

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 354 785**

21 Número de solicitud: 201001193

51 Int. Cl.:

C12Q 1/70 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

C12R 1/92 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **30.09.2010**

30 Prioridad: **30.09.2008 ES 200802766**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **18.03.2011**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
18.03.2011

62 Número de la solicitud inicial: **P 200802766**

71 Solicitante/s:
**Universidade de Santiago de Compostela
Edificio EMPRENDIA - Campus Vida
15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES
NANOGAP**

72 Inventor/es: **Regueiro García, Benito José**

74 Agente: **No consta**

54 Título: **Método de evaluación de resistencia de fenotipos de VIH-1 a antirretrovirales.**

57 Resumen:

Método de evaluación de resistencia de fenotipos de VIH-1 a antirretrovirales.

En la presente invención se provee un método de análisis de la resistencia fenotípica de VIH-1 de muestras clínicas a antirretrovirales. El método hace uso de plásmidos en los que se han creado mutaciones que generan sitios únicos de secuencia original, de modo que permite la clonación de fragmentos progresivamente mayores del gen *pol* y/o del gen que codifica para la proteasa del virus VIH procedentes de pacientes en estos plásmidos, y por tanto proporciona un modelo capaz de caracterizar los genes y las subregiones genómicas de VIH-1 implicadas en la resistencia a antirretrovirales.

ES 2 354 785 A1

DESCRIPCIÓN

Método de evaluación de resistencia de fenotipos de VIH-1 a antirretrovirales.

5 En la presente invención se provee un método de análisis de la resistencia fenotípica de VIH-1 de muestras clínicas a antirretrovirales. El método hace uso de plásmidos en los que se han creado mutaciones que generan sitios únicos de restricción en posiciones sucesivas del gen *pol* del virus VIH-1, siendo la expresión de aminoácidos idéntica a la de la secuencia original, de modo que permite la clonación de fragmentos progresivamente mayores del gen *pol* y/o del gen que codifica para la proteasa del virus VIH procedentes de pacientes en estos plásmidos, y por tanto proporciona un modelo capaz de caracterizar los genes y las subregiones genómicas de VIH-1 implicadas en la resistencia a antirretrovirales.

Estado de la técnica anterior

15 El método objeto de la presente invención constituye un sistema alternativo para analizar la resistencia fenotípica de VIH-1 de muestras clínicas a antirretrovirales, cuya eficacia se muestra en el correspondiente ejemplo.

Aunque el virus VIH tipo NL4.3 ha sido usado para la evaluación fenotípica de resistencias de VIH a los antirretrovirales, los sistemas comerciales y experimentales similares al que se presenta en esta invención, no son capaces de facilitar la discriminación en la aportación de diferentes regiones de los fragmentos clonados en la resistencia de diversos fenotipos de VIH a antirretrovirales. Por tanto, se provee de un modelo capaz de caracterizar los genes y las subregiones genómicas de VIH-1 implicadas en la resistencia a antirretrovirales. Con ello se permite la clonación y el estudio de fragmentos progresivamente más largos del mismo gen, con lo que se puede determinar la aportación de las porciones diferentes del espacio de secuencia correspondiente al gen *pol*, usando cada una de las construcciones tras pseudotiparlas con la secuencia correspondiente del paciente en la valoración de la resistencia a los antirretrovirales.

Las regiones de la proteasa y de la retrotranscriptasa son reguladoras de la actividad del virus VIH-1 en etapas clave del proceso de infección y, por tanto, fundamentales para el éxito de la integración del ADN viral en el ADN del huésped. La proteasa actúa cortando unidades de las proteínas Gag, Pol y de la Gag-Pol. La retrotranscriptasa tiene la función de sintetizar el ADN de doble cadena del provirus usando como patrón la cadena singular del ARN viral; es una ADN-polimerasa que actúa como dependiente del ARN. Una parte de los fármacos empleados para evitar la progresión del ciclo vital del virus VIH son inhibidores de la función de estos genes, así pues, los pseudotipos virales construidos usando secuencias de los genes de los virus aislados en los pacientes en las construcciones descritas en la presente invención, permiten valorar el comportamiento *in vivo* de estos fármacos en la infección por VIH en experimentos de inhibición de la infección usando concentraciones crecientes de antirretrovirales.

Explicación de la invención

40 El método de la presente invención hace uso de cuatro plásmidos en los que se han creado mutaciones dirigidas al tercer nucleótido del codón sin cambio en la traducción de una secuencia original, para la valoración de la resistencia fenotípica de VIH-1 a antirretrovirales, es decir, el análisis fenotípico de resistencias VIH que permite valorar el "fitness" genético del virus o el papel de mutaciones compensatorias al usar secuencias más largas de la que habitualmente se usa en este tipo de análisis con NL4.3, que es la integración en el vector del fragmento *ApaI-PinA1*.

Las cuatro construcciones están basadas en un virus VIH tipo NL4.3 (Adachi *et al.*, 1986. *J. Virol.* 59:284-291.) *NIH AIDS Reagent Reference Program* (Cat. Num.: 144.), en las que se han creado mutaciones dirigidas al tercer nucleótido del codón, de forma que, siendo la expresión de aminoácidos idéntica a la de la secuencia original, se generan sitios únicos de restricción en posiciones sucesivas del gen *pol* del virus VIH-1. Mediante este sistema es posible obtener ácidos nucleicos con cuatro polimorfismos de un solo nucleótido (de las siglas en inglés SNP, *Single nucleotide polymorphism*) y además, al tener secuencias conocidas, podemos obtener la construcción como ADN lineales (por corte en lugares únicos comunes como *ApaI*) o circulares. Alternativamente puede obtenerse por transfección con Calphos™ (Invitrogen) en células empaquetadoras (por ejemplo, células 293T/17), viriones VIH infecciosos que puedan usarse como origen de ARNs o como herramienta para la infección experimental "*in vivo*" y la posible valoración de la capacidad inhibitoria de los antirretrovirales. Por tanto, una aplicación clínica o de desarrollo con las construcciones mencionadas es la evaluación de la resistencia de los diferentes fenotipos de VIH-1 a antirretrovirales comerciales o en vías de ensayo.

El método de construcción de los plásmidos consistió en amplificar la región de ADN del VIH-1 correspondiente al gen *pol* contenida en el plásmido pNL4.3 mediante los cebadores SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, clonar la región amplificada en un vector de expresión, realizar mutagénesis dirigidas independientes en el vector mediante el empleo de pares de cebadores donde el cebador de selección es SEQ ID NO: 11 y el cebador mutagénico se selecciona de la lista que comprende SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10 (de modo que se generaron sitios únicos de restricción en posiciones sucesivas del gen *pol* del virus VIH-1), y reclonar de forma independiente cada uno de los 4 fragmentos obtenidos en el vector original pNL4.3, obteniendo los plásmidos de secuencias SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4. (Tras obtener las mutaciones en cada uno de los plásmidos de manera independiente se puede seleccionar el fragmento de ADN comprendido entre los sitios de restricción *ApaI/PflmI* y reclonarlo en el vector original pNL4.3 tras ser digerido previamente con los mismos enzimas de restricción *ApaI* y *PflmI*, en este caso). Por

ES 2 354 785 A1

tanto, el plásmido de que hace uso el método de la presente invención es un plásmido seleccionado de la lista que comprende SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.

5 La secuencia de cada uno de los plásmidos está basada en la del plásmido pNL4.3 que incluye parte de la secuencia del virus VIH-1. Asimismo, también se considera cualquier combinación de los plásmidos de la lista. A continuación describimos las características de las secuencias:

10 SEQ ID NO: 1. Se sustituyó el nucleótido que ocupaba la posición 4243 del plásmido original pNL4.3 correspondiente al gen *pol* que cambió el codón ATA (codifica para el aminoácido isoleucina) por ATC (también codifica para el aminoácido isoleucina), generándose de ese modo un nuevo sitio de restricción *Clal*.

15 SEQ ID NO: 2. Se sustituyó el nucleótido que ocupaba la posición 4403 del plásmido original pNL4.3 correspondiente al gen *pol* que cambió el codón CCA (codifica para el aminoácido prolina) por CCG (también codifica para el aminoácido prolina), generándose de ese modo un nuevo sitio de restricción *XmaI*.

20 SEQ ID NO: 3. Se sustituyeron dos nucleótidos que ocupaban las posiciones 4625 y 4626 del plásmido original pNL4.3 correspondiente al gen *pol* que cambió la secuencia TGGGCG por TGCCCG. Se produjeron dos cambios de aminoácido TGG (codifica para el aminoácido triptófano) por TGC (codifica para el aminoácido cisteína) y GCG (codifica para el aminoácido alanina) por CCG (codifica para el aminoácido prolina), generándose de ese modo un nuevo sitio de restricción *XmaI*.

25 SEQ ID NO: 4. Se sustituyó el nucleótido que ocupaba la posición 4688 del plásmido original pNL4.3 correspondiente al gen *pol* que cambió el codón TCT (codifica para el aminoácido serina) por TCG (también codifica para el aminoácido serina), generándose de ese modo un nuevo sitio de restricción *Clal*.

30 En este aspecto de la invención también se incluyen aquellos plásmidos derivados de los plásmidos SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4. Por plásmidos derivados se entienden aquellos que conservan las mutaciones que los caracterizan y permiten reconocer las enzimas de restricción que se han descrito anteriormente para cada uno de ellos.

35 Un aspecto necesario para aplicar el método de la presente invención es una célula empaquetadora transfectada con cualquiera de los plásmidos de la invención.

40 El término “célula empaquetadora” hace referencia a cualquier célula modificada para expresar los genes correspondientes a las proteínas virales necesarias para que se pueda constituir la partícula viral infectiva a partir de la construcción que se transfecta.

45 El término célula “transformada” o “transfectada” hace referencia a la célula procarionta o eucariota, respectivamente, en la que se ha introducido material genético externo mediante plásmidos, vectores víricos u otras herramientas de transferencia de este tipo de material.

50 Para aplicar el método de la presente invención también es necesario un virión que contiene el ARN codificado por cualquiera de los plásmidos de secuencia SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4. El término “virión” se refiere a la partícula viral infectiva compuesta al menos por:

45 Ácido nucleico vírico: el ácido nucleico es ARN de cadena sencilla.

50 Proteínas víricas: Pueden ser proteínas estructurales como las que forman la cubierta externa o cápside (por ejemplo las proteínas ENV de los plásmidos de la presente invención), o también pueden ser otro tipo de proteínas enzimáticas (por ejemplo POL, VIF, VPR, TAT, etc...).

55 Los viriones de la presente invención se obtienen como consecuencia de la transfección de células empaquetadoras mediante un plásmido caracterizado por las secuencias del primer aspecto de la presente invención. Los viriones son liberados al medio en el que se cultivan las células empaquetadoras transfectadas.

60 Otro aspecto necesario para aplicar el método de la presente invención es una célula *reporter* transfectada con cualquiera de los viriones según el aspecto anterior.

65 El término “célula *reporter*” hace referencia a la célula que contiene un gen foráneo cuya proteína puede ser detectada por la medida de su fluorescencia o cualquier otro gen cuya proteína sea detectable.

Las células que expresan cualquiera de los plásmidos de la invención pueden ser todas aquellas que admitan la replicación de los plásmidos descritos con el objeto de conseguir amplificar el número de copias de cada uno de los citados plásmidos.

Como se ha mencionado anteriormente, los viriones definidos en la presente invención contienen el ARN codificado por la secuencia de los plásmidos SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4. El virión contiene la secuencia del virus VIH-1, compuesto por dos copias de ARN de cadena sencilla (sARN) en las cuales se encuentra la secuencia de la retrotranscriptasa y la proteasa.

ES 2 354 785 A1

En el método de la presente invención, los plásmidos seleccionados de la lista que comprende SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4, o cualquiera de sus combinaciones, pueden emplearse para clonar fragmentos del gen *pol* y de la proteasa del virus VIH-1.

5 En el método de la presente Invención, los fragmentos del gen *pol* y de la proteasa que se clonan en los plásmidos SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4 proceden de muestras aisladas de personas infectadas por el virus VIH. Una vez amplificados los fragmentos procedentes de pacientes infectados, éstos pueden clonarse mediante la linearización por la acción de enzimas de restricción y su posterior ligamiento, es decir, mediante el empleo de técnicas de clonación que forman parte del conocimiento general común. Las enzimas de restricción óptimas para llevar a cabo las clonaciones son los pares de enzimas *ApaI/ClaI* y *ApaI/XmaI* para los plásmidos mutados siempre que se hayan empleado cebadores para amplificar los fragmentos deseados de la secuencia del VIH-1 que contengan las secuencias nucleotídicas reconocidas por las enzimas *ApaI*, *ClaI* y *XmaI*. Estos fragmentos solo pueden clonarse en los plásmidos descritos en la invención. *ApaI* es un sitio único común en todas las construcciones de pNL4.3 ya que aparece en la secuencia original.

15 Por tanto, el plásmido de la invención, o cualquiera de sus combinaciones, los viriones que se obtienen con los plásmidos tal como se ha descrito anteriormente y la célula *reporter*, o cualquiera de sus combinaciones, pueden emplearse para evaluar la resistencia de fenotipos del virus VIH-1 a antirretrovirales.

20 El término “fenotipo” hace referencia a cualquier característica detectable de un organismo (estructural, bioquímica, fisiológica o conductual) determinada por una interacción entre su genotipo y el medio en el que se desarrolla.

25 El término “antirretroviral” hace referencia a una sustancia química o fármaco que es capaz de tratar la infección por el virus VIH. Los antirretrovirales actúan en varias etapas del ciclo vital del virus VIH. Los tipos de antirretrovirales pueden ser: Inhibidores de transcriptasa inversa (inhibidores de transcriptasa análogos de nucleósidos, inhibidores de transcriptasa no análogos de nucleótidos (NNRT) e inhibidores de transcriptasa análogos de nucleótidos (NRT)). Inhibidores de proteasa (IP), inhibidores de la integrasa, inhibidores de fusión, anticuerpos monoclonales dirigidos contra co-receptores, además se pueden usar diversas mezclas de los anteriores, así como potenciadores de su efecto.

30 Las mutaciones que caracterizan a los virus VIH, cuya tasa de replicación es muy elevada y no tienen sistema de reparación genética, pueden provocar cambios en la resistencia de los virus a los diferentes antirretrovirales que existen en la actualidad. La resistencia puede deberse a cambios en algún aminoácido, estructurales o de cualquier otro tipo que puede tener como consecuencia la pérdida de afinidad del antirretroviral por la proteína con la que interactúa.

35 Para evaluar la resistencia de diferentes fenotipos de virus VIH a antirretrovirales mediante el método de la presente invención, es necesaria la clonación, en los plásmidos de secuencia SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4., de los fragmentos del gen que codifica para la polimerasa y/o del gen que codifica para la proteasa del virus VIH presente en los pacientes por medio de su amplificación por PCR mediante el uso de un cebador directo común y diferentes cebadores reversos, incluyendo estos últimos, sitios de restricción correspondientes a cada uno de los sitios obtenidos por mutagénesis dirigida en los plásmidos. Posteriormente, se transfectarían estos plásmidos en una línea celular empaquetadora, se recogerían los viriones liberados, se emplearían los viriones para infectar células *reporter*, y tras añadir un antirretroviral a dichas células se mediría la fluorescencia, dando una idea de la resistencia al antirretroviral en cuestión.

45 Una realización preferida de la invención es un método de evaluación fenotípico de la resistencia de VIH a antirretrovirales que comprende:

- a. recoger muestras biológicas de pacientes infectados por el virus VIH,
- 50 b. extraer el ARN de las muestras del paso (a),
- c. amplificar, mediante RT-PCR, fragmentos del gen que codifica para la polimerasa y/o del gen que codifica para la proteasa del virus VIH del ARN del paso (b) mediante el empleo del cebador directo SEQ ID NO: 12 y el cebador reverso seleccionado de la lista que comprende SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10,
- 55 d. clonar de forma independiente los fragmentos obtenidos en (c), en los plásmidos SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4,
- 60 e. transfectar los plásmidos obtenidos en (d) en una línea celular empaquetadora y recoger los viriones liberados,
- f. infectar células *reporter* con los viriones obtenidos en (e),
- 65 g. añadir un antirretroviral a las células del paso (f) y
- h. medir la fluorescencia, calculando la IC₅₀.

ES 2 354 785 A1

Por el término “muestra biológica” se entiende aquella muestra que procede de un fluido fisiológico como sangre, plasma, suero u orina y/o cualquier tejido celular procedente de un organismo vivo. Queda claro por tanto que se trata de una muestra biológica aislada del organismo vivo.

5 La técnica de la RT-PCR consigue amplificar el ADN codificante de los genes deseados mediante el empleo de cualquier enzima (retrotranscriptasa; RT o transcriptasa reversa) que utiliza el ARNm aislado de las muestras descritas y un cebador reverso seleccionado de la lista que comprende SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10. El cebador conocido como reverso de cada uno de los pares descritos anteriormente hará de iniciador para obtener el ADN de cadena simple o monocatenario complementario a la secuencia de ARNm transcrita.

10 El siguiente paso es la obtención de fragmentos de ADN de doble cadena amplificados mediante PCR (de las siglas en inglés *Polimerase Chain Reaction*) utilizando como molde el ADN codificante obtenido mediante la reacción de retrotranscripción y los pares de cebadores directo/reverso siguientes: el cebador directo es SEQ ID NO: 12 y el cebador reverso se selecciona de la lista que comprende SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10. Además, para la síntesis del ADN es necesaria la presencia de nucleótidos dNTPs, es decir, dATP, dTTP, dCTP y dGTP, ADN polimerasa termoresistente, cloruro de magnesio en una concentración determinada así como tampones que creen las condiciones físico-químicas adecuadas para el funcionamiento de todos los componentes y se consiga con ello la amplificación.

20 La clonación de los fragmentos obtenidos en el paso (c) en los plásmidos de la invención se puede llevar a cabo mediante los enzimas de restricción *ApaI* y *Clal* o *XmaI*.

Tras la selección de los viriones liberados al medio por las células empaquetadoras puede emplearse un paso intermedio; la titulación de los viriones del paso (d) por medio de la infección de una línea celular capaz de formar sincitios. Las células formadoras de sincitios que pueden ser empleadas para llevar a cabo la titulación son células MT-2 o cualquier otra línea celular capaz de formar sincitios. La formación de sincitios es el efecto citopático de VIH en algunas líneas celulares y consiste en la formación de acúmulos celulares que pierden el papel de separación que tiene la membrana externa de forma que aparecen grandes células llenas de núcleos. La titulación tal como se entiende en la presente invención es la determinación de la dilución del sobrenadante con viriones y su capacidad infectiva relativa. La titulación puede llevarse a cabo de forma alternativa valorando la presencia de la proteína p24 (que es sintetizada si el virión es infectivo).

El antirretroviral añadido a las células del paso (f) se selecciona de la lista disponible que en la actualidad comprendería zidovudina, didanosina, zalcitabina, estavudina, lamivudina, abacavir, emtricitabina, nevirapina, delavirdina, efavirenz, tenofovir, disoproxil fumarato, saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir, amprenavir, lopinavir, atazanavir, fosamprenavir, tipranavir, darunavir, enfuvirtida, maraviroc, raltegravir, elvitegravir o cualquier otro inhibidor de transcriptasa inversa (inhibidor de transcriptasa análogo de nucleósidos, inhibidor de transcriptasa no análogo de nucleósidos e inhibidor de transcriptasa análogo de nucleótidos), Inhibidor de proteasa, inhibidor de la integrasa, inhibidor de fusión, anticuerpos monoclonales dirigidos contra co-receptores o potenciadores de su efecto además de mezclas de los anteriores.

La medida de fluorescencia emitida es debida a la activación de la expresión del gen *reporter* GFP dirigido por el promotor LTR que reconoce el virus VIH-1, al ser activado por la presencia del transactivador Tat, producido durante la infección de la célula con el virión infeccioso. La medida de la fluorescencia puede servir para calcular la IC₅₀. La IC₅₀ es la medida de la efectividad de un compuesto (en este caso antirretroviral) en su proceso de inhibición biológica o de una función bioquímica. Por tanto, el IC₅₀ representa la concentración de un compuesto que es necesaria para la inhibición de la replicación viral *in vitro* en un 50%.

En una realización más preferida del método anterior, la célula empaquetadora es 293-T y las células *reporter* son CEM-GFP.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

60 Fig 1. Muestra el mapa genético del plásmido pNLA.3 CLA 4254 definido por la secuencia SEQ ID NO: 1.

En el mapa se muestra la posición relativa de los genes *gag* (GAG), *pol* (POL), *env* (ENV) y otros fragmentos (LTR; *Long Terminal Repeat*, pUC18; fragmento procedente del vector pUC18,...) así como los sitios de restricción más comunes para llevar a cabo cortes por enzimas de restricción. También se muestra la posición de la mutación que da lugar a este plásmido, en el nucleótido que ocupa la posición 4254.

ES 2 354 785 A1

Fig 2. Muestra el mapa genético del plásmido pNL4.3 XMA 4411 definido por la secuencia SEQ ID NO: 2.

5 En el mapa se muestra la posición relativa de los genes *gag* (GAG), *pol* (POL), *env* (ENV) y otros fragmentos (LTR; *Long Terminal Repeat*, pUC18; fragmento procedente del vector pUC18,...) así como los sitios de restricción más comunes para llevar a cabo cortes por enzimas de restricción. También se muestra la posición de la mutación que da lugar a este plásmido, en el nucleótido que ocupa la posición 4411.

10 Fig 3. Muestra el mapa genético del plásmido pNL4.3 XMA 4634 definido por la secuencia SEQ ID NO: 3.

10 En el mapa se muestra la posición relativa de los genes *gag* (GAG), *pol* (POL), *env* (ENV) y otros fragmentos (LTR; *Long Terminal Repeat*, pUC18; fragmento procedente del vector pUC18,...) así como los sitios de restricción más comunes para llevar a cabo cortes por enzimas de restricción. También se muestra la posición de la mutación que da lugar a este plásmido, en el nucleótido que ocupa la posición 4634.

15 Fig 4. Muestra el mapa genético del plásmido pNL4.3 CLA 4696 definido por la secuencia SEQ ID NO: 4.

20 En el mapa se muestra la posición relativa de los genes *gag* (GAG), *pol* (POL), *env* (ENV) y otros fragmentos (LTR; *Long Terminal Repeat*, pUC18; fragmento procedente del vector pUC18,...) así como los sitios de restricción más comunes para llevar a cabo cortes por enzimas de restricción. También se muestra la posición de la mutación que da lugar a este plásmido, en el nucleótido que ocupa la posición 4696.

25 Fig 5. Muestra el patrón de migración en gel de agarosa de los diferentes fragmentos diferenciales de los plásmidos definidos por las secuencias SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4.

30 Patrón electroforético de los cortes de los plásmidos con enzimas de restricción: (A) Control PM, (B) pNL4.3 cortado con *ApaI* y *PvuII* (fragmento 1480 bp), (C) pNL4.3 C4254 (SEQ ID NO: 1) cortado con *ApaI* y *ClaI* (fragmento 2248 bp), (D) pNL4.3 X4411 (SEQ ID NO: 2) cortado con *ApaI* y *XmaI* (fragmento 2405 bp), (E) pNL4.3 X4634 (SEQ ID NO: 3) cortado con *ApaI* y *XmaI* (fragmento 2628 bp) y (F) pNL4.3 X4696 (SEQ ID NO: 4) cortado con *ApaI* y *ClaI* (fragmento 2690 bp).

35 Fig 6. Muestra los pasos del análisis fenotípico de resistencias de VIH-1 a antirretrovirales.

En esta figura se muestra el esquema de los procesos llevados a cabo para evaluar la resistencia de los diferentes virus VIH-1 a antirretrovirales.

40 El plásmido construido se transfecta en células 293T/17. Los viriones infecciosos con el fragmento del gen *pol* se titulan en células MT2 formadoras de sinticios y, a continuación, se infectan células CEM-GFP para que pueda medirse el nivel de fluorescencia emitida tras añadir fármacos antirretrovirales.

45 Fig 7. Muestra un ejemplo demostrativo de las curvas de inhibición de las células CEM-GFP infectadas con SEQ ID NO: 1 respecto de las infectadas con pNL4.3 (control) cuando son tratadas con el antirretroviral INDINAVIR.

NL4.3 con la mutación 4254 hace referencia a SEQ ID NO: 1.

50 Fig 8. Muestra un ejemplo demostrativo de las curvas de inhibición de las células CEM-GFP infectadas con SEQ ID NO: 2 respecto de las infectadas con pNL4.3 (control) cuando son tratadas con un antirretroviral INDINAVIR.

NL4.3 con la mutación 4411 hace referencia a SEQ ID NO: 2.

55 Fig 9. Muestra un ejemplo demostrativo de las curvas de inhibición de las células CEM-GFP infectadas con SEQ ID NO: 4 respecto de las infectadas con pNL4.3 (control) cuando son tratadas con un antirretroviral INDINAVIR.

60 NL4.3 con la mutación 4696 hace referencia a SEQ ID NO: 4.

Ejemplos

65 A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores que describen la obtención de los nuevos plásmidos y su ensayo en la evaluación de los sistemas de extracción de ácidos nucleicos así como en la evaluación de su resistencia a antirretrovirales.

ES 2 354 785 A1

Ejemplo 1

Construcción de los cuatro plásmidos (pseudotipos) por mutación dirigida

5 Las construcciones se crearon con mutaciones dirigidas a un sitio concreto en el gen *pol* del virus VIH-1.

Para ello, la región del pNL4.3 entre los lugares de secuencia 1548 y 5979 se amplificó con el cebador directo SEQ ID NO: 5 y con el cebador reverso SEQ ID NO: 6. Ambos corresponden a porciones de secuencia en el gen *pol*, se usó con este propósito polimerasa de alta fidelidad (*Expand high fidelity PCR System*). El fragmento amplificado se clonó en el vector TOPO TA (Invitrogen). Una vez probada la correcta orientación de los insertos realizados se procedió a llevar a cabo cuatro de mutagénesis dirigidas individuales (*Transformer Site-Directed Mutagénesis Kit (Clontech)*) usando los cuatro cebadores para mutagénesis siguientes: SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10.

15 Se utilizó otro cebador para selección que incluye el sitio de restricción *NcoI* definida por la secuencia SEQ ID NO: 11. Tras obtener las mutaciones se cortó el fragmento, *ApaI/PflmI* que incluye cada mutación y se reinsertó en el fragmento correspondiente obtenido en pNL4.3, de esta forma se obtuvieron los cuatro plásmidos mutados.

Los cuatro plásmidos que se obtuvieron tras el proceso de mutagénesis dirigida fueron:

20 - SEQ ID NO: 1 (pNL4.3 CLA 4254) (Fig 1): Se substituyó el nucleótido que ocupaba la posición 4243 del plásmido original pNL4.3 correspondiente al gen *pol* que cambió el codón ATA (codifica para el aminoácido isoleucina) por ATC (también codifica para el aminoácido isoleucina), generándose de ese modo un nuevo sitio de restricción *ClaI*. El fragmento generado va desde la posición que ocupa el sitio de restricción *ApaI* a *ClaI* con un tamaño de 2248 pb.

25 - SEQ ID NO: 2 (pNL4.3 XMA 4411) (Fig 2): Se substituyó el nucleótido que ocupaba la posición 4403 del plásmido original pNL4.3 correspondiente al gen *pol* que cambió el codón CCA (codifica para el aminoácido prolina) por CCG (también codifica para el aminoácido prolina), generándose de ese modo un nuevo sitio de restricción *XmaI*. El fragmento generado va desde la posición que ocupa el sitio de restricción *ApaI* a *XmaI* con un tamaño de 2405 pb.

30 - SEQ ID NO: 3 (pNL4.3 XMA 4634) (Fig 3): Se substituyeron dos nucleótidos que ocupaban las posiciones 4625 y 4626 del plásmido original pNL4.3 correspondiente al gen *pol* que cambió la secuencia TGGGCG por TGCCCG. Se produjeron dos cambios de aminoácido TGG (codifica para el aminoácido triptófano) por TGC (codifica para el aminoácido cisteína) y GCG (codifica para el aminoácido alanina) por CCG (codifica para el aminoácido prolina), generándose de ese modo un nuevo sitio de restricción *XmaI*. El fragmento generado va desde la posición que ocupa el sitio de restricción *ApaI* a *XmaI* con un tamaño de 2628 pb. El virus producido resultó no infeccioso e incapaz de producir sinticios, por tanto, puede ser considerado como control negativo.

35 - SEQ ID NO: 4 (pNL4.3 CLA 4696) (Fig 4): Se substituyó el nucleótido que ocupaba la posición 4688 del plásmido original pNL4.3 correspondiente al gen *pol* que cambió el codón TCT (codifica para el aminoácido serina) por TCG (también codifica para el aminoácido serina), generándose de ese modo un nuevo sitio de restricción *ClaI*. El fragmento generado va desde la posición que ocupa el sitio de restricción *ApaI* a *ClaI* con un tamaño de 2690 pb.

45 El control de las mutaciones se llevó a cabo mediante digestión de los plásmidos con las enzimas de restricción apropiadas así como mediante la secuenciación de las construcciones. En la columna 1 de la Fig 5 se muestra el patrón de bandas de un ADN control cuyo tamaño de banda (nº de pares de bases) es conocido y por tanto, sirve de referencia para determinar el tamaño de las bandas obtenidas tras la digestión de cada uno de los plásmidos construidos. En el resto de columnas se muestran dos bandas correspondientes a ADN lineal obtenido mediante corte por digestión de los enzimas de restricción *ApaI/Pim AI*, *ApaI/ClaI*, *ApaI/XmaI*, *ApaI/XmaI* y *ApaI/ClaI* que proceden de los plásmidos pNL4.3 (plásmido original), p4254 (SEQ ID NO: 1), p4411 (SEQ ID NO: 2), p4634 (SEQ ID NO: 3) y p4696 (SEQ ID NO: 4), respectivamente. La banda más grande (migra más lentamente), correspondiente a cada uno de los plásmidos, pertenece a la mayor parte del ADN del plásmido y las bandas más pequeñas (migran más lentamente) pertenecen al ADN de parte del gen *gag* y *pol* del virus VIH-1.

55 Ejemplo 2

Clonación de fragmentos del gen pol del virus VIH-1 de pacientes infectados

60 Mediante el empleo de la técnica de amplificación por RT-PCRs se obtuvieron fragmentos del gen *pol* del virus VIH-1 de pacientes infectados. Se usaron los pares de cebadores SEQ ID NO: 12 (cebador directo con el sitio de restricción *ApaI*) y SEQ ID NO: 7 (cebador reverso con el sitio de restricción *ClaI*), SEQ ID NO: 8 (cebador reverso con el sitio de restricción *XmaI*), SEQ ID NO: 9 (cebador reverso con el sitio de restricción *XmaI*) o SEQ ID NO: 10 (cebador reverso con el sitio de restricción *ClaI*).

65 Los cebadores fueron diseñados con la ayuda del programa *Primer3 Output* (<http://www-genome.wi.mit.edu>) incluyendo el sitio de restricción de *ApaI* en el cebador directo y el *XmaI/ClaI* en cada cebador reverso, necesarios para el posterior ligamiento de los fragmentos de *ApaI-XmaI/ClaI* del paciente en cada uno de los cuatro plásmidos generados.

ES 2 354 785 A1

Es decir, se generaron cuatro alternativas viables para la construcción de virus para el análisis de resistencias fenotípicas con fragmentos más largos que los tradicionalmente usados *Apa I-PinAI*.

5 Ejemplo 3

Análisis de la resistencia de fenotipos de VIH-1 a antirretrovirales

Experimento I

10 Para construir un sistema de valoración fenotípica de la infección del VIH-1, que ampliase las posibilidades de pseudotipado del virus VIH-1 con el fragmento de la región *gag-pol* estudiada actualmente (*ApaI*2010-*PinAI*3486 = 1476 pb), fueron introducidas en el gen *pol* cuatro mutaciones mediante mutagénesis dirigida de manera que se formaran cuatro nuevos sitios de reconocimiento para enzimas de restricción (dos sitios para *ClaI* y dos para *XmaI*).
 15 De este modo se amplían los posibles fragmentos genéticos a estudiar en los virus recombinados a 2248, 2405, 2628 y 2690 pb hasta abarcar toda la región de la proteasa y de la retrotranscriptasa.

Las mutaciones se realizaron en el vector pNL4.3, tras lo cual cada uno fue transfectado mediante fosfato cálcico en la línea celular empaquetadora 293-T. 48-72 horas post-transfección se cosecharon los sobrenadantes que contenían los viriones liberados al medio y se titularon por el método de formación de sincitios en la línea celular MT-2. En este punto conviene recordar que el virus que incluye el plásmido definido por SEQ ID NO: 3 (pNL4.3X4634) (Fig 3) resultó no infeccioso e incapaz de producir sincitios, por tanto, puede ser considerado como control negativo. Se utilizaron inóculos virales de 5×10^5 dosis infectivas/ml para infectar células reporter CEM-GFP. Los ensayos de infección *in vitro* se optimizaron y protocolizaron para su aplicación en la determinación de la replicación viral (Fig 6).
 20 25

Las células CEM-GFP son células T humanas que contienen un promotor LTR (*Long Terminal Repeat*) que dirigen la expresión de la proteína “reporter” GFP (*Green Fluorescent Protein*). El promotor LTR tiene una región, *transactivating responsive sequence* (TAR), que reconoce la proteína TAT (Trans-activating proteína). La proteína TAT es liberada al medio extracelular por las células infectadas y es recogida por las células sanas donde activa la replicación del virus VIH induciendo la fosforilación del dominio C-terminal de la ARN polimerasa II. Las células infectadas por el virus VIH (en el caso de esta invención, los plásmidos que contienen la secuencia de los genes *gag-pol* del virus) expresan el gen GFP tanto más cuanto mayor es la infección. De este modo, cuando se añade un antirretroviral después de una infección por VIH, la medida de la expresión del gen GFP variará en base al nivel de resistencia del virus infectado.
 30 35

Las mediciones de los niveles de fluorescencia emitidos por las células en cultivo en cada caso fueron realizadas mediante fluorimetría, procesadas en una hoja de cálculo creada con el programa Excel (Microsoft) y utilizada para el cálculo de las IC 50 que se realizó con el programa GraFit32.
 40

Se ensayaron *in vitro* infecciones del plásmido base pNL4.3, de un plásmido semejante pero con mutaciones que lo hacen resistente a inhibidores de proteasa, pL10R/M46I/L63P/V82T/184V* (L10R), y de los plásmidos de la presente invención, mutados en el gen *pol*. A partir de los resultados obtenidos en estos ensayos se pudo establecer la dinámica de la infección con estos virus y comparar su comportamiento modificando de forma secuencial las características de su gen *pol*.
 45

Tras los primeros resultados, se consiguieron testar las construcciones de la presente invención con los métodos de la empresa VIRCO. Los resultados se presentan en la tabla 1.

TABLA 1

Resultados de las medidas de fluorescencia para cada una de las construcciones (primera columna) cuando se aplican diferentes antirretrovirales. Los antirretrovirales empleados causan disminución en la actividad del virus VIH-1. Se han resaltado en negrita los valores que indican resistencia a los respectivos antirretrovirales

	AZT (NRTI)	Lamivudina (NRTI)	Emtricitabina (NRTI)	Didanosina (NRTI)
	Fenotipado	Fenotipado	Fenotipado	Fenotipado
L10R	0,94± 0,19	0,96± 0,05	1,10± 0,62	0,93± 0,10
rt10R 4245C	1,91± 0,65	1,10± 0,05	1,66± 1,47	1,53± 0,13
rt10R 4411X	1,51± 0,42	0,96± 0,23	1,45± 1,28	1,23± 0,32
rt10R 4696C	0,62± 0,03	0,88± 0,06	1,06± 0,55	0,98± 0,15
rt10R	0,73± 0,35	0,92± 0,28	0,73± 0,05	1,03± 0,49

ES 2 354 785 A1

Apa/PinAI				
NL4.3	1± 0,00	1± 0,00	1± 0,00	1± 0,00
NL4.3 4245C	1,14± 0,67	0,98± 0,27	1,34± 1,31	1,43± 0,84
NL4.3 4411X	0,83± 0,58	1,22± 0,53	0,68± 0,25	1,69± 1,05
NL4.3 4696C	0,89± 0,19	1,23± 0,06	1,43± 1,34	1,07± 0,23
rt4.3 4245C	1,16± 0,53	1,06± 0,29	1,62± 1,05	1,22± 0,37
rt4.3 4411X	1,08± 0,18	1,45± 0,62	0,91± 0,30	1,54± 0,48
rt4.3 4696C	0,70± 0,15	0,73± 0,18	0,75± 0,57	0,75± 0,19
rt4.3 Apa/PinAI	1,49± 0,32	1,11± 0,15	1,55± 1,03	1,16± 0,02

	Stavudina (NRTI)	Abacavir (NRTI)	Tenofovir (NTRI)	Efavirenz (NNRTI)
	Fenotipado	Fenotipado	Fenotipado	Fenotipado
L10R	1,14± 0,33	0,95± 0,27	1,09± 0,00	0,85± 0,24
rt10R 4245C	2,07± 1,41	1,70± 0,45	0,93± 0,19	0,90± 0,08
rt10R 4411X	1,60± 0,82	1,40± 0,07	0,82± 0,12	1,43± 0,22
rt10R 4696C	0,87± 0,30	0,83± 0,08	0,63± 0,02	0,69± 0,01
rt10R Apa/PinAI	1,01± 0,77	0,89± 0,34	0,86± 0,31	1,96± 0,93
NL4.3	1± 0,00	1± 0,00	1± 0,00	1± 0,00
NL4.3 4245C	1,01± 0,19	1,31± 0,66	0,92± 0,26	0,91± 0,19
NL4.3 4411X	0,87± 0,41	1,18± 0,08	1,26± 0,56	1,22± 0,74
NL4.3 4696C	1,03± 0,18	0,97± 0,14	0,81± 0,06	0,71± 0,08
rt4.3 4245C	1,03± 0,23	1,14± 0,14	0,91± 0,26	0,98± 0,20
rt4.3 4411X	1,15± 0,29	1,31± 0,26	1,25± 0,10	1,30± 0,14
rt4.3 4696C	0,66± 0,15	0,87± 0,07	0,46± 0,13	0,48± 0,04
rt4.3 Apa/PinAI	1,19± 0,04	1,18± 0,49	0,83± 0,15	1,06± 0,31

	Nevirapina (NNRTI)	Atazanavir (IP)	Indinavir (IP)	Saquinavir (IP)
	Fenotipado	Fenotipado	Fenotipado	Fenotipado
L10R	1,08± 0,13	5,45± 1,86	8,54± 2,88	1,98± 0,40
rt10R 4245C	1,41± 0,08	5,73± 2,00	11,31± 1,61	3,85± 2,99
rt10R 4411X	1,89± 0,29	7,92± 1,62	12,05± 5,13	4,96± 4,35
rt10R 4696C	0,91± 0,62	2,89± 0,44	3,4± 1,92	1,28± 0,66
rt10R Apa/PinAI	1,28± 0,71	4,75± 1,51	8,32± 4,80	2,11± 0,88
NL4.3	1± 0,00	1± 0,00	1± 0,00	1± 0,00
NL4.3 4245C	1,09± 0,20	1,22± 0,64	1,23± 0,04	1,48± 1,00
NL4.3 4411X	1,01± 0,01	1,31± 0,58	0,96± 0,03	0,62± 0,28
NL4.3 4696C	1,04± 0,27	0,93± 0,14	1,07± 0,66	0,83± 0,20
rt4.3 4245C	1,18± 0,23	0,88± 0,27	1,44± 0,55	1,06± 0,06
rt4.3 4411X	1,13± 0,30	1,20± 0,41	1,37± 0,71	1,21± 0,59
rt4.3 4696C	0,80± 0,01	0,87± 0,24	0,89± 0,35	0,71± 0,31
rt4.3 Apa/PinAI	1,04± 0,26	1,01± 0,10	1,33± 0,08	1,37± 0,62

ES 2 354 785 A1

	<u>Nelfinavir</u> (IP)	<u>Amprenavir</u> (IP)	<u>Lopinavir</u> (IP)
	Fenotipado	Fenotipado	Fenotipado
L10R	4,33± 2,65	3,89± 0,46	8,61± 0,42
rt10R 4245C	7,80± 5,13	8,01± 1,83	17,18± 1,23
rt10R 4411X	8,63±6,52	6,10± 0,64	14,86± 3,01
rt10R 4696C	2,60± 0,93	3,07± 0,67	6,47± 0,82
rt10R Apa/PinAI	5,10± 2,34	4,04± 0,69	10,73± 4,11
NL4.3	1± 0,00	1± 0,00	1± 0,00
NL4.3 4245C	1,20± 1,10	1,23± 0,85	0,84± 0,30
NL4.3 4411X	0,67±0,19	0,97± 0,09	0,91± 0,35
NL4.3 4696C	0,84± 0,54	1,15± 0,05	0,86± 0,00
rt4.3 4245C	1,07± 0,21	1,60± 0,40	1,17± 0,25
rt4.3 4411X	0,80± 0,24	1,44± 0,16	1,22± 0,21
rt4.3 4696C	0,70± 0,42	0,83± 0,10	0,95± 0,02
rt4.3 Apa/PinAI	1,66± 1,31	1,50± 0,52	1,11± 0,06

Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor (NRTI),

Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor (NNRTI),

Protease Inhibitor (IP)

Los resultados realizados por triplicado y en colaboración con VIRCO (Mechelen (Bélgica)) mostraron la concordancia entre las predicciones fenotípicas y genotípicas al comparar los resultados del fenotipado con las predicciones del sistema *VIRCOType*.

El valor a partir del cual se considera resistente fue establecido por la empresa VIRCO (www.vircolab.com) y se basa en valores en la lectura de fluorescencia de más de 3 y criterios de respuesta clínica.

Conclusión preliminar: Las construcciones realizadas y su funcionamiento tras la inclusión de los fragmentos correspondientes posibilita el trabajo con fragmentos más amplios y es aplicable al estudio de efectos de mutaciones a más distancia de las convencionales *ApaI-PinAI*.

Experimento II

Se ha desarrollado según lo previsto en el proyecto un método de evaluación de las resistencias fenotípicas propio. Dicho método presentó diferencias con las estrategias de evaluación del método desarrollado por VIRCO o *Virologic* pero los resultados obtenidos fueron coherentes con los obtenidos en las pruebas realizadas en colaboración con VIRCO.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 2

Resultados de las medidas de fluorescencia para cada una de las construcciones (primera columna) cuando se aplican diferentes antirretrovirales. Los antirretrovirales empleados causan disminución en la actividad del virus VIH-1. Se han resaltado en negrita los valores que indican resistencia a los respectivos antirretrovirales

	<u>VIRCO</u>	<u>VIRCO</u>	<u>CHUS</u>	<u>CHUS</u>
	<u>AZT</u>	<u>Indinavir</u>	<u>AZT</u>	<u>Indinavir</u>
	Fenotipado	Fenotipado	Fenotipado	Fenotipado
L10R	0,94± 0,19	8,54± 2,88		27,93
rt10R 4245C	1,91± 0,65	11,31± 1,61		
rt10R 4411X	1,51± 0,42	12,05± 5,13		
rt10R 4696C	0,62± 0,03	3,4± 1,92		
rt10R Apa/PinAI	0,73± 0,35	8,32± 4,80		18,95
NL4.3	1± 0,00	1± 0,00		
NL4.3 4245C	1,14± 0,67	1,23± 0,04	1,05	1,17
NL4.3 4411X	0,83± 0,58	0,96± 0,03	1,1	1,23
NL4.3 4696C	0,89± 0,19	1,07± 0,66	1,42	1,04
rt4.3 4245C	1,16± 0,53	1,44± 0,55	3,39	0,5
rt4.3 4411X	1,08± 0,18	1,37± 0,71	1,05	0,87
rt4.3 4696C	0,70± 0,15	0,89± 0,35	1,17	0,62
rt4.3 Apa/PinAI	1,49± 0,32	1,33± 0,08		

Los valores en negrita indican resistencia a antirretrovirales.

El plásmido pCHUS es un vector mínimo que contiene el genoma completo HIV procedente de pNL4.3, así como el gen de resistencia a ampicilina y el origen de replicación derivados de pUC18, que permiten su propagación en *E. coli*. El plásmido tiene un tamaño de 11.538 pb y posee varios sitios de restricción únicos nuevos. Este vector minimizado puede facilitar no sólo su propia manipulación genética, sino también los procesos de transformación tanto en *E. coli* como en cultivos celulares e incluso podría permitir la mutagénesis *in vitro* directamente, sin necesidad de clonaciones y subclonaciones (*Molecular Biotechnology*. 2004. 28:87-95).

Conclusión preliminar: el modelo desarrollado y su medida posibilita el estudio de la infección por virus VIH en un modelo fenotípico con un rendimiento adecuado y permitiría testar antirretrovirales convencionales usando las construcciones de la presente invención personalizadas con secuencias *pol* del virus de pacientes.

En las Fig 7, 8 y 9 se muestran las curvas de respuesta de los plásmidos definidos según las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4 respectivamente.

ES 2 354 785 A1

A continuación mostramos los resultados numéricos de cada una de las curvas de respuesta.

Datos numéricos de las curvas de respuesta de la figura 7; tablas 3 y 4

TABLA 3

Datos correspondientes a la curva de inhibición de las células CEM-GFP infectadas con SEQ ID NO: 1 cuando son tratadas con el antirretroviral INDINAVIR

Parámetro	Valor	Error estadístico
Rango Y	100,5539	2,2888
IC ₅₀	0,0681	0,0013
Factor de la pendiente	-8,7671	1,1476
Fondo	-13,3565	1,8378

TABLA 4

Datos correspondientes a la curva de inhibición de las células CEM-GFP infectadas con pNL4.3 cuando son tratadas con el antirretroviral INDINAVIR (respuesta control)

Parámetro	Valor	Error estadístico
Rango Y	89,6941	0,7481
IC ₅₀	0,0578	0,0004
Factor de la pendiente	-7,1535	0,2513
Fondo	1,5899	0,6198

IC₅₀: 1,17

Datos numéricos de las curvas de respuesta de la figura 8; tablas 5 y 6

TABLA 5

Datos correspondientes a la curva de inhibición de las células CEM-GFP infectadas con SEQ ID NO: 2 cuando son tratadas con el antirretroviral INDINAVIR

Parámetro	Valor	Error estadístico
Rango Y	99,9653	4,3807
IC ₅₀	0,0714	0,0242
Factor de la pendiente	-36,6243	189,8832
Fondo	-10,0760	3,4629

ES 2 354 785 A1

TABLA 6

Datos correspondientes a la curva de inhibición de las células CEM-GFP infectadas con pNL4.3 cuando son tratadas con el antirretroviral INDINAVIR (respuesta control)

Parámetro	Valor	Error estadístico
Rango Y	89,6941	0,7481
IC ₅₀	0,0578	0,0004
Factor de la pendiente	-7,1535	0,2513
Fondo	1,5899	0,6198

IC₅₀: 1,23

Datos numéricos de las curvas de respuesta de la figura 9; tablas 7 y 8

TABLA 7

Datos correspondientes a la curva de inhibición de las células CEM-GFP infectadas con SEQ ID NO: 4 cuando son tratadas con el antirretroviral INDINAVIR

Parámetro	Valor	Error estadístico
Rango Y	85,3287	0,5191
IC ₅₀	0,0603	0,0004
Factor de la pendiente	-11,6884	0,3656
Fondo	4,7227	0,4361

TABLA 8

Datos correspondientes a la curva de inhibición de las células CEM-GFP infectadas con pNL4.3 cuando son tratadas con el antirretroviral INDINAVIR (respuesta control)

Parámetro	Valor	Error estadístico
Rango Y	89,6941	0,7481
IC ₅₀	0,0578	0,0004
Factor de la pendiente	-7,1535	0,2513
Fondo	1,5899	0,6198

IC₅₀: 1,04

ES 2 354 785 A1

REIVINDICACIONES

1. Método de evaluación de la resistencia de fenotipos de VIH a antirretrovirales que comprende:

- 5
- a. recoger muestras biológicas de pacientes infectados por el virus VIH,
 - b. extraer el ARN de las muestras del paso (a),
 - 10 c. amplificar, mediante RT-PCR, fragmentos del gen que codifica para la polimerasa y/o del gen que codifica para la proteasa del virus VIH del ARN del paso (b) mediante el empleo del cebador directo SEQ ID NO: 12 y el cebador reverso seleccionado de la lista que comprende SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10,
 - 15 d. clonar de forma independiente los fragmentos obtenidos en (c), en los plásmidos seleccionados de la lista que comprende SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4,
 - e. transfectar los plásmidos obtenidos en (d) en una línea celular empaquetadora y recoger los viriones liberados,
 - 20 f. infectar células *reporter* con los viriones obtenidos en (e),
 - g. añadir un antirretroviral a las células del paso (f) y
 - 25 h. medir la fluorescencia.

2. Método según la reivindicación 1 donde la célula empaquetadora es 293-T y las células *reporter* son CEM-GFP.

30

35

40

45

50

55

60

65

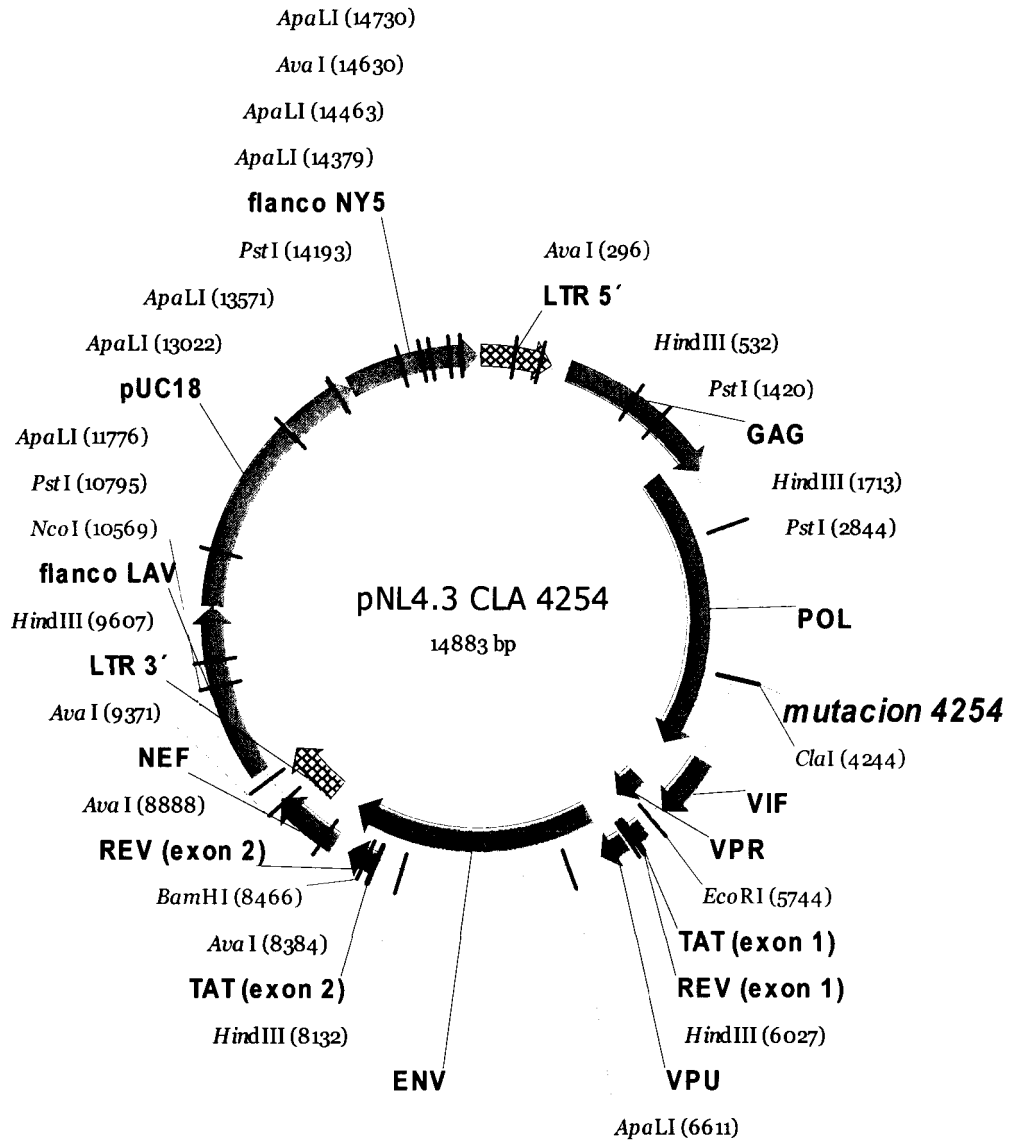


FIG. 1

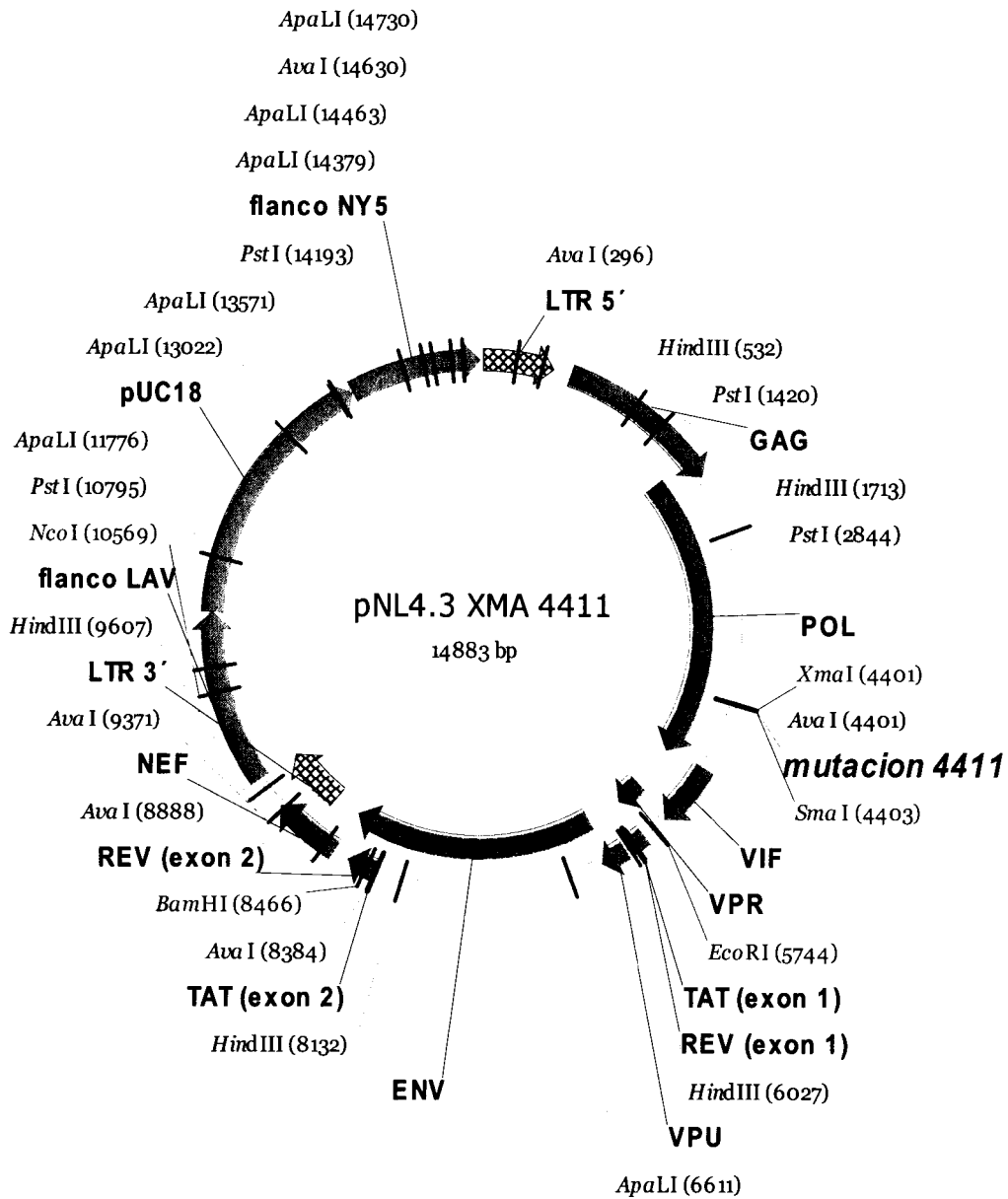


FIG. 2.

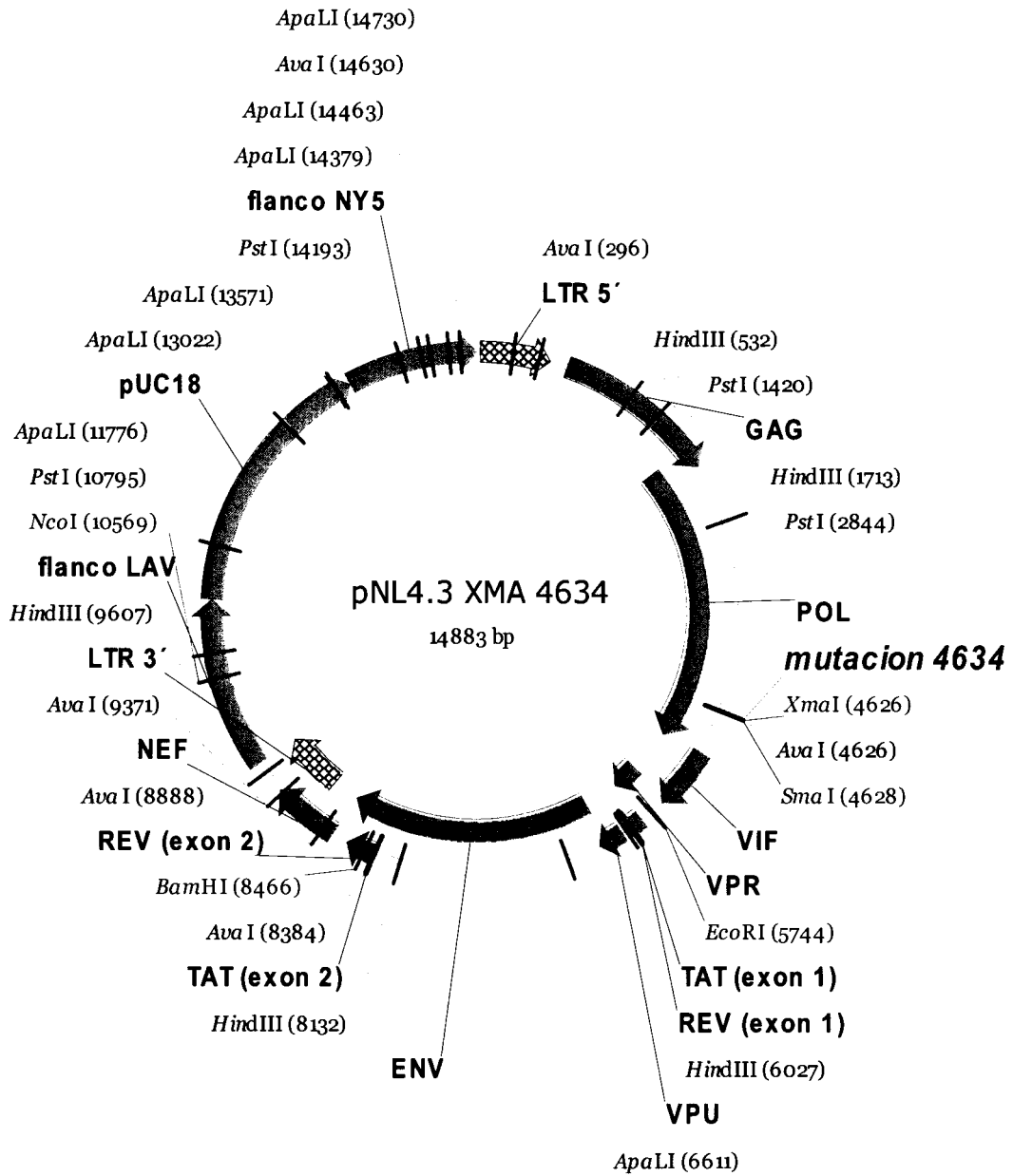


FIG. 3

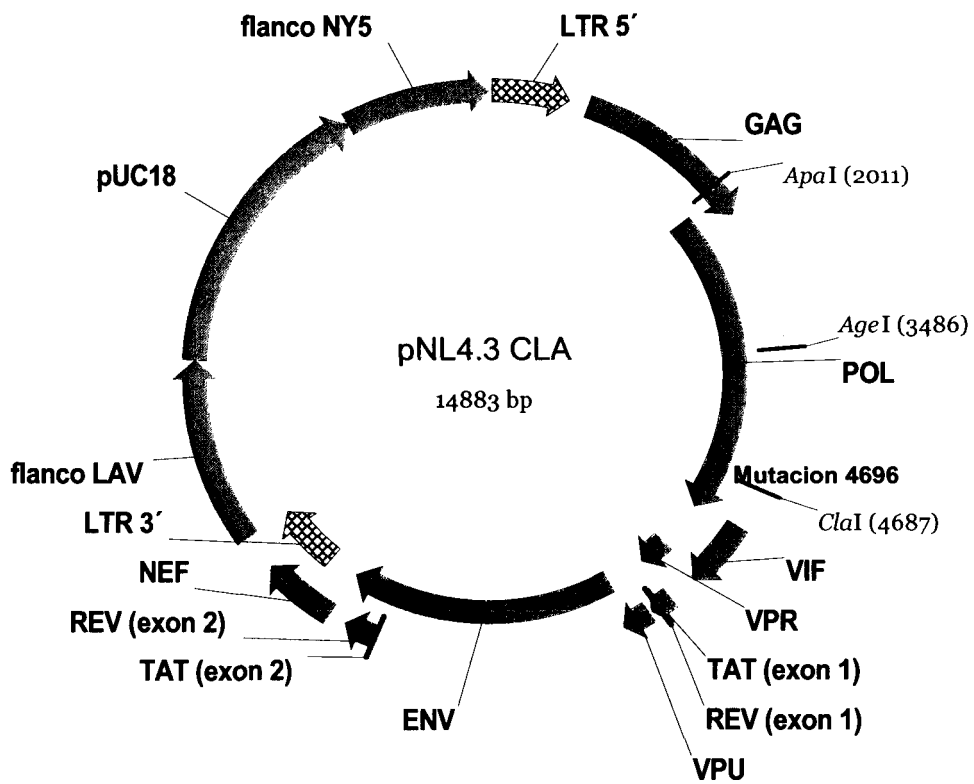


FIG. 4

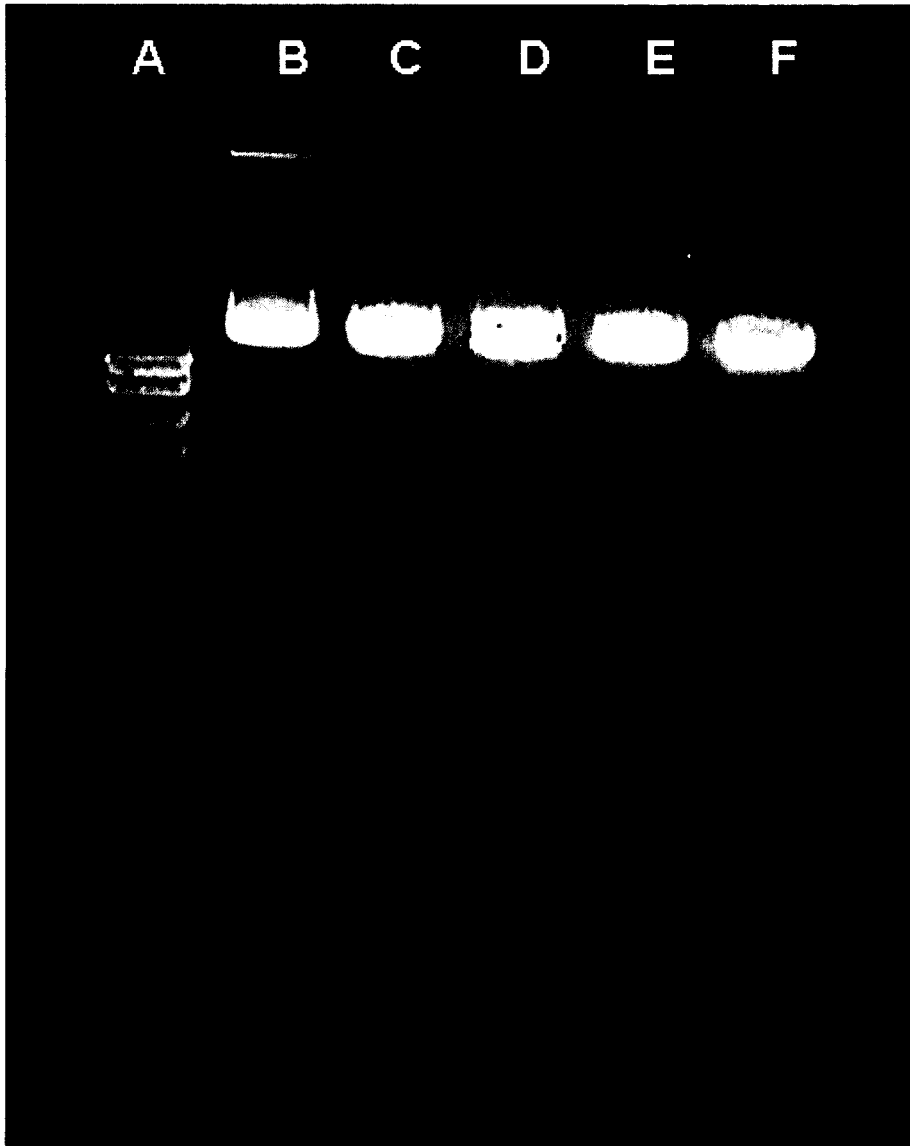


FIG. 5

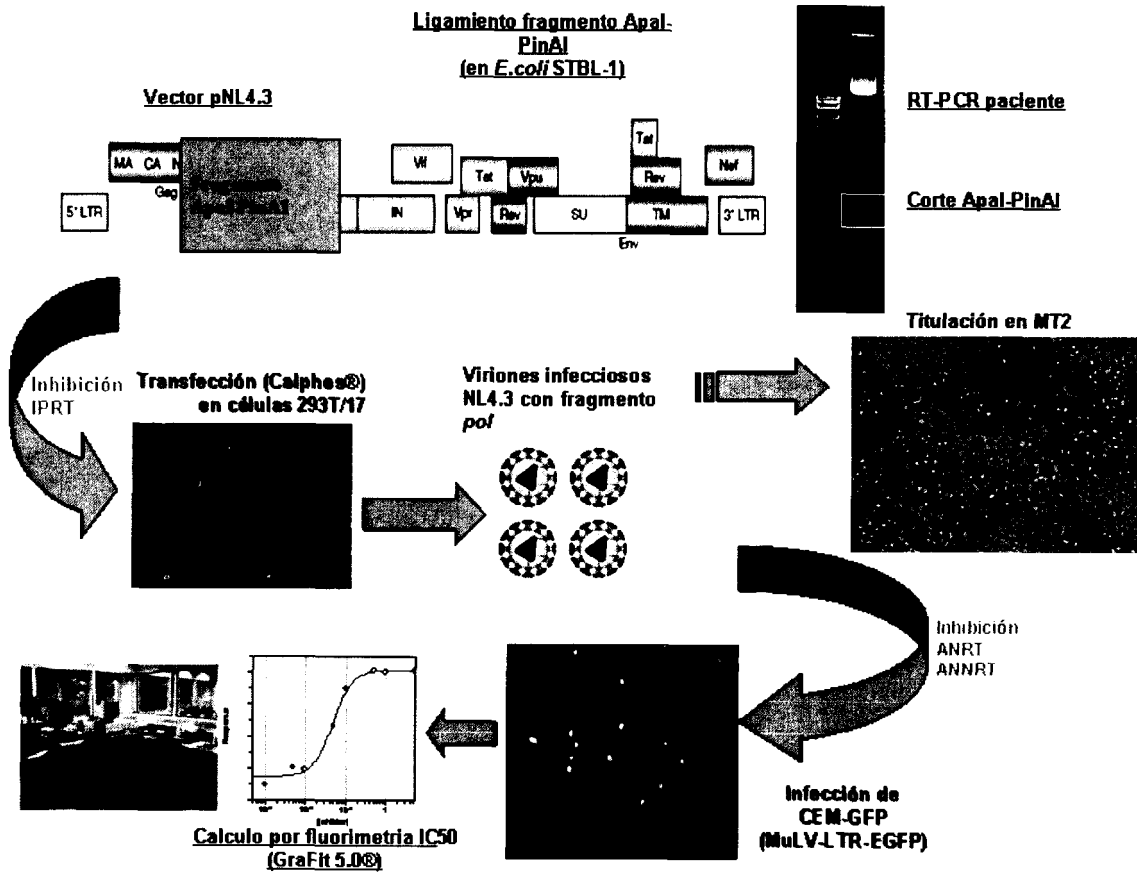


FIG. 6

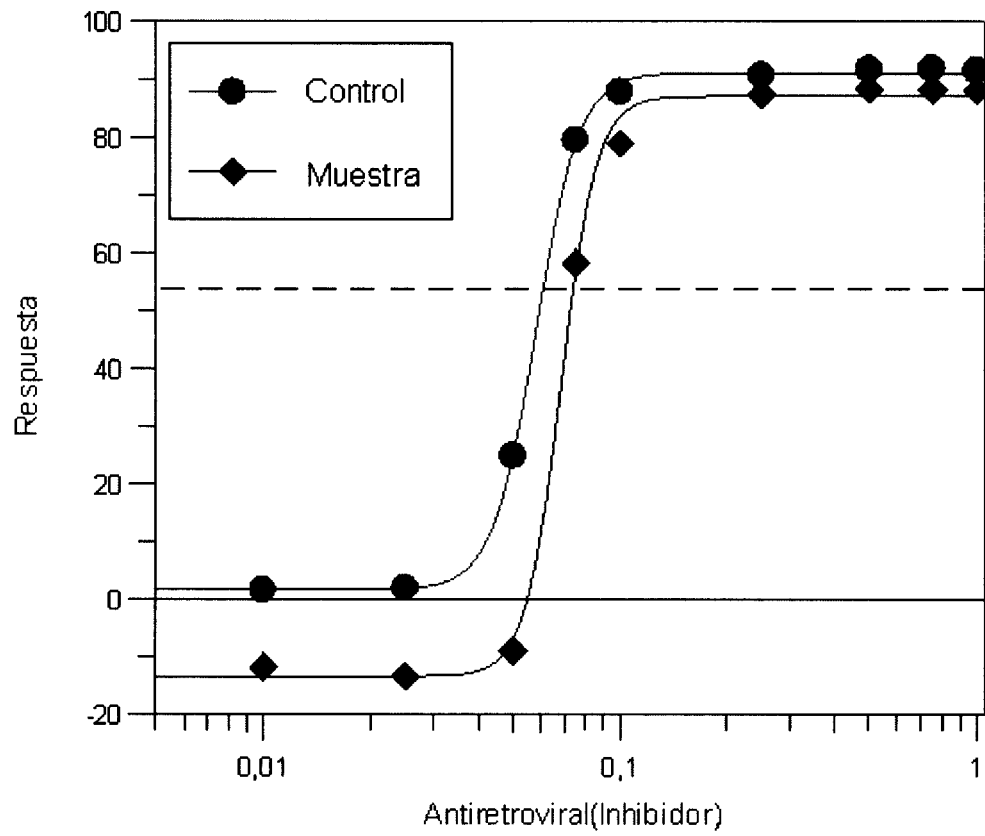


FIG. 7

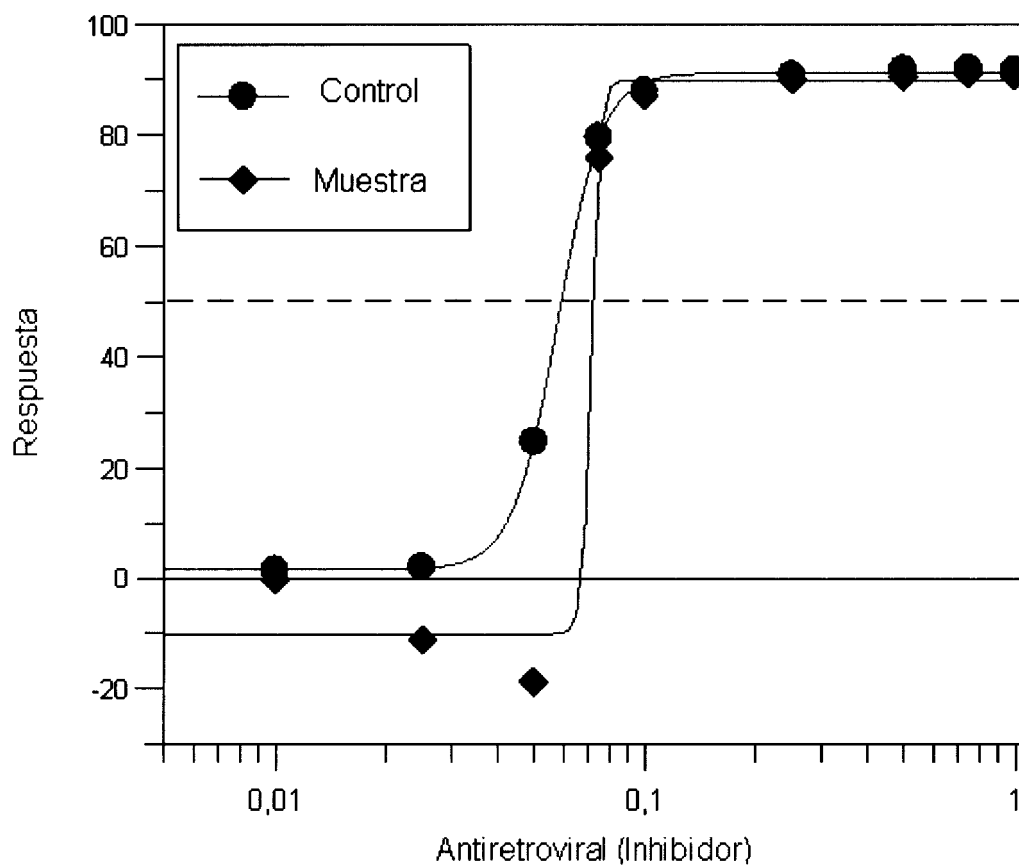


FIG. 8

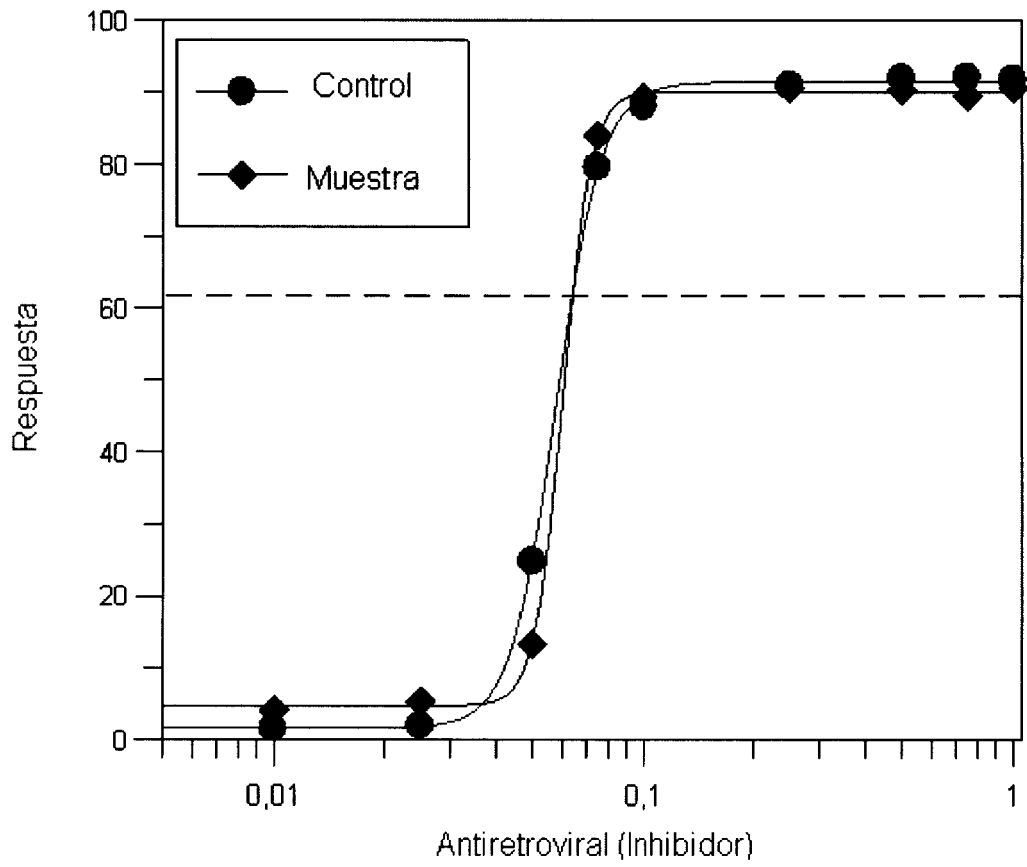


FIG. 9

ES 2 354 785 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110>	Universidade de Santiago de Compostela Nanogap	
5	<120>	Método de evaluación de resistencia de fenotipos de VIH-1 a antirretrovirales
	<130>	1596.15-2
10	<160>	24
	<170>	PatentIn version 3.5
15	<210>	1
	<211>	14883
	<212>	DNA
20	<213>	Secuencia artificial
	<220>	misc_recomb
	<223>	Plásmido p4254
25	<400>	1
	tggaagggct aatttgggcc caaaaaagac aagagatcct tgatctgtgg atctaccaca	60
30	cacaaggcta cttccctgat tggcagaact acacaccagg gccagggatc agatatccac	120
	tgacctttgg atggtgcttc aagttagtac cagttgaacc agagcaagta gaagaggcca	180
	aataaggaga gaagaacagc ttgttacacc ctatgagcca gcatgggatg gaggaccggg	240
35	agggagaagt attagtgtgg aagtttgaca gcctcctagc atttcgtcac atggcccag	300
	agctgcatcc ggagtactac aaagactgct gacatcgagc tttctacaag ggactttccg	360
40	ctggggactt tccagggagg tgtggcctgg gcgggactgg ggagtggcga gccctcagat	420
	gctacatata agcagctgct ttttgctgt actgggtctc tctggttaga ccagatctga	480
	gcctgggagc tctctggcta actagggaac cactgctta agcctcaata aagcttgctt	540
45	tgagtgtctca aagtagtgtg tgcccgtctg ttgtgtgact ctggtaacta gagatccctc	600
	agaccctttt agtcagtgtg gaaaatctct agcagtggcg cccgaacagg gacttgaaag	660
	cgaaagtaaa gccagaggag atctctcgac gcaggactcg gcttgctgaa gcgcgcacgg	720
50	caagaggcga ggggcggcga ctggtgagta cgccaaaaat tttgactagc ggaggctaga	780
	aggagagaga tgggtgagc agcgtcggtg ttaagcgggg gagaattaga taaatgggaa	840
55	aaaattcggg taaggccagg gggaaagaaa caatataaac taaaacatat agtatgggca	900
	agcaggggagc tagaacgatt cgaggttaat cctggccttt tagagacatc agaaggctgt	960
	agacaaatac tgggacagct acaaccatcc cttcagacag gatcagaaga acttagatca	1020
	ttatataata caatagcagt cctctattgt gtgcatcaaa ggatagatgt aaaagacacc	1080
60	aaggaagcct tagataagat agaggaagag caaaacaaaa gtaagaaaaa ggcacagcaa	1140
	gcagcagctg acacaggaaa caacagccag gtcagccaaa attaccctat agtgcagaac	1200
	ctccaggggc aaatggtaca tcaggccata tcacctagaa ctttaaatgc atgggtaaaa	1260
65	gtagtagaag agaaggcttt cagcccagaa gtaataccca tgttttcagc attatcagaa	1320
	ggagccaccc cacaagatth aaataccatg ctaaacacag tgggggggaca tcaagcagcc	1380

ES 2 354 785 A1

	atgcaaatgt taaaagagac catcaatgag gaagctgcag aatgggatag attgcatcca	1440
	gtgcatgcag ggcctattgc accaggccag atgagagaac caaggggaag tgacatagca	1500
5	ggaactacta gtacccttca ggaacaaata ggatggatga cacataatcc acctatccca	1560
	gtaggagaaa tctataaaaag atggataatc ctgggattaa ataaaatagt aagaatgtat	1620
	agccctacca gcattctgga cataagacaa ggaccaaaagg aacccttttag agactatgta	1680
10	gaccgattct ataaaactct aagagccgag caagcttcac aagaggtaaa aaattggatg	1740
	acagaaacct tgttgggtcca aaatgcgaac ccagattgta agactatfff aaaagcattg	1800
15	ggaccaggag cgacactaga agaaatgatg acagcatgtc agggagtggg gggacccggc	1860
	cataaagcaa gagttttggc tgaagcaatg agccaagtaa caaatccagc taccataatg	1920
	atacagaaag gcaatfffag gaaccaaaga aagactgtta agtgtttcaa ttgtggcaaa	1980
20	gaagggcaca tagccaaaaa ttgcagggcc cctaggaaaa agggctgttg gaaatgtgga	2040
	aaggaaggac accaaatgaa agattgtact gagagacagg ctaatfffat agggaagatc	2100
	tggccttccc acaaggggaag gccaggggaat tttcttcaga gcagaccaga gccaacagcc	2160
25	ccaccagaag agagcttcag gtttggggaa gagacaacaa ctcccttca gaagcaggag	2220
	ccgatagaca aggaactgta tccttttagct tcctcagat cactctttgg cagcgacccc	2280
	tcgtcacaat aaagataggg gggcaattaa aggaagctct attagataca ggagcagatg	2340
30	atacagtatt agaagaaatg aatttgccag gaagatggaa accaaaaatg atagggggaa	2400
	ttggaggttt tatcaaagta agacagtatg atcagatact catagaaatc tgcggacata	2460
35	aagctatagg tacagtatta gtaggaccta cacctgtcaa cataattgga agaaatctgt	2520
	tgactcagat tggctgcact ttaaattttc ccattagtcc tattgagact gtaccagtaa	2580
	aattaaagcc aggaatggat ggcccaaaag ttaaacaatg gccattgaca gaagaaaaaa	2640
40	taaaagcatt agtagaaatt tgtacagaaa tggaaaagga aggaaaaatt tcaaaaattg	2700
	ggcctgaaaa tccatacaat actccagtat ttgccataaa gaaaaaagac agtactaaat	2760
45	ggagaaaatt agtagatffc agagaactta ataagagaac tcaagatffc tgggaagffc	2820
	aattaggaat accacatcct gcagggttaa aacagaaaaa atcagtaaca gtactggatg	2880
	tgggcgatgc atatfffca gttcccttag ataaagactt caggaagtat actgcattta	2940
50	ccatacctag tataaacaat gagacaccag ggattagata tcagtacaat gtgcttccac	3000
	agggatggaa aggatcacca gcaatattcc agtgtagcat gacaaaaatc ttagagcctt	3060
	ttagaaaaca aaatccagac atagtcatct atcaatacat ggatgatttg tatgtaggat	3120
55	ctgacttaga aatagggcag catagaacaa aaatagagga actgagacaa catctgttga	3180
	ggtggggatt taccacacca gacaaaaaac atcagaaaga acctccattc ctttggatgg	3240
60	gttatgaact ccatcctgat aaatggacag tacagcctat agtgctgcca gaaaaggaca	3300
	gctggactgt caatgacata cagaaattag tgggaaaatt gaattgggca agtcagattt	3360
	atgcagggat taaagtaagg caattatgta aacttcttag gggaaaccaa gcactaacag	3420

65

ES 2 354 785 A1

	aagtagtacc	actaacagaa	gaagcagagc	tagaactggc	agaaaacagg	gagattctaa	3480
	aagaaccggt	acatggagtg	tattatgacc	catcaaaaaga	cttaatagca	gaaatacaga	3540
5	agcaggggca	aggccaatgg	acatatcaaa	tttatcaaga	gccatttaaa	aatctgaaaa	3600
	caggaaaata	tgcaagaatg	aagggtgccc	acactaatga	tgtgaaacaa	ttaacagagg	3660
	cagtacaaaa	aatagccaca	gaaagcatag	taatatgggg	aaagactcct	aaatttaaat	3720
10	taccataca	aaaggaaaca	tgggaagcat	ggtggacaga	gtattggcaa	gccacctgga	3780
	ttcctgagtg	ggagtttgtc	aatacccctc	ccttagtgaa	gttatggtac	cagttagaga	3840
15	aagaacccat	aataggagca	gaaactttct	atgtagatgg	ggcagccaat	agggaaacta	3900
	aattagggaa	agcaggatat	gtaactgaca	gaggaagaca	aaaagttgtc	cccctaacgg	3960
	acacaacaaa	tcagaagact	gagttacaag	caattcatct	agctttgcag	gattcgggat	4020
20	tagaagtaaa	catagtgaca	gactcacaat	atgcattggg	aatcattcaa	gcacaaccag	4080
	ataagagtga	atcagagtta	gtcagtcaaa	taatagagca	gttaataaaa	aaggaaaaag	4140
	tctacctggc	atgggtacca	gcacacaaag	gaattggagg	aatgaacaa	gtagataaat	4200
25	tggtcagtg	tggaatcagg	aaagtactat	ttttagatgg	aatcgataag	gccaagaag	4260
	aacatgagaa	atatcacagt	aattggagag	caatggctag	tgattttaac	ctaccacctg	4320
	tagtagcaaa	agaaatagta	gccagctgtg	ataaatgtca	gctaaaaggg	gaagccatgc	4380
30	atggacaagt	agactgtagc	ccaggaatat	ggcagctaga	ttgtacacat	ttagaaggaa	4440
	aagttatctt	ggtagcagtt	catgtagcca	gtggatatat	agaagcagaa	gtaattccag	4500
35	cagagacagg	gcaagaaaca	gcatacttcc	tcttaaaatt	agcaggaaga	tggccagtaa	4560
	aaacagtaca	tacagacaat	ggcagcaatt	tcaccagtac	tacagttaag	gccgcctggt	4620
	ggtgggagg	gatcaagcag	gaatttggca	ttccctacaa	tcccaaaagt	caaggagtaa	4680
40	tagaatctat	gaataaagaa	ttaaagaaaa	ttataggaca	ggtaagagat	caggctgaac	4740
	atcttaagac	agcagtacaa	atggcagtat	tcatccacaa	ttttaaaaga	aaagggggga	4800
	ttggggggta	cagtgcaggg	gaaagaatag	tagacataat	agcaacagac	atacaaacta	4860
45	aagaattaca	aaaacaaatt	acaaaaattc	aaaattttcg	ggttttattac	agggacagca	4920
	gagatccagt	ttggaaagga	ccagcaaagc	tcctctggaa	aggtgaaggg	gcagtagtaa	4980
50	tacaagataa	tagtgacata	aaagtagtgc	caagaagaaa	agcaaagatc	atcagggtatt	5040
	atggaaaaca	gatggcaggt	gatgattgtg	tggcaagtag	acaggatgag	gattaacaca	5100
	tggaaaagat	tagtaaaaca	ccatatgtat	atttcaagga	aagctaagga	ctggttttat	5160
55	agacatcact	atgaaagtac	taatccaaaa	ataagttcag	aagtacacat	cccactaggg	5220
	gatgctaaat	tagtaataac	aacatattgg	ggtctgcata	caggagaaag	agactggcat	5280
	ttgggtcagg	gagtctccat	agaatggagg	aaaaagagat	atagcacaca	agtagaccct	5340
60	gacctagcag	accaactaat	tcctctgcac	tattttgatt	gtttttcaga	atctgctata	5400
	agaaatacca	tattaggacg	tatagttagt	cctaggtgtg	aatatcaagc	aggacataac	5460
65	aaggtaggat	ctctacagta	cttggcacta	gcagcattaa	taaaaccaa	acagataaag	5520

ES 2 354 785 A1

ccacctttgc ctagtgttag gaaactgaca gaggacagat ggaacaagcc ccagaagacc 5580
 aagggccaca gagggagcca tacaatgaat ggacactaga gcttttagag gaacttaaga 5640
 5 gtgaagctgt tagacatfff cctaggatat ggctccataa cttaggacaa catatctatg 5700
 aaacttacgg ggatacttgg gcaggagtgg aagccataat aagaattctg caacaactgc 5760
 tgtttatcca tttcagaatt ggggtgctgac atagcagaat aggcgttact cgacagagga 5820
 10 gagcaagaaa tggagccagt agatcctaga ctagagccct ggaagcatcc aggaagtcag 5880
 cctaaaactg cttgtacca tttgtattgt aaaaagtgtt gctttcattg ccaagtttgt 5940
 15 ttcattgacaa aagccttagg catctcctat ggcaggaaga agcggagaca gcgacgaaga 6000
 gctcatcaga acagtcagac tcatcaagct tctctatcaa agcagtaagt agtacatgta 6060
 atgcaaccta taatagtagc aatagtagca ttagtagtag caataataat agcaatagtt 6120
 20 gtgtggtcca tagtaatcat agaatatagg aaaatattaa gacaaagaaa aatagacagg 6180
 ttaattgata gactaataga aagagcagaa gacagtggca atgagagtga aggagaagta 6240
 tcagcacttg tggagatggg ggtggaaatg gggcaccatg ctccttggga tattgatgat 6300
 25 ctgtagtgct acagaaaaat tgtgggtcac agtctattat ggggtacctg tgtggaagga 6360
 agcaaccacc actctatfff gtgcatcaga tgctaaagca tatgatacag aggtacataa 6420
 tgtttgggcc acacatgcct gtgtaccac agaccccaac ccacaagaag tagtattggt 6480
 30 aaatgtgaca gaaaatffta acatgtggaa aaatgacatg gtagaacaga tgcattgagga 6540
 tataatcagt ttatgggatc aaagcctaaa gccatgtgta aaattaacc cactctgtgt 6600
 35 tagtttaag tgcactgatt tgaagaatga tactaatacc aatagtagta gcgggagaat 6660
 gataatggag aaaggagaga taaaaaactg ctctttcaat atcagcacia gcataagaga 6720
 taaggtgcag aaagaatatg cattctffta taaacttgat atagtaccaa tagataatac 6780
 40 cagctatagg ttgataagtt gtaacacctc agtcattaca caggcctgtc caaaggatc 6840
 ctttgagcca attccatac attattgtgc cccggctggt tttgcatc taaaatgtaa 6900
 taataagacg ttcaatggaa caggaccatg tacaatgtc agcacagtac aatgtacaca 6960
 45 tggaatcagg ccagtagtat caactcaact gctgttaaat ggcagtctag cagaagaaga 7020
 tgtagtaatt agatctgcca atttcacaga caatgctaaa accataatag tacagctgaa 7080
 50 cacatctgta gaaattaatt gtacaagacc caacaacaat acaagaaaa gtatccgtat 7140
 ccagagggga ccaggagag catttgttac aataggaaaa ataggaaata tgagacaagc 7200
 acattgtaac attagtagag caaatggaa tgccacttta aacagatag ctagcaatt 7260
 55 aagagaacaa tttggaaata ataaaacaat aatctfftaag caatcctcag gaggggaccc 7320
 agaaattgta acgcacagtt ttaattgtgg aggggaattt ttctactgta attcaacaca 7380
 actgtfftaat agtacttggt ttaatagtag ttggagtact gaagggtcaa ataactga 7440
 60 aggaagtgac acaatcacac tcccatgcag aataaaacaa tttataaaca tgtggcagga 7500
 agtaggaaaa gcaatgtatg cccctcccat cagtggacaa attagatggt catcaaatat 7560

65

ES 2 354 785 A1

	tactgggctg ctattaacaa gagatggtgg taataacaac aatgggtccg agatcttcag	7620
	acctggagga ggcgatatga gggacaattg gagaagtga ttatataaat ataaagtagt	7680
5	aaaaattgaa ccattaggag tagcaccac caaggcaaag agaagagtgg tgcagagaga	7740
	aaaaagagca gtgggaatag gagctttggt ccttgggttc ttgggagcag caggaagcac	7800
	tatgggcgca gcgtcaatga cgctgacggt acaggccaga caattattgt ctgatatagt	7860
10	gcagcagcag aacaatttgc tgagggctat tgaggcgcaa cagcatctgt tgcaactcac	7920
	agtctggggc atcaaacagc tccaggcaag aatcctggct gtggaaagat acctaaagga	7980
15	tcaacagctc ctggggattt ggggttgctc tggaaaactc atttgcacca ctgctgtgcc	8040
	ttggaatgct agttggagta ataaatctct ggaacagatt tggaaataca tgacctgat	8100
	ggagtgggac agagaaatta acaattacac aagcttaata cactccttaa ttgaagaatc	8160
20	gcaaaaccag caagaaaaga atgaacaaga attattggaa ttagataaat gggcaagttt	8220
	gtggaattgg ttaacataa caaattggct gtggtatata aaattattca taatgatagt	8280
	aggaggcttg gtaggtttaa gaatagtttt tgctgtactt tctatagtga atagagttag	8340
25	gcagggatat tcaccattat cgtttcagac ccacctcca atcccagggg gacctgacag	8400
	gcccgaagga atagaagaag aagggtggaga gagagacaga gacagatcca ttcgattagt	8460
30	gaacggatcc ttagcactta tctgggacga tctgcggagc ctgtgcctct tcagctacca	8520
	ccgcttgaga gacttactct tgattgtaac gaggattgtg gaacttctgg gacgcagggg	8580
	gtgggaagcc ctcaaatatt ggtggaatct cctacagtat tggagtcagg aactaaagaa	8640
35	tagtgctggt aacttgctca atgccacagc catagcagta gctgagggga cagatagggt	8700
	tatagaagta ttacaagcag cttatagagc tattcgccac atacctagaa gaataagaca	8760
	gggcttgtaa aggattttgc tataagatgg gtggcaagtg gtcaaaaagt agtgtgattg	8820
40	gatggcctgc tgtaagggaa agaatgagac gagctgagcc agcagcagat ggggtgggag	8880
	cagtatctcg agacctagaa aaacatggag caatcacaag tagcaataca gcagctaaca	8940
45	atgctgcttg tgcttggtta gaagcacaag aggaggaaga ggtgggtttt ccagtcacac	9000
	ctcaggtacc ttaagacca atgacttaca aggcagctgt agatcttagc cactttttaa	9060
	aagaaaaggg gggactggaa gggctaattc actcccaaag aagacaagat atccttgatc	9120
50	tgtggatcta ccacacacaa ggctacttcc ctgattggca gaactacaca ccagggccag	9180
	gggtcagata tccactgacc tttggatggt gctacaagct agtaccagtt gagccagata	9240
	aggtagaaga ggccaataaa ggagagaaca ccagcttggt acaccctgtg agcctgcatg	9300
55	gaatggatga ccctgagaga gaagtgttag agtggagggt tgacagccgc ctagcatttc	9360
	atcacgtggc ccgagagctg catccggagt acttcaagaa ctgctgacat cgagcttgct	9420
60	acaagggact ttccgctggg gactttccag ggaggcgtgg cctgggcggg actggggagt	9480
	ggcgagccct cagatgctgc atataagcag ctgctttttg cctgtactgg gtctctctgg	9540
	ttagaccaga tctgagcctg ggagctctct ggctaactag ggaaccact gcttaagcct	9600
65	caataaagct tgcttgagt gcttcaagta gtgtgtgccc gtctgtttgtg tgactctggt	9660

ES 2 354 785 A1

	aactagagat ccctcagacc cttttagtca gtgtggaaaa tctctagcac cccccaggag	9720
	gtagagggtg cagtgagcca agatcgcgcc actgcattcc agcctgggca agaaaacaag	9780
5	actgtctaaa ataataataa taagttaagg gtattaaata tatttataca tggagggtcat	9840
	aaaaatatat atatttgggc tgggcgcagt ggctcacacc tgcgcccggc cctttgggag	9900
	gccgaggcag gtggatcacc tgagtttggg agttccagac cagcctgacc aacatggaga	9960
10	aacccttct ctgtgtattt ttagtagatt ttattttatg tgtattttat tcacaggtat	10020
	ttctggaaaa ctgaaactgt ttttctcta ctctgatacc acaagaatca tcagcacaga	10080
15	ggaagacttc tgtgatcaaa tgtggtggga gagggagggt ttcaccagca catgagcagt	10140
	cagttctgcc gcagactcgg cgggtgtcct tcggttcagt tccaacaccg cctgcctgga	10200
	gagaggctag accacagggg gagggctcag tccccaagac ataaacaccc aagacataaa	10260
20	caccaacag gtccaccccg cctgctgccc aggcagagcc gattcaccaa gacgggaatt	10320
	aggatagaga aagagtaagt cacacagagc cggctgtgcg ggagaacgga gttctattat	10380
	gactcaaate agtctcccca agcattcggg gatcagagtt ttaaggata acttagtgtg	10440
25	tagggggcca gtgagttgga gatgaaagcg tagggagtcg aagggttcct tttgcgccga	10500
	gtcagttcct ggggtggggc cacaagatcg gatgagccag tttatcaatc cgggggtgcc	10560
	agctgatcca tggagtgacg ggtctgcaaa atatctcaag cactgattga tcttaggttt	10620
30	tacaatagtg atgttaccct aggaacaatt tggggaaggt cagaatcttg tagcctgtag	10680
	ctgcatgact cctaaacat aatttctttt ttgtttttt tttttattt ttgagacagg	10740
35	gtctcactct gtcacctagg ctggagtgca gtggtgcaat cacagctcac tgcagcctca	10800
	acgtcgtaag ctcaagcgat cctcccact cagcctgcct ggtagctgag actacaagcg	10860
	acgccccagt taatttttgt atttttggta gaggcagcgt tttgccgtgt ggccctggct	10920
40	ggtctcgaac tcctgggctc aagtgatcca gcctcagcct cccaaagtgc tgggacaacc	10980
	ggggccagtc actgcacctg gccctaaacc ataatttcta atcttttggc taatttgta	11040
	gtcctacaaa ggcagtctag tccccaggca aaaagggggt ttgtttcggg aaagggctgt	11100
45	tactgtcttt gtttcaaact ataaactaag ttctcctaa acttagttcg gcctacacc	11160
	aggaatgaac aaggagagct tggagggt .g aagcacgatg gaattggta ggtcagatct	11220
50	ctttcactgt ctgagttata attttgcaat ggtggttcaa agactgcccg cttctgacac	11280
	cagtcgctgc attaatgaat cggccaacgc gcggggagag gcggtttgcg tattggcgct	11340
	cttccgcttc ctcgctcact gactcgctgc gctcggctgt tcggctgagg cgagcggat	11400
55	cagctcactc aaaggcggta atacggttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga	11460
	acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggcccg tigtgtggcgt	11520
	ttttccatag gctccgccc cctgacgagc atcacaaaa tcgacgctca agtcagagggt	11580
60	ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc	11640
	gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa	11700

65

ES 2 354 785 A1

	gcgtggcgct ttctcaatgc tcacgctgta ggtatctcag ttcggtgtag gtcgttcgct	11760
	ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg ttcagcccga ccgctgcgcc ttatccggta	11820
5	actatcgtct tgagtccaac ccggtaaagac acgacttata gccactggca gcagccactg	11880
	gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac agagttcttg aagtggtagc	11940
10	ctaactacgg ctacactaga aggacagtat ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta	12000
	ccttcggaaa aagagttggt agctcttgat ccggcaaaca aaccaccgct ggtagcggtg	12060
	gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt	12120
15	tgatcttttc tacggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa ctcacgttaa gggatttttg	12180
	tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta	12240
	aatcaatcta aagtatatat gagtaaactt ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg	12300
20	aggcacctat ctcagcgatc tgtctatttc gttcatccat agttgcctga ctccccgctg	12360
	tgtagataac tacgatacgg gagggcttac catctggccc cagtgcctgca atgataccgc	12420
	gagaccacg ctcaccggct ccagatttat cagcaataaa ccagccagcc ggaagggccg	12480
25	agcgcagaag tggcctgca actttatccg cctccatcca gtctattaat tgttgccggg	12540
	aagctagagt aagtagttcg ccagttaata gtttgcgcaa cgttggtgcc attgctacag	12600
30	gcatcgtggt gtcacgctcg tcgtttggtg tggcttcatt cagctccggt tcccaacgat	12660
	caaggcgagt tacatgatcc cccatgttgt gcaaaaaagc ggttagctcc ttcggctctc	12720
	cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgcag tgttatcact catggttatg gcagcactgc	12780
35	ataattctct tactgtcatg ccatccgtaa gatgcttttc tgtgactggt gagtactcaa	12840
	ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgcggc gaccgagttg ctcttgcccg gcgtcaatac	12900
	gggataatac cgcgccacat agcagaactt taaaagtgct catcattgga aaacgttctt	12960
40	cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc tgttgagatc cagttcgatg taaccactc	13020
	gtgcacccaa ctgatcttca gcatctttta ctttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa	13080
45	caggaaggca aatgcccga aaaaagggaa taagggcgac acggaatgt tgaatactca	13140
	tactcttctt tttcaatat tattgaagca tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat	13200
	acatatttga atgtatttag aaaaataaac aaataggggt tccgcgcaca tttccccgaa	13260
50	aagtgccacc tgacgtctaa gaaaccatta ttatcatgac attaacctat aaaaataggc	13320
	gtatcacgag gccctttcgt cttcaagaac tgcctcgcgc gtttcggtga tgacggtgaa	13380
	aacctctgac acatgcagct cccggagacg gtcacagctt gtctgtaagc ggatgccggg	13440
55	agcagacaag cccgtcaggg cgcgtcagcg ggtgttggcg ggtgtcgggg cgcagccatg	13500
	accagtcac gtagcgatag cggagtgtac tggcttaact atgcggcatc agagcagatt	13560
60	gtactgagag tgcaccatat gcggtgtgaa ataccgcaca gatgcgtaag gagaaaatac	13620
	cgcatcaggc gccattcgcc attcaggctg cgcaactgtt gggaaagggc atcgggtcgg	13680
	gcctcttcgc tattacgcca gcgcggggag gcagagattg cagtaagctg agatcgcagc	13740
65	actgcactcc agcctgggcg acagagtaag actctgtctc aaaaataaaa taaataaatc	13800

ES 2 354 785 A1

	aatcagatat tccaatcttt tcctttattht atthtattttat tttctattht ggaaacacag	13860
	tccttcctta ttccagaatt acacatatat tctatthtttc tttatatgct ccagttthtt	13920
5	ttagaccttc acctgaaatg tgtgtataca aaatctaggc cagtccagca gaggcctaaag	13980
	gtaaaaaata aaataataaa aaataaataa aatctagctc actccttcac atcaaaatgg	14040
	agatacagct gtttagcatta aataccaaat aacctatctt gtcctcaata atthttaagcg	14100
10	cctctctcca ccacatctaa ctctgtcaa aggcattgtgc cccttccggg cgctctgctg	14160
	tgctgccaac caactggcat gtggactctg cagggctcct aactgccaag cccacagtg	14220
15	tgccctgagg ctgcccttc cttctagcgg ctgccccac tcggctthtgc tthccctagt	14280
	tthcagttact tgcgttcagc caaggctga aactaggctgc gcacagagcg gtaagactgc	14340
	gagagaaaga gaccagcttht acagggggtt tatcacagtg caccctgaca gtcgtcagcc	14400
20	tcacaggggg tthtatcacat tgcacctga cagtcgtcag cctcacaggg ggtthtatcac	14460
	agtgcacctt tacaatcatt ccatttgatt cacaatthtt ttagtctcta ctgtgcctaa	14520
	cttgtaagtt aaatthgatc agaggctgtg tcccagaggg gaaaacagta tatacagggt	14580
25	tcagtactat cgcatttcag gcctccacct gggctthtga atgtgtcccc cgaggggtga	14640
	tgactacctc agttggatct ccacaggctca cagtgacaca agataaccaa gacacctccc	14700
30	aaggctacca caatgggccg ccctccacgt gcacatggcc ggaggaactg ccatgtcggg	14760
	gggtgaagca cacctgcgca tcagagctct tgggtgtggag ggagggacca gcgcagcttc	14820
	cagccatcca cctgatgaac agaacctagg gaaagcccca gttctactta caccaggaaa	14880
35	ggc	14883

<210> 2

<211> 14883

40 <212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220> misc_recomb

45 <223> p4411

<400> 2

	tggagggtc aatthgtcc caaaaaagac aagagatcct tgatctgtgg atctaccaca	60
	cacaaggcta cthccctgat tggcagaact acacaccagg gccagggatc agatatccac	120
	tgacctthtgg atggtgcttc aagtttagtac cagttgaacc agagcaagta gaagaggcca	180
55	aaataaggaga gaagaacagc ttgttacacc ctatgagcca gcatgggatg gaggacctcg	240
	agggagaagt attagtgtgg aagthtgaca gcctcctagc atthcgtcac atggccccgag	300
60	agctgcatcc ggagtactac aaagactgct gacatcgagc tthctacaag ggactthtccg	360
	ctggggactt tccagggagg tgtggcctgg gcgggactgg ggagtggcga gccctcagat	420
	gctacatata agcagctgct thttgcctgt actgggtctc tctggttaga ccagatctga	480
65	gcctgggagc tctctggcta actagggaac cactgctta agcctcaata aagctthtcc	540
	tgagtgtca aagtagtgtg tgccctctg thgtgtgact ctggttaacta gagatcctc	600

ES 2 354 785 A1

	agaccctttt agtcagtgtg gaaaatctct agcagtggcg cccgaacagg gacttgaaag	660
	cgaaagtaaa gccagaggag atctctcgac gcaggactcg gcttgctgaa gcgcgcacgg	720
5	caagaggcga ggggcggcga ctggtgagta cgccaaaaat tttgactagc ggaggctaga	780
	aggagagaga tgggtgagag agcgtcggta ttaagcgggg gagaattaga taaatgggaa	840
	aaaattcggg taaggccagg gggaaagaaa caatataaac taaaacatat agtatgggca	900
10	agcagggagc tagaacgatt cgcagttaat cctggccttt tagagacatc agaaggctgt	960
	agacaaatac tgggacagct acaacctatcc cttcagacag gatcagaaga acttagatca	1020
15	ttatataata caatagcagt cctctattgt gtgcatcaaa ggatagatgt aaaagacacc	1080
	aaggaagcct tagataagat agaggaagag caaaacaaaa gtaagaaaaa ggcacagcaa	1140
	gcagcagctg acacaggaaa caacagccag gtcagccaaa attaccctat agtgcagaac	1200
20	ctccaggggc aatgggtaca tcaggccata tcacctagaa ctttaaatgc atgggtaaaa	1260
	gtagtagaag agaaggcttt cagcccagaa gtaataccca tgttttcagc attatcagaa	1320
	ggagccacc cacaagattt aaataccatg ctaaacacag tggggggaca tcaagcagcc	1380
25	atgcaaatgt taaaagagac catcaatgag gaagctgcag aatgggatag attgcatcca	1440
	gtgcatgcag ggcctattgc accaggccag atgagagaac caaggggaag tgacatagca	1500
30	ggaactacta gtacccttca ggaacaaata ggatggatga cacataatcc acctatccca	1560
	gtaggagaaa tctataaaaag atggataatc ctgggattaa ataaaatagt aagaatgtat	1620
	agccctacca gcattctgga cataagacaa ggaccaaaagg aaccctttag agactatgta	1680
35	gaccgattct ataaaactct aagagccgag caagcttcac aagaggtaaa aaattggatg	1740
	acagaaacct tgttgggtcca aaatgcgaac ccagattgta agactatttt aaaagcattg	1800
	ggaccaggag cgacactaga agaaatgatg acagcatgtc agggagtggg gggaccggc	1860
40	cataaagcaa gagttttggc tgaagcaatg agccaagtaa caaatccagc taccataatg	1920
	atacagaaag gcaattttag gaaccaaaga aagactgtta agtgtttcaa ttgtggcaaa	1980
45	gaagggcaca tagccaaaaa ttgcagggcc cctaggaaaa agggctgttg gaaatgtgga	2040
	aaggaaggac accaaatgaa agattgtact gagagacagg ctaatttttt agggaagatc	2100
	tggccttccc acaaggggaag gccagggaat tttcttcaga gcagaccaga gccaacagcc	2160
50	ccaccagaag agagcttcag gtttggggaa gagacaacaa ctccctctca gaagcaggag	2220
	ccgatagaca aggaactgta tccttttagct tcctcagat cactctttgg cagcgacccc	2280
	tcgtcacaat aaagataggg gggcaattaa aggaagctct attagataca ggagcagatg	2340
55	atacagtatt agaagaaatg aatttgccag gaagatggaa accaaaaatg atagggggaa	2400
	ttggaggttt tatcaaagta agacagtatg atcagatact catagaaatc tgcggacata	2460
60	aagctatagg tacagtatta gtaggacctc cacctgtcaa cataattgga agaaatctgt	2520
	tgactcagat tggctgcact ttaaattttc ccattagtcc tattgagact gtaccagtaa	2580
	aattaaagcc aggaatggat ggcccaaaaag ttaaacaatg gccattgaca gaagaaaaaa	2640
65	taaaagcatt agtagaaatt tgtacagaaa tggaaaagga aggaaaaatt tcaaaaattg	2700

ES 2 354 785 A1

	ggcctgaaaa	tccatacaat	actccagtat	ttgccataaa	gaaaaaagac	agtactaaat	2760
	ggagaaaatt	agtagatttc	agagaactta	ataagagaac	tcaagatttc	tgggaagttc	2820
5	aattaggaat	accacatcct	gcaggggtaa	aacagaaaaa	atcagtaaca	gtactggatg	2880
	tgggcatg	atatttttca	gttcccttag	ataaagactt	caggaagtat	actgcattta	2940
	ccatacctag	tataaacaat	gagacaccag	ggattagata	tcagtacaat	gtgcttccac	3000
10	agggatggaa	aggatcacca	gcaatattcc	agtgtagcat	gacaaaaatc	ttagagcctt	3060
	ttagaaaaca	aatccagac	atagtcatct	atcaatacat	ggatgatttg	tatgtaggat	3120
	ctgacttaga	aatagggcag	catagaacaa	aaatagagga	actgagacaa	catctgttga	3180
15	ggtggggatt	taccacacca	gacaaaaaac	atcagaaaga	acctccattc	ctttggatgg	3240
	gttatgaact	ccatcctgat	aaatggacag	tacagcctat	agtgctgcca	gaaaaggaca	3300
20	gctggactgt	caatgacata	cagaaattag	tgggaaaatt	gaattgggca	agtcagattt	3360
	atgcagggat	taaagtaagg	caattatgta	aacttcttag	gggaaccaa	gcactaacag	3420
	aagtagtacc	actaacagaa	gaagcagagc	tagaactggc	agaaaacagg	gagattctaa	3480
25	aagaaccggt	acatggagtg	tattatgacc	catcaaaaga	cttaatagca	gaaatacaga	3540
	agcaggggca	aggccaatgg	acatatcaaa	tttatcaaga	gccatttaa	aatctgaaaa	3600
	caggaaaata	tgcaagaatg	aagggtgcc	acactaatga	tgtgaaacaa	ttaacagagg	3660
30	cagtacaaaa	aatagccaca	gaaagcatag	taatatgggg	aaagactcct	aaatttaa	3720
	taccataca	aaaggaaaca	tgggaagcat	ggtggacaga	gtattggcaa	gccacctgga	3780
35	ttcctgagt	ggagtgtg	aatacccctc	ccttagtgaa	gttatggtac	cagttagaga	3840
	aagaacccat	aataggagca	gaaactttct	atgtagatgg	ggcagccaat	agggaaacta	3900
	aattagggaa	agcaggatat	gtaactgaca	gaggaagaca	aaaagttgtc	cccctaacgg	3960
40	acacaacaaa	tcagaagact	gagttacaag	caattcatct	agctttgcag	gattcgggat	4020
	tagaagtaaa	catagtgaca	gactcacaat	atgcattggg	aatcattcaa	gcacaaccag	4080
45	ataagagtga	atcagagtta	gtcagtcaaa	taatagagca	gttaataaaa	aaggaaaaag	4140
	tctacctggc	atgggtacca	gcacacaaag	gaattggagg	aatgaacaa	gtagataaat	4200
	tggtcagtgc	tggaatcagg	aaagtactat	ttttagatgg	aatagataag	gccaagaag	4260
50	aacatgagaa	atatcacagt	aattggagag	caatggctag	tgattttaac	ctaccacctg	4320
	tagtagcaaa	agaaatagta	gccagctgtg	ataaatgtca	gctaaaaggg	gaagccatgc	4380
	atggacaagt	agactgtagc	ccgggaatat	ggcagctaga	ttgtacacat	ttagaaggaa	4440
55	aagttatctt	gtagcagtt	catgtagcca	gtggatata	agaagcagaa	gtaattccag	4500
	cagagacagg	gcaagaaaca	gcatacttcc	tcttaaaatt	agcaggaaga	tggccagtaa	4560
	aaacagtaca	tacagacaat	ggcagcaatt	tcaccagtac	tacagttaag	gccgcctggt	4620
60	ggtgggctgg	gatcaagcag	gaatttggca	ttccctacaa	tcccaaaagt	caaggagtaa	4680
	tagaatctat	gaataaagaa	ttaaagaaaa	ttataggaca	ggtaagagat	caggctgaac	4740

65

ES 2 354 785 A1

	atcttaagac agcagtacaa atggcagtat tcatccacaa ttttaaaaga aaagggggga	4800
	ttgggggggta cagtgcaggg gaaagaatag tagacataat agcaacagac atacaaacta	4860
5	aagaattaca aaaacaaatt acaaaaattc aaaattttcg ggttttattac agggacagca	4920
	gagatccagt ttggaaagga ccagcaaagc tcctctggaa aggtgaaggg gcagtagtaa	4980
	tacaagataa tagtgacata aaagtagtgc caagaagaaa agcaaagatc atcagggatt	5040
10	atggaaaaca gatggcaggt gatgattgtg tggcaagtag acaggatgag gattaacaca	5100
	tggaaaagat tagtaaaaca ccatatgtat atttcaagga aagctaagga ctggttttat	5160
15	agacatcact atgaaagtac taatccaaaa ataagttcag aagtacacat cccactaggg	5220
	gatgctaaat tagtaataac aacatattgg ggtctgcata caggagaaag agactggcat	5280
	ttgggtcagg gagtctccat agaatggagg aaaaagagat atagcacaca agtagaccct	5340
20	gacctagcag accaactaat tcatctgcac tattttgatt gtttttcaga atctgctata	5400
	agaaatacca tattaggacg tatagttagt cctaggtgtg aatatcaagc aggacataac	5460
	aaggtaggat ctctacagta cttggcacta gcagcattaa taaaaccaa acagataaag	5520
25	ccacctttgc ctagtgttag gaaactgaca gaggacagat ggaacaagcc ccagaagacc	5580
	aagggccaca gagggagcca tacaatgaat ggacactaga gcttttagag gaacttaaga	5640
30	gtgaagctgt tagacatttt cctaggatat ggctccataa cttaggacaa catatctatg	5700
	aaacttacgg ggatacttgg gcaggagtgg aagccataat aagaattctg caacaactgc	5760
	tgtttatcca tttcagaatt ggggtgctgac atagcagaat aggcgttact cgacagagga	5820
35	gagcaagaaa tggagccagt agatcctaga ctagagccct ggaagcatcc aggaagtcag	5880
	cctaaaactg cttgtaccaa ttgctattgt aaaaagtgtt gctttcattg ccaagtttgt	5940
	ttcatgacaa aagccttagg catctcctat ggagggaaga agcggagaca gcgacgaaga	6000
40	gctcatcaga acagtcagac tcatcaagct tctctatcaa agcagtaagt agtacatgta	6060
	atgcaaccta taatagtagc aatagtagca ttagtagtag caataataat agcaatagtt	6120
45	gtgtggtcca tagtaatcat agaatatagg aaaatattaa gacaaagaaa aatagacagg	6180
	ttaattgata gactaataga aagagcagaa gacagtggca atgagagtga aggagaagta	6240
	tcagcacttg tggagatggg ggtggaaatg gggcaccatg ctccttggga tattgatgat	6300
50	ctgtagtgct acagaaaaat tgtgggtcac agtctattat ggggtacctg tgtggaagga	6360
	agcaaccacc actctatfff gtgcatcaga tgctaaagca tatgatacag aggtacataa	6420
	tgtttgggcc acacatgctt gtgtaccac agacccaac ccacaagaag tagtattggt	6480
55	aatgtgaca gaaaatttta acatgtggaa aatgacatg gtagaacaga tgcatgagga	6540
	tataatcagt ttatgggatc aaagcctaaa gccatgtgta aaattaacc cactctgtgt	6600
60	tagtttaaag tgcactgatt tgaagaatga tactaatacc aatagtagta gcgggagaat	6660
	gataatggag aaaggagaga taaaaactg ctctttcaat atcagcacia gcataagaga	6720
	taaggtgcag aaagaatatg cattctttta taaacttgat atagtaccaa tagataatac	6780
65	cagctatagg ttgataagtt gtaacacctc agtcattaca caggcctgtc caaaggtatc	6840

ES 2 354 785 A1

ctttgagcca attcccatac attattgtgc cccggctggt tttgcgattc taaaatgtaa 6900
 taataagacg ttcaatggaa caggaccatg tacaaatgtc agcacagtac aatgtacaca 6960
 5 tggaatcagg ccagtagtat caactcaact gctgttaaat ggcagtctag cagaagaaga 7020
 tgtagtaatt agatctgcca atttcacaga caatgctaaa accataatag tacagctgaa 7080
 cacatctgta gaaattaatt gtacaagacc caacaacaat acaagaaaaa gtatccgtat 7140
 10 ccagagggga ccagggagag catttgttac aataggaaaa ataggaaata tgagacaagc 7200
 acattgtaac attagtagag caaaatggaa tgccacttta aaacagatag ctagcaaatt 7260
 15 aagagaacaa tttggaaata ataaaacaat aatccttaag caatcctcag gaggggaccc 7320
 agaaattgta acgcacagtt ttaattgtgg aggggaattt ttctactgta attcaacaca 7380
 actgtttaat agtacttggg ttaatagtac ttggagtact gaagggtcaa ataactga 7440
 20 aggaagtgc acaatcacac tcccatgcag aataaaca tttataaaca tgtggcagga 7500
 agtaggaaaa gcaatgtatg cccctcccat cagtggacaa attagatggt catcaaata 7560
 tactgggctg ctattaacaa gagatggtgg taataacaac aatgggtccg agatcttcag 7620
 25 acctggagga ggcgatatga gggacaattg gagaagtga tttataaat ataaagtagt 7680
 aaaaattgaa ccattaggag tagcaccac caaggcaaag agaagagtgg tgcagagaga 7740
 aaaaagagca gtgggaatag gagctttggt ccttgggttc ttgggagcag caggaagcac 7800
 30 tatgggcgca gcgtcaatga cgctgacggt acaggccaga caattattgt ctgatatagt 7860
 gcagcagcag aacaatttgc tgagggctat tgaggcga cagcatctgt tgcaactcac 7920
 35 agtctggggc atcaaacagc tccaggcaag aatcctggct gtggaaagat acctaaagga 7980
 tcaacagctc ctggggattt ggggttgc tggaaaactc atttgcacca ctgctgtgcc 8040
 ttggaatgct agttggagta ataatctct ggaacagatt tggaaataca tgacctggat 8100
 40 ggagtgggac agagaaatta acaattacac aagcttaata cactccttaa ttgaagaatc 8160
 gcaaaccag caagaaaaga atgaacaaga attattggaa ttagataaat gggcaagttt 8220
 gtggaattgg ttaacataa caaattggct gtggtatata aaattattca taatgatagt 8280
 45 aggaggcttg gtaggtttaa gaatagttt tgctgtactt tctatagtga atagagttag 8340
 gcagggatat tcaccattat cgtttcagac ccacctcca atcccagggg gaccgacag 8400
 50 gcccgaggga atagaagaag aaggtggaga gagagacaga gacagatcca ttcgattagt 8460
 gaacggatcc ttagcactta tctgggacga tctgcggagc ctgtgcctct tcagctacca 8520
 ccgcttgaga gacttactct tgattgtaac gaggattgtg gaacttctgg gacgcagggg 8580
 55 gtgggaagcc ctcaaatatt ggtggaatct cctacagtat tggagtcagg aactaaagaa 8640
 tagtgctgtt aacttctca atgccacagc catagcagta gctgagggga cagatagggt 8700
 60 tatagaagta ttacaagcag cttatagagc tattcgccac atacctagaa gaataagaca 8760
 gggcttgaa aggattttgc tataagatgg gtggcaagtg gtcaaaaagt agtgtgattg 8820
 gatggcctgc tgtaagggaa agaatgagac gagctgagcc agcagcagat ggggtgggag 8880

65

ES 2 354 785 A1

	cagtatctcg agacctagaa aaacatggag caatcacaag tagcaataca gcagctaaca	8940
	atgctgcttg tgccctggcta gaagcacaag aggaggaaga ggtgggtttt ccagtcacac	9000
5	ctcaggtacc ttttaagacca atgacttaca aggcagctgt agatccttagc cactttttaa	9060
	aagaaaaggg gggactggaa gggctaattc actcccaaag aagacaagat atccttgatc	9120
	tgtggatcta ccacacacaa ggctacttcc ctgattggca gaactacaca ccagggccag	9180
10	gggtcagata tccactgacc tttggatggt gctacaagct agtaccagtt gagccagata	9240
	aggtagaaga ggccaataaa ggagagaaca ccagcttggt acaccctgtg agcctgcatg	9300
15	gaatggatga ccctgagaga gaagtgttag agtggagggt tgacagccgc ctagcatttc	9360
	atcacgtggc ccgagagctg catccggagt acttcaagaa ctgctgacat cgagcttgct	9420
	acaagggact ttccgctggg gactttccag ggaggcgtgg cctgggcggg actggggagt	9480
20	ggcgagccct cagatgctgc atataagcag ctgctttttg cctgtactgg gtctctctgg	9540
	ttagaccaga tctgagcctg ggagctctct ggctaactag ggaaccact gcttaagcct	9600
	caataaagct tgccctgagt gcttcaagta gtgtgtgccc gtctgttggt tgactctggt	9660
25	aactagagat ccctcagacc ctttttagtca gtgtggaaaa tctctagcac cccccaggag	9720
	gtagaggttg cagtgagcca agatcgcgcc actgcattcc agcctgggca agaaaacaag	9780
30	actgtctaaa ataataataa taagttaagg gtattaaata tatttataca tggaggatcat	9840
	aaaaatatat atattttgggc tgggcgcagt ggctcacacc tgcgcccggc cttttgggag	9900
	gccgaggcag gtggatcacc tgagtttggg agttccagac cagcctgacc aacatggaga	9960
35	aacccttct ctgtgtatatt ttagtagatt ttattttatg tgtattttat tcacaggtat	10020
	ttctggaaaa ctgaaactgt ttttctcta ctctgatacc acaagaatca tcagcacaga	10080
	ggaagacttc tgtgatcaaa tgtggtggga gaggagggtt ttcaccagca catgagcagt	10140
40	cagttctgcc gcagactcgg cgggtgtcct tcggttcagt tccaacaccg cctgcctgga	10200
	gagaggtcag accacagggg gagggctcag tcccaagac ataaacacc aagacataaa	10260
	caccaacag gtccaccccg cctgctgccc aggcagagcc gattcaccaa gacgggaatt	10320
45	aggatagaga aagagtaagt cacacagagc cggctgtgcg ggagaacgga gttctattat	10380
	gactcaaatc agtctcccca agcattcggg gatcagagtt ttttaaggata acttagtggtg	10440
50	tagggggcca gtgagttgga gatgaaagcg tagggagtcg aagggtgcct tttgcgccga	10500
	gtcagttcct ggggtgggggc cacaagatcg gatgagccag tttatcaatc cgggggtgcc	10560
	agctgatcca tggagtgcag ggtctgcaaa atatctcaag cactgattga tcttaggttt	10620
55	tacaatagtg atgttacccc aggaacaatt tggggaaggc cagaatcttg tagcctgtag	10680
	ctgcatgact cctaaacat aatttctttt ttgttttttt ttttttattt ttgagacagg	10740
	gtctcactct gtcacctagg ctggagtgca gtggtgcaat cacagctcac tgcagcctca	10800
60	acgtcgtaag ctcaagcgat cctccacct cagcctgcct ggtagctgag actacaagcg	10860
	acgcccagtg taatttttgt atttttggta gaggcagcgt tttgccgtgt ggccctggct	10920
65	ggtctcgaac tcctgggctc aagtgatcca gcctcagcct cccaaagtgc tgggacaacc	10980

ES 2 354 785 A1

	ggggccagtc actgcacctg gccctaaacc ataatttcta atcttttggc taatttgтта	11040
	gtcctacaaa ggcagtctag tccccaggca aaaagggggt ttgtttcggg aaagggctgt	11100
5	tactgtcttt gtttcaaact ataaactaag ttcctcctaa acttagttcg gcctacaccc	11160
	aggaatgaac aaggagagct tggaggttag aagcacgatg gaattggтта ggtcagatct	11220
	ctttcactgt ctgagttata attttgcaat ggtggttcaa agactgcccг cttctgacac	11280
10	cagtcgctgc attaatgaat cggccaacgc gcggggagag gcggtttgcg tattggcgct	11340
	cttccgcttc ctcgctcact gactcgctgc gctcggtcgt tcggctgcgg cgagcggtat	11400
15	cagctcactc aaaggcggta atacggttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga	11460
	acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccггг ttgctggcgct	11520
	ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt	11580
20	ggcgaaaccг gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc	11640
	gctctcctgt tccgacctg ccgcttaccg gatacctgtc cgcctttctc ctttcgggaa	11700
	gcgtggcgct ttctcaatgc tcacgctgта ggtatctcag ttcgggtgtag gtcgttcgct	11760
25	ccaagctggg ctgtgtgcac gaacccccг ttcagcccga ccgctgcгcc ttatccgгта	11820
	actatcgtct tgagtccaac ccgгтаagac acgacttatc gccactggca gcagccactg	11880
30	gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac agagttcttg aagtggтггс	11940
	ctaactacгг ctacactaga aggacagtat ttggtatctg cгctctgctg aagccagtta	12000
	ccttcggaaa aagagttggt agctcttgat ccggcaaaaa aaccaccgct ggtagcggтг	12060
35	gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt	12120
	tgatcttttc tacggggтct gacgctcagt ggaacgaaaa ctcacgгтаа gggattttgг	12180
	tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta	12240
40	aatcaatcta aagtatatat gagtaaactt ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagтг	12300
	aggcacctat ctcagcгatc tgtctatttc gttcatccat agttgcctga ctccccгtcг	12360
	tgtagataac tacgatacгг gagggcttac catctggccc cagtgctgca atgataccгc	12420
45	gagaccacгг ctcaccгггct ccagatttat cagcaataaa ccagccagcc ggaagggccг	12480
	agcгcagaag tгггctctgca actttatccг cctccatcca gtctattaat tгttгccггг	12540
50	aagctagagt aagtagttcg ccagгтаата gttгcгcaa cгttгttгcc attгctacag	12600
	gcatcггггг gtcacгctcг tcgtttgгта tггcttcatt cagctccггг tccaacгat	12660
	caaggcгagт tacatgatcc cccatgтггт gcaaaaaagc ggтtagctcc ttcгггctctc	12720
55	cгatcгttггт cagaagгтааg ttggccгcag тггtatcact catggгttatg gcagcactгc	12780
	ataattctct tactgtcatg ccatccгтаа gatgcttttc тгггactgггт gagtactcaa	12840
60	ccaagtcatt ctgagaatag тгtatгcгггг gaccгagгтг ctcttgcccc гcггтааtac	12900
	gggataatac cгcгccacat agcagaactt taaaagтггct catcattггта aaacгttctt	12960
	cggggcгaaa actctcaagg atcttaccгc тгttgagatc cagttcгatg таaccactc	13020

65

ES 2 354 785 A1

	gtgcacccaa ctgatcttca gcatctttta ctttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa	13080
	caggaaggca aaatgccgca aaaaagggaa taagggcgac acggaaatgt tgaatactca	13140
5	tactcttcct ttttcaatat tattgaagca tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat	13200
	acatatttga atgtatttag aaaaataaac aaataggggt tccgcgcaca tttccccgaa	13260
	aagtgccacc tgacgtctaa gaaaccatta ttatcatgac attaacctat aaaaataggc	13320
10	gtatcacgag gccctttcgt cttcaagaac tgcctcgcgc gtttcggtga tgacggtgaa	13380
	aacctctgac acatgcagct cccggagacg gtcacagctt gtctgtaagc ggatgccggg	13440
15	agcagacaag cccgtcaggg cgcgtcagcg ggtgttggcg ggtgtcgggg cgagccatg	13500
	accagtcac gtagcgatag cggagtgtac tggcttaact atgcggcatc agagcagatt	13560
	gtactgagag tgcaccatat gcggtgtgaa ataccgcaca gatgcgtaag gagaaaatac	13620
20	cgcatcaggc gccattcgcc attcaggctg cgcaactgtt gggaaagggcg atcgggtcgg	13680
	gcctcttcgc tattacgcca gcgcggggag gcagagattg cagtaagctg agatcgcagc	13740
	actgcactcc agcctgggcy acagagtaag actctgtctc aaaaataaaa taaataaatc	13800
25	aatcagatat tccaatcttt tcctttattt atttatttat tttctatttt ggaaacacag	13860
	tccttcctta ttccagaatt acacatatat tctatcttct tttatatgct ccagtttttt	13920
30	ttagaccttc acctgaaatg tgtgtataca aaatctaggc cagtccagca gagcctaaag	13980
	gtaaaaaata aaataataaa aaataaataa aatctagctc actccttcac atcaaaatgg	14040
	agatacagct gttagcatta aataccaat aacctatctt gtcctcaata attttaagcy	14100
35	cctctctcca ccacatctaa ctctgtcaa aggcatgtgc cccttccggg cgctctgctg	14160
	tgctgccaac caactggcat gtggactctg cagggtccct aactgccaaag ccccacagtg	14220
	tgccctgagg ctgccccttc cttctagcgg ctgccccac tcggctttgc tttccctagt	14280
40	ttcagttact tgcgttcagc caaggtctga aactaggtgc gcacagagcg gtaagactgc	14340
	gagagaaaga gaccagcttt acaggggggt tatcacagtg caccctgaca gtcgtcagcc	14400
45	tcacaggggg tttatcacat tgcaccctga cagtcgtcag cctcacaggg ggtttatcac	14460
	agtgcaccct tacaatcatt ccatttgatt cacaatcttt ttagtctcta ctgtgcctaa	14520
	cttgtaagtt aaatttgatc agaggtgtgt tcccagaggg gaaaacagta tatacagggt	14580
50	tcagtactat cgcatttcag gcctccacct gggcttggga atgtgtccc cgaggggtga	14640
	tgactacctc agttggatct ccacaggtca cagtgcaca agataacca gacacctccc	14700
	aaggctacca caatgggccg ccctccacgt gcacatggcc ggaggaactg ccatgtcgga	14760
55	ggtgcaagca cacctgcgca tcagagtcct tgggtgtggag ggagggacca gcgcagcttc	14820
	cagccatcca cctgatgaac agaacctagg gaaagcccca gttctactta caccagaaa	14880
60	ggc	14883

<210> 3

<211> 14883

65 <212> DNA

<213> Secuencia artificial

ES 2 354 785 A1

<220> misc_recomb

<223> p4634

5 <400> 3

	tggaaaggct aatttggctc caaaaaagac aagagatcct tgatctgtgg atctaccaca	60
10	cacaaggcta cttccctgat tggcagaact acacaccagg gccagggatc agatatccac	120
	tgaccttgg atggtgcttc aagttagtagt cagttgaacc agagcaagta gaagaggcca	180
	aataaggaga gaagaacagc ttgttacacc ctatgagcca gcatgggatg gaggaccg	240
15	agggagaagt attagtgtgg aagtttgaca gcctcctagc atttcgtcac atggcccgag	300
	agctgcatcc ggagtactac aaagactgct gacatcgagc tttctacaag ggactttccg	360
	ctggggactt tccagggagg tgtggcctgg gcgggactgg ggagtggcga gccctcagat	420
20	gctacatata agcagctgct ttttgcctgt actgggtctc tctggttaga ccagatctga	480
	gcctgggagc tctctggcta actagggaac cactgctta agcctcaata aagcttgcct	540
	tgagtgtca aagtagtgtg tgcccgtctg ttgtgtgact ctggtaacta gagatccctc	600
25	agaccctttt agtcagtgtg gaaaatctct agcagtggcg cccgaacagg gacttgaaag	660
	cgaaagtaaa gccagaggag atctctcgac gcaggactcg gcttgctgaa gcgvcacgg	720
30	caagaggcga ggggcggcga ctggtgagta cgccaaaaat tttgactagc ggaggctaga	780
	aggagagaga tgggtgagc agcgtcggta ttaagcgggg gagaattaga taaatgggaa	840
	aaaattcggg taaggccagg gggaaagaaa caatataaac taaaacatat agtatgggca	900
35	agcagggagc tagaacgatt cgcagttaat cctggccttt tagagacatc agaaggctgt	960
	agacaaatac tgggacagct acaaccatcc cttcagacag gatcagaaga acttagatca	1020
40	ttatataata caatagcagt cctctattgt gtgcatcaaa ggatagatgt aaaagacacc	1080
	aaggaagcct tagataagat agaggaagag caaaacaaaa gtaagaaaaa ggcacagcaa	1140
	gcagcagctg acacaggaaa caacagccag gtcagccaaa attacctat agtgcagaac	1200
45	ctccaggggc aaatggtaca tcaggccata tcacctagaa ctttaaatgc atgggtaaaa	1260
	gtagtagaag agaaggcttt cagcccagaa gtaataccca tgttttcagc attatcagaa	1320
	ggagccacc cacaagattt aaataccatg ctaaacacag tggggggaca tcaagcagcc	1380
50	atgcaaatgt taaaagagac catcaatgag gaagctgcag aatgggatag attgcatcca	1440
	gtgcatgcag ggcctattgc accaggccag atgagagaac caaggggaag tgacatagca	1500
55	ggaactacta gtacccttca ggaacaaata ggatggatga cacataatcc acctatccca	1560
	gtaggagaaa tctataaaag atggataatc ctgggattaa ataaaatagt aagaatgtat	1620
	agccctacca gcattctgga cataagacaa ggaccaaagg aaccctttag agactatgta	1680
60	gaccgattct ataaaactct aagagccgag caagcttcac aagaggtaaa aattggatg	1740
	acagaaacct tgttggtcca aaatgcgaac ccagattgta agactatfff aaaagcattg	1800
	ggaccaggag cgacactaga agaaatgatg acagcatgtc agggagtggg gggaccggc	1860
65	cataaagcaa gagttttggc tgaagcaatg agccaagtaa caaatccagc taccataatg	1920

ES 2 354 785 A1

	atacagaaag gcaatthttag gaaccaaaga aagactgtta agtgthttcaa ttgtggcaaa	1980
	gaagggcaca tagccaaaaa ttgcagggcc cctaggaaaa agggctgttg gaaatgtgga	2040
5	aaggaaggac accaaatgaa agattgtact gagagacagg ctaatthttt agggaagatc	2100
	tggccttccc acaagggaaag gccagggaaat tttcttcaga gcagaccaga gccaacagcc	2160
10	ccaccagaag agagcttcag gtttggggaa gagacaacaa ctccctctca gaagcaggag	2220
	ccgatagaca aggaactgta tcctttagct tccctcagat cactctttgg cagcgacccc	2280
	tcgtcacaat aaagataggg gggcaattaa aggaagctct attagatata ggagcagatg	2340
15	atacagtatt agaagaaatg aatttgccag gaagatggaa accaaaaatg atagggggaa	2400
	ttggaggttt tatcaaagta agacagtatg atcagatact catagaaatc tgcggacata	2460
	aagctatagg tacagtatta gtaggaccta cacctgtcaa cataattgga agaaatctgt	2520
20	tgactcagat tggctgcact ttaaattttc ccattagtcc tattgagact gtaccagtaa	2580
	aattaaagcc aggaatggat ggcccaaaag ttaaacaatg gccattgaca gaagaaaaaa	2640
25	taaaagcatt agtagaaatt tgtacagaaa tggaaaagga aggaaaaatt tcaaaaattg	2700
	ggcctgaaaa tccatacaat actccagtat ttgccataaa gaaaaaagac agtactaaat	2760
	ggagaaaatt agtagatttc agagaactta ataagagaac tcaagatttc tgggaagttc	2820
30	aattaggaat accacatcct gcaggggtaa aacagaaaaa atcagtaaca gtactggatg	2880
	tgggcgatgc atatthttca gttcccttag ataaagactt caggaagtat actgcattta	2940
	ccatacctag tataaacaat gagacaccag ggattagata tcagtacaat gtgcttcac	3000
35	agggatggaa aggatcacca gcaatattcc agtgtagcat gacaaaaatc ttagagcctt	3060
	ttagaaaaca aaatccagac atagtcatct atcaatacat ggatgatttg tatgtaggat	3120
40	ctgacttaga aatagggcag catagaacaa aaatagagga actgagacaa catctgttga	3180
	ggtggggatt taccacacca gacaaaaaac atcagaaaaga acctccattc ctttggatgg	3240
	gttatgaact ccatcctgat aaatggacag tacagcctat agtgctgcca gaaaaggaca	3300
45	gctggactgt caatgacata cagaaattag tgggaaaatt gaattgggca agtcagattt	3360
	atgcagggat taaagtaagg caattatgta aacttcttag gggaaaccaa gcaactaacag	3420
	aagtagtacc actaacagaa gaagcagagc tagaactggc agaaaacagg gagattctaa	3480
50	aagaaccggg acatggagtg tattatgacc catcaaaaga cttaatagca gaaatacaga	3540
	agcaggggca aggccaatgg acatatcaaa tttatcaaga gccatttaaa aatctgaaaa	3600
55	caggaaaata tgcaagaatg aagggtgcc acactaatga tgtgaaacaa ttaacagagg	3660
	cagtacaaaa aatagccaca gaaagcatag taatatgggg aaagactcct aattttaa	3720
	taccataca aaaggaaaca tgggaagcat ggtggacaga gtattggcaa gccacctgga	3780
60	ttctgagtg ggagtttgtc aatacccctc ccttagtgaa gttatggtac cagttagaga	3840
	aagaacccat aataggagca gaaactttct atgtagatgg ggcagccaat agggaaacta	3900
	aattaggaaa agcaggatat gtaactgaca gaggaagaca aaaagtgtc cccctaacgg	3960
65	acacaacaaa tcagaagact gagttacaag caattcatct agctttgcag gattcgggat	4020

ES 2 354 785 A1

tagaagtaaa catagtgaca gactcacaat atgcattggg aatcattcaa gcacaaccag 4080
 ataagagtga atcagagtta gtcagtcaaa taatagagca gttaataaaa aaggaaaaag 4140
 5 tctacctggc atgggtacca gcacacaaaag gaattggagg aatgaacaa gtagataaat 4200
 tggtcagtgc tggaatcagg aaagtactat ttttagatgg aatagataag gcccaagaag 4260
 aacatgagaa atatcacagt aattggagag caatggctag tgattttaac ctaccacctg 4320
 10 tagtagcaaa agaaatagta gccagctgtg ataaatgtca gctaaaaggg gaagccatgc 4380
 atggacaagt agactgtagc ccaggaatat ggcagctaga ttgtacacat ttagaaggaa 4440
 aagttatctt ggtagcagtt catgtagcca gtggatataat agaagcagaa gtaattccag 4500
 15 cagagacagg gcaagaaaca gcatacttcc tcttaaaatt agcaggaaga tggccagtaa 4560
 aaacagtaca tacagacaat ggcagcaatt tcaccagtac tacagttaag gccgcctgtt 4620
 20 ggtgcccggg gatcaagcag gaatttggca ttccctacaa tcccacaaagt caaggagtaa 4680
 tagaatctat gaataaagaa ttaaagaaaa ttataggaca ggtaagagat caggctgaac 4740
 atcttaagac agcagtacaa atggcagtat tcatccacaa ttttaaaaga aaagggggga 4800
 25 ttggggggta cagtgacagg gaaagaatag tagacataat agcaacagac atacaaacta 4860
 aagaattaca aaaacaaatt acaaaaattc aaaattttcg ggtttattac agggacagca 4920
 gagatccagt ttggaaagga ccagcaaagc tcctctggaa aggtgaaggg gcagtagtaa 4980
 30 tacaagataa tagtgacata aaagtagtgc caagaagaaa agcaaagatc atcagggatt 5040
 atggaaaaca gatggcagggt gatgattgtg tggcaagtag acaggatgag gattaacaca 5100
 35 tggaaaagat tagtaaaaca ccatatgtat atttcaagga aagctaagga ctggtttttat 5160
 agacatcact atgaaagtac taatccaaaa ataagttcag aagtacacat cccactaggg 5220
 gatgctaaat tagtaataac aacatattgg ggtctgcata caggagaaag agactggcat 5280
 40 ttgggtcagg gagtctccat agaatggagg aaaaagagat atagcacaca agtagaccct 5340
 gacctagcag accaactaat tcatctgcac tattttgatt gtttttcaga atctgctata 5400
 agaaatacca tattaggacg tatagttagt cctaggtgtg aatatcaagc aggacataac 5460
 45 aaggtaggat ctctacagta cttggcacta gcagcattaa taaaacaaa acagataaag 5520
 ccacctttgc ctagtgttag gaaactgaca gaggacagat ggaacaagcc ccagaagacc 5580
 50 aagggccaca gagggagcca tacaatgaat ggacactaga gcttttagag gaacttaaga 5640
 gtgaagctgt tagacatttt cctaggatat ggctccataa cttaggacaa catatctatg 5700
 aaacttacgg ggatacttgg gcaggagtgg aagccataat aagaattctg caacaactgc 5760
 55 tgtttatcca tttcagaatt ggggtgtcgac atagcagaat aggcgttact cgacagagga 5820
 gagcaagaaa tggagccagt agatcctaga ctagagccct ggaagcatcc aggaagtcag 5880
 60 cctaaaactg cttgtaccaa ttgctattgt aaaaagtgtt gctttcattg ccaagtttgt 5940
 ttcatgacaa aagccttagg catctcctat ggcaggaaga agcggagaca gcgacgaaga 6000
 gctcatcaga acagtcagac tcatcaagct tctctatcaa agcagtaagt agtacatgta 6060

65

ES 2 354 785 A1

	atgcaaccta taatagtagc aatagtagca ttagtagtag caataataat agcaatagtt	6120
	gtgtggtcca tagtaatcat agaatatagg aaaatattaa gacaaagaaa aatagacagg	6180
5	ttaattgata gactaataga aagagcagaa gacagtggca atgagagtga aggagaagta	6240
	tcagcacttg tggagatggg ggtggaaatg gggcaccatg ctccttggga tattgatgat	6300
	ctgtagtgtc acagaaaaat tgtgggtcac agtctattat ggggtacctg tgtggaagga	6360
10	agcaaccacc actctatfff gtgcatcaga tgctaaagca tatgatacag aggtacataa	6420
	tgtttgggcc acacatgcct gtgtaccac agacccaac ccacaagaag tagtattggt	6480
15	aaatgtgaca gaaaatttta acatgtggaa aaatgacatg gtagaacaga tgcattgagga	6540
	tataatcagt ttatgggatc aaagcctaaa gccatgtgta aaattaaccc cactctgtgt	6600
	tagtttaag tgcactgatt tgaagaatga tactaatacc aatagtagta gcgggagaat	6660
20	gataatggag aaaggagaga taaaaaactg ctctttcaat atcagcacia gcataagaga	6720
	taaggtgcag aaagaatatg cattctttta taaacttgat atagtaccaa tagataatac	6780
	cagctatagg ttgataagtt gtaacacctc agtcattaca caggcctgtc caaaggatc	6840
25	ctttgagcca attcccatac attattgtgc cccggctggt tttgctgattc taaaatgtaa	6900
	taataagacg ttcaatggaa caggaccatg tacaatgtc agcacagtac aatgtacaca	6960
30	tggaatcagg ccagtagtat caactcaact gctgttaaat ggcagtctag cagaagaaga	7020
	tgtagtaatt agatctgcca atttcacaga caatgctaaa accataatag tacagctgaa	7080
	cacatctgta gaaattaatt gtacaagacc caacaacaat acaagaaaaa gtatccgtat	7140
35	ccagagggga ccagggagag catttgttac aataggaaaa ataggaaata tgagacaagc	7200
	acattgtaac attagtagag caaaatggaa tgccacttta aaacagatag ctagcaaatt	7260
	aagagaacaa ttggaaata ataaaacaat aatctttaag caatcctcag gaggggaccc	7320
40	agaaattgta acgcacagtt ttaattgtgg aggggaattt ttctactgta attcaacaca	7380
	actgtttaat agtacttggg ttaatagtac ttggagtact gaagggtaa ataactga	7440
45	aggaagtgc acaatcacac tcccatgcag aataaaacaa tttataaaca tgtggcagga	7500
	agtaggaaaa gcaatgtatg cccctccat cagtggacaa attagatggt catcaaatat	7560
	tactgggctg ctattaacaa gagatggtgg taataacaac aatgggtccg agatcttcag	7620
50	acctggagga ggcgatatga gggacaattg gagaagtgaa ttatataaat ataaagtagt	7680
	aaaaattgaa ccattaggag tagcaccac caaggcaag agaagagtgg tgcagagaga	7740
	aaaaagagca gtgggaatag gagctttggt ccttgggttc ttgggagcag caggaagcac	7800
55	tatgggagca gcgtcaatga cgctgacggt acaggccaga caattattgt ctgatatagt	7860
	gcagcagcag aacaatttgc tgagggctat tgaggcgcaa cagcatctgt tgcaactcac	7920
60	agtctggggc atcaaacagc tccaggcaag aatcctggct gtggaaagat acctaaagga	7980
	tcaacagctc ctggggattt ggggttgctc tggaaaactc atttgacca ctgctgtgcc	8040
	ttggaatgct agttggagta ataaatctct ggaacagatt tggaaataca tgacctgat	8100
65	ggagtgggac agagaaatta acaattacac aagcttaata cactccttaa ttgaagaatc	8160

ES 2 354 785 A1

	gcaaaaccag	caagaaaaga	atgaacaaga	attattggaa	ttagataaat	gggcaagttt	8220
	gtggaattgg	tttaacataa	caaattggct	gtggtatata	aaattattca	taatgatagt	8280
5	aggaggcttg	gtaggtttta	gaatagtttt	tgctgtactt	tctatagtga	atagagttag	8340
	gcagggatat	tcaccattat	cgtttcagac	ccacctccca	atcccgaggg	gacccgacag	8400
	gcccgaagga	atagaagaag	aaggtggaga	gagagacaga	gacagatcca	ttcgattagt	8460
10	gaacggatcc	ttagcactta	tctgggacga	tctgcgagc	ctgtgcctct	tcagctacca	8520
	ccgcttgaga	gacttactct	tgattgtaac	gaggattgtg	gaacttctgg	gacgcagggg	8580
15	gtgggaagcc	ctcaaatatt	ggtggaatct	cctacagtat	tggagtcagg	aactaaagaa	8640
	tagtgctgtt	aacttgctca	atgccacagc	catagcagta	gctgagggga	cagatagggg	8700
	tatagaagta	ttacaagcag	cttatagagc	tattcgccac	atacctagaa	gaataagaca	8760
20	gggcttgga	aggatthtgc	tataagatgg	gtggcaagtg	gtcaaaaagt	agtgtgattg	8820
	gatggcctgc	tgtaagggaa	agaatgagac	gagctgagcc	agcagcagat	ggggtgggag	8880
	cagtatctcg	agacctagaa	aaacatggag	caatcacaag	tagcaataca	gcagctaaca	8940
25	atgctgcttg	tgcttgcta	gaagcacaag	aggaggaaga	ggtgggtttt	ccagtcacac	9000
	ctcaggtacc	tttaagacca	atgacttaca	aggcagctgt	agatcttagc	cacttttta	9060
	aagaaaagg	gggactgga	gggctaattc	actcccaaag	aagacaagat	atccttgatc	9120
30	tgtggatcta	ccacacaca	ggctacttcc	ctgattggca	gaactacaca	ccagggccag	9180
	gggtcagata	tccactgacc	tttggatggt	gctacaagct	agtaccagtt	gagccagata	9240
35	aggtagaaga	ggccaataaa	ggagagaaca	ccagcttggt	acaccctgtg	agcctgcatg	9300
	gaatggatga	ccctgagaga	gaagtgttag	agtggagggt	tgacagccgc	ctagcatttc	9360
	atcacgtggc	ccgagagctg	catccggagt	acttcaagaa	ctgctgacat	cgagcttgct	9420
40	acaagggact	ttccgctggg	gactttccag	ggaggcgtgg	cctgggcggg	actggggagt	9480
	ggcgagccct	cagatgctgc	atataagcag	ctgctttttg	cctgtactgg	gtctctctgg	9540
45	ttagaccaga	tctgagcctg	ggagctctct	ggctaactag	ggaaccact	gcttaagcct	9600
	caataaagct	tgcttgagt	gcttcaagta	gtgtgtgccc	gtctgttggt	tgactctggt	9660
	aactagagat	ccctcagacc	cttttagtca	gtgtggaaaa	tctctagcac	ccccaggag	9720
50	gtagaggttg	cagtgagcca	agatcgcgcc	actgcattcc	agcctgggca	agaaaacaag	9780
	actgtctaaa	ataataataa	taagttaagg	gtattaaata	tatttataca	tggaggatcat	9840
	aaaaatatat	atatttgggc	tgggcgcagt	ggctcacacc	tgccccggc	cctttgggag	9900
55	gccgaggcag	gtggatcacc	tgagtttggg	agttccagac	cagcctgacc	aacatggaga	9960
	aacccttct	ctgtgtattt	ttagtagatt	ttattttatg	tgtattttat	tcacaggtat	10020
60	ttctggaaaa	ctgaaactgt	ttttcctcta	ctctgatacc	acaagaatca	tcagcacaga	10080
	ggaagacttc	tgtgatcaaa	tgtgggtggg	gagggagggt	ttcaccagca	catgagcagt	10140
	cagttctgcc	gcagactcgg	cgggtgtcct	tcggttcagt	tccaacaccg	cctgcctgga	10200

65

ES 2 354 785 A1

	gagaggtcag accacagggg gagggctcag tccccaagac ataaacaccc aagacataaa	10260
	caccaacag gtccaccccg cctgctgccc aggcagagcc gattcaccaa gacgggaatt	10320
5	aggatagaga aagagtaagt cacacagagc cggctgtgcg ggagaacgga gttctattat	10380
	gactcaaadc agtctcccca agcattcggg gatcagagtt ttttaaggata acttagtggtg	10440
	tagggggcca gtgagttgga gatgaaagcg tagggagtcg aagggtgtcct tttgcgccga	10500
10	gtcagttcct ggggtggggc cacaagatcg gatgagccag tttatcaatc cgggggtgcc	10560
	agctgatcca tggagtgacg ggtctgcaaa atatctcaag cactgattga tcttaggttt	10620
15	tacaatagtg atgttaccac aggaacaatt tggggaaggt cagaatcttg tagcctgtag	10680
	ctgcatgact cctaaacat aatttctttt ttgtttttt tttttattt ttgagacagg	10740
	gtctcactct gtcacctagg ctggagtgca gtggtgcaat cacagctcac tgcagcctca	10800
20	acgtcgtaaq ctcaagcgat cctcccacct cagcctgcct ggtagctgag actacaagcg	10860
	acgccccagt taatttttgt atttttggta gaggcagcgt tttgccgtgt ggccctggct	10920
	ggtctcgaac tcctgggctc aagtgatcca gcctcagcct cccaaagtgc tgggacaacc	10980
25	ggggccagtc actgcacctg gccctaaacc ataatttcta atcttttggc taatttgta	11040
	gtcctacaaa ggcagtctag tccccaggca aaaagggggg ttgtttcggg aaagggctgt	11100
30	tactgtcttt gtttcaaact ataaactaag ttctcctaa acttagttcg gcctacacc	11160
	aggaatgaac aaggagagct tggaggttag aagcacgatg gaattggta ggtcagatct	11220
	ctttcactgt ctgagttata attttgcaat ggtggttcaa agactgcccg cttctgacac	11280
35	cagtcgctgc attaatgaat cggccaacgc gcggggagag gcggtttgcg tattggcgct	11340
	cttccgcttc ctcgctcact gactcgctgc gctcggtcgt tcggctgcgg cgagcggat	11400
	cagctcactc aaaggcggta atacggttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga	11460
40	acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggcccg ttgctggcgt	11520
	ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt	11580
45	ggcgaacccc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc	11640
	gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg gatacctgtc cgcctttctc cttcgggaa	11700
	gcgtggcgct ttctcaatgc tcacgctgta ggtatctcag ttcggtgtag gtcgttcgct	11760
50	ccaagctggg ctgtgtgcac gaacccccg ttcagcccga ccgctgcgcc ttatccgta	11820
	actatcgtct tgagtccaac ccgtaagac acgacttatc gccactggca gcagccactg	11880
	gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac agagttcttg aagtggggc	11940
55	ctaactacgg ctacactaga aggacagtat ttggtatctg cgctctgctg aagccagta	12000
	ccttcggaaa aagagttggg agctcttgat ccggcaaaaa aaccaccgct ggtagcggtg	12060
60	gttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt	12120
	tgatcttttc tacggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa ctcacgttaa gggattttg	12180
	tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta	12240
65	aatcaatcta aagtatatat gagtaaactt ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg	12300

ES 2 354 785 A1

aggcacctat ctcagcgatc tgtctatttc gttcatccat agttgcctga ctccccgtcg 12360
 tgtagataac tacgatacgg gagggccttac catctggccc cagtgcctgca atgataccgc 12420
 5 gagaccacg ctcaccggct ccagatttat cagcaataaa ccagccagcc ggaagggccg 12480
 agcgcagaag tggcctgca actttatccg cctccatcca gtctattaat tgttgccggg 12540
 aagctagagt aagtagttcg ccagttaata gtttgcgcaa cgttgttgcc attgctacag 12600
 10 gcatcgtggt gtcacgctcg tcgtttggta tggcttcatt cagctccggt tcccaacgat 12660
 caaggcgagt tacatgatcc cccatgtttg gcaaaaaagc ggtagctcc ttcggctctc 12720
 cgatcgtttg cagaagtaag ttggccgcag tgttatcact catggttatg gcagcactgc 12780
 15 ataatttctt tactgtcatg ccatccgtaa gatgcttttc tgtgactggt gagtactcaa 12840
 ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgcggc gaccgagttg ctcttgcccg gcgtcaatac 12900
 20 gggataatac cgcgccacat agcagaactt taaaagtgct catcattgga aaacgttctt 12960
 cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc tgttgagatc cagttcgatg taaccactc 13020
 gtgcacccaa ctgatcttca gcatctttta cttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa 13080
 25 caggaaggca aatgcccga aaaaaggga taagggcgac acggaaatgt tgaatactca 13140
 tactcttctt tttcaatat tattgaagca tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat 13200
 acatatttga atgtatttag aaaaataaac aaataggggt tccgcgcaca tttccccgaa 13260
 30 aagtgccacc tgacgtctaa gaaaccatta ttatcatgac attaacctat aaaaataggc 13320
 gtatcacgag gccctttcgt cttcaagaac tgcctcgcgc gtttcggtga tgacggtgaa 13380
 35 aacctctgac acatgcagct cccggagacg gtcacagctt gtctgtaagc ggatgccggg 13440
 agcagacaag cccgtcaggg cgcgtcagcg ggtgttgcg ggtgtcgggg cgcagccatg 13500
 acccagtcac gtagcgatag cggagtgtac tggcttaact atgcggcatc agagcagatt 13560
 40 gtactgagag tgcaccatat gcggtgtgaa ataccgcaca gatgcgtaag gagaaaatac 13620
 cgcacagggc gccattcgc attcaggctg cgcaactgtt ggaagggcg atcgggtcgg 13680
 gcctcttcgc tattacgcca gcgcggggag gcagagattg cagtaagctg agatcgcagc 13740
 45 actgcactcc agcctgggcg acagagtaag actctgtctc aaaaataaaa taaataaatc 13800
 aatcagatat tccaatcttt tcctttatth atttattht tttctattht ggaacacag 13860
 50 tccttcctta ttccagaatt acacatatat tctatthttc tttatathgt ccagthtttt 13920
 ttagaccttc acctgaaatg tgtgtataca aaatctaggc cagtccagca gagcctaaag 13980
 gtaaaaaata aaataataaa aaataaataa aatctagctc actccttcac atcaaaatgg 14040
 55 agatacagct gttagcatta aataccaaat aacctatctt gtcctcaata atthtaagcg 14100
 cctctctcca ccacatctaa ctctgtcaa aggcattgtc cccttccggg cgctctgctg 14160
 60 tgctgccaac caactggcat gtggactctg cagggtccct aactgccaag cccacagtg 14220
 tgccctgagg ctgccccttc cttctagcgg ctgccccac tcggctttgc tttccctagt 14280
 ttcagttact tgcgttcagc caaggtctga aactaggtgc gcacagagcg gtaagactgc 14340

65

ES 2 354 785 A1

	gagagaaaga gaccagcttt acagggggtt taccacagtg caccctgaca gtcgtcagcc	14400
	tcacagggggg tttatcacat tgcaccctga cagtcgtcag cctcacaggg ggtttatcac	14460
5	agtgcaccct tacaatcatt ccatttgatt cacaatTTTT ttagtctcta ctgtgcctaa	14520
	cttghtaagtt aaatttgatc agaggtgtgt tcccagaggg gaaaacagta tatacagggt	14580
	tcagtactat cgcatttcag gcctccacct gggctcttga atgtgtcccc cgaggggtga	14640
10	tgactacctc agttggatct ccacaggtca cagtgcacaca agataaccaa gacacctccc	14700
	aaggctacca caatgggccg ccctccacgt gcacatggcc ggaggaactg ccatgtcggg	14760
	gggtgaagca cacctgcgca tcagagtcct tgggtgtggag ggagggacca gcgcagcttc	14820
15	cagccatcca cctgatgaac agaacctagg gaaagcccca gttctactta caccaggaaa	14880
	ggc	14883

<210> 4
 20 <211> 14883
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 25 <220> misc_recomb
 <223> p4696

	<400> 4	
30	tggaagggct aatttggctc caaaaaagac aagagatcct tgatctgtgg atctaccaca	60
	cacaaggcta cttccctgat tggcagaact acacaccagg gccagggatc agatatccac	120
35	tgaccttgg atgggtgcttc aagtttagtac cagttgaacc agagcaagta gaagaggcca	180
	aataaggaga gaagaacagc ttgttacacc ctatgagcca gcatgggatg gaggaccgg	240
	agggagaagt attagtgtgg aagtttgaca gcctcctagc atttcgtcac atggccccgag	300
40	agctgcatcc ggagtactac aaagactgct gacatcgagc tttctacaag ggactttccg	360
	ctggggactt tccagggagg tgtggcctgg gcgggactgg ggagtggcga gccctcagat	420
	gctacatata agcagctgct ttttgcctgt actgggtctc tctggttaga ccagatctga	480
45	gcctgggagc tctctggcta actagggaac cactgctta agcctcaata aagcttgcct	540
	tgagtgtca aagtagtgtg tgcccgtctg ttgtgtgact ctggtaacta gagatccctc	600
50	agaccctttt agtcagtgtg gaaaatctct agcagtggcg cccgaacagg gacttgaaag	660
	cgaaagtaaa gccagaggag atctctcgac gcaggactcg gcttgctgaa gcgcgcacgg	720
	caagaggcga ggggcggcga ctggtgagta cgccaaaaat tttgactagc ggaggctaga	780
55	aggagagaga tgggtgagc agcgtcggtg ttaagcgggg gagaattaga taaatgggaa	840
	aaaattcggg taaggccagg gggaaagaaa caatataaac taaaacatat agtatgggca	900
	agcagggagc tagaacgatt cgcagttaat cctggccttt tagagacatc agaaggctgt	960
60	agacaaatac tgggacagct acaacctacc cttcagacag gatcagaaga acttagatca	1020
	ttatataata caatagcagt cctctattgt gtgcatcaaa ggatagatgt aaaagacacc	1080
	aaggaagcct tagataagat agaggaagag caaaacaaaa gtaagaaaaa ggcacagcaa	1140
65	gcagcagctg acacaggaaa caacagccag gtcagccaaa attacctat agtgcagaac	1200

ES 2 354 785 A1

	ctccaggggc	aaatggtaca	tcaggccata	tcacctagaa	ctttaaattgc	atgggtaaaa	1260
	gtagtagaag	agaaggcttt	cagcccagaa	gtaataacca	tgttttcagc	attatcagaa	1320
5	ggagccaccc	cacaagattt	aataccatg	ctaaacacag	tggggggaca	tcaagcagcc	1380
	atgcaaatgt	taaaagagac	catcaatgag	gaagctgcag	aatgggatag	attgcatcca	1440
10	gtgcatgcag	ggcctattgc	accaggccag	atgagagaac	caaggggaag	tgacatagca	1500
	ggaactacta	gtacccttca	ggaacaaata	ggatggatga	cacataatcc	acctatccca	1560
	gtaggagaaa	tctataaaag	atggataatc	ctgggattaa	ataaaatagt	aagaatgtat	1620
15	agccctacca	gcattctgga	cataagacaa	ggaccaaagg	aaccctttag	agactatgta	1680
	gaccgattct	ataaaactct	aagagccgag	caagcttcac	aagaggtaaa	aaattggatg	1740
	acagaaacct	tgttgggtcca	aatgccaac	ccagattgta	agactatttt	aaaagcattg	1800
20	ggaccaggag	cgacactaga	agaaatgatg	acagcatgtc	agggagtggg	gggacccggc	1860
	cataaagcaa	gagttttggc	tgaagcaatg	agccaagtaa	caaatccagc	taccataatg	1920
25	atacagaaaag	gcaatttttag	gaaccaaaga	aagactgtta	agtgtttcaa	ttgtggcaaa	1980
	gaagggcaca	tagccaaaaa	ttgcagggcc	cctaggaaaa	agggctgttg	gaaatgtgga	2040
	aaggaaggac	accaaataaa	agattgtact	gagagacagg	ctaatttttt	aggggaagatc	2100
30	tggccttccc	acaaggggaag	gccaggggaat	tttcttcaga	gcagaccaga	gccaacagcc	2160
	ccaccagaag	agagcttcag	gtttggggaa	gagacaacaa	ctccctctca	gaagcaggag	2220
	ccgatagaca	aggaactgta	tcctttagct	tccctcagat	cactctttgg	cagcgacccc	2280
35	tcgtcacaat	aaagataggg	gggcaattaa	aggaagctct	attagatata	ggagcagatg	2340
	atacagtatt	agaagaaatg	aatttgccag	gaagatggaa	accaaaaatg	ataggggggaa	2400
40	ttggaggttt	tatcaaagta	agacagtatg	atcagatact	catagaaatc	tgcggacata	2460
	aagctatagg	tacagtatta	gtaggaccta	cacctgtcaa	cataattgga	agaaatctgt	2520
	tgactcagat	tggctgcact	ttaaattttc	ccattagtcc	tattgagact	gtaccagtaa	2580
45	aattaaagcc	aggaatggat	ggcccaaaag	ttaaacaatg	gccattgaca	gaagaaaaaa	2640
	taaaagcatt	agtagaaatt	tgtacagaaa	tggaaaagga	aggaaaaatt	tcaaaaattg	2700
	ggcctgaaaa	tccatacaat	actccagtat	ttgccataaa	gaaaaaagac	agtactaaat	2760
50	ggagaaaatt	agtagatttc	agagaactta	ataagagaac	tcaagatttc	tgggaagttc	2820
	aattaggaat	accacatcct	gcagggttaa	aacagaaaaa	atcagtaaca	gtactggatg	2880
55	tgggcgatgc	atatttttca	gttcccttag	ataaagactt	caggaagtat	actgcattta	2940
	ccatacctag	tataaacaat	gagacaccag	ggattagata	tcagtacaat	gtgcttccac	3000
	agggatggaa	aggatcacca	gcaatattcc	agtgtagcat	gacaaaaatc	ttagagcctt	3060
60	ttagaaaaca	aaatccagac	atagtcatct	atcaatacat	ggatgatttg	tatgtaggat	3120
	ctgacttaga	aatagggcag	catagaacaa	aaatagagga	actgagacaa	catctgttga	3180
65	ggtggggatt	taccacacca	gacaaaaaac	atcagaaaga	acctccattc	ctttggatgg	3240

ES 2 354 785 A1

	gttatgaact	ccatcctgat	aaatggacag	tacagcctat	agtgctgcca	gaaaaggaca	3300
	gctggactgt	caatgacata	cagaaattag	tgggaaaatt	gaattgggca	agtcagattt	3360
5	atgcagggat	taaagtaagg	caattatgta	aacttcttag	gggaaccaa	gcactaacag	3420
	aagtagtacc	actaacagaa	gaagcagagc	tagaactggc	agaaaacagg	gagattctaa	3480
	aagaaccggt	acatggagtg	tattatgacc	catcaaaaga	cttaatagca	gaaatacaga	3540
10	agcaggggca	aggccaatgg	acatatcaaa	tttatcaaga	gccatttaaa	aatctgaaaa	3600
	caggaaaata	tgcaagaatg	aagggtgccc	acactaatga	tgtgaaacaa	ttaacagagg	3660
15	cagtacaaaa	aatagccaca	gaaagcatag	taatatgggg	aaagactcct	aaatttaaat	3720
	taccataca	aaaggaaaca	tgggaagcat	ggtggacaga	gtattggcaa	gccacctgga	3780
	ttcctgagtg	ggagtttgtc	aatacccctc	ccttagtgaa	gttatggtac	cagttagaga	3840
20	aagaacccat	aataggagca	gaaactttct	atgtagatgg	ggcagccaat	agggaaacta	3900
	aattaggaaa	agcaggatat	gtaactgaca	gaggaagaca	aaaagttgtc	cccctaacgg	3960
	acacaacaaa	tcagaagact	gagttacaag	caattcatct	agctttgcag	gattcgggat	4020
25	tagaagtaaa	catagtgaca	gactcacaat	atgcattggg	aatcattcaa	gcacaaccag	4080
	ataagagtga	atcagagtta	gtcagtcaaa	taatagagca	gttaataaaa	aaggaaaaag	4140
30	tctacctggc	atgggtacca	gcacacaaag	gaattggagg	aatgaacaa	gtagataaat	4200
	tggtcagtg	tggaatcagg	aaagtactat	ttttagatgg	aatagataag	gccaagaag	4260
	aacatgagaa	atatcacagt	aattggagag	caatggctag	tgattttaac	ctaccacctg	4320
35	tagtagcaaa	agaaatagta	gccagctgtg	ataaatgtca	gctaaaaggg	gaagccatgc	4380
	atggacaagt	agactgtagc	ccaggaatat	ggcagctaga	ttgtacacat	ttagaaggaa	4440
	aagttatctt	ggtagcagtt	catgtagcca	gtggatata	agaagcagaa	gtaattccag	4500
40	cagagacagg	gcaagaaaca	gcatacttcc	tcttaaaatt	agcaggaaga	tggccagtaa	4560
	aaacagtaca	tacagacaat	ggcagcaatt	tcaccagtac	tacagttaag	gccgcctggt	4620
45	ggtgggcggg	gatcaagcag	gaatttgca	ttccctacaa	tcccaaagt	caaggagtaa	4680
	tagaatcgat	gaataaagaa	ttaaagaaa	ttataggaca	ggtaagagat	caggctgaac	4740
	atcttaagac	agcagtacaa	atggcagtat	tcatccacaa	ttttaaaaga	aaagggggga	4800
50	ttggggggta	cagtgcaggg	gaaagaatag	tagacataat	agcaacagac	atacaaaacta	4860
	aagaattaca	aaaacaaatt	acaaaaattc	aaaattttcg	ggtttattac	agggacagca	4920
	gagatccagt	ttggaagga	ccagcaaagc	tcctctggaa	aggtgaaggg	gcagtagtaa	4980
55	tacaagataa	tagtgacata	aaagtagtgc	caagaagaaa	agcaaagatc	atcagggatt	5040
	atggaaaaca	gatggcaggt	gatgattgtg	tggcaagtag	acaggatgag	gattaacaca	5100
60	tggaaaagat	tagtaaaaca	ccatatgtat	atttcaagga	aagctaagga	ctggttttat	5160
	agacatcact	atgaaagtac	taatccaaaa	ataagttcag	aagtacacat	cccactaggg	5220
	gatgctaaat	tagtaataac	aacatattgg	ggtctgcata	caggagaaag	agactggcat	5280
65	ttgggtcagg	gagtctccat	agaatggagg	aaaaagagat	atagcacaca	agtagaccct	5340

ES 2 354 785 A1

gacctagcag accaactaat tcatctgcac tattttgatt gtttttcaga atctgctata 5400
 agaaatacca tattaggacg tatagttagt cctaggtgtg aatatcaagc aggacataac 5460
 5 aaggtaggat ctctacagta cttggcacta gcagcattaa taaaacccaaa acagataaag 5520
 ccacctttgc ctagtgttag gaaactgaca gaggacagat ggaacaagcc ccagaagacc 5580
 10 aagggccaca gagggagcca tacaatgaat ggacactaga gcttttagag gaacttaaga 5640
 gtgaagctgt tagacatttt cctaggatat ggctccataa cttaggacaa catatctatg 5700
 aaacttacgg ggatacttgg gcaggagtgg aagccataat aagaattctg caacaactgc 5760
 15 tgtttatcca tttcagaatt ggggtgctgac atagcagaat aggcgttact cgacagagga 5820
 gagcaagaaa tggagccagt agatcctaga ctagagccct ggaagcatcc aggaagtcag 5880
 cctaaaactg cttgtaccaa ttgctattgt aaaaagtgtt gctttcattg ccaagtttgt 5940
 20 ttcatgacaa aagccttagg catctcctat ggcaggaaga agcggagaca gcgacgaaga 6000
 gctcatcaga acagtcagac tcatcaagct tctctatcaa agcagtaagt agtacetgta 6060
 atgcaaccta taatagtagc aatagtagca ttagtagtag caataataat agcaatagtt 6120
 25 gtgtggtcca tagtaatcat agaatatagg aaaatattaa gacaaagaaa aatagacagg 6180
 ttaattgata gactaataga aagagcagaa gacagtggca atgagagtga aggagaagta 6240
 30 tcagcacttg tggagatggg ggtggaaatg gggcaccatg ctccttggga tattgatgat 6300
 ctgtagtgct acagaaaaat tgtgggtcac agtctattat ggggtacctg tgtggaagga 6360
 agcaaccacc actctatttt gtgcatcaga tgctaaagca tatgatacag aggtacataa 6420
 35 tgtttgggcc acacatgcct gtgtaccac agacccaac ccacaagaag tagtattggt 6480
 aatgtgaca gaaaatttta acatgtggaa aatgacatg gtagaacaga tgcagtagga 6540
 tataatcagt ttatgggatc aaagcctaaa gccatgtgta aaattaacc cactctgtgt 6600
 40 tagtttaaag tgcactgatt tgaagaatga tactaatacc aatagtagta gcgggagaat 6660
 gataatggag aaaggagaga taaaaactg ctctttcaat atcagcacia gcataagaga 6720
 45 taaggtgcag aaagaatatg cattctttta taaacttgat atagtaccaa tagataatac 6780
 cagctatagg ttgataagtt gtaacacctc agtcattaca caggcctgtc caaaggtatc 6840
 ctttgagcca attcccatac attattgtgc cccggctggt tttgcgattc taaaatgtaa 6900
 50 taataagacg ttcaatggaa caggaccatg tacaatgtc agcacagtac aatgtacaca 6960
 tggaaatcagg ccagtagtat caactcaact gctgttaaata ggcagtctag cagaagaaga 7020
 tgtagtaatt agatctgcca atttcacaga caatgctaaa accataatag tacagctgaa 7080
 55 cacatctgta gaaattaatt gtacaagacc caacaacaat acaagaaaaa gtatccgtat 7140
 ccagagggga ccagggagag catttgttac aataggaaaa ataggaaata tgagacaagc 7200
 60 acattgtaac attagtagag caaatggaa tgccacttta aaacagatag ctagcaaat 7260
 aagagaacaa tttggaaata ataaaacaat aatctttaag caatcctcag gaggggaccc 7320
 agaaattgta acgcacagtt ttaattgtgg aggggaattt ttctactgta attcaacaca 7380
 65

ES 2 354 785 A1

	actgtttaat agtacttggg ttaatagtac ttggagtact gaaggggtcaa ataactga	7440
	aggaagtgac acaatcacac tcccatgcag aataaaacaa ttataaaca tgtggcagga	7500
5	agtaggaaaa gcaatgtatg cccctcccat cagtggacaa attagatggt catcaaata	7560
	tactgggctg ctattaacaa gagatggtgg taataacaac aatgggtccg agatcttcag	7620
	acctggagga ggcgatatga gggacaattg gagaagtga ttatataaat ataaagtagt	7680
10	aaaaattgaa ccattaggag tagcacccac caaggcaaag agaagagtgg tgcagagaga	7740
	aaaagagca gtgggaatag gagctttggt ccttgggttc ttgggagcag caggaagcac	7800
15	tatgggcgca gcgtcaatga cgctgacggt acaggccaga caattattgt ctgatatagt	7860
	gcagcagcag aacaatttgc tgagggctat tgaggcgcaa cagcatctgt tgcaactcac	7920
	agtctggggc atcaaacagc tccaggcaag aatcctggct gtggaaagat acctaaagga	7980
20	tcaacagctc ctggggattt ggggttgctc tggaaaactc atttgacca ctgctgtgcc	8040
	ttggaatgct agttggagta ataaatctct ggaacagatt tggaaataca tgacctgat	8100
	ggagtgggac agagaaatta acaattacac aagcttaata cactccttaa ttgaagaatc	8160
25	gcaaaaccag caagaaaaga atgaacaaga attattgaa ttagataaat gggcaagttt	8220
	gtggaattgg ttaacataa caaattggct gtggtatata aaattattca taatgatagt	8280
	aggaggcttg gtaggtttaa gaatagtttt tgctgtactt tctatagtga atagagttag	8340
30	gcagggatat tcaccattat cgtttcagac ccacctcca atcccagggg gacccgacag	8400
	gcccgaagga atagaagaag aaggtggaga gagagacaga gacagatcca ttcgattagt	8460
35	gaacggatcc ttagcactta tctgggacga tctgcggagc ctgtgcctct tcagctacca	8520
	ccgcttgaga gacttactct tgattgtaac gaggattgtg gaacttctgg gacgcagggg	8580
	gtgggaagcc ctcaaattt ggtggaatct cctacagtat tggagtcagg aactaaagaa	8640
40	tagtgctgtt aacttgctca atgccacagc catagcagta gctgagggga cagatagggt	8700
	tatagaagta ttacaagcag cttatagagc tattcgccac atacctagaa gaataagaca	8760
	gggcttgtaa aggattttgc tataagatgg gtggcaagt gtcaaaaagt agtgtgattg	8820
45	gatggcctgc tgtaagggaa agaatgagac gagctgagcc agcagcagat ggggtgggag	8880
	cagtatctcg agacctagaa aaacatggag caatcacaag tagcaataca gcagctaaca	8940
50	atgctgcttg tgcttgctca gaagcacaag aggaggaaga ggtgggtttt ccagtcacac	9000
	ctcaggtacc ttaagacca atgacttaca aggcagctgt agatcttagc cactttttaa	9060
	aagaaaaggg gggactggaa gggctaattc actcccaaag aagacaagat atccttgatc	9120
55	tgtggatcta ccacacacaa ggctacttcc ctgattggca gaactacaca ccagggccag	9180
	gggtcagata tccactgacc tttggatggt gctacaagct agtaccagtt gagccagata	9240
60	aggtagaaga ggccaataaa ggagagaaca ccagcttgtt acaccctgtg agcctgcatg	9300
	gaatggatga ccctgagaga gaagtgttag agtggaggt tgacagccgc ctagcatttc	9360
	atcacgtggc ccgagagctg catccggagt acttcaagaa ctgctgacat cgagcttgct	9420
65	acaagggact ttccgctggg gactttccag ggaggcgtgg cctgggcggg actggggagt	9480

ES 2 354 785 A1

5 ggcgagccct cagatgctgc atataagcag ctgctttttg cctgtactgg gtctctctgg 9540
 ttagaccaga tctgagcctg ggagctctct ggctaactag ggaaccctact gcttaagcct 9600
 caataaagct tgccttgagt gcttcaagta gtgtgtgccc gtctgtttgtg tgactctggt 9660
 aactagagat ccctcagacc cttttagtcg gtgtggaaaa tctctagcac cccccaggag 9720
 gtagaggttg cagttagcca agatcgcgcc actgcattcc agcctgggca agaaaacaag 9780
 10 actgtctaaa ataataataa taagttaagg gtattaaata tattataca tggagggtcat 9840
 aaaaatatat atatttgggc tgggcgcagt ggctcacacc tgcgcccggc cttttgggag 9900
 gccgaggcag gtggatcacc tgagtttggg agttccagac cagcctgacc aacatggaga 9960
 15 aacccttct ctgtgtattt ttagtagatt ttattttatg tgtattttat tcacaggtat 10020
 ttctggaaaa ctgaaactgt ttttctctca ctctgatacc acaagaatca tcagcacaga 10080
 20 ggaagacttc tgtgatcaaa tgtggtggga gagggaggtt ttcaccagca catgagcagt 10140
 cagttctgcc gcagactcgg cgggtgtcct tcggttcagt tccaacaccg cctgcctgga 10200
 gagaggctag accacagggt gagggctcag tccccagac ataaacaccc aagacataaa 10260
 25 caccacaag gtccaccccg cctgctgccc aggcagagcc gattcaccaa gacgggaatt 10320
 aggatagaga aagagtaagt cacacagagc cggctgtgcy ggagaacgga gttctattat 10380
 gactcaaact agtctcccca agcattcggg gatcagagtt ttaaggata acttagtgtg 10440
 30 tagggggcca gtgagttgga gatgaaagcg tagggagtcg aaggtgtcct tttgcgccga 10500
 gtcagttcct ggggtggggc cacaagatcg gatgagccag tttatcaatc cgggggtgcc 10560
 35 agctgatcca tggagtgcag ggtctgcaaa atatctcaag cactgattga tcttaggttt 10620
 tacaatagtg atgttaccac aggaacaatt tggggaaggt cagaatcttg tagcctgtag 10680
 ctgcatgact cctaaaccat aatttctttt ttgttttttt ttttttattt ttgagacagg 10740
 40 gtctcactct gtcacctagg ctggagtgca gtggtgcaat cacagctcac tgcagcctca 10800
 acgtcgtgta ctcaagcgat cctcccacct cagcctgcct ggtagctgag actacaagcg 10860
 acgccccagt taatttttgt atttttggta gaggcagcgt tttgccgtgt ggccctggct 10920
 45 ggtctcgaac tcctgggctc aagtgatcca gcctcagcct cccaagtgc tgggacaacc 10980
 ggggccagtc actgcacctg gccctaaacc ataatttcta atcttttggc taatttggtta 11040
 50 gtccatacaa ggcagtctag tccccaggca aaaagggggt ttgtttcggg aaagggctgt 11100
 tactgtcttt gtttcaaact ataaactaag ttctctctaa acttagttcg gcctacacc 11160
 agaatgaac aaggagagct tggaggttag aagcacgatg gaattgggta ggtcagatct 11220
 55 ctttactgt ctgagttata attttgcaat ggtggttcaa agactgcccg cttctgacac 11280
 cagtcgctgc attaatgaat cggccaacgc gcggggagag gcggtttgcy tattggcgct 11340
 cttccgcttc ctcgctcact gactcgctgc gctcggtcgt tcggctgcgg cgagcggat 11400
 60 cagctcactc aaaggcggta atacggttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga 11460
 acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcy ttgctggcgt 11520

65

ES 2 354 785 A1

	ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt	11580
	ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc	11640
5	gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg gatacctgtc cgcttttctc ccttcgggaa	11700
	gcgtggcgct ttctcaatgc tcacgctgta ggtatctcag ttcggtgtag gtcgttcgct	11760
	ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg ttcagcccga ccgctgcgcc ttatccggta	11820
10	actatcgtct tgagtccaac ccggtaaagc acgacttata gccactggca gcagccactg	11880
	gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac agagttcttg aagtggtagc	11940
	ctaactacgg ctacactaga aggacagtat ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta	12000
15	ccttcggaaa aagagttggt agctcttgat ccggcaaaaa aaccaccgct ggtagcgggtg	12060
	gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt	12120
20	tgatcttttc tacggggctc gacgctcagt ggaacgaaaa ctcacggttaa gggattttgg	12180
	tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta	12240
	aatcaatcta aagtatatat gagtaaactt ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg	12300
25	aggcacctat ctcagcgatc tgtctatttc gttcatccat agttgcctga ctccccgtcg	12360
	tgtagataac tacgatacgg gagggcttac catctggccc cagtgctgca atgataccgc	12420
	gagaccacag ctcaccggct ccagatttat cagcaataaa ccagccagcc ggaagggccg	12480
30	agcgcagaag tggtcctgca actttatccg cctccatcca gtctattaat tgttgccggg	12540
	aagctagagt aagtagttcg ccagttaata gtttgcgcaa cgttggtgcc attgctacag	12600
35	gcatcgtggt gtcacgctcg tcgtttggtgta tggcttcatt cagctccggt tcccaacgat	12660
	caaggcgagt tacatgatcc cccatgttgt gcaaaaaagc ggtagctcc ttcggtcctc	12720
	cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgcag tgttatcact catggttatg gcagcactgc	12780
40	ataattctct tactgtcatg ccatccgtaa gatgcttttc tgtgactggt gagtactcaa	12840
	ccaagtcatc ctgagaatag tgtatgcggc gaccgagttg ctcttgcccg gcgtcaatac	12900
	gggataatac cgcgccacat agcagaactt taaaagtgct catcattgga aaacgttctt	12960
45	cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc tgttgagatc cagttcgatg taaccactc	13020
	gtgcacccaa ctgatcttca gcatctttta ctttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa	13080
50	caggaaggca aaatgccgca aaaaagggaa taagggcgac acggaaatgt tgaatactca	13140
	tactcttcct ttttcaatat tattgaagca tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat	13200
	acatatttga atgtatttag aaaaataaac aataggggt tccgcgcaaa tttccccgaa	13260
55	aagtgcacc tgacgtctaa gaaaccatta ttatcatgac attaacctat aaaaataggc	13320
	gtatcacgag gccctttcgt cttcaagaac tgctcgcgc gtttcggtaga tgacggtgaa	13380
	aacctctgac acatgcagct cccggagacg gtcacagctt gtctgtaagc ggatgccggg	13440
60	agcagacaag cccgtcaggg cgcgtcagcg ggtgttgccg ggtgtcgggg cgagccatg	13500
	accagtcac gtagcgatag cggagtgtac tggcttaact atgcggcatc agagcagatt	13560
65	gtactgagag tgcacatat gcggtgtgaa ataccgcaca gatgcgtaag gagaaaatac	13620

ES 2 354 785 A1

	cgcatcaggc gccattcgcc attcaggctg cgcaactggt gggaaagggcg atcgggtgcbg	13680
	gcctcttcgc tattacgccca gcgcggggag gcagagattg cagtaagctg agatcgcagc	13740
5	actgcactcc agcctggggcg acagagtaag actctgtctc aaaaataaaa taaataaatc	13800
	aatcagatat tccaatcttt tcctttattht atthtattat tttctattht ggaaacacag	13860
	tccttcctta ttccagaatt acacatatat tctatthttc tttatatgct ccagthtttt	13920
10	ttagaccttc acctgaaatg tgtgtataca aaatctaggc cagtccagca gagcctaaag	13980
	gtaaaaaata aaataataaa aaataaataa aatctagctc actccttcac atcaaaatgg	14040
15	agatacagct gttagcatta aataccaaat aacctatctt gtcctcaata atthttaagcg	14100
	cctctctcca ccacatctaa ctctgtcaa aggcattgtc cccttccggg cgctctgctg	14160
	tgctgccaac caactggcat gtggactctg cagggtccct aactgccaag ccccacagtg	14220
20	tgccctgagg ctgccccctc ctcttagcgg ctgccccac tcggctttgc tttccctagt	14280
	ttcagttact tgcgttcagc caaggtctga aactaggctc gcacagagcg gtaagactgc	14340
	gagagaaaga gaccagcttt acaggggggt tatcacagtg caccctgaca gtcgtcagcc	14400
25	tcacaggggg tttatcacat tgcaccctga cagtcgtcag cctcacaggg ggtttatcac	14460
	agtgcacctt tacaatcatt ccatttgatt cacaatthtt ttagtctcta ctgtgcctaa	14520
30	cttgtaagtt aaatthgatc agaggtgtgt tcccagaggg gaaaacagta tatacaggggt	14580
	tcagtactat cgcattthcag gcctccacct gggctctgga atgtgtcccc cgaggggtga	14640
	tgactacctc agttggatct ccacaggtca cagtgcacaca agataaccaa gacacctccc	14700
35	aaggctacca caatgggccg ccctccacgt gcacatggcc ggaggaactg ccattgtcggg	14760
	gggtgcaagca cacctgcgca tcagagtcct tgggtgtggag ggagggacca gcgcagcttc	14820
	cagccatcca cctgatgaac agaacctagg gaaagcccca gttctactta caccaggaaa	14880
40	ggc	14883

<210> 5
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana
 <400> 5

tccacctatc ccagtaagga gaa

23

<210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> virus de la inmunodeficiencia humana
 <400> 6

cttcctgccca taggatgctc

20

ES 2 354 785 A1

<210> 7
<211> 22
<212> DNA
5 <213> Secuencia artificial

<220> primer_bind
<223> Usado en la mutagénesis directa
10
<400> 7

gggccttatc gattccatct aa 22

15

<210> 8
<211> 20
20 <212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220> primer_bind
25 <223> Usado en la mutagénesis directa

<400> 8

30 **catattcccg ggctacagtc** 20

<210> 9
35 <211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

40 <220> primer_bind
<223> Usado en la mutagénesis directa

<400> 9
45

tgcttgatcc ccgggcacca acag 24

50 <210> 10
<211> 28
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

55 <220> primer_bind
<223> usado en la mutagénesis directa

60 <400> 10

ttattcatcg attctattac tccttgac 28

65 <210> 11
<211> 24

ES 2 354 785 A1

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

5 <220> primer_bind

<223> usado en la mutagénesis directa

<400> 11

10

aggcatcgcc atatggatca cgac

24

<210> 12

15

<211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

20

<220> primer_bind

<223> Sitio de restricción ApaI

<400> 12

25

gctgaagcaa tgagccaagt

20

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201001193

②② Fecha de presentación de la solicitud: 30.09.2010

③② Fecha de prioridad: **30-09-2008**

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	EDELSTEIN R. et al. "Oligonucleotide ligation assay for detecting mutations in the human immunodeficiency virus type 1 pol gene that are associated with resistance to zidovudine, didanosine and lamivudine" Journal of Clinical Microbiology (1998) Vol.36, páginas 569-572.	1-2
A	ES 2244332 B1 (FUNCACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN Y LA PREVENCIÓN DEL SIDA EN ESPAÑA E INSTITUTO DE SALUD CARLOS III) 01.12.2007	1-2
A	SACHDEVA N., et al. "Frequency of drug-resistant variants of HIV-1 coexistent with wild-type in treatment-naïve patients of India." Journal of the International AIDS Society." (2005) Vol. 7 páginas 1-7.	1-2
A	ABAD et al. "Construction and characterization of a minimized version of the HIV-1 pNL4-3 plasmid and its application for pseudotyping HIV-1 vectors." Molecular Biotechnology (2004) Vol. 28, páginas 87-95.	1-2
A	ES 2246859 T3 (VIRCO BVBA) 13.03.2002	1-2

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
03.03.2011

Examinador
M. García Bueno

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12Q1/70 (01.01.2006)

C12Q1/68 (01.01.2006)

C12N15/00 (01.01.2006)

C12N7/00 (01.01.2006)

C12R1/92 (01.01.2006)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q, C12N, C12R

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTE, TXTF, MEDLINE, BIOSIS, NPL, XPESP, EMBASE, EMBL ALL.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 03.03.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-2	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-2	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	EDELSTEIN R. et al. "Oligonucleotide ligation assay for detecting mutations in the human immunodeficiency virus type 1 pol gene that are associated with resistance to zidovudine, didanosine and lamivudine" Journal of Clinical Microbiology (1998) Vol.36, páginas 569-572.	1998
D02	ES 2244332 B1 (FUNCIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN Y LA PREVENCIÓN DEL SIDA EN ESPAÑA E INSTITUTO DE SALUD CARLOS III)	01.12.2007
D03	SACHDEVA N., et al. "Frequency of drug-resistant variants of HIV-1 coexistent with wild-type in treatment-naïve patients of India." Journal of the International AIDS Society." (2005) Vol. 7 páginas 1-7.	2005
D04	ABAD et al. "Construction and characterization of a minimized version of the HIV-1 pNL4-3 plasmid and its application for pseudotyping HIV-1 vectors." Molecular Biotechnology (2004) Vol. 28, páginas 87-95.	2004
D05	ES 2246859 T3 (VIRCO BVBA)	13.03.2002

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud de invención consiste en un método de evaluación de resistencia de fenotipos VIH a antirretrovirales (reivindicaciones 1-2).

El documento D01 divulga la detección de mutaciones en el gen pol de VIH-1 relacionadas con la resistencia a antirretrovirales mediante genotipado por ensayo de ligación de oligonucleótidos en codones específicos en el gen pol amplificado por PCR (ver resumen y páginas 569 y 571).

El documento D02 divulga una generación de nuevos clones virales recombinantes basados en VIH y su utilización en métodos analíticos. Dichos clones resultan de una serie de manipulaciones genéticas realizadas sobre un fragmento de ADN, entre ellas la introducción por mutagénesis dirigida de sitios de restricción que permitan extraer fácilmente determinados fragmentos de ADN del provirus matriz, para sustituirlos por genes de aislados procedentes de pacientes a valorar (ver página 8). Para la obtención de los clones se parte del vector proviral NL4.3 (ver página 9, líneas 29-30).

El documento D02 también divulga un sistema de determinación de resistencias fenotípicas a fármacos antirretrovirales (ver página 16 y reivindicación 9).

El documento D03 divulga mutaciones en el gen pol asociadas a resistencia a antirretrovirales y la dependencia de esta resistencia según la frecuencia de mutación del gen pol, la carga viral, y el número de mutaciones necesarias para conferir el fenotipo de resistencia (ver páginas 2-3).

El documento D04 la construcción de un nuevo vector retroviral basado en el plásmido pNL4-3, que puede ser útil para facilitar el diseño de vectores un vitro del VIH-1 para realizar pruebas fenotípicas de resistencia a antirretrovirales, permitiendo la introducción de sitios de restricción apropiados y específicas por mutagénesis dirigida al sitio del genoma proviral (ver páginas 87 y 91).

El documento D05 divulga ensayos para la detección de mutaciones en el VIH-1 que se basan en la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de secuencias genómicas víricas y ensayos para la determinación de la susceptibilidad de las fenotípicas (ver página 3, líneas 47-53, página 5, línea 63- página 6, línea 19, página 10, líneas 54-60, página 15, línea 66- página 16, línea 29 y página 17, líneas 13-26).

1. NOVEDAD (Art 6 Ley 11/1986) Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8 Ley 11/1986).**1.1. REIVINDICACIONES 1-2.**

La invención reivindicada difiere principalmente de los documentos citados en que ninguno de dichos documentos muestra los plásmidos que comprenden SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.

Así, la invención reivindicada implica la creación de nuevos sitios de restricción en el gen pol que no se divulga en el estado de la técnica.

Por lo tanto, los documentos citados son solo documentos que reflejan el estado de la técnica. En consecuencia, las reivindicaciones 1-2 son nuevas y se considera que implican actividad inventiva según los artículos 6 y 8 de la Ley 11/1986.