAAATGCCCAAATCTCACATTGGAAGACATTGATGACCTCATTCTTCAATGAAGGGCTAACG
 GAGTTGACTAATGTTGTGGGAAATTGGAGCGATAAGCGTGCCTCTGCCGTGGCAGGACAACGTATACTCATC
 AGATAACAGCAATACCTGATCACTACTCGCACTAGTTCTCGTACTATGCATATGATCCAATATCAAAGGA
 AATGATAGCATTGAAGGATGAGACTAATCCAATTGAGGAGTGGCAGCATATAGAACAGCTAAAGGTAGTGCT
 GAAGGAAGCATAKGATACCCGCATGGATGGATAATATCACAGGAGGTACTAGACTACCTTCATCCTACA
 TAAATAGACGCATAACTACGCATTAAAGCATAAACACGCACATGCCGTTCTCATGTATATATATA
 CAGGCAACACGCAGATATAGGTGCGACGTGAACAGTGGCTGTGAGCTCGCAGCTCGCGTGCATTTCGGAA
 GCGCTCGTTTCGAAACGCTTGAAGTCCCTATCCGAAGTCCCTATTCTCTAGAAAAGTATAGGAACCTCAG
 AGCGCTTTGAAAACCAAAAGCGCTCTGAAGACGCACCTTCAAAAACCAAAACGCACCGACTGTAACGAG
 CTACTAAAATATTGCAATACCGCTTCAACAAACATTGCTCAAAAGTATCTTTGCTATATATCTGTGCT
 ATATCCCTATATAACCTACCCATCCACCTTCGCTCCTGAACCTGCATCTAAACTCGACCTACATTTC
 ATGTTATCTCTAGTATTACTCTTAGACAAAAAATTGAGTAAAGAAACTATTGATAGAGTGAATCGAAAACA
 ATACGAAAATGAAACATTCTATACGTAGTATAGAGACAAAATAGAAGAAACCGTTATAATTCTG
 CCAATGAAGAATCATCAACGCTATCATTCTGTCACAAAGTATGCGCAATCCACATCGGTATAGAATATAA
 TCGGGGATGCCATTCTGAAAAATGCACCCGAGCTCGCTAGTAATCAGTAAACGCGGAAAGTGGAGTC
 AGGCTTTTTATGGAAGAGAAAATAGACACCAAAAGTAGCCTTCTTAACCTTAACGGACCTACAGTC
 AAGTTATCAAGAGACTGCATTAGAGCGCACAAAGGAGAAAAAAGTAATCTAAGATGCTTGTAGAAAAA
 TAGCGCTCTCGGGATGCATTCTGAGAACAAGGAGATAGATTCTTGTGTTGAAAATTAGCGCTCTCG
 CGTTGCATTCTGTTCTGTTAAAGCAGCTCAGATTCTTGTGTTGAAAATTAGCGCTCTCGCGTGCATT
 TTGTTTACAAAATGAAGCACAGATTCTCGTGGTAAAATTAGCGCTCTCGCGTGCATTCTGTTCTGAA
 AAATGCAGCTCAGATTCTTGTGAAAATTAGCGCTCTCGCGTGCATTCTGTTCTACAAAATGAAGC
 AGATGCTCGTTACAAAGATATGCTATTGAGTGAAGTGAAGATGGAACCGAGAAAATGAACCGGGATGCC
 TGCAAGATTACCTATGCAATAGATGCAATAGTTCTCCAGGAACCGAAATACATACATTGTCCTCGTAAAGC
 GCTAGACTATATATTATACAGGTTCAAATATACTATCTGTTCAGGGAAAATCCCAGGTCGGATGTT
 AAAATTCAATGATGGTAACAAGTACGATCGTAAATCTGAAAACAGTTGTCGGATATTAGGCTGTATCTCC
 TCAAAGCGTATTGCAATATCATTGAGAAGCTGCAGGCAAGTGCACAAACAATACTAAATAACTACTCAG
 TAATAACCTATTCTTAGCATTTGACGAAATTGCTATTGTTAGAGTCTTTACACCATTGTCCTCCAC
 ACCTCCGCTTACATCAACACCAATAACGCCATTAACTAAGCGCATCACCAACATTCTGGCGTCACTCCA
 CCAGCTAACATAAAATGTAAGCTTCTGGGCTCTTGCCTCCAACCCAGTCAGAAATCGAGTCCAATCCA
 AAAGTTCACCTGTCACCTGTTCTGAACTAAACAAAGGAATAACGAATGAGGTTCTGTAAGCTGCACT

FIGURA 13 (CONTINÚA) - SEQ ID NO 7 (CONTINÚA)

GAGTAGTATGTTGCAGTCTTGGAAATACGAGTCCTTAATAACTGGCAAACCGAGGAACCTTGGTATTCT
 TGCCACGACTCATCTCATGCAGTGGACGATATCAATGCCGTAACTCATTGACCAGAGCCAAACATCCTCCT
 TAGGTTGATTACGAAAACACGCCAACCAAGTATTCGGAGTGCGCTGAACACTATTTTATATGCTTTACAAGACT
 TGAAATTTCCTTGCATAACCGGGTCAATTGTTCTTTCTATTGGGCACACATATAATACCCAGCAAGTCA
 GCATCGGAATCTAGAGCACATTCTGCGGCTCTGTGCTCTGCAAGCGCAAACCTTCACCAATGGACCAGAAC
 TACCTGTGAAATTAAACAGACATACTCCAAGCTGCCCTTGTGCTTAATCACGTATACTCACGTGCTCAA
 TAGTCACCAATGCCCTCCCTTGGCCCTCCTCCTTTCTTTGACCGCTAGCGTCGACAGCGACACACT
 TGCATCGGATGCAGCCGGTTAACGTGCCGGCACGGCTGGTAACCAGGTATTTGTCACATAACCGTGCG
 CAAAATGTTGTTGATAAGCAGGACACAGCAGCAATCCACAGCAGGCATAACCCGACACCGAGGTTACTCCG
 TTCTACAGGTTACGACGATGTCAATACTTGCCTTGACAGGCATTGATGGAATCGTAGTCTCACGCTGATA
 GTCTGATCGACAATAACAAGTGGGACCGTGGTCCCAGACCGATAATCAGACCGACAAACACGAGTGGGATCGTGG
 TCCCAGACTAATAATCAGACCGACGATACGAGTGGGACCGTGGTCCCAGACTAATAATCAGACCGACGATACG
 AGTGGGACCGTGGTCCAGACTAATAATCAGACCGACGATACGAGTGGGACCGTGGTCCCAGACTAATAATCA
 GACCGACGATACGAGTGGGACCATGGTCCCAGACTAATAATCAGACCGACGATACGAGTGGGACCGTGGTCCC
 AGTCTGATTATCAGACCGACGATACGAGTGGGACCGTGGTCCCAGACTAATAATCAGACCGACGATACGAGTG
 GGACCGTGGTCCCAGACTAATAATCAGACCGACGATACGAGTGGGACCGTGGTCCCAGTCTGATTATCAGACC
 GACGATACAAGTGGAACAGTGGGCCAGAGAGAATATTCAAGGCCAGTTATGCTTCTGGCTGTAACAAAGGA
 CATTAAGTAAAGACAGATAACGTAGACTAAACGTGGTGCATCAGGGTGTGGCTTTCAAGTTCTTAAG
 AATGGCCTCAATTCTCTATACACTCAGTTGAAACACGGGACCTGTCAGGTTAACGACCAATTATCGCCC
 TTATACAATACTGTCGCTCCAGGAGCAAACGTGATGTCGTGAGCTTAAACTAGTTCTGATGCAAGATGACGTTT
 TAAGCACAGAAGTAAAAGAGTGTAAACTTCTCAGCTCAAATATCACCCCAGCTTTCTGCTCATGAAG
 GTTAGATGCCTGCTGTTAAGTAATTCTCTTATCTGTAAGGCTTTGAAGTGCATCACCTGACCGGGCA
 GATAGTTCACCGGGGTGAGAAAAAGAGCAACAACGTGATTTAGGCAATTGGCGGTGTTGATACAGCGGGTAA
 TAATCTTACGTGAAATATTTCCGCATCAGCCAGCGCAGAAATATTCAGCAAAATTCTGCAATCGGCT
 TGCATAACGCTGACCACGTTATAAGCACTTGTGGGATAATCGTACCCAACTGGATAATGCAGCCATC
 TGCTCATCATCCAGCTGCCAACAGAACACGATAATCACTTCGGTAAGTGCAGCAGCTTACGACGGCGAC
 TCCCACCGCAATTCTATGACACCAGATACTCTGACCGAACGCGTCTGGTCAGCTCATTACCTGACCATACCGA
 AGAAGGGATGAGATCATCCAGTGCCTCAGTAACCAGCTCCTGGTCAGCTCATTACCTGACCATACCGA
 GAGGTCTCTAACACTATCACCCGGAGCACTCAAGAGTAAACTTCACATCCCAGCACATACAGGCAAAG
 TAATGGCATTACCGCGAGCCATTACTCCTACCGCGCAATTACGAATCCACCATCGGGCAGCTGGTGTGCA
 TAACGAAGTATCTCAACCGGTTGAGTATTGAGCGTATGTTGGAAATAACAGGCGCACGCTCATTATCTAA
 TCTCCACCGTGGTTAACGACGATCGAAAATTTCATTGAGACAGGTTCCAAATAGAAAGAGCATTCT
 CCAGGCACCAGTTGAAGAGCGTTGATCAATGGCTGTTCAAAAACAGTTCTCATCCGGATCTGACCTTACCA
 ACTTCATCCGTTACGTACAACATTAGAACCATGCTCCCCAGGCATCCGAATTGCTCCTCCATCC
 ACGGGACTGAGAGCATTACTATTGCTGATTGGTAAGCAAATACGTACATCAGGCTCGAACCCCTTAAG
 ATCAACGTTCTGAGCAGATCAGAACGATATCGAAAACGTGAGTGCAGGAGGTGAGTCAAACAAACTCAGCA
 GGCCTGGAAACAATCAGCACATCAGCAGCACATACGACATTAATCGTCCGATACCCAGGTTAGGCGCGTGT
 CAATAACTATGACATCATGAGCAACAGTTCAATGCCAGTCCGAGCATCAGGTGGATCGGTGGGG
 CAGTTACCTCATCAAATTGCCATTAAACTCAGTTCAATACGGTGCAGAGCCAGACAGGAAGGAATAATG
 TCAAGCCCCGGCCAGCAAGTGGCTTATTGCTAAGTGCACATCGTCTTTCCCAAGATAGAAAGGCAGGA
 GAGTGTCTCTGCTGATGAATATGAAGATCTGGTACCCATCGTGATACATTGAGGCTGTTCCCTGGGGTGT
 ACCTTCACCGAGCAAACACGTAGCCCCCTCAGAGCCAGATCTGAGCAAGATGAAACAGAAACTGAGGTTTG
 TAAACGCCACTTATGGCAGCAACCCGATCACCCTGGAAATAACGTCTCAGCACGTGCAATCGCGTAC
 CAAACACATCAGCATATGATTAATTGTTCAATTGTATAACCAACACGTTGCTCAACCGTCTCGAATTTC
 CATATCCGGGTGCGGTAGTCGCCCTGCTTCTCGGCATCTGTGATAGCCTGAGAAGAAACCCAACTAAATCC
 GCTGCTCACCTATTCTCAGCGCCGGTTATTTCCTCGCTCCGGCTGTATCATTAAACTGTGCAATGG

FIGURA 13 (CONTINÚA) - SEQ ID NO 7 (CONTINÚA)

CGATAGCCTCGTCATTCATGACCAGCGTTATGCACTGGTTAAGTGTTCATGAGTTCATCTGAACAT
 CCTTTAACATTGCTTGCCTTTTTATTAAATCTGCAATTACTGCAAAGCAACAACAAAATCGAAAGT
 CATCAAAAAACCGCAAAGTGTAAATAAGAGCAACACTACAAAGGAGATAAGAAGAGCACATACCTCAG
 TCACCTATTACTAGCGCTCGCCGCAGCGTGTAAACCGAGCATAGCGAGCGAACTGGCGAGGAAGCAAAGA
 AGAACTGTTCTGTCAGATAGCTTACGCTCAGCGCAAGAAGAAATATCCACCGTGGGAAAACCTCCAGGTAG
 AGGTACACACCGGGATAGCCAATTAGAGTAATAAACTGTGATAATCAACCTCATCAATGATGACGAACATAA
 CCCCCGATATCAGGTACATGACGAAGGGAAAGAGAAGGAAATCAACTGTGACAAACTGCCCTCAAATTGGC
 TTCCCTAAAATTACAGTTCAAAAGTATGAGAAAATCCATGCAAGGCTGAAGGAAACAGCAAAACTGTGACAA
 ATTACCCTAGTAGGTACAGAACAAATGTGACGAACCACCCCAAATCTGTGACAGATAACCCAGACTATCC
 TGTCGTATGGAAGTGTATCGCGAAGGAAATACGATATGAGTCGCTGGCGGCCCTTCTTTCTCAATG
 TATGAGAGGCGCATTGGAGTTCTGCTGTTGATCTCATTAACACAGACCTGCAGGAAGCGCGCGGAAGTCAG
 GCATACGCTGGTAACCTTGAGGCAGCTGGTAACGCTCTATGATCCAGTCGATTTCAAGAGACGATGCTG
 GCCATCCGGCTTACGATACTGACACAGGGATTCTGTATAACCGCATGGCATACTGGATTGGTATTCTTGTT
 TCACTAAGCGAAACTGCGTAAACCGGTTCTGTAAACCGATAAAAGAAGGAAATGAGATATGGTTGATATGTA
 CACTGTAAGCCCTCTGGATGGACTGTGGCACGTTGATAAAACCAAGGAAAAGATTCAAGCCTTTTCATC
 GCCGGCATCCTCTTCAGGGCGATAAAAACCACCTCCTCCCCGCAAACCTTCAATGCCCTGCCGTATATCC
 TTACTGGCTTCCGAGGGTCAATCGAATATTTCAGCATATTAGCAACATGGATCTGCAGATAACCGTCAT
 GTTCCCTGTAGGGTGCATCAGATTCTGATCTGGTCAACGAACAGATAACAGCATACTGGTTGATCCGGGA
 GAGACTATATGCCCTCAGTAGGGTCTGAGGTGTTGACTGGACGATCGCGGCCATTTCAGTTCTGTGATTG
 ATAACCGCTTTCCGCCATGACAGATCCATGTGAGGTGTGACAAGTTTAGATTGTCACACTAAATAAAA
 AGAGTCAATAAGCAGGGATAACTTGTGAAAAAACAGCTTCTGAGGGCAATTGTCACAGGGTTAAGGGC
 AATTGTCACAGACAGGACTGTCAATTGAGGGTGTGATTCAGACTGAAAGGGCAATTGTCACAACACCTTC
 TCTAGAACAGCATGGATAAAGGCCATAAGGCCTCAAAGGCCTCTAAAGAAGATCTAAAACATAAAAAAATAAT
 TATAAAATATCCCCGTGGATAAGTGGATAACCCCAAGGGAAAGTTTCAGGCATCGTGTGTAAGCAGAATA
 TATAAGTGTGTTCCCTGGTCTTCTCGCTCACTGACCGGGAGGGTTCAGAGAAGGGGGGCCACCCCCCTTC
 GGCGTGCAGGGTCAAGCGCACAGGGCGAGCCCTGGTAAAAACAAGGTTATAAAATATTGGTTAAAAGCAG
 GTTAAAAGACAGGTTAGCGGTGGCCGAAAAACGGCGGAAACCCCTGCAAATGCTGGATTCTGCCGTGGA
 CAGCCCCCTCAAATGTCATAAGTGCAGCCCTCATCTGTCAAGTGTCAAATACCGCAGGGACTTATCCCAGG
 CTGTCAGTCAGTAGTCGCCCTCAAGTGTCAAATACCGCAGGGACTTATCCCAGGCTGTCACATCA
 TCTGTGGAAACTCGCGTAAATCAGGGTTTCGCCGATTGCGAGGCTGCCAGCTCCACGTCGCCGGCG
 AAATCGAGCCTGCCCTCATCTGTCAACGCCGCCGGGTGAGTCGGCCCTCAAGTGTCAAAGTCGCC
 CATCTGTCAAGTGCAGGGCAAGTTTCCCGAGGTATCCACAACGCCGGGCCGGCGGTGTCTGCCACAC
 GGCTTCGACGGCGTTCTGGCGCTTGCAGGGCATAGACGGCCGCCAGCCAGGGCGAGGGCAACCAGCC
 GAGGGCTCGCCCTGTCGCTGACTGCCGAGCACTACTGGCTGAAAGGACAGACCACATCGTGT
 TGTTCAATTAGGTTGTTCTGTCATTGTCGACATAATCCGCTTCACTTCAGCTAACGTAACACCGCAG
 GAAGATTCTATTGTTCTGTCAGGATCTCATGACAGAAACACTACTTCCTAT
 AACGCTACACAGGCTCTGAGATAATAATGCCGATCTACGATAATGGGAGATTTCAGGACTGTTCTG
 TCGCTTCAGTGGATAACAGCCAGCTCTGTTAACAGACAAAACAGCATATCCACTCAGTCCACATT
 TCCATATAAAGGCCAAGGCATTATTCTCAGGATAATTGTTCACTGCATCGCAACCGCATCAGACTCCGG
 GCAAACATGCACCCGGTGCCGGCAGCCACATCCAGCGCAAAACCTCGTAGACTCCGTTGAACTGATGG
 ACTTATGTCCTCAGGCTTGCAGAACCTTCAGCGGTATACCGGCATACAGCATGTCATCGCATAGGAATG
 GCGGAACGTATGTTGACCGGAACAGAGAACGTCACACCGTCAGCAGCAGCGGGCAACCGCCTCCCC
 ATCCAGGTCTGACCGTTCTGTCGTCACTTCCAGATCCCGCTTCTGTGTCCTCTGTGCGACGGTTAC
 GCGCTCCATGAGCTTATCGCGAATAAAACCTGTGACGGAGATCAGTCAGGAAATAAAATCCTGGT
 TCCCTGTTGATACCGGGAAAGCCCTGGCCAACCTTTGGCAAAATGAGACGTTGATCGGCACGTAAGAGG
 TCAACTTCAACCATAATGAAATAAGATCACTACCGGGCTATTGAGTTATCGAGATTTCAGGAGCTAAG

FIGURA 13 (CONTINÚA) - SEQ ID NO 7 (CONTINÚA)

GAAGCTAAATGGAGAAAAAAACTGGATATACCACCGTTGATATATCCCAATGGCATCGTAAAGAACATT
TTGAGGCATTCAGTCAGTGCTCAATGTACCTATAACCAGACCGTTCAGCTGGATATTACGGCTTTTAAA
GACCGTAAAGAAAAATAAGCACAAGTTTATCCGGCCTTATTCACATTCTTGCCTGCTGATGAATGCTCAT
CCGGAATTCGTATGGCAATGAAAGACGGTGAGCTGGTATGGATAGTGTTCACCCCTGTTACACCGTT
TCCATGAGCAAACGTAAACGTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTCCGGCAGTTCTACACAT
ATATTCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTAAAAACCTGGCTATTCCTAAAGGGTTATTGAGAATATGTTT
TTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTCACCAAGTTGATTAAACGTGCCAATATGGACAACCTCTCG
CCCCCGTTTCACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGCACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCATTAGGTTCA
TCATGCCGTTGTGATGGCTCCATGCGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAG
GGCGGGGCGTAATTTTAAGGCAGTTATTGGTGCCTAAACGCCCTGGTGTACGCCGAATAAGTGATA
ATAAGCGGATGAATGGCAGAAATTGATGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTGGTCGACCCGTGGAATGTG
GTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTC
AGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTC
GCAACCATAGTCCCCTAACTCCGCCATCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCCGCCATTCTCCGCC
ATGGCTGACTAATTTTTTATTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTC

SEQ ID NO 7 (CONTINÚA)

FIGURA 13 (CONTINÚA)