



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 355 027**

② Número de solicitud: 200802766

⑤ 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

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

⑫ Fecha de presentación: **30.09.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **22.03.2011**

Fecha de la concesión: **30.09.2011**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:
05.05.2011

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **13.10.2011**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente:
13.10.2011

⑰ Titular/es:

**Universidade de Santiago de Compostela
Edificio EMPRENDIA - Campus Sur
15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES
Nanogap Sub-NM-Powder, S.A.**

⑱ Inventor/es: **Regueiro García, Benito José**

⑳ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Plásmidos que incluyen la secuencia del VIH-1 y sus usos.**

㉑ Resumen:

Plásmidos que incluyen la secuencia del VIH-1 y sus usos. En la presente invención se proveen cuatro plásmidos en los que se han creado mutaciones dirigidas al tercer nucleótido del codón sin cambio en la traducción de la secuencia original, así como los usos para utilizar estas construcciones en la evaluación de sistemas de extracción de ácidos nucleicos, en la clonación de fragmentos del gen *pol* y del gen que codifica para la proteasa del virus VIH-1 y en el análisis de la resistencia fenotípica de VIH-1 de muestras clínicas a antirretrovirales, así como los correspondientes métodos para realizar la evaluación de los sistemas de extracción de ácidos nucleicos y para la construcción de los plásmidos.

ES 2 355 027 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 40.2.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Plásmidos que incluyen la secuencia del VIH-1 y sus usos.

5 En la presente invención se proveen cuatro plásmidos en los que se han creado mutaciones dirigidas al tercer nucleótido del codón sin cambio en la traducción de la secuencia original, así como los usos para utilizar estas construcciones en la evaluación de sistemas de extracción de ácidos nucleicos, en la clonación de fragmentos del gen *pol* y del gen que codifica para la proteasa del virus VIH-1 y en el análisis de la resistencia fenotípica de VIH-1 de muestras clínicas a antirretrovirales, así como los correspondientes métodos para realizar la evaluación de los sistemas de extracción de ácidos nucleicos y para la construcción de los plásmidos.

Estado de la técnica anterior

15 Las pruebas diagnósticas moleculares pueden seguir tres pasos consecutivos: extracción, amplificación/detección y análisis de datos. El primero de estos pasos, la extracción, condiciona el tiempo de respuesta de la prueba y, a su vez, éste está condicionado por el tipo y cantidad de la muestra, que debe ser siempre representativo del compartimento que se pretende analizar. El diseño de sistemas para la extracción de ácidos nucleicos, paso previo a cualquier detección molecular diagnóstica, se basa cada vez de forma más acentuada en el uso de nanopartículas magnéticas y lleva asociada una química diseñada para lograr la absorción inespecífica del ácido nucleico a la nanopartícula. El control de los métodos de producción y el rendimiento de los sistemas de extracción se ha basado en el posterior funcionamiento del sistema de detección que incluye una reacción de amplificación. Este proceso de expansión de la diana, imprescindible en la mayor parte de los test diagnósticos en uso, hace que el paso previo de extracción haya tenido sólo una importancia relativa, pero cada vez más, debido a las condiciones previamente apuntadas (duración del test e importancia del compartimento que se quiere analizar), este paso inicial cobra más trascendencia.

25 Se conocen dos tipos de soluciones alternativas para el control de la extracción y valoración de su calidad: 1) Colecciones o paneles de sueros estándar (Ronsin *et al.*, 2006. *J. Clin. Microbiol.*, 44:4, 1390-1399) y 2). Uso de muestras aleatorias obtenidas de pacientes.

30 Las evaluaciones encontradas hasta la fecha, no incluyen ni los plásmidos propuestos en esta invención, ni su combinación (Loens *et al.*, 2007. *J. Clin. Microbiol.* 45:2, 421-425). En el mercado se encuentra disponible OptiQual® un set de controles de ARN de VIH-1 que provee una herramienta para testar los resultados obtenidos mediante diferentes metodologías, evaluando o comparando nuevos procedimientos basados en el uso de ácidos nucleicos para la determinación del virus VIH-1.

40 Los plásmidos objeto de la presente invención ofrecen un método alternativo para evaluar y comparar la calidad de la extracción de los sistemas de extracción de ácido nucleicos, cuya eficacia se muestra en el correspondiente ejemplo de la presente invención.

Además, aunque 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.

50 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 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 contruidos usando secuencias de los genes de los virus aislados en los pacientes en las construcciones de 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 antiretrovirales.

Explicación de la invención

65 En la presente invención se proveen cuatro plásmidos en los que se han creado mutaciones dirigidas al tercer nucleótido del codón sin cambio en la traducción de una secuencia original, así como los usos para dos aplicaciones alternativas (1) evaluar los sistemas de extracción de ácidos nucleicos; cantidad, pureza e integridad de los fragmentos de ácidos nucleicos ADN y ARN eluidos y (2) 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-PinAI*. Asimismo, la presente invención provee el método de construcción de estos plásmidos, así como el método para evaluar la calidad de los sistemas de extracción de ADN y ARN eluidos.

5 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 generen sitios únicos de restricción en posiciones sucesivas del gen *pol* del virus VIH-1. La ventaja de este sistema es que 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 ADNs 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 en el otro uso alternativo de la invención como herramienta para la infección experimental “*in vivo*” y la posible valoración de la capacidad inhibitoria de los antiretrovirales.

Para evaluar el rendimiento de los sistemas de extracción de ácidos nucleicos, se lleva a cabo la extracción de los plásmidos integrados en una mezcla estándar cuya cantidad y composición inicial es conocida. Una aplicación colateral desarrollada, es la posibilidad de un rápido análisis clonal que detecte sesgos en el proceso de extracción que puede realizarse por pirosecuenciación, con pares de cebadores que hemos diseñado y reconocen de forma específica cada uno de los plásmidos de la presente invención permitiendo valorar la calidad de la extracción realizada. Los sistemas convencionales de análisis clonal mediante los cuales se determina la calidad del proceso de extracción, son procesos que no determinan sesgos, que recuperan de forma equilibrada todas las especies de ácidos nucleicos, y que se suelen hacer por transfección en bacterias y análisis individual de clones bacterianos que crecen de la placa de cultivo tras la transformación. Éste es un método largo y laborioso. En la presente invención esta determinación se puede hacer de forma rápida utilizando cebadores mediante los que, por pirosecuenciación, se detectan los diferentes polimorfismos y permiten comparar el porcentaje de especies de cada uno de los cuatro tipos de ácido nucleico incluidos en la presente invención tras el proceso de extracción en cuestión de horas.

30 La producción de reactivos para la detección de VIH y extracción de ADN de VIH es un aspecto que posee una clara aplicación industrial. Los sistemas automáticos de extracción y detección se han basado en el paso de detección para garantizar la calidad del producto comercializado. Los plásmidos y el sistema propuesto en la presente invención permiten establecer criterios de normalización de los reactivos de extracción de forma alternativa e independiente al resto del procedimiento, de forma que el uso del sistema de extracción no esté restringido a un proceso de detección específico y los lotes de nanopartículas magnéticas o de cartuchos de filtración puedan utilizarse con distintas técnicas de detección y análisis (secuenciación, PCR, Lipa, etc.).

Otra posible aplicación clínica o de desarrollo con las construcciones diseñadas en esta invención es la evaluación de la resistencia de los diferentes fenotipos de VIH-1 a antirretrovirales comerciales o en vías de ensayo.

40 Para evaluar la resistencia de diferentes fenotipos de virus a antirretrovirales, es necesaria la clonación, en los plásmidos de la invención, de los fragmentos deseados de los virus presentes 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.

45 En este sentido, un primer aspecto 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. En adelante nos referiremos a este plásmido/s como “el plásmido de la presente invención” o “los plásmidos de la invención”.

50 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:

55 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*.

60 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*.

65 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*.

ES 2 355 027 B2

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 *ClaI*.

5 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.

10 Un segundo aspecto de la presente invención es el uso de una célula empaquetadora transfectada con cualquiera de los plásmidos de la invención.

15 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.

El término célula “transformada” o “transfectada” hace referencia a la célula procariota 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.

20 Un tercer aspecto de la presente invención es un virión que contiene el ARN codificado por cualquiera de los plásmidos descritos en el primer aspecto de la presente invención. El término “virión” se refiere a la partícula viral infectiva compuesta al menos por:

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

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...).

30 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.

35 Un cuarto aspecto de la presente invención es el uso de una célula *reporter* transfectada con cualquiera de los viriones según el aspecto anterior.

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.

40 Un quinto aspecto es el uso del plásmido de la presente invención, o cualquiera de sus combinaciones, para evaluar la calidad de los sistemas de extracción de ADN. Por “calidad de los sistemas de extracción de ADN” se entiende la evaluación de la concentración, pureza y composición de las especies de ácidos nucleicos obtenidos tras el proceso de extracción. El uso descrito en este aspecto de la invención permite evaluar el nivel de estandarización de un sistema de extracción de ácidos nucleicos (por ejemplo un lote de nanopartículas) que debería poseer unas condiciones fijas en la capacidad de recuperación de los mismos. Estas condiciones fijas se ven alteradas por el efecto de impurezas presentes, otros ácidos nucleicos o compuestos aromáticos y otros agentes contaminantes que interfieren la capacidad de absorción de las matrices que se usan para purificar y extraer ácidos nucleicos.

45 Para poder determinar la calidad de la extracción se comparan los datos de concentración y los porcentajes de bases nucleotídicas obtenidos después de la extracción de la mezcla de las construcciones, mediante los métodos de extracción de ácidos nucleicos que se deseen probar, con la mezcla estándar compuesta por todos los plásmidos en una concentración conocida y con un porcentaje de bases conocido. En este proceso, se usa una cantidad alta de ADN, superior a la que son capaces de absorber las nanopartículas utilizadas, así podemos ver el rendimiento del proceso. La pureza se calcula por espectrofotometría; la relación de lecturas A280/A260 debe ser en torno a 1,8 para un 90% de pureza y los sesgos se valoran rápidamente por pirosecuenciación (ejemplo 2).

50 La pirosecuenciación es un tipo de secuenciación basada en la síntesis. Se utiliza una hebra del ADN inmovilizada y se sintetiza su hebra complementaria medio de la enzima ADN polimerasa empleando otra enzima quimioluminiscente. De este modo se consigue detectar de una forma rápida base por base según son adicionadas en la síntesis de la hebra complementaria. El uso que se propone para la pirosecuenciación, es el del análisis de cada una de las construcciones ya que permite valorar rápidamente si hay sesgos en el proceso de extracción y si se recuperan todas las especies o algunas con preferencia a otras. La composición de las especies de ácidos nucleicos recuperadas de la mezcla estándar se puede evaluar por medio de la determinación del porcentaje de la presencia en la mezcla de los nucleótidos mutados por pirosecuenciación, los porcentajes de la tabla 6 representan el porcentaje de SNPs en las mezclas tras la extracción por distintas plataformas.

65

ES 2 355 027 B2

Una realización preferida es un método de evaluación de la calidad de los sistemas de extracción de ácidos nucleicos que comprende:

- a. obtener una mezcla estándar de ADN,
- b. aplicar la mezcla estándar de (a) al sistema de extracción de ADN,
- c. cuantificar la concentración de ADN extraído en el paso (b) y/o pirosecuenciar un fragmento de dicho ADN, y
- d. comparar los resultados obtenidos en (c) con los valores de concentración y/o composición nucleotídica de la mezcla estándar.

El término “mezcla estándar de ADN” tal como se entiende en la presente invención es una mezcla de cantidades iguales de al menos cualquier combinación de los plásmidos SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4. Para obtener el ADN plasmídico que forma parte de la mezcla estándar, es necesario cultivar células que expresen cualquiera de los plásmidos de la invención y extraer el ADN plasmídico de las células anteriores de forma que el ADN que se obtenga esté libre de otros ácidos nucleicos o componentes. En este caso la extracción del ADN plasmídico puede realizarse, por ejemplo, mediante un sistema de extracción plasmiprep, miniprep, midiprep o maxiprep, sin excluir de esta lista otros sistemas de extracción.

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.

La calidad en el proceso de extracción de los ácidos nucleicos se entiende como la medida de la concentración y pureza del ADN eluido (ADN recuperado tras el proceso de extracción), que se hace por medio de espectrofotometría y/o fluorimetría (en la presente invención se ha utilizado el método fluorométrico Invitrogen Qubit™). La determinación de la composición del ADN eluido se puede llevar a cabo por medio de la determinación del porcentaje de la presencia en la mezcla de los nucleótidos mutados que se puede obtener por medio de pirosecuenciación.

Un sexto aspecto es la posibilidad de uso del virión VIH según el tercer aspecto de la presente invención, o cualquiera de sus combinaciones, para evaluar la calidad de los sistemas de extracción de ARN. Una ventaja de este uso es que se puede utilizar el ADN plasmídico o se pueden obtener viriones de cada una de las construcciones y mezclarlos, de forma que, en lugar de usar ADN circular o lineal se puede usar ARN del virión del sobrenadante del cultivo de las células infectadas o de las propias células. Esto hace muy versátil el sistema ya que casi todas las combinaciones son posibles.

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.

Asimismo, una realización preferida es un método de evaluación de la calidad de los sistemas de extracción de ácidos nucleicos que comprende:

- a. cultivar cualquiera de las células empaquetadoras que contienen los plásmidos de la invención,
- b. recoger los viriones liberados al medio de cultivo por las células del apartado (a),
- c. extraer el ARN de los viriones del apartado (b),
- d. obtener una mezcla estándar con el ARN de (c),
- e. aplicar la mezcla estándar de (d) al sistema de extracción de ARN,
- f. cuantificar la concentración de ARN extraído en el paso (e) y/o pirosecuenciarlo
- g. comparar los resultados obtenidos en (f) con los valores de concentración y/o composición nucleotídica de la mezcla estándar.

El término “mezcla estándar de ARN” tal como se entiende en la presente invención es una mezcla de cantidades iguales de al menos cualquier combinación del ARN codificado en los plásmidos SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4, es decir, el ARN de los viriones que son generados como consecuencia de la transfección de células empaquetadoras con los plásmidos de la invención.

La extracción del ARN de los viriones liberados al medio se lleva a cabo mediante sistemas de extracción, de forma que el ARN que se obtenga esté libre de otros ácidos nucleicos o componentes.

ES 2 355 027 B2

La calidad en el proceso de extracción se evalúa mediante la medida de la concentración y pureza del ARN eluido (ARN recuperado tras el proceso de extracción), que se hace por medio de espectrofotometría y/o fluorimetría. La determinación de la composición del ARN eluido se puede llevar a cabo por medio de la determinación del porcentaje de la presencia en la mezcla de los nucleótidos mutados que se puede obtener por medio de pirosecuenciación.

5 Un séptimo aspecto de la presente invención es el uso del plásmido de la invención, o cualquiera de sus combinaciones, para clonar fragmentos del gen *pol* y de la proteasa del virus VIH-1.

10 Los fragmentos del gen *pol* y del gen que codifica para la proteasa proceden de muestras aisladas de personas infectadas. Una vez amplificados los fragmentos, 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 obtenidos en la invención. *ApaI* es un sitio único común en todas las construcciones de pNL4.3 ya que aparece en la secuencia original.

20 Tres aspectos más de la presente invención son los usos del 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* según el cuarto aspecto de la presente invención, o cualquiera de sus combinaciones, para evaluar la resistencia de fenotipos del virus VIH-1 a antirretrovirales.

25 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.

30 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.

35 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.

40 Para evaluar la resistencia de diferentes fenotipos de virus VIH a antirretrovirales, es necesaria la clonación, en los plásmidos de la invención, 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.

Otro aspecto de la presente invención es un método de construcción de un plásmido que comprende:

- 50 a. amplificar la región de ADN del VIH-1 contenida en el plásmido pNL4.3 mediante los cebadores SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6,
- b. clonar la región amplificada en (a) en un vector de expresión,
- 55 c. realizar mutagénesis dirigidas independientes en el vector del apartado anterior 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,
- 60 d. reclonar de forma independiente cada uno de los 4 fragmentos obtenidos en (c), en el vector original pNL4.3.

65 Para la construcción de los cuatro plásmidos de la invención se ha llevado a cabo un procedimiento estándar de mutagénesis dirigida que se realizó mediante amplificación por PCR de la región de ADN del VIH-1 contenida en el plásmido pNL4.3 con los cebadores que se describen en el paso (a) del presente aspecto. Esta región se clona en un vector de expresión como por ejemplo el vector TOPO TA (Invitrogen) por el procedimiento que indica el proveedor de dicho vector. Un vector de expresión se define como aquel vector que se puede utilizar para clonar al menos un gen y además contiene las secuencias reguladoras necesarias para que la expresión del gen pueda someterse a experimentación. Este tipo de vectores posee, al menos, un origen de replicación, un marcador de selección, uno o varios sitios de clonación.

Tras sucesivas digestiones y realización de electroforesis en geles de agarosa, o bien secuenciación, se puede comprobar la correcta orientación de la región amplificada. Posteriormente se llevan a cabo cuatro procedimientos de mutagénesis dirigida de forma individual que origina los plásmidos que se reivindican en la presente invención. Para poder llevar a cabo el procedimiento de mutagénesis dirigida, se puede emplear el “*Transformer site-directed mutagenesis kit*” y los siguientes cebadores: cebador de selección SEQ ID NO: 11 y cebador mutagénico seleccionado de la lista que comprende SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10. 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. La presente descripción no limita el uso de otros vectores de expresión, métodos de llevar a cabo la mutagénesis dirigida así como los enzimas de restricción necesarios para reclonar el fragmento amplificado.

Por otra parte, el plásmido original del que se amplifica una región determinada de ADN del virus VIH-1 y en el cual se reclona el fragmento una vez realizadas las mutaciones descritas en la presente invención, podría ser otro distinto al pNL4.3 como por ejemplo, el plásmido pCHUS. El plásmido pCHUS es un plásmido mínimo desarrollado y publicado por los inventores de la presente invención que contiene el genoma completo del VIH-1 procedente del vector 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 bp 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 otros cultivos celulares e incluso podría permitir la mutagénesis *in vitro* directamente, sin necesidad de clonaciones y subclonaciones, siendo una alternativa compatible con las utilidades antes indicadas.

Otro aspecto de la presente invención es un kit para evaluar la calidad de los sistemas de extracción de ácidos nucleicos que comprende una mezcla estándar de ADN y/o ARN.

La mezcla estándar de ADN es una mezcla de cantidades iguales de al menos cualquier combinación de los plásmidos SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4. La mezcla estándar de ARN es una mezcla de cantidades iguales de al menos cualquier combinación del ARN codificado en los plásmidos SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4, es decir, el ARN de los viriones que son generados como consecuencia de la transfección de células empaquetadoras con los plásmidos de la invención. Las mezclas anteriores no excluyen la adición de otros ADNs y/o ARNs como por ejemplo el plásmido original pNL4.3 y/o el ARN codificado por la secuencia nucleotídica de los viriones obtenidos por la transfección de células empaquetadoras con pNL4.3.

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

Fig 1. Muestra el mapa genético del plásmido pNL4.3 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.

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

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.

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

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.

ES 2 355 027 B2

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

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.

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.

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).

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.

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.

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.

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.

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.

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

Ejemplos

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.

Ejemplo 1

Construcción de los cuatro plásmidos (pseudotipos) por mutación dirigida

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.

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.

ES 2 355 027 B2

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

- 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.

- 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.

- 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.

- 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.

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/Pin 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.

Ejemplo 2

Evaluación de los métodos de extracción de ácidos nucleicos

Utilizando métodos fluorométricos y espectrofotométricos para calcular los contenidos de ADN circular y lineal, se construyó un estándar. Dicho estándar incluye las cuatro especies de ADN plasmídico de la presente invención más el plásmido original pNL4.3. Un ejemplo de la aplicación de este estándar es su uso con varios sistemas que usan nanopartículas magnéticas o un sistema comercial de extracción por columnas de filtración de uso habitual.

El ADN de la mezcla estándar se aplicó a los sistemas de extracción. El ADN presente en la mezcla estándar es ADN plasmídico previamente obtenido desde una plasmiprep y mezclado después de digerir (con *ApaI*) para obtener el ADN linearizado o sin digerir. Éste ADN se valoró por fluorimetría y se mezclaron volúmenes equivalentes de los cinco plásmidos. Se utilizó una concentración de partida de 2740 ng, pero pueden usarse otras concentraciones obtenidas por concentración mediante precipitación con etanol o por dilución que pueden permitir el diseño de curvas de saturación que permita valorar el rendimiento de cualquier proceso de extracción. Otra alternativa que plantean los inventores es el empleo del sobrenadante de cultivo de células 293T transfectadas con cada uno de los plásmidos. De esta forma la mezcla estaría compuesta, en lugar de ADN lineal o circular, por los cinco tipos de viriones y su ácido nucleico sería ARN. La concentración de cada plásmido puede variarse y la de los viriones titularse de forma independiente con células MT2 o valorando la presencia de la proteína p24 (que es sintetizada si el virión es infeccioso).

En la tabla 1 se muestran los valores iniciales de la mezcla estándar y los porcentajes de cada población obtenidos tras pasar la muestra estándar (como ADN lineal, tras corte con el enzima *ApaI*, o como ADN circular, en forma circular) por varios sistemas de extracción automática comerciales: Siemens, Easymag (Biomerieux), Ampliprep, Magnapure (Roche) y Qiagen. Todos ellos están basados en nanopartículas magnéticas y extracción estándar en Qiagen (basado en filtración por columna).

TABLA 1

ADN de la mezcla estándar extraído utilizando cada uno de los sistemas

Método	Muestra*	Concentración obtenida	Total extraído (ng)	Rendimiento (%)
Mezcla estándar.	Contenido inicial	13,7 mg/ml x 200 ml	2740	100
Siemens	ADN lineal	3.6 ± 0,31 mg/ml x 70 ml	252	9,1
	ADN circular	4.3 ± 0,34 mg/ml x 70 ml	301	10,9
Easymag	ADN lineal	0.25 ± 0,01 mg/ml x 55 ml	13,72	0,5
	ADN circular	0.38 ± 0,01 mg/ml x 55 ml	21,25	0,7
Ampliprep	ADN lineal	0.30 ± 0,04 mg/ml x 70 ml	21	0,7
	ADN circular	0.50 ± 0,01 mg/ml x 70 ml	35	1,2
Magnapure	ADN lineal	23.5 ± 0,01 mg/ml x 200 ml	1175	42,8
	ADN circular	18.2 ± 1 mg/ml x 200 ml		3,2
Quiagen	ADN lineal	9.4 ± 0,3 mg/ml x 200 ml	1890	69
	ADN circular	4.3 ± 1 mg/ml x 200 ml	859	31,3

* El ADN lineal fue obtenido mediante corte enzimático con *Apal*. La concentración de ADN fue medida mediante el sistema Qubit™ (Invitrogen).

La capacidad de extracción de los diferentes ácidos nucleicos integrados en la mezcla estándar se puede evaluar, tras la extracción del ADN, por análisis clonal por pirosecuenciación.

Así pues, cada set de cebadores permite analizar el porcentaje de presencia de especies de ADN con el nucleótido (SNP) mutado o sin mutar, cada set corresponde a cada una de las mutaciones estudiadas y nos permite ver si las especies individuales de ADN extraído se ven afectadas en el proceso de absorción inespecífica que tiene lugar al utilizar diferentes nanopartículas o matrices durante la extracción. Para llevar a cabo la pirosecuenciación se ha empleado el sistema PYROMARK (Isogen):

ES 2 355 027 B2

Los set de cebadores son:

TABLA 2

Set 1: Correspondientes a SEQ ID NO: 1

Secuencia de cebadores para SEQ ID NO: 1		Puntuación: 93 Calidad: Alta.		
Cebador	Secuencia	Tamaño (pb)	Tm, °C	%GC
Directo	SEQ ID NO: 13	24	70.4	37.5
Reverso	SEQ ID NO: 14	23	69.6	43.5
Secuenciación	SEQ ID NO: 15	16	51.5	43.8

TABLA 3

Set 1.2: Correspondiente a SEQ ID NO: 2

Secuencia de cebadores para SEQ ID NO: 2		Puntuación: 83 Calidad: Media.		
Cebador	Secuencia	Tamaño (pb)	Tm, °C	%GC
Directo	SEQ ID NO: 16	22	71.7	50.0
Reverso	SEQ ID NO: 17	21	69.8	52.4
Secuenciación	SEQ ID NO: 18	17	51.1	47.1

ES 2 355 027 B2

TABLA 4

Set 1.3: Correspondiente a SEQ ID NO: 3

Secuencia de cebadores para SEQ ID NO: 3		Puntuación: 74 Calidad: Media.		
Cebador	Secuencia	Tamaño (pb)	Tm, °C	%GC
Directo	SEQ ID NO: 19	24	72,2	41,7
Reverso	SEQ ID NO: 20	22	73,3	45,5
Secuenciación	SEQ ID NO: 21	15	55,4	53,3

TABLA 5

Set 1.4: Correspondiente a SEQ ID NO: 4

Secuencia de cebadores para SEQ ID NO: 4		Puntuación: 88 Calidad: Alta.		
Cebador	Secuencia	Tamaño (pb)	Tm, °C	%GC
Directo	SEQ ID NO: 22	22	72,5	50,0
Reverso	SEQ ID NO: 23	24	69,5	41,7
Secuenciación	SEQ ID NO: 24	20	46,8	35,0

ES 2 355 027 B2

Los porcentajes de las bases nucleotídicas que integran las secuencias de cada uno de los sets, se describen en la tabla 6.

5

TABLA 6

Resultados de la pirosecuenciación

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

	Set 1		Set 1.2		Set 1.3		Set 1.4	
	T	G	T	C	G	C	T	G
Mezcla estándar	74,35%	26,00%	83,30%	16,70%	54,60%	45,40%	49,80%	50,20%
M20 Magna Pure Apa I (lineal)	72,85%	27,15%	85,70%	14,30%	41,40%	58,16%	69,40%	30,60%
M20 Magna Pure (circular)	71,95%	28,05%	85,00%	15,00%	47,90%	52,10%	63,05%	28,60%
M20 EasyMag Apa I (lineal)	58,30%	41,70%	84,30%	15,70%	42,60%	57,40%	71,40%	28,60%
M20 EasyMag (circular)	79,35%	20,65%	86,90%	13,10%	70,85%	29,15%	57,65%	42,35%
M20 Siemens (lineal)	73,50%	26,50%	82,10%	17,90%	39,85%	60,15%	71,68%	28,33%
M20 Siemens (circular)	75,10%	24,90%	87,05%	12,95%	38,15%	61,85%	71,68%	28,33%
M20 Qiagen (lineal)	69,60%	30,40%	88,30%	11,70%	41,65%	58,35%	65,90%	34,10%
M20 Qiagen (circular)	72,25%	27,75%	87,95%	12,05%	51,50%	48,50%	59,05%	40,95%

Ejemplo 3

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

5 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*).

10 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.

15 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 *ApaI-PlnAI*.

20 Ejemplo 4

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

Experimento I

25 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 (*ApaI2010-PinAI3486* = 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*).

30 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.

35 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).

45 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.

50 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.

55 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*.

60 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 7.

65

ES 2 355 027 B2

TABLA 7

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 Apa/PinAI	0,73± 0,35	0,92± 0,28	0,73± 0,05	1,03± 0,49
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

	<u>Nevirapina</u> (NNRTI)	<u>Atazanavir</u> (IP)	<u>Indinavir</u> (IP)	<u>Saquinavir</u> (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

	<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.

ES 2 355 027 B2

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*.

5 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 8

15 *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
20 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		
30 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
40 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
45 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
50 rt4.3 Apa/PinAI	1,49± 0,32	1,33± 0,08		

Los valores en negrita indican resistencia a antirretrovirales.

55 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.

65 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 2 355 027 B2

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 9 y 10

5

TABLA 9

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

10

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

15

20

25

TABLA 10

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)

30

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

35

40

IC₅₀: 1,17

45

Datos numéricos de las curvas de respuesta de la figura 8; tablas 11 y 12

TABLA 11

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

50

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

55

60

65

ES 2 355 027 B2

TABLA 12

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 13 y 14

TABLA 13

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 14

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

REIVINDICACIONES

- 5 4. 1. Plásmido seleccionado de la lista que comprende SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.
2. Célula empaquetadora transfectada con cualquiera de los plásmidos según la reivindicación 1.
3. Virión que contiene el ARN codificado por cualquiera de los plásmidos según la reivindicación 1.
- 10 4. Célula *reporter* transfectada con cualquiera de los viriones según la reivindicación 3.
5. Uso del plásmido según la reivindicación 1, o cualquiera de sus combinaciones, para evaluar la calidad de los sistemas de extracción de ADN.
- 15 6. Uso del virión según la reivindicación 3, o cualquiera de sus combinaciones, para evaluar la calidad de los sistemas de extracción de ARN.
7. Uso del plásmido según la reivindicación 1, o cualquiera de sus combinaciones, para clonar fragmentos del gen *pol* y de la proteasa del ADN del virus VIH-1.
- 20 8. Uso del plásmido según la reivindicación 1, o cualquiera de sus combinaciones, para evaluar la resistencia de fenotipos del virus VIH-1 a antirretrovirales.
9. Uso del virión según la reivindicación 3, o cualquiera de sus combinaciones, para evaluar la resistencia de fenotipos del virus VIH-1 a antirretrovirales.
- 25 10. Uso de la célula según la reivindicación 4, o cualquiera de sus combinaciones, para evaluar la resistencia de fenotipos del virus VIH-1 a antirretrovirales.
- 30 11. Método de construcción de un plásmido según la reivindicación 1 que comprende:
- a. amplificar la región de ADN del VIH-1 contenida en el plásmido pNL4.3 mediante los cebadores SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6,
- 35 b. clonar la región amplificada en (a) en un vector de expresión,
- c. realizar mutagénesis dirigidas independientes en el vector del apartado anterior 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, y
- 40 d. reclonar de forma independiente cada uno de los 4 fragmentos obtenidos en (c), en el vector original pNL4.3.
- 45 12. Método de evaluación de la calidad de los sistemas de extracción de ácidos nucleicos que comprende:
- a. cultivar cualquiera de las células según la reivindicación 2,
- b. recoger los viriones liberados al medio de cultivo por las células del apartado (a),
- 50 c. extraer el ARN de los viriones del apartado (b),
- d. obtener una mezcla estándar con el ARN de (c),
- 55 e. aplicar la mezcla estándar de (d) al sistema de extracción de ARN,
- f. cuantificar la concentración de ARN extraído en el paso (e) y/o pirosecuenciarlo y
- 60 g. comparar los resultados obtenidos en (f) con los valores de concentración y/o composición nucleotídica de la mezcla estándar de ARN.
13. Kit para evaluar la calidad de los sistemas de extracción de ácidos nucleicos que comprende los medios adecuados para llevar a cabo el método de la reivindicación 12.

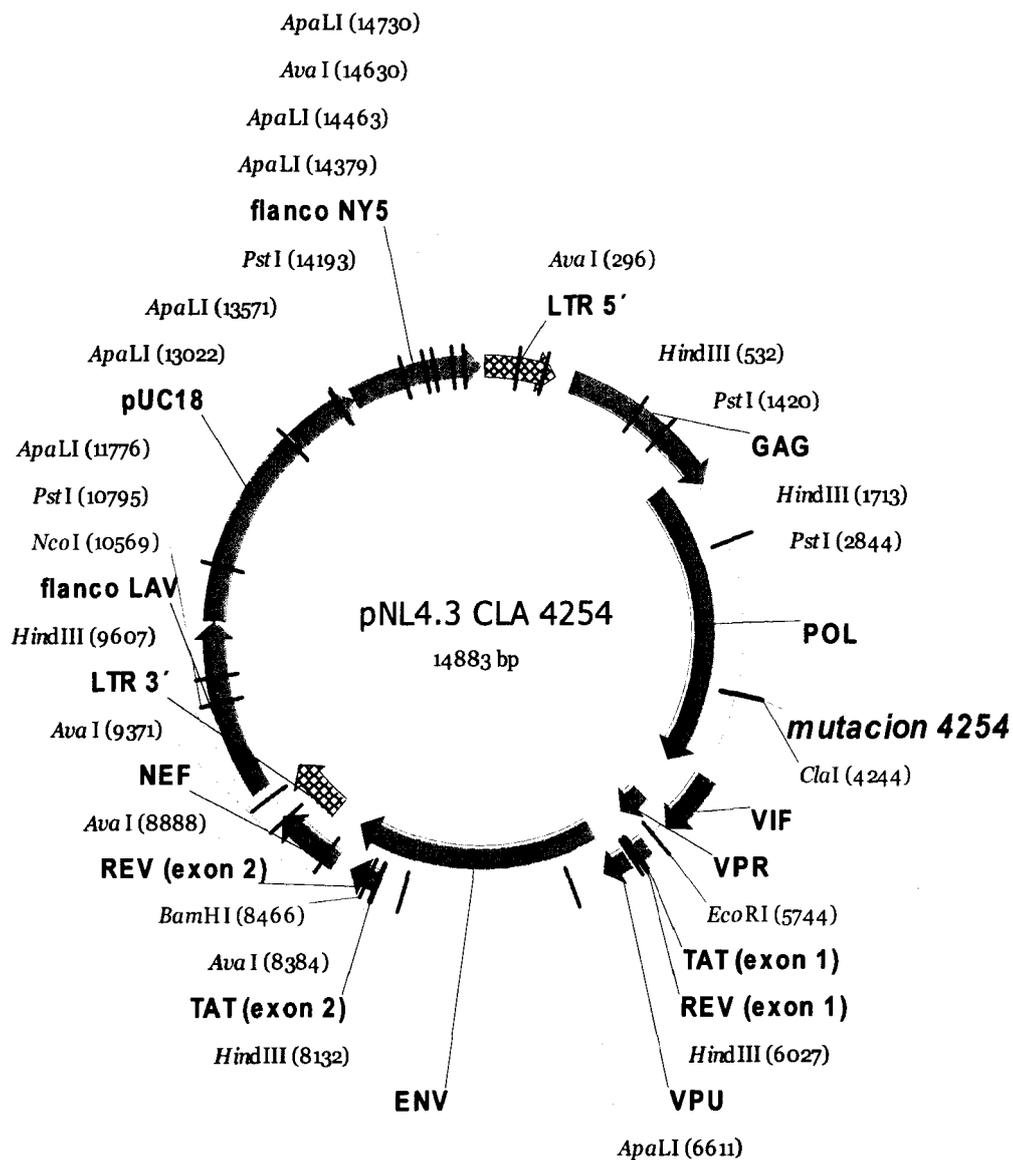


FIG. 1

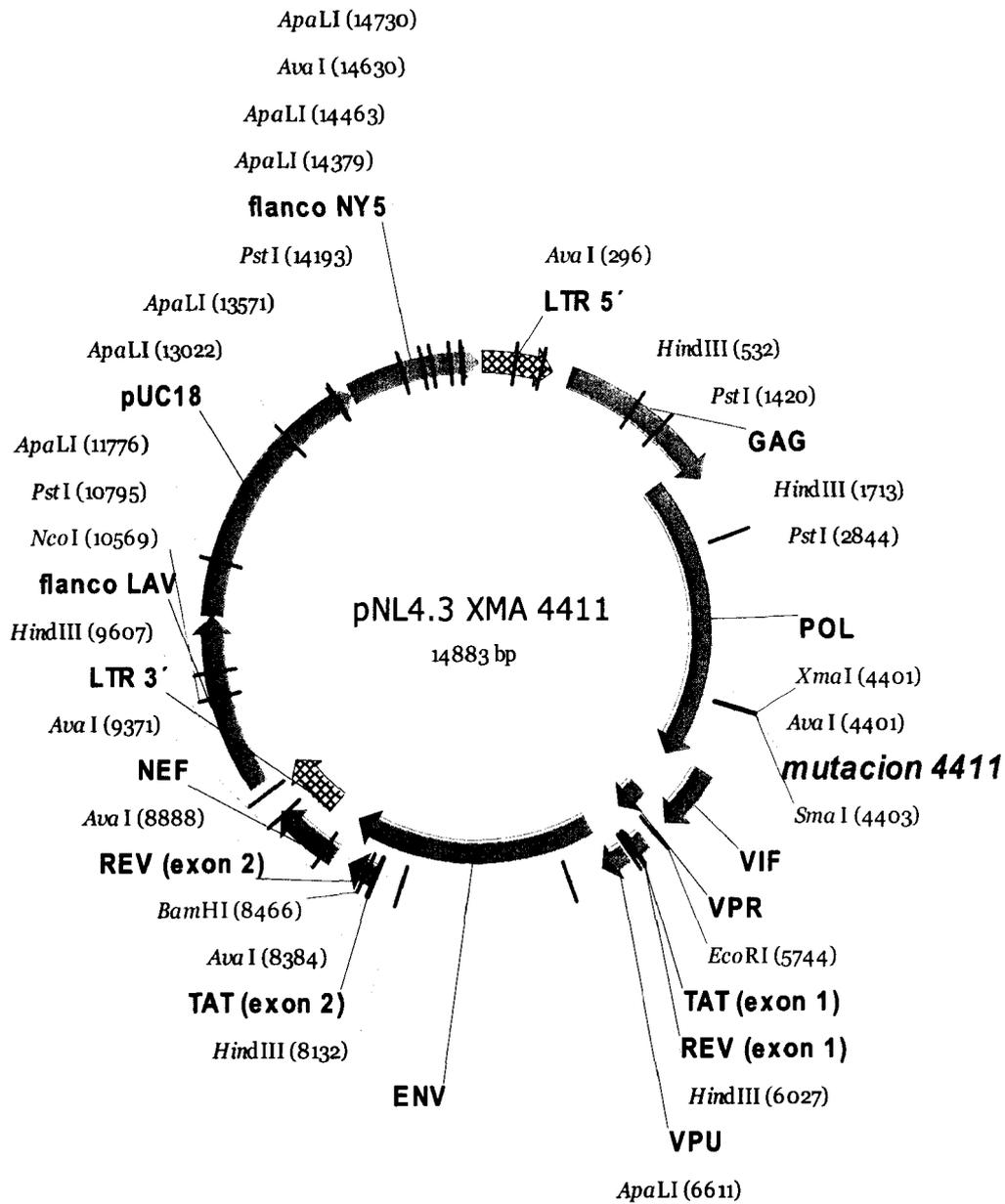


FIG. 2.

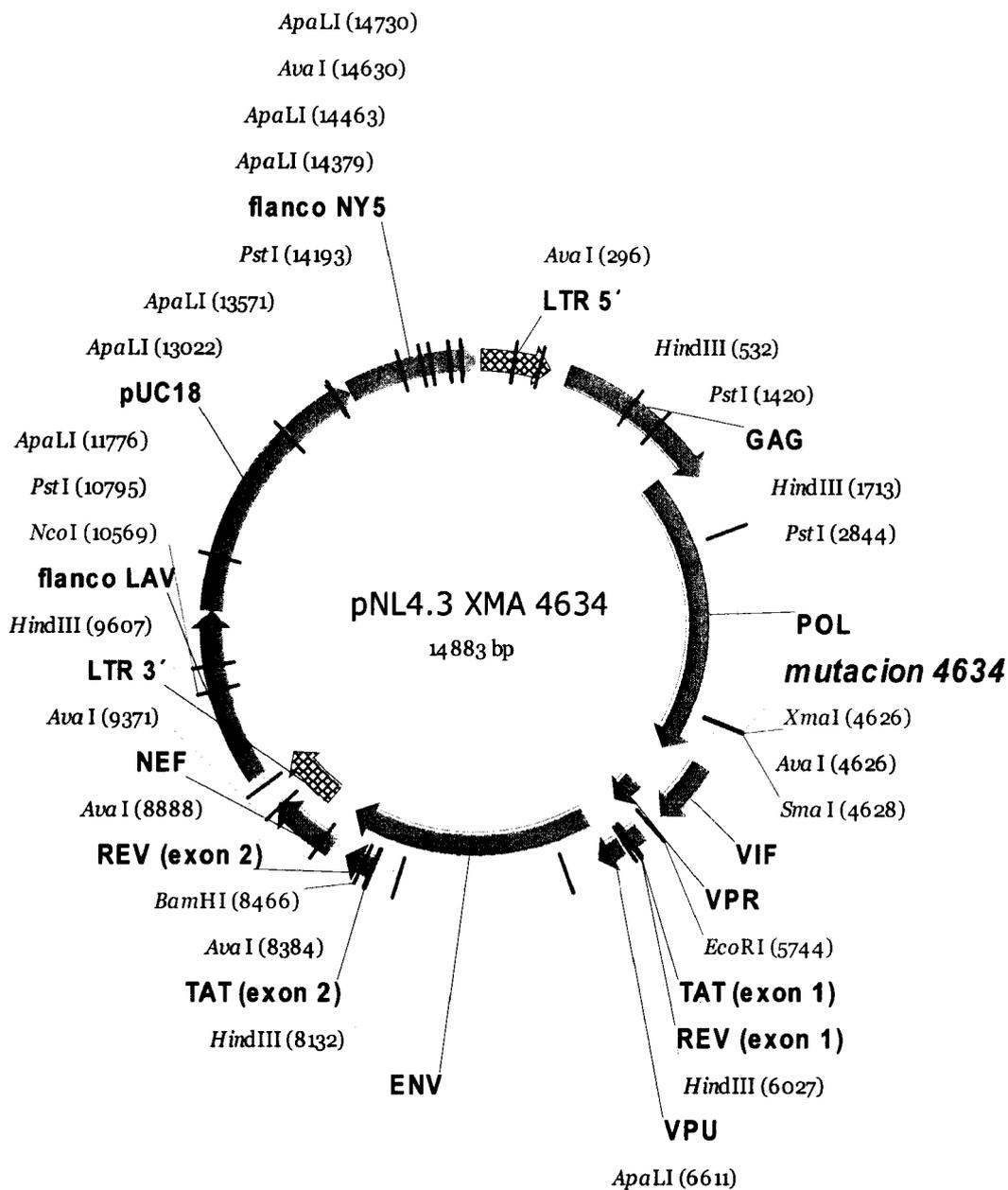


FIG. 3

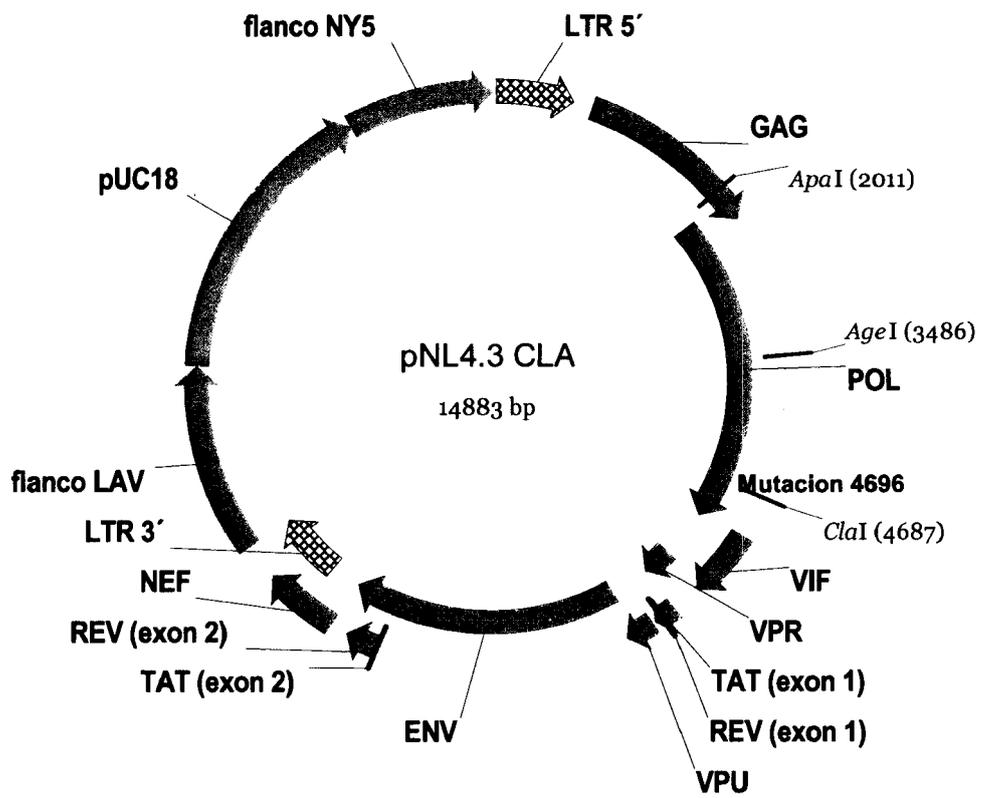


FIG. 4

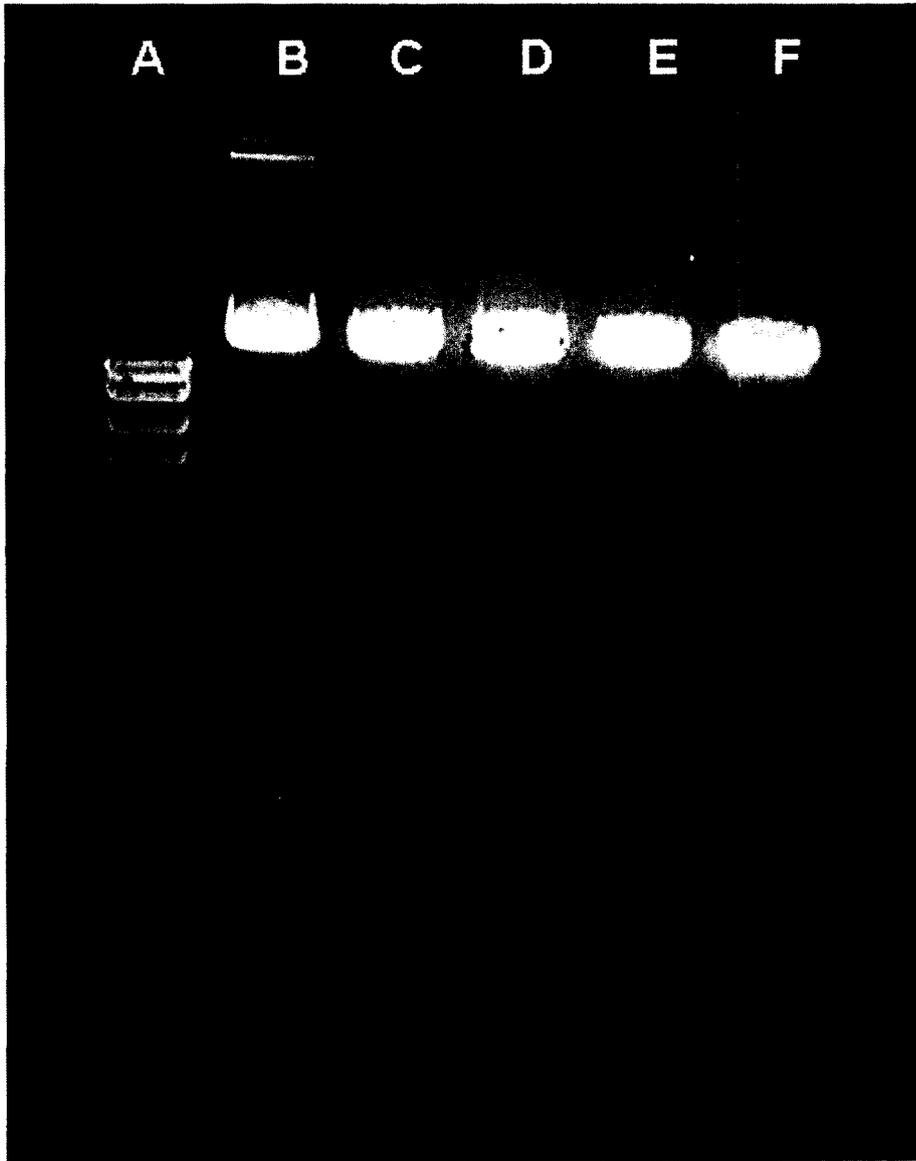


FIG. 5

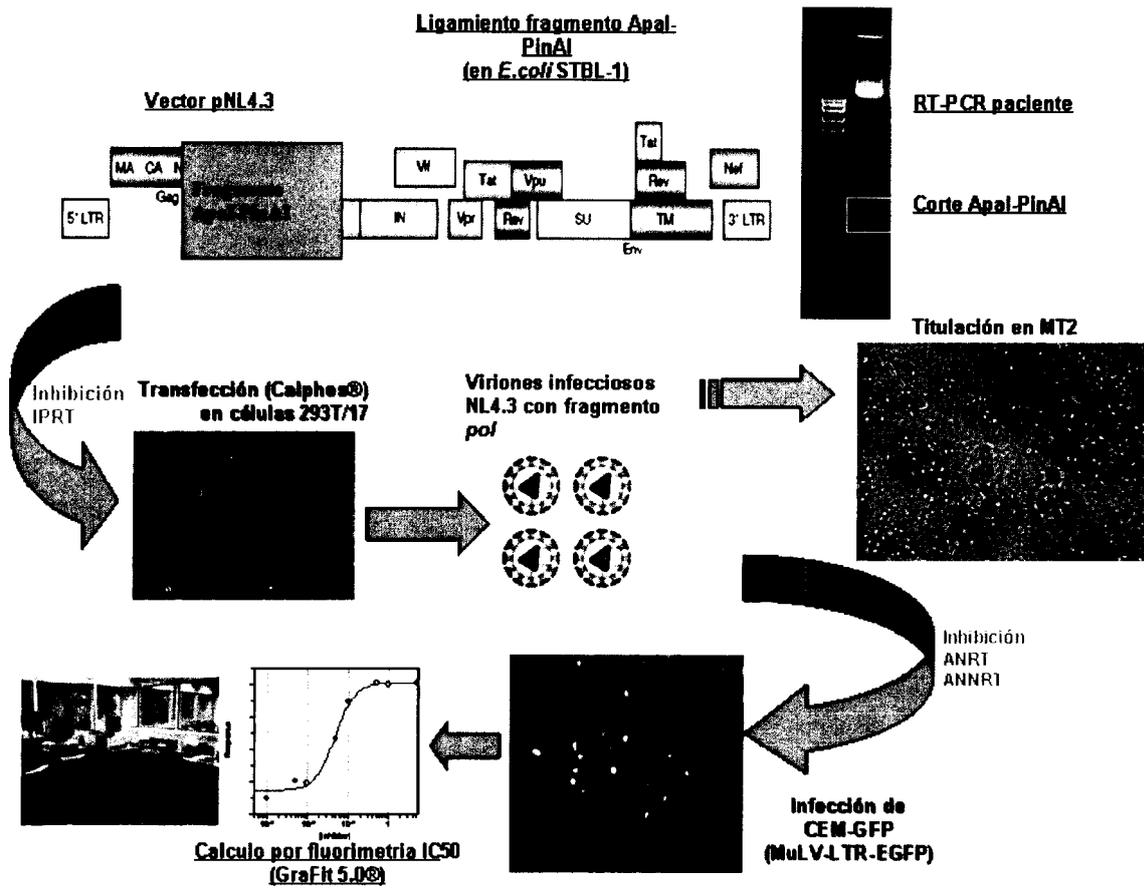


FIG. 6

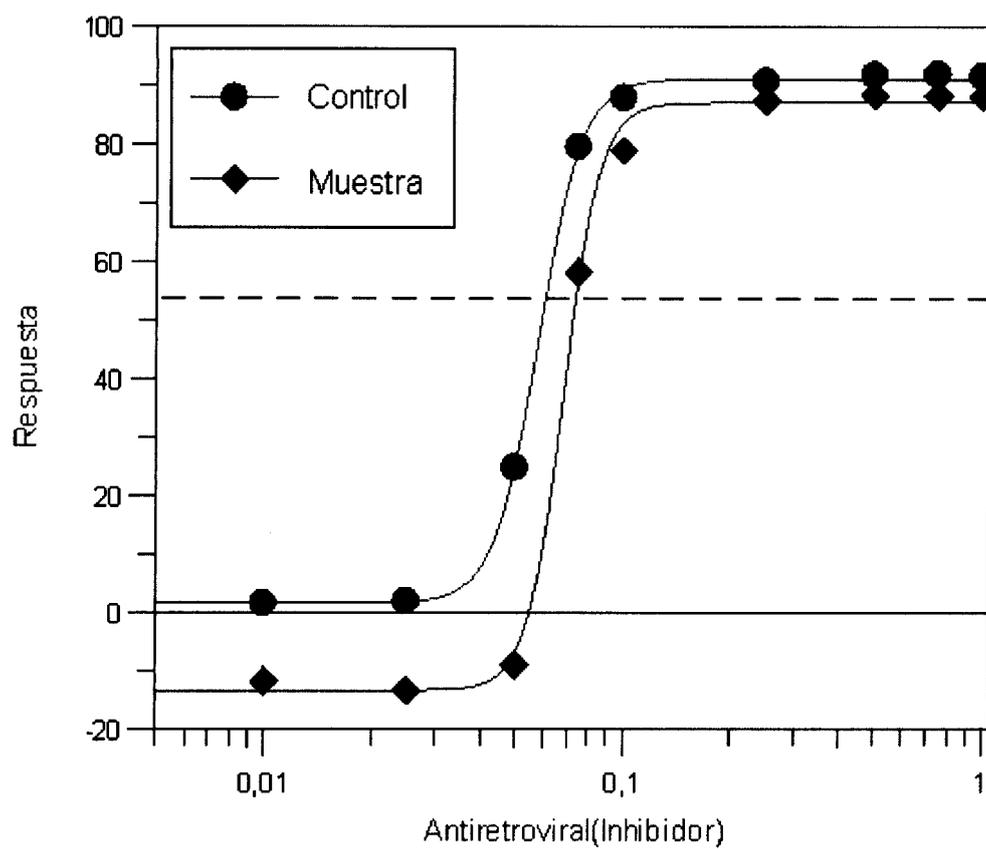


FIG. 7

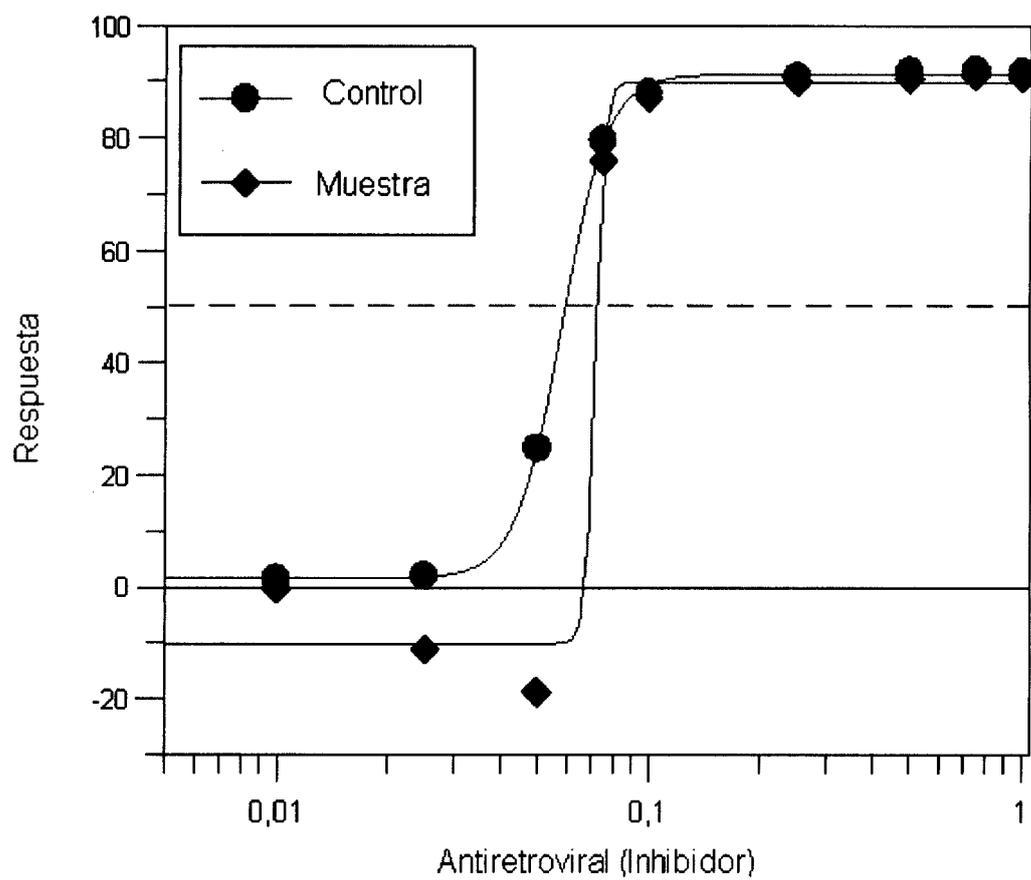


FIG. 8

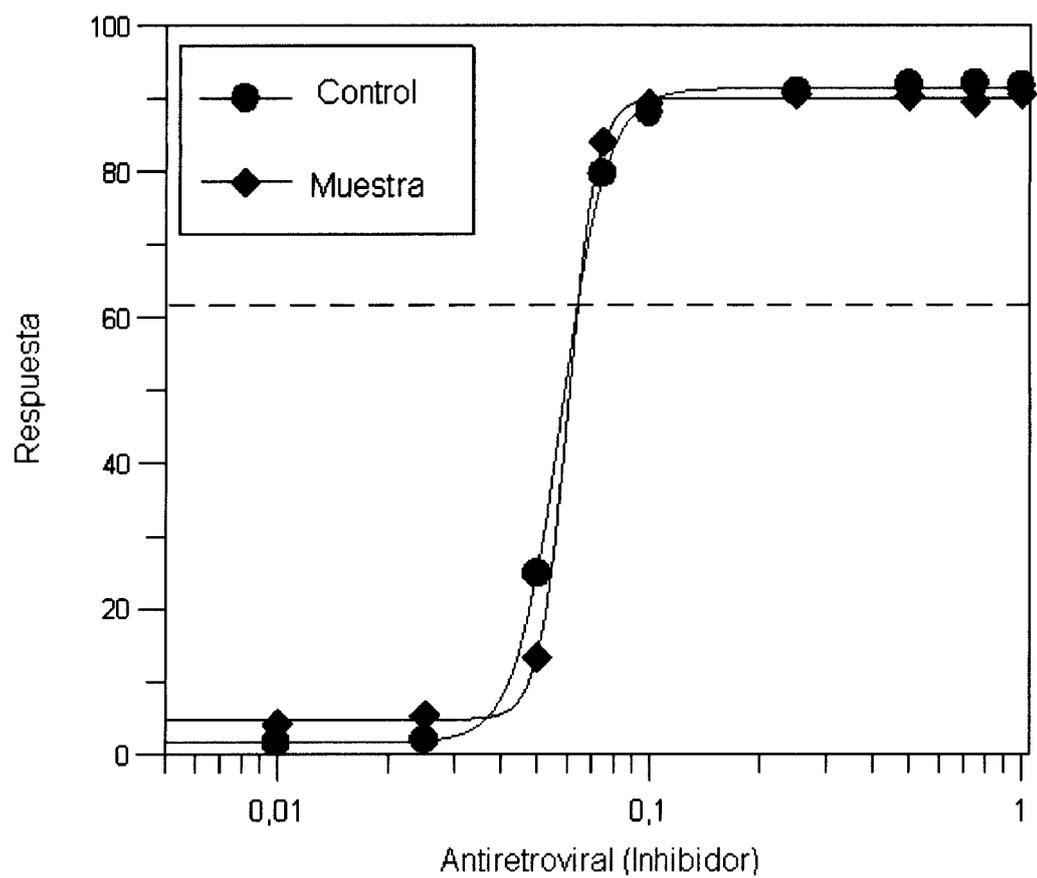


FIG. 9

ES 2 355 027 B2

LISTA DE SECUENCIAS

<110>	Universidade de Santiago de Compostela Nanogap	
5		
<120>	Plásmidos que incluyen la secuencia del virus VIH-1 y sus usos	
<130>	1596.15-1	
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	
30	tggaagggct aatttggtcc caaaaaagac aagagatcct tgatctgtgg atctaccaca	60
	cacaaggcta cttccctgat tggcagaact acacaccagg gccagggatc agatatccac	120
	tgaccttgg atggtgcttc aagttagtac cagttgaacc agagcaagta gaagaggcca	180
35	aataaggaga gaagaacagc ttgttacacc ctatgagcca gcatgggatg gaggaccg	240
	agggagaagt attagtgtgg aagtttgaca gcctcctagc atttcgtcac atggcccag	300
	agctgcatcc ggagtactac aaagactgct gacatcgagc tttctacaag ggactttccg	360
40	ctggggactt tccagggagg tgtggcctgg gcgggactgg ggagtggcga gccctcagat	420
	gctacatata agcagctgct ttttgcctgt actgggtctc tctggttaga ccagatctga	480
	gcctgggagc tctctggcta actagggaac cactgctta agcctcaata aagcttgctc	540
	tgagtgtca aagtagtgtg tgcccgtctg ttgtgtgact ctggtaacta gagatccctc	600
45	agaccctttt agtcagtgtg gaaaatctct agcagtggcg cccgaacagg gacttgaaag	660
	cgaaagtaaa gccagaggag atctctcgac gcaggactcg gcttgctgaa gcgcgacgg	720
	caagaggcga gggcgggcga ctggtgagta cgccaaaaat tttgactagc ggaggctaga	780
50	aggagagaga tgggtgagag agcgtcggta ttaagcgggg gagaattaga taaatgggaa	840
	aaaattcggg taaggccagg gggaaagaaa caatataaac taaaacatat agtatgggca	900
	agcagggagc tagaacgatt cgcagttaat cctggccttt tagagacatc agaaggctgt	960
55	agacaaatac tgggacagct acaaccatcc cttcagacag gatcagaaga acttagatca	1020
	ttatataata caatagcagt cctctattgt gtgcatcaaa ggatagatgt aaaagacacc	1080
	aaggaagcct tagataagat agaggaagag caaaacaaaa gtaagaaaaa ggcacagcaa	1140
60	gcagcagctg acacaggaag caacagccag gtcagccaaa attaccctat agtgcagaac	1200
	ctccaggggc aaatggtaca tcaggccata tcacctagaa ctttaaatgc atgggtaaaa	1260
	gtagtagaag agaaggcttt cagcccagaa gtaataccca tgttttcagc attatcagaa	1320
65	ggagccaccc cacaagatth aaataccatg ctaaacacag tggggggaca tcaagcagcc	1380

ES 2 355 027 B2

	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	ggaccaaagg	aaccctttag	agactatgta	1680
10	gaccgattct	ataaaaactct	aagagccgag	caagcttcac	aagaggtaaa	aaattggatg	1740
	acagaaacct	tgttggtcca	aaatgcgaac	ccagattgta	agactatfff	aaaagcattg	1800
15	ggaccaggag	cgacactaga	agaaatgatg	acagcatgtc	agggagtggg	gggacccggc	1860
	cataaagcaa	gagttttggc	tgaagcaatg	agccaagtaa	caaatccagc	taccataatg	1920
	atacagaaaag	gcaatfffag	gaaccaaaga	aagactgtta	agtgtttcaa	ttgtggcaaa	1980
20	gaagggcaca	tagccaaaaa	ttgcagggcc	cctaggaaaa	agggctgttg	gaaatgtgga	2040
	aaggaaggac	accaaataaa	agattgtact	gagagacagg	ctaatfff	aggaagatc	2100
25	tggccttccc	acaaggggaag	gccaggggaat	tttcttcaga	gcagaccaga	gccaacagcc	2160
	ccaccagaag	agagcttcag	gtttggggaa	gagacaacaa	ctccctctca	gaagcaggag	2220
	ccgatagaca	aggaactgta	tcctffagct	tcctcagat	cactctffgg	cagcgacccc	2280
30	tcgtcacaat	aaagataggg	gggcaattaa	aggaagctct	attagataca	ggagcagatg	2340
	atacagtatt	agaagaaatg	aatffgccag	gaagatggaa	accaaaaaatg	atagggggaa	2400
35	ttggaggtff	tatcaaagta	agacagtatg	atcagatact	catagaaatc	tgcgacata	2460
	aagctatagg	tacagtatta	gtaggaccta	cacctgtcaa	cataattgga	agaaatctgt	2520
	tgactcagat	tggctgcact	ttaaatfftc	ccattagtcc	tattgagact	gtaccagtaa	2580
40	aattaaagcc	aggaatggat	ggcccaaaaag	ttaaacaatg	gccattgaca	gaagaaaaaa	2640
	taaaagcatt	agtagaaatt	tgtacagaaa	tggaaaagga	aggaaaaaatt	tcaaaaattg	2700
	ggcctgaaaa	tccatacaat	actccagtat	ttgccataaa	gaaaaaagac	agtactaaat	2760
45	ggagaaaatt	agtagatfftc	agagaactta	ataagagaac	tcaagatfftc	tgggaagttc	2820
	aattaggaat	accacatcct	gcaggggtaa	aacagaaaaa	atcagtaaca	gtactggatg	2880
50	tgggcgatgc	atatffttca	gttcccttag	ataaagactt	caggaagtat	actgcattta	2940
	ccatacctag	tataaacaat	gagacaccag	ggattagata	tcagtacaat	gtgcttcac	3000
	agggatggaa	aggatcacca	gcaatattcc	agtgtagcat	gacaaaaatc	ttagagcctt	3060
55	ttagaaaaca	aatccagac	atagtcatct	atcaatacat	ggatgatttg	tatgtaggat	3120
	ctgacttaga	aatagggcag	catagaacaa	aaatagagga	actgagacaa	catctgttga	3180
	ggtggggatt	taccacacca	gacaaaaaac	atcagaaaga	acctccattc	ctffggatgg	3240
60	gttatgaact	ccatcctgat	aaatggacag	tacagcctat	agtgtctgcca	gaaaaggaca	3300
	gctggactgt	caatgacata	cagaaattag	tgggaaaatt	gaattgggca	agtcagatff	3360
65	atgcagggat	taaagtaagg	caattatgta	aactffcttag	gggaaccaa	gcactaacag	3420
	aagtagtacc	actaacagaa	gaagcagagc	tagaactggc	agaaaacagg	gagattctaa	3480

ES 2 355 027 B2

aagaaccggt acatggagtg tattatgacc catcaaaaga cttaatagca gaaatacaga 3540
 agcaggggca aggccaatgg acatatcaaa tttatcaaga gccatttaa aatctgaaaa 3600
 5 caggaaaata tgcaagaatg aagggtgcc acactaatga tgtgaaaca ttaacagagg 3660
 cagtacaaaa aatagccaca gaaagcatag taatatgggg aaagactcct aaatttaa
 10 taccataca aaaggaaaca tgggaagcat ggtggacaga gtattggca gccacctgga 3780
 ttcctgagtg ggagtttgtc aatacccctc ccttagtgaa gttatggtac cagttagaga 3840
 aagaacccat aataggagca gaaactttct atgtagatgg ggcagccaat agggaaacta 3900
 15 aattaggaag agcaggatat gtaactgaca gaggaagaca aaaagttgtc cccctaacgg 3960
 acacaacaaa tcagaagact gagttacaag caattcatct agctttgcag gattcgggat 4020
 tagaagtaaa catagtgaca gactcacaat atgcattggg aatcattca gcacaaccag 4080
 20 ataagagtga atcagagtta gtcagtcaaa taatagagca gttaataaaa aaggaaaaag 4140
 tctacctggc atgggtacca gcacacaaag gaattggagg aatgaaca gtagataaat 4200
 25 tggtcagtgc tggaatcagg aaagtactat ttttagatgg aatcgataag gcccaagaag 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
 ggtgggcggg gatcaagcag gaatttggca ttccttaca tccccaaagt caaggagtaa 4680
 40 tagaatctat gaataagaa ttaaagaaaa ttataggaca ggtaagagat caggctgaac 4740
 atcttaagac agcagtacaa atggcagtat tcatccaca ttttaaaaga aaagggggga 4800
 ttggggggta cagtgcaggg gaaagaatag tagacataat agcaacagac atacaaacta 4860
 45 aagaattaca aaaacaaatt acaaaaattc aaaattttcg ggtttattac agggacagca 4920
 gagatccagt ttgaaagga ccagcaaagc tcctctggaa aggtgaaggg gcagtagtaa 4980
 50 tacaagataa tagtgacata aaagtagtgc caagaagaaa agcaaagatc atcagggatt 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 tcatctgcac ttttttgatt gttttcaga atctgctata 5400
 agaaatacca tattaggacg tatagttagt cctaggtgtg aatatcaagc aggacataac 5460
 65 aaggtaggat ctctacagta cttggcacta gcagcattaa taaaaccaa acagataaag 5520

ES 2 355 027 B2

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
 10 tgtttatcca tttcagaatt ggggtgtcgac atagcagaat aggcgttact cgacagagga 5820
 gagcaagaaa tggagccagt agatcctaga ctagagccct ggaagcatcc aggaagtcag 5880
 cctaaaactg cttgtaccaa ttgctattgt aaaaagtgtt gctttcattg ccaagtttgt 5940
 15 ttcatgacaa 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
 25 tcagcacttg tggagatggg ggtggaaatg gggcaccatg ctccttggga tattgatgat 6300
 ctgtagtgct acagaaaaat tgtgggtcac agtctattat ggggtacctg tgtggaagga 6360
 agcaaccacc actctatfff gtgcatcaga tgctaaagca tatgatacag aggtacataa 6420
 30 tgtttgggcc acacatgcct gtgtaccac agacccaac ccacaagaag tagtattggt 6480
 aatgtgaca gaaaatffta acatgtggaa aatgacatg gtagaacaga tgcagtagga 6540
 35 tataatcagt ttatgggatc aaagcctaaa gccatgtgta aaattaacc cactctgtgt 6600
 tagtttaaag tgcactgatt tgaagaatga tactaatacc aatagtagta gcgggagaat 6660
 gataatggag aaaggagaga taaaaaactg ctctttcaat atcagcacia gcataagaga 6720
 40 taaggtgcag aaagaatatg cattctffta taaacttgat atagtaccaa tagataatac 6780
 cagctatagg ttgataagtt gtaacacctc agtcattaca caggcctgtc caaaggtatc 6840
 ctttgagcca attcccatac attattgtgc cccggctggt tttgcgattc taaaatgtaa 6900
 45 taataagacg ttcaatggaa caggaccatg tacaatgtc agcacagtac aatgtacaca 6960
 tggaatcagg ccagtagtat caactcaact gctgttaaat ggcagtctag cagaagaaga 7020
 50 tgtagtaatt agatctgcca atttcacaga caatgctaaa accataatag tacagctgaa 7080
 cacatctgta gaaattaatt gtacaagacc caacaacaat acaagaaaaa gtatccgtat 7140
 ccagagggga ccagggagag catttgttac aataggaaaa ataggaaata tgagacaagc 7200
 55 acattgtaac attagtagag caaaatggaa tgccactffa aaacagatag ctagcaaatt 7260
 aagagaacaa tttggaaata ataaaacaat aatctfftaag caatcctcag gaggggacc 7320
 agaaattgta acgcacagtt ttaattgtgg aggggaattt ttctactgta attcaacaca 7380
 60 actgtffaat agtacttggg ttaatagtac ttggagtact gaaggggtcaa ataactga 7440
 aggaagtgac acaatcacac tccatgcag aataaaacaa tttataaaca tgtggcagga 7500
 65 agtaggaaaa gcaatgtatg cccctccat cagtggacaa attagatggt catcaaatat 7560
 tactgggctg ctattaacaa gagatggtgg taataacaac aatgggtccg agatcttcag 7620

ES 2 355 027 B2

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

ES 2 355 027 B2

aactagagat ccctcagacc cttttagtca gtgtggaaaa tctctagcac cccccaggag 9720
gtagaggttg cagtgagcca agatcgcgcc actgcattcc agcctgggca agaaaacaag 9780
5 actgtctaaa ataataataa taagttaagg gtattaaata tatttataca tggagggtcat 9840
aaaaatatat atatttgggc tgggcgcagt ggctcacacc tgcgcccggc cttttgggag 9900
gccgaggcag gtggatcacc tgagtttggg agttccagac cagcctgacc aacatggaga 9960
10 aacccttct ctgtgtattt ttagtagatt ttattttatg tgtattttat tcacaggtat 10020
ttctggaaaa ctgaaactgt ttttctcta ctctgatacc acaagaatca tcagcacaga 10080
ggaagacttc tgtgatcaaa tgtggtggga gagggagggt ttcaccagca catgagcagt 10140
15 cagttctgcc gcagactcgg cgggtgtcct tcggttcagt tccaacaccg cctgcctgga 10200
gagaggctag accacagggg gagggctcag tccccaagac ataaacacc aagacataaa 10260
20 cacccaacag gtccaccccg cctgctgccc aggcagagcc gattcaccaa gacgggaatt 10320
aggatagaga aagagtaagt cacacagagc cggctgtgcg ggagaacgga gttctattat 10380
gactcaaadc agtctcccca agcattcggg gatcagagtt ttaaggata acttagtggtg 10440
25 tagggggcca gtgagttgga gatgaaagcg tagggagtcg aagggtgcct tttgcgccga 10500
gtcagttcct ggggtggggc cacaagatcg gatgagccag tttatcaatc cgggggtgcc 10560
agctgatcca tggagtgcag ggtctgcaaa atatctcaag cactgattga tcttaggttt 10620
30 tacaatagtg atgttaccac aggaacaatt tggggaaggt cagaatcttg tagcctgtag 10680
ctgcatgact cctaaacat aatttctttt ttgttttttt tttttattt ttgagacagg 10740
35 gtctcactct gtcacctagg ctggagtgca gtggtgcaat cacagctcac tgcagcctca 10800
acgtcgtag ctcaagcgat cctcccacct cagcctgcct ggtagctgag actacaagcg 10860
acgccccagt taattttgt atttttggta gaggcagcgt tttgccgtgt ggccctggct 10920
40 ggtctcgaac tcctgggctc aagtgatcca gcctcagcct cccaaagtgc tgggacaacc 10980
ggggccagtc actgcacctg gccctaaacc ataatttcta atcttttggc taatttggtta 11040
45 gtcctacaaa ggcagtctag tccccaggca aaaagggggt ttgtttcggg aaagggctgt 11100
tactgtcttt gtttcaaact ataaactaag ttctctctaa acttagttcg gcctacacc 11160
aggaatgaac aaggagagct tggagggttag aagcacgatg gaattgggta ggtcagatct 11220
50 ctttactgt ctgagttata attttgcaat ggtggttcaa agactgcccg cttctgacac 11280
cagtcgctgc attaatgaat cggccaacgc gcggggagag gcggtttgcg tattggcgct 11340
cttccgcttc ctcgctcact gactcgctgc gctcggctgt tcggctgagg cgagcggat 11400
55 cagctcactc aaaggcggtg atacggttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga 11460
acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggcccg ttgctggcgt 11520
60 ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt 11580
ggcgaaacc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc 11640
gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg gatacctgtc cgcctttctc ctttcgggaa 11700
65 gcgtggcgct ttctcaatgc tcacgctgta ggtatctcag ttcggtgtag gtcggtcgt 11760

ES 2 355 027 B2

ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg ttcagcccga ccgctgcgcc ttatccggta 11820
 actatcgtct tgagtccaac ccggtaaagac acgacttatc gccactggca gcagccactg 11880
 5 gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac agagttcttg aagtgggtggc 11940
 ctaactacgg ctacactaga aggacagtat ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta 12000
 ccttcggaaa aagagttggt agctcttgat ccggcaaaca aaccaccgct ggtagcggtg 12060
 10 gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt 12120
 tgatcttttc tacggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa ctcacgttaa gggattttgg 12180
 15 tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta 12240
 aatcaatcta aagtatatat gagtaaactt ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg 12300
 aggcacctat ctacagcgtc tgtctatttc gttcatccat agttgcctga ctccccgtcg 12360
 20 tgtagataac tacgatacgg gagggttac catctggccc cagtgtctga atgataccgc 12420
 gagaccacg ctacaccggt ccagatttat cagcaataaa ccagccagcc ggaagggccg 12480
 agcgcagaag tggctctgca actttatccg cctccatcca gtctattaat tgttgccggg 12540
 aagctagagt aagtagttcg ccagttaata gtttgcgcaa cgttgttgcc attgctacag 12600
 gcatcgtggt gtcacgctcg tcgtttggtg tggcttcatt cagctccggt tccaacgat 12660
 30 caaggcgagt tacatgatcc cccatgttgt gcaaaaaagc ggtagctcc ttcggtcctc 12720
 cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgcag tgttatcact catggttatg gcagcactgc 12780
 ataattctct tactgtcatg ccatccgtaa gatgcttttc tgtgactggt gagtactcaa 12840
 35 ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgcggc gaccgagttg ctcttgcccg gcgtcaatac 12900
 gggataatac cgcgccacat agcagaactt taaaagtgct catcattgga aaacgttctt 12960
 40 cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc tgttgagatc cagttcgatg taaccctctc 13020
 gtgcacccaa ctgatcttca gcatctttta ctttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa 13080
 caggaaggca aaatgccgca aaaaagggaa taagggcgac acggaaatgt tgaatactca 13140
 45 tactcttctt ttttcaatat tattgaagca tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat 13200
 acatatttga atgtatttag aaaaataaac aaataggggt tccgcgaca tttccccgaa 13260
 aagtgccacc tgacgtctaa gaaaccatta ttatcatgac attaacctat aaaaataggc 13320
 50 gtatcacgag gccctttcgt cttcaagaac tgcctcgcgc gtttcggtga tgacggtgaa 13380
 aacctctgac acatgcagct cccggagacg gtcacagctt gtctgtaagc ggatgccggg 13440
 55 agcagacaag cccgtcaggg cgcgtcagcg ggtgttgggc ggtgtcgggg cgcagccatg 13500
 acccagtcac gtagcgatag cggagtgtac tggcttaact atgcggcatc agagcagatt 13560
 gtactgagag tgcacatat gcggtgtgaa ataccgcaca gatgcgtaag gagaaaatac 13620
 60 cgcacagggc gccattcgcc attcaggctg cgcaactggt ggaagggcg atcgggtcgg 13680
 gcctcttcgc tattacgcca gcgcggggag gcagagattg cagtaagctg agatcgcagc 13740
 65 actgcactcc agcctggggc acagagtaag actctgtctc aaaaataaaa taaataaatc 13800

ES 2 355 027 B2

aatcagatat tccaatcttt tcctttattht atthtatttt tttctattht ggaaacacag 13860
 tccttcctta ttccagaatt acacatatat tctatthttc tttatatgct ccagthtttt 13920
 5 ttagacctc acctgaaatg tgtgtataca aaatctaggc cagtccagca gaggctaaag 13980
 gtaaaaaata aaataataaa aaataaataa aatctagctc actccttcac atcaaaatgg 14040
 agatacagct gttagcatta aatacctaat aacctatctt gtcctcaata atthtaagcg 14100
 10 cctctctcca ccacatctaa ctctgtcaa aggcattgtc cccttccggg cgctctgctg 14160
 tgctgccaac caactggcat gtggactctg cagggtccct aactgccaag cccacagtg 14220
 tgccctgagg ctgccccctc ctctagcgg ctgccccac tcggctttgc tttccctagt 14280
 15 ttcagttact tgcgttcagc caaggtctga aactaggtgc gcacagagcg gtaagactgc 14340
 gagagaaaga gaccagcttt acagggggtt tatcacagtg caccctgaca gtcgtcagcc 14400
 tcacaggggg tttatcacat tgcaccctga cagtctcag cctcacaggg ggtttatcac 14460
 20 agtgcaccct tacaatcatt ccatttgatt cacaatthtt ttagtctcta ctgtgcctaa 14520
 ctgtgaagt aaatthgatc agaggtgtgt tcccagaggg gaaaacagta tatacaggg 14580
 tcagtactat cgcatttcag gcctccacct gggctctgga atgtgtccc cgaggggtga 14640
 25 tgactacctc agttggatct ccacaggtca cagtgcaca agataacca gacacctccc 14700
 aaggctacca caatgggccc ccctccact gcacatggcc ggaggaactg ccatgtcgg 14760
 30 ggtgcaagca cacctgcgca tcagagctct tgggtgtggag ggagggacca gcgcagcttc 14820
 cagcatcca cctgatgaac agaacctagg gaaagcccca gttctactta caccaggaaa 14880
 ggc 14883

35

<210> 2

<211> 14883

40

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220> misc_recomb

45

<223> p4411

<400> 2

50 tggaggggct aatthgttcc caaaaaagac aagagatcct tgatctgtgg atctaccaca 60
 cacaaggcta ctccctgat tggcagaact acacaccagg gccagggatc agatatccac 120
 tgacctthgg atggtgcttc aagthtagtac cagthgaacc agagcaagta gaagaggcca 180
 55 aataaggaga gaagaacagc ttgttacacc ctatgagcca gcatgggatg gaggacctcg 240
 agggagaagt attagtgtgg aagthtgaca gcctcctagc atthcgtcac atggcccag 300
 agctgcatcc ggagtactac aaagactgct gacatcgagc tttctacaag ggactthccg 360
 60 ctggggactt tccagggagg tgtggcctgg gcgggactgg ggagtggcga gccctcagat 420
 gctacatata agcagctgct thttgcctgt actgggtctc tctggttaga ccagatctga 480
 gcctgggagc tctctggcta actagggaac cactgctta agcctcaata aagctthcct 540
 65 tgagtgtca aagtagtgtg tgcctgtctg ttgtgtgact ctggtaacta gagatccctc 600
 agacccttht agtcagttg gaaaatctct agcagtggtc cccgaacagg gactthgaaag 660

ES 2 355 027 B2

	cgaaagtaaa gccagaggag atctctcgac gcaggactcg gcttgctgaa ggcgcacg	720
	caagaggcga ggggcggcga ctggtgagta cgccaaaaat tttgactagc ggaggctaga	780
5	aggagagaga tgggtgagag agcgtcggta ttaagcgggg gagaattaga taaatgggaa	840
	aaaattcggg taaggccagg gggaaagaaa caatataaac taaaacatat agtatgggca	900
	agcagggagc tagaacgatt cgcagttaat cctggccttt tagagacatc agaaggctgt	960
10	agacaaatac tgggacagct acaacctatc cttcagacag gatcagaaga acttagatca	1020
	ttatataata caatagcagt cctctattgt gtgcatcaaa ggatagatgt aaaagacacc	1080
15	aaggaagcct tagataagat agaggaagag caaaacaaaa gtaagaaaaa ggcacagcaa	1140
	gcagcagctg acacaggaaa caacagccag gtcagccaaa attacctat agtgcagaac	1200
	ctccaggggc aaatggtaca tcaggccata tcacctagaa ctttaaatgc atgggtaaaa	1260
20	gtagtagaag agaaggcttt cagcccagaa gtaataccca tgttttcagc attatcagaa	1320
	ggagccaccc cacaagattht aaataccatg ctaaaccacag tggggggaca tcaagcagcc	1380
25	atgcaaatgt taaaagagac catcaatgag gaagctgcag aatgggatag attgcatcca	1440
	gtgcatgcag ggcctattgc accaggccag atgagagaac caaggggaag tgacatagca	1500
	ggaactacta gtacccttca ggaacaaata ggatggatga cacataatcc acctatccca	1560
30	gtaggagaaa tctataaaag atggataatc ctgggattaa ataaaatagt aagaatgtat	1620
	agccctacca gcattctgga cataagacaa ggaccaaagg aaccctttag agactatgta	1680
	gaccgattct ataaaactct aagagccgag caagcttcac aagaggtaaa aaattggatg	1740
35	acagaaacct tgttggtcca aaatgcgaac ccagattgta agactattht aaaagcattg	1800
	ggaccaggag cgacactaga agaaatgatg acagcatgtc agggagtggg gggacccggc	1860
40	cataaagcaa gagthtttggc tgaagcaatg agccaagtaa caaatccagc taccataatg	1920
	atacagaaag gcaatthtag gaaccaaaga aagactgtta agtgthtcaa ttgtggcaaa	1980
	gaagggcaca tagccaaaaa ttgcagggcc ctaggaaaaa agggctgttg gaaatgtgga	2040
45	aaggaaggac accaaatgaa agattgtact gagagacagg ctaatthttt agggaagatc	2100
	tggcctthcc acaagggag gccagggaat thtcttcaga gcagaccaga gccaacagcc	2160
	ccaccagaag agagcttcag gthtggggaa gagacaacaa ctccctctca gaagcagc ag	2220
50	ccgatagaca aggaactgta thctthtagct thcctcagat cactctthtg cagcgacccc	2280
	tcgtcacaat aaagataggg gggcaattaa aggaagctct attagataca ggagcagatg	2340
55	atacagtatt agaagaaatg aatthgccag gaagatggaa accaaaaatg atagggggaa	2400
	thggaggtth tatcaaagta agacagtatg atcagatact catagaaatc tgcggacata	2460
	aagctatagg tacagtatta gtaggaccth cacctgtcaa cataatthgga agaaatctgt	2520
60	tgactcagat tggctgcact thaaatthtc ccattagtcc thttgagact gtaccagtaa	2580
	aatthaaagcc aggaatggat gggccaaaaa thaaacaatg gccattgaca gaagaaaaa	2640
65	thaaaagcatt agtagaaatt tgtacagaaa tggaaaagga aggaaaaatth thaaaaatthg	2700

ES 2 355 027 B2

	ggcctgaaaa	tccatacaat	actccagtat	ttgccataaa	gaaaaaagac	agtactaaat	2760
	ggagaaaatt	agtagatttc	agagaactta	ataagagaac	tcaagatttc	tgggaagttc	2820
5	aattaggaat	accacatcct	gcagggttaa	aacagaaaaa	atcagtaaca	gtactggatg	2880
	tgggcgatgc	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
15	ctgacttaga	aatagggcag	catagaacaa	aatagagga	actgagacaa	catctgttga	3180
	ggtggggatt	taccacacca	gacaaaaaac	atcagaaaga	acctccattc	ctttggatgg	3240
	gttatgaact	ccatcctgat	aatggacag	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
30	caggaaaata	tgcaagaatg	aagggtgccc	acactaatga	tgtgaaacaa	ttaacagagg	3660
	cagtacaaaa	aatagccaca	gaaagcatag	taatatgggg	aaagactcct	aaatttaa	3720
	taccataca	aaaggaaaca	tgggaagcat	ggtggacaga	gtattggcaa	gccacctgga	3780
35	ttcctgagtg	ggagtttgtc	aatacccctc	ccttagtgaa	gttatggtac	cagttagaga	3840
	aagaacccat	aataggagca	gaaactttct	atgtagatgg	ggcagccaat	agggaaacta	3900
40	aattagggaaa	agcaggatat	gtaactgaca	gaggaagaca	aaaagttgtc	cccctaacgg	3960
	acacaacaaa	tcagaagact	gagttacaag	caattcatct	agctttgcag	gattcgggat	4020
	tagaagtaaa	catagtgaca	gactcacaat	atgcattggg	aatcattcaa	gcacaaccag	4080
45	ataagagtga	atcagagtta	gtcagtcaaa	taatagagca	gttaataaaa	aaggaaaaag	4140
	tctacctggc	atgggtacca	gcacacaaaag	gaattggagg	aatgaacaa	gtagataaat	4200
	tggtcagtgc	tggaatcagg	aaagtactat	ttttagatgg	aatagataag	gcccagaag	4260
50	aacatgagaa	atatcacagt	aattggagag	caatggctag	tgattttaac	ctaccacctg	4320
	tagtagcaaa	agaaatagta	gccagctgtg	ataaatgtca	gctaaaaggg	gaagccatgc	4380
55	atggacaagt	agactgtagc	ccgggaatat	ggcagctaga	ttgtacacat	ttagaaggaa	4440
	aagttatctt	ggtagcagtt	catgtagcca	gtggatatat	agaagcagaa	gtaattccag	4500
	cagagacagg	gcaagaaaca	gcatacttcc	tcttaaaatt	agcaggaaga	tggccagtaa	4560
60	aaacagtaca	tacagacaat	ggcagcaatt	tcaccagtac	tacagttaag	gccgcctgtt	4620
	ggtgggcggg	gatcaagcag	gaatttggca	ttcctacaa	tcccacaaag	caaggagtaa	4680
	tagaatctat	gaataaagaa	ttaaagaaaa	ttataggaca	ggtaagagat	caggctgaac	4740
65	atcttaagac	agcagtacaa	atggcagtat	tcatccacaa	ttttaaaga	aaagggggga	4800

ES 2 355 027 B2

	ttggggggta cagtgcaggg gaaagaatag tagacataat agcaacagac atacaaacta	4860
	aagaattaca aaaacaaatt acaaaaattc aaaattttcg ggtttattac agggacagca	4920
5	gagatccagt ttggaaagga ccagcaaagc tcctctggaa aggtgaaggg gcagtagtaa	4980
	tacaagataa tagtgacata aaagtagtgc caagaagaaa agcaaagatc atcagggatt	5040
	atggaaaaca gatggcaggt gatgattgtg tggcaagtag acaggatgag gattaacaca	5100
10	tggaaaagat tagtaaaaca ccatatgtat atttcaagga aagctaagga ctggttttat	5160
	agacatcact atgaaagtac taatccaaaa ataagttcag aagtacacat cccactaggg	5220
15	gatgctaaat tagtaataac aacatattgg ggtctgcata caggagaaag agactggcat	5280
	ttgggtcagg gagtctccat agaatggagg aaaagagat atagcacaca agtagaccct	5340
	gacctagcag accaactaat tcctctgcac tattttgatt gtttttcaga atctgctata	5400
20	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
	gtgaagctgt tagacatfff cctaggatat ggctccataa cttaggacaa catatctatg	5700
30	aaacttacgg ggatacttgg gcaggagtgg aagccataat aagaattctg caacaactgc	5760
	tgtttatcca tttcagaatt ggggtgtcgac atagcagaat aggcgttact cgacagagga	5820
	gagcaagaaa tggagccagt agatcctaga ctagagccct ggaagcatcc aggaagtcag	5880
35	cctaaaactg cttgtaccaa ttgctattgt aaaaagtgtt gctttcattg ccaagtttgt	5940
	ttcatgacaa aagccttagg catctcctat ggaggaaga agcggagaca gcgacgaaga	6000
40	gctcatcaga acagtcagac tcatcaagct tctctatcaa agcagtaagt agtacatgta	6060
	atgcaaccta taatagtagc aatagtagca ttagtagtag caataataat agcaatagtt	6120
	gtgtggtcca tagtaatcat agaatatagg aaaatattaa gacaaagaaa aatagacagg	6180
45	ttaattgata gactaataga aagagcagaa gacagtggca atgagagtga aggagaagta	6240
	tcagcacttg tggagatggg ggtggaaatg gggcaccatg ctccttggga tattgatgat	6300
	ctgtagtgct acagaaaaat tgtgggtcac agtctattat ggggtacctg tgtggaagga	6360
50	agcaaccacc actctatfff gtgcatcaga tgctaaagca tatgatacag aggtacataa	6420
	tgtttgggcc acacatgcct gtgtaccac agacccaac ccacaagaag tagtattggt	6480
55	aatgtgaca gaaaatffta acatgtggaa aatgacatg gtagaacaga tgcagtagga	6540
	tataatcagt ttatgggatc aaagcctaaa gccatgtgta aaattaacc cactctgtgt	6600
	tagtttaag tgcactgatt tgaagaatga tactaatacc aatagtagta gctggagaat	6660
60	gataatggag aaaggagaga taaaaactg ctctttcaat atcagcacia gcataagaga	6720
	taaggtgcag aaagaatatg cattctffta taaacttgat atagtaccaa tagataatac	6780
65	cagctatagg ttgataagtt gtaacacctc agtcattaca caggcctgtc caaggtatc	6840

ES 2 355 027 B2

ctttgagcca attcccatcac attattgtgc cccggctggt tttgcgattc taaaatgtaa 6900
 taataagacg ttcaatggaa caggaccatg tacaatgtc agcacagtac aatgtacaca 6960
 5 tggaaatcagg ccagtagtat caactcaact gctgtttaa ggcagtctag cagaagaaga 7020
 tgtagtaatt agatctgcca atttcacaga caatgctaaa accataatag tacagctgaa 7080
 cacatctgta gaaattaatt gtacaagacc caacaacaat acaagaaaa gtatccgtat 7140
 10 ccagagggga ccagggagag cttttgttac aataggaaaa ataggaaata tgagacaagc 7200
 acattgtaac attagtagag caaaatggaa tgccacttta aaacagatag ctagcaaatt 7260
 15 aagagaacaa tttggaaata ataaaacaat aatctttaag caatcctcag ggggggacc 7320
 agaaattgta acgcacagtt ttaattgtgg aggggaattt ttctactgta attcaacaca 7380
 actgtttaat agtacttgggt ttaatagtac ttggagtact gaagggtcaa ataactga 7440
 20 aggaagtgac acaatcacac tcccatgcag aataaaacaa tttataaaca tgtggcagga 7500
 agtaggaaaa gcaatgtatg cccctcccat cagtggacaa attagatggt catcaaatat 7560
 25 tactgggctg ctattaacaa gagatggtgg taataacaac aatgggtccg agatcttcag 7620
 acctggagga ggcgatatga gggacaattg gagaagtga ttatataaat ataaagtagt 7680
 aaaaattgaa ccattaggag tagcaccac caaggcaaag agaagagtgg tgcagagaga 7740
 30 aaaaagagca gtgggaatag gagctttgtt ccttgggttc ttgggagcag caggaagcac 7800
 tatgggcgca gcgtcaatga cgctgacgggt acaggccaga caattattgt ctgatatagt 7860
 gcagcagcag aacaatttgc tgagggtat tgaggcgcaa cagcatctgt tgcaactcac 7920
 35 agtctggggc atcaaacagc tccaggcaag aatcctggct gtggaaagat acctaaagga 7980
 tcaacagctc ctggggattt ggggttgctc tggaaaactc atttgacca ctgctgtgcc 8040
 40 ttggaatgct agttggagta ataaatctct ggaacagatt tggaaataaca tgacctggat 8100
 ggagtgggac agagaaatta acaattacac aagcttaata cactccttaa ttgaagaatc 8160
 gcaaaaccag caagaaaaga atgaacaaga attattggaa ttagataaat gggcaagttt 8220
 45 gtggaattgg tttaacataa caaattggct gtggtatata aaattattca taatgatagt 8280
 aggaggcttg gtaggtttaa gaatagtttt tgctgtactt tctatagtga atagagttag 8340
 gcagggatat tcaccattat cgtttcagac ccacctcca atcccagggg gaccgacag 8400
 50 gcccgaagga atagaagaag aagggtggaga gagagacaga gacagatcca ttcgattagt 8460
 gaacggatcc ttagcactta tctgggacga tctgcggagc ctgtgcctct tcagctacca 8520
 55 ccgcttgaga gacttactct tgattgtaac gaggattgtg gaacttctgg gacgcagggg 8580
 gtgggaagcc ctcaaatatt ggtggaatct cctacagtat tggagtcagg aactaaagaa 8640
 tagtgctggt aacttgctca 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 cagtatctcg agacctagaa aaacatggag caatcacaag tagcaataca gcagctaaca 8940

ES 2 355 027 B2

atgctgcttg tgcctggcta gaagcacaag aggaggaaga ggtgggtttt ccagtcacac 9000
 ctcaggtacc ttttaagacca atgacttaca aggcagctgt agatcttagc cactttttaa 9060
 5 aagaaaaggg gggactggaa gggctaattc actcccaaag aagacaagat atccttgatc 9120
 tgtggatcta ccacacacaa ggctacttcc ctgattggca gaactacaca ccagggccag 9180
 gggtcagata tccactgacc tttggatggt gctacaagct agtaccagtt gagccagata 9240
 10 aggtagaaga ggccaataaa ggagagaaca ccagcttgtt acaccctgtg agcctgcatg 9300
 gaatggatga ccctgagaga gaagtgttag agtggaggtt tgacagccgc ctagcatttc 9360
 atcacgtggc ccgagagctg catccggagt acttcaagaa ctgctgacat cgagcttgct 9420
 acaagggact ttccgctggg gactttccag ggaggcgtgg cctgggcggg actggggagt 9480
 ggcgagccct cagatgctgc atataagcag ctgctttttg cctgtactgg gtctctctgg 9540
 20 ttagaccaga tctgagcctg ggagctctct ggctaactag ggaaccact gcttaagcct 9600
 caataaagct tgccttgagt gcttcaagta gtgtgtgccc gtctgtttgtg tgactctggt 9660
 aactagagat ccctcagacc cttttagtca gtgtggaaaa tctctagcac cccccaggag 9720
 25 gtagaggttg cagtgagcca agatcgcgcc actgcattcc agcctgggca agaaaacaag 9780
 actgtctaaa ataataataa taagttaagg gtattaaata tatttataca tggagggtcat 9840
 30 aaaaatatat atatttgggc tgggcgcagt ggctcacacc tgcgcccggc cttttgggag 9900
 gccgaggcag gtggatcacc tgagtttggg agttccagac cagcctgacc aacatggaga 9960
 aacccttct ctgtgtatth ttagtagatt ttatthtatg tgtatthtat tcacaggtat 10020
 35 ttctggaaaa ctgaaactgt ttttctcta ctctgatacc acaagaatca tcagcacaga 10080
 ggaagacttc tgtgatcaaa tgtggtggga gagggagggtt ttcaccagca catgagcagt 10140
 cagttctgcc gcagactcgg cgggtgtcct tcggttcagt tccaacaccg cctgcctgga 10200
 40 gagaggtcag accacagggt gagggctcag tccccaaagac ataaacacc aagacataaa 10260
 cacccaacag gtccaccccg cctgctgccc aggcagagcc gattcaccaa gacgggaatt 10320
 45 aggatagaga aagagtaagt cacacagagc cggctgtgcy ggagaacgga gttctattat 10380
 gactcaaatc agtctcccca agcattcggg gatcagagtt ttttaaggata acttagtgty 10440
 tagggggcca gtgagttgga gatgaaagcy tagggagtcy aagggtgcct tttgcgccga 10500
 50 gtcagttcct ggggtggggc cacaagatcy gatgagccag tttatcaatc cgggggtgcc 10560
 agctgatcca tggagtgcag ggtctgcaaa atatctcaag cactgattga tcttaggttt 10620
 55 tacaatagty atgttaccch aggaacaatt tggggaagggt cagaatctty tagcctgty 10680
 ctgcatgact cctaaacct aatttctttt ttgtttttt tttttattt ttgagacagg 10740
 gtctcactct gtcacctagg ctggagtyca gtggtgcaat cacagctcac tgcagctca 10800
 60 acgtcgyaag ctcaagcyat cctcccacct cagcctgcct ggtagctgy actacaagcy 10860
 acgccccagt taatthttgt atthttggya gaggcagcyt tttgcccgtgt ggcctggct 10920
 65 ggtctcgaac tcctgggctc aagtgatcca gcctcagcct cccaagtgc tgggacaacc 10980

ES 2 355 027 B2

5 ggggccagtc actgcacctg gccctaaacc ataatttcta atcttttggc taatttgтта 11040
 gtcctacaaa ggcagtctag tccccaggca aaaaggggggt ttgtttcggg aaagggctgt 11100
 5 tactgtcttt gtttcaaact ataaactaag ttctctctaa acttagttcg gcctacaccc 11160
 aggaatgaac aaggagagct tggaggttag aagcacgatg gaattggtta ggtcagatct 11220
 10 ctttactgt ctgagttata attttgcaat ggtggttcaa agactgcccg cttctgacac 11280
 cagtcgctgc attaatgaat cggccaacgc gcggggagag gcggtttgcg tattggcgct 11340
 cttccgcttc ctcgctcact gactcgctgc gctcggtcgt tcggctgcgg cgagcggat 11400
 15 cagctcactc aaaggcggtta atacggttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga 11460
 acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt 11520
 ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt 11580
 20 ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc 11640
 gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg gatacctgtc cgcctttctc ctttcgggaa 11700
 gcgtggcgct ttctcaatgc tcacgctgta ggtatctcag ttcgggtgtag gtcgttcgct 11760
 25 ccaagctggg ctgtgtgcac gaacccccg ttcagcccga ccgctgcgcc ttatccggta 11820
 actatcgtct tgagtccaac ccggtaaagac acgacttatc gccactggca gcagccactg 11880
 30 gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac agagtcttg aagtgggtggc 11940
 ctaactacgg ctacactaga aggacagtat ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta 12000
 ctttcgaaa aagagttggt agctcttgat ccggcaaaca aaccaccgct ggtagcggtg 12060
 35 gttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt 12120
 tgatcttttc tacgggtct gacgctcagt ggaacgaaaa ctcacgttaa gggattttgg 12180
 tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta 12240
 40 aatcaatcta aagtatatat gagtaaactt ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg 12300
 aggcacctat ctcagcgatc tgtctatttc gttcatccat agttgcctga ctcccgcgctg 12360
 45 tgtagataac tacgatacgg gagggcttac catctggccc cagtgcgca atgataccgc 12420
 gagaccacg ctcaccggct ccagatttat cagcaataaa ccagccagcc ggaagggccg 12480
 agcgcagaag tggcctgca actttatccg cctccatcca gtctattaat tgttgccggg 12540
 50 aagctagagt aagtagttcg ccagttaata gtttgcgcaa cgttgttgcc attgctacag 12600
 gcatcgtggt gtcacgctcg tcgtttggtta tggcttcatt cagctccggt tcccaacgat 12660
 55 caaggcgagt tacatgatcc cccatgttgt gcaaaaaagc ggttagctcc ttcggtcctc 12720
 cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgag tgttatcact catggttatg gcagcactgc 12780
 ataattctct tactgtcatg ccatccgtaa gatgcttttc tgtgactggt gactactcaa 12840
 60 ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgcggc gaccgagttg ctcttgcccg gcgtcaatac 12900
 gggataatac cgcgccacat agcagaactt taaaagtgct catcattgga aaacgttctt 12960
 cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc tgttgagatc cagttcgatg taaccactc 13020
 65 gtgcacccaa ctgatcttca gcatctttta cttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa 13080

ES 2 355 027 B2

5 caggaaggca aaatgccgca aaaaagggaa taagggcgac acggaatgt tgaatactca 13140
 tactcttcct ttttcaatat tattgaagca tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat 13200
 10 acatatttga atgtatttag aaaaataaac aaataggggt tccgcgcaca tttccccgaa 13260
 aagtgccacc tgacgtctaa gaaaccatta ttatcatgac attaacctat aaaaataggc 13320
 gtatcacgag gccctttcgt cttcaagaac tgcctcgcgc gtttcggtga tgacggtgaa 13380
 aacctctgac acatgcagct cccggagacg gtcacagctt gtctgtaagc ggatgccggg 13440
 15 agcagacaag cccgtcaggg cgcgtcagcg ggtgttgccg ggtgtcgggg cgcagccatg 13500
 acccagtcac gtagcgatag cggagtgtac tggcttaact atgcggcatc agagcagatt 13560
 gtactgagag tgcacatat gcggtgtgaa ataccgcaca gatgcgtaag gagaaaatac 13620
 cgcatcaggg gccattcgcc attcaggctg cgcaactggt ggaagggcg atcggtgccg 13680
 20 gcctcttcgc tattacgcca gcgcggggag gcagagattg cagtaagctg agatcgcagc 13740
 actgcactcc agcctggggc acagagtaag actctgtctc aaaaataaaa taaataaatc 13800
 aatcagatat tccaatcttt tcctttattt atttatttat tttctatfff gaaaacacag 13860
 tccttcctta ttccagaatt acacatatat tctatfffft tttatatgct ccagttffff 13920
 ttagaccttc acctgaaatg tgtgtataca aaatctaggc cagtccagca gagcctaaag 13980
 30 gtaaaaaata aaataataaa aaataataaa aatctagctc actccttcac atcaaaatgg 14040
 agatacagct gttagcatta aataccaaat aacctatctt gtcctcaata attttaagcg 14100
 cctctctcca ccacatctaa ctctgtcaa aggcattgtc cccttccggg cgctctgctg 14160
 35 tgctgccaac caactggcat gtggactctg cagggctcct aactgccaag cccacagtg 14220
 tgccctgagg ctgcccctc cttctagcgg ctgccccac tcggctttgc tttccctagt 14280
 40 ttcagttact tgcgttcagc caaggtctga aactaggtgc gcacagagcg gtaagactgc 14340
 gagagaaaga gaccagcttt acaggggggt taccacagtg caccctgaca gtcgtcagcc 14400
 tcacaggggg tttatcacat tgcaccctga cagtcgtcag cctcacaggg ggtttatcac 14460
 45 agtgcaccct tacaatcatt ccatttgatt cacaatffff ttagtctcta ctgtgcctaa 14520
 cttgtaagtt aaatttgatc agaggtgtgt tcccagaggg gaaaacagta tatacaggg 14580
 tcagtactat cgcatttcag gcctccacct gggctcttga atgtgtcccc cgaggggtga 14640
 50 tgactacctc agttggatct ccacaggtca cagtgacaca agataacca gacacctccc 14700
 aaggctacca caatgggccg ccctccacgt gcacatggcc ggaggaactg ccatgtcggg 14760
 55 ggtgcaagca cacctgcgca tcagagtcct tgggtgtggag ggagggacca gcgcagcttc 14820
 cagccatcca cctgatgaac agaacctagg gaaagcccca gttctactta caccaggaaa 14880
 ggc 14883

60 <210> 3
 <211> 14883
 <212> DNA
 65 <213> Secuencia artificial
 <220> misc_recomb

ES 2 355 027 B2

<223> p4634

<400> 3

5	tggaagggct aatttgggtcc caaaaaagac aagagatcct tgatctgtgg atctaccaca	60
	cacaaggcta cttccctgat tggcagaact acacaccagg gccagggatc agatatccac	120
	tgacctttgg atggtgcttc aagtttagtac cagttgaacc agagcaagta gaagaggcca	180
10	aataaggaga gaagaacagc ttgttacacc ctatgagcca gcatgggatg gaggacccgg	240
	agggagaagt attagtgtgg aagtttgaca gcctcctagc atttcgtcac atggcccag	300
15	agctgcatcc ggagtactac aaagactgct gacatcgagc tttctacaag ggactttccg	360
	ctggggactt tccagggagg tgtggcctgg gcgggactgg ggagtggcga gccctcagat	420
	gctacatata agcagctgct ttttgccctgt actgggtctc tctggttaga ccagatctga	480
20	gcctgggagc tctctggcta actagggaac cactgctta agcctcaata aagcttgcct	540
	tgagtgtca aagtagtgtg tgcccgtctg ttgtgtgact ctggtaacta gagatccctc	600
	agaccctttt agtcagtggtg gaaaatctct agcagtggtg cccgaacagg gacttgaaag	660
25	cgaaagtaaa gccagaggag atctctcgac gcaggactcg gcttgctgaa gcgcgcacgg	720
	caagaggcga ggggaggcga ctggtgagta cgccaaaaat tttgactagc ggaggctaga	780
30	aggagagaga tgggtgagc agcgtcggta ttaagcgggg gagaattaga taaatgggaa	840
	aaaattcggg taaggccagg gggaaagaaa caatataaac taaaacatat agtatgggca	900
	agcagggagc tagaacgatt cgcagttaat cctggccttt tagagacatc agaaggctgt	960
35	agacaaatac tgggacagct acaaccatcc cttcagacag gatcagaaga acttagatca	1020
	ttatataata caatagcagt cctctattgt gtgcatcaaa ggatagatgt aaaagacacc	1080
40	aaggaagcct tagataagat agaggaagag caaaacaaaa gtaagaaaaa ggcacagcaa	1140
	gcagcagctg acacaggaaa caacagccag gtcagccaaa attaccctat agtgcagaac	1200
	ctccaggggc aaatggtaca tcaggccata tcacctagaa ctttaaatgc atgggtaaaa	1260
45	gtagtagaag agaaggcttt cagcccagaa gtaataacca tgttttcagc attatcagaa	1320
	ggagccaccc cacaagattht aataccatg ctaaacacag tggggggaca tcaagcagcc	1380
	atgcaaagt taaaagagac catcaatgag gaagctgcag aatgggatag attgcatcca	1440
50	gtgcatgcag ggcctattgc accaggccag atgagagaac caaggggaag tgacatagca	1500
	ggaactacta gtacccttca ggaacaaata ggatggatga cacataatcc acctatcca	1560
55	gtaggagaaa tctataaaag atggataatc ctgggattaa ataaaatagt aagaatgtat	1620
	agccctacca gcattctgga cataagacaa ggaccaaagg aaccctttag agactatgta	1680
	gaccgattct ataaaactct aagagccgag caagcttcac aagaggtaaa aattggatg	1740
60	acagaaacct tgttggtcca aatgcgaac ccagattgta agactattht aaaagcattg	1800
	ggaccaggag cgacactaga agaatgatg acagcatgtc agggagtggt gggacccggc	1860
	cataaagcaa gagttttggc tgaagcaatg agccaagtaa caaatccagc taccataatg	1920
65	atacagaaag gcaatthttag gaaccaaaga aagactgtta agtgthtcaa ttgtggcaaa	1980

ES 2 355 027 B2

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

ES 2 355 027 B2

	tagaagtaaa	catagtgaca	gactcacaat	atgcattggg	aatcattcaa	gcacaaccag	4080
	ataagagtga	atcagagtta	gtcagtcaaa	taatagagca	gttaataaaa	aaggaaaaag	4140
5	tctacctggc	atgggtacca	gcacacaaag	gaattggagg	aatgaacaa	gtagataaat	4200
	tggtcagtgc	tggaatcagg	aaagtactat	ttttagatgg	aatagataag	gccaagaag	4260
	aacatgagaa	atatcacagt	aattggagag	caatggctag	tgattttaac	ctaccacctg	4320
10	tagtagcaaa	agaaatagta	gccagctgtg	ataaatgtca	gctaaaaggg	gaagccatgc	4380
	atggacaagt	agactgtagc	ccaggaatat	ggcagctaga	ttgtacacat	ttagaaggaa	4440
15	aagtatctt	ggtagcagtt	catgtagcca	gtggatata	agaagcagaa	gtaattccag	4500
	cagagacagg	gcaagaaaca	gcatacttcc	tcttaaaatt	agcaggaaga	tggccagtaa	4560
	aaacagtaca	tacagacaat	ggcagcaatt	tcaccagtac	tacagttaag	gccgcctgtt	4620
20	ggtgcccggg	gatcaagcag	gaatttggca	ttccctacaa	tcccaaagt	caaggagtaa	4680
	tagaatctat	gaataaagaa	ttaaagaaaa	ttataggaca	ggtaagagat	caggctgaac	4740
	atcttaagac	agcagtacaa	atggcagtat	tcatccacaa	ttttaaaga	aaagggggga	4800
25	ttggggggta	cagtgcaggg	gaaagaatag	tagacataat	agcaacagac	atacaacta	4860
	aagaattaca	aaaacaaatt	acaaaaattc	aaaattttcg	ggtttattac	agggacagca	4920
30	gagatccagt	ttggaaagga	ccagcaaagc	tcctctggaa	aggtgaaggg	gcagtagtaa	4980
	tacaagataa	tagtgacata	aaagtagtgc	caagaagaaa	agcaaagatc	atcagggatt	5040
	atggaaaaca	gatggcaggt	gatgattgtg	tggcaagtag	acaggatgag	gattaacaca	5100
35	tggaaaagat	tagtaaaaca	ccatatgtat	atttcaagga	aagctaagga	ctggttttat	5160
	agacatcact	atgaaagtac	taatccaaaa	ataagttcag	aagtacacat	cccactaggg	5220
	gatgctaaat	tagtaataac	aacatattgg	ggctctgcata	caggagaaag	agactggcat	5280
40	ttgggtcagg	gagtctccat	agaatggagg	aaaaagagat	atagcacaca	agtagaccct	5340
	gacctagcag	accaactaat	tcatctgcac	tattttgatt	gtttttcaga	atctgctata	5400
45	agaaatacca	tattaggacg	tatagttagt	cctaggtgtg	aatatcaagc	aggacataac	5460
	aaggtaggat	ctctacagta	cttggcacta	gcagcattaa	taaaaccaa	acagataaag	5520
	ccacctttgc	ctagtgttag	gaaactgaca	gaggacagat	ggaacaagcc	ccagaagacc	5580
50	aagggccaca	gagggagcca	tacaatgaat	ggacactaga	gcttttagag	gaacttaaga	5640
	gtgaagctgt	tagacatttt	cctaggatat	ggctccataa	cttaggacaa	catatctatg	5700
55	aaacttacgg	ggatacttgg	gcaggagtgg	aagccataat	aagaattctg	caacaactgc	5760
	tgtttatcca	tttcagaatt	gggtgtcgac	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	atgcaaccta	taatagtagc	aatagtagca	ttagtagtag	caataataat	agcaatagtt	6120

ES 2 355 027 B2

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

ES 2 355 027 B2

gcaaaaccag caagaaaaga atgaacaaga attattggaa ttagataaat gggcaagttt 8220
 gtggaattgg ttaacataa caaattggct gtggtatata aaattattca taatgatagt 8280
 5 aggaggcttg gtaggtttta gaatagtttt tgctgtactt tctatagtga atagagttag 8340
 gcagggatat tcaccattat cgtttcagac ccacctcca atcccgaggg gacccgacag 8400
 10 gcccgaagga atagaagaag aagggtggaga gagagacaga gacagatcca ttcgattagt 8460
 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 cagatagggt 8700
 tatagaagta ttacaagcag cttatagagc tattcgccac atacctagaa gaataagaca 8760
 20 gggcttgaa aggattttgc tataagatgg gtggcaagt gtcaaaaagt agtgtgattg 8820
 gatggcctgc tgtaagggaa agaatgagac gagctgagcc agcagcagat ggggtgggag 8880
 25 cagtatctcg agacctagaa aaacatggag caatcacaag tagcaataca gcagctaaca 8940
 atgctgcttg tgcttgctta gaagcacaag aggaggaaga ggtgggtttt ccagtcacac 9000
 ctcaggtacc ttaagacca atgacttaca aggcagctgt agatcttagc cactttttaa 9060
 30 aagaaaaggg gggactggaa gggctaattc actcccaaag aagacaagat atccttgatc 9120
 tgtggatcta ccacacacaa ggctacttcc ctgattggca gaactacaca ccagggccag 9180
 gggtcagata tccactgacc tttggatggt gctacaagct agtaccagtt gagccagata 9240
 35 aggtagaaga ggccaataaa ggagagaaca ccagcttgtt acaccctgtg agcctgcatg 9300
 gaatggatga ccctgagaga gaagtgttag agtggaggtt tgacagccgc ctagcatttc 9360
 40 atcacgtggc ccgagagctg catccggagt acttcaagaa ctgctgacat cgagcttgct 9420
 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 gtgtgtgcc gtctgttggt tgactctggt 9660
 aactagagat ccctcagacc cttttagtca gtgtggaaaa tctctagcac cccccaggag 9720
 50 gtagaggttg cagtgagcca agatcgcgcc actgcattcc agcctgggca agaaaacaag 9780
 actgtctaaa ataataataa taagttaagg gtattaaata tatttataca tggaggcat 9840
 55 aaaaatatat atatttgggc tgggcgcagt ggctcacacc tgcgccggc cctttgggag 9900
 gccgaggcag gtggatcacc tgagtttggg agttccagac cagcctgacc aacatggaga 9960
 aacccttct ctgtgtattt ttagtagatt ttattttatg tgtattttat tcacaggtat 10020
 60 ttctggaaaa ctgaaactgt tttcctcta ctctgatacc acaagaatca tcagcacaga 10080
 ggaagacttc tgtgatcaaa tgtggtggga gagggaggtt ttcaccagca catgagcagt 10140
 cagttctgcc gcagactcgg cgggtgtcct tcggttcagt tccaacaccg cctgcctgga 10200
 65 gagaggtcag accacagggg gagggctcag tccccaagac ataaacaccc aagacataaa 10260

ES 2 355 027 B2

cacccaacag gtccacccc cctgctgccc aggcagagcc gattcaccaa gacgggaatt 10320
 aggatagaga aagagtaagt cacacagagc cggctgtgcg ggagaacgga gttctattat 10380
 5 gactcaaatc agtctcccca agcattcggg gatcagagtt ttttaaggata acttagtgtg 10440
 tagggggcca gtgagttgga gatgaaagcg tagggagtcg aaggtgtcct tttgcgccga 10500
 gtcagttcct ggggtgggggc cacaagatcg gatgagccag tttatcaatc cgggggtgcc 10560
 10 agctgatcca tggagtgagc ggtctgcaaa atatctcaag cactgattga tcttaggttt 10620
 tacaatagtg atgttacccc aggaacaatt tggggaaggt cagaatcttg tagcctgtag 10680
 ctgcatgact cctaaacat aatttctttt ttgttttttt ttttttattt ttgagacagg 10740
 15 gtctcactct gtcacctagg ctggagtgca gtggtgcaat cacagctcac tgcagcctca 10800
 acgtcgtaag ctcaagcgat cctcccacct cagcctgcct ggtagctgag actacaagcg 10860
 20 acgccccagt taatttttgt atttttggta gaggcagcgt tttgccgtgt ggccctggct 10920
 ggtctcgaac tcctgggctc aagtgatcca gcctcagcct cccaaagtgc tgggacaacc 10980
 ggggccagtc actgcacctg gccctaaacc ataatttcta atcttttggc taatttgta 11040
 25 gtcttcaaaa ggcagtctag tccccaggca aaaaggggggt ttgtttcggg aaagggctgt 11100
 tactgtcttt gtttcaaact ataaactaag ttcctcctaa acttagttcg gcctacacc 11160
 30 aggaatgaac aaggagagct tggaggttag aagcacgatg gaattggta ggtcagatct 11220
 ctttactgt ctgagttata attttgcaat ggtggttcaa agactgccg cttctgacac 11280
 cagtcgctgc attaatgaat cggccaacgc gcggggagag gcggtttgcg tattggcgct 11340
 35 cttccgcttc ctcgctcact gactcgctgc gctcggtcgt tcggctgcgg cgagcggtat 11400
 cagctcactc aaaggcggta atacggttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga 11460
 40 acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt 11520
 ttttccatag gctccgccc cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt 11580
 ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc 11640
 45 gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa 11700
 gcgtggcgct ttctcaatgc tcacgctgta ggtatctcag ttcggtgtag gtcgttcgct 11760
 ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg ttcagcccga ccgctgcgcc ttatccggta 11820
 50 actatcgtct tgagtccaac ccggaagac acgacttatc gccactggca gcagccactg 11880
 gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac agagttcttg aagtgggtggc 11940
 55 ctaactacgg ctacactaga aggacagtat ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta 12000
 ccttcggaaa aagagttggg agctcttgat ccggcaaaaa aaccaccgct ggtagcgggtg 12060
 gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt 12120
 60 tgatcttttc tacgggtctt gacgctcagt ggaacgaaaa ctcacgtaa gggattttgg 12180
 tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta 12240
 65 aatcaatcta aagtatatat gagtaaactt ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg 12300

ES 2 355 027 B2

aggcacctat ctcagcgatc tgtctatttc gttcatccat agttgcctga ctccccgtcg 12360
 tgtagataac tacgatacgg gagggccttac catctggccc cagtgctgca 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 tcgtttggtgta tggcttcatt cagctccggt tcccaacgat 12660
 caaggcgagt tacatgatcc cccatgttgt gcaaaaaagc ggtagctcc ttcggctctc 12720
 15 cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgag tgttatcact catggttatg gcagcactgc 12780
 ataattctct 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 taaccctctc 13020
 gtgcacccaa ctgatcttca gcatctttta ctttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa 13080
 25 caggaaggca aatgccgca aaaaagggaa taagggcgac acggaaatgt tgaatactca 13140
 tactcttctt ttttcaatat tattgaagca tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat 13200
 30 acatatttga atgtatttag aaaaataaac aaataggggt tccgcgcaca tttccccgaa 13260
 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 ggtgttggcg ggtgtcgggg cgagccatg 13500
 40 acccagtcac gtagcgatag cggagtgtac tggcttaact atgcggcatc agagcagatt 13560
 gtactgagag tgcaccatat gcggtgtgaa ataccgcaca gatgcgtaag gagaaaatac 13620
 cgcacaggg gccattcgc attcaggctg cgcaactggt ggggaagggcg atcgggtcgg 13680
 45 gcctcttcgc tattacgcca gcgcggggag gcagagattg cagtaagctg agatcgcagc 13740
 actgcactcc agcctgggcg acagagtaag actctgtctc aaaaataaaa taaataaatc 13800
 aatcagatat tccaatcttt tcctttatth atttattht tttctattht ggaaacacag 13860
 50 tccttcctta ttccagaatt acacatatat tctatthttc tttatatgct ccagthtttt 13920
 ttagacctc acctgaaatg tgtgtataca aatctagggc cagtcagca gagcctaaag 13980
 55 gtaaaaaata aaataataaa aaataaataa aatctagctc actccttcac atcaaaatgg 14040
 agatacagct gtagcatta aataccaaat aacctatctt gtcctcaata atthtaagcg 14100
 cctctctcca ccacatctaa ctctgtcaa aggcattgtc cccttccggg cgctctgctg 14160
 60 tgctgccaac caactggcat gtggactctg cagggtcctt aactgccaag cccacagtg 14220
 tgccctgagg ctgccccctt cttctagcgg ctgccccac tcggctttgc thtccctagt 14280
 ttcagttact tgcgttcagc caaggtctga aactaggtgc gcacagagcg gtaagactgc 14340
 65 gagagaaaga gaccagcttt acagggggtt tatcacagtg caccctgaca gtcgtcagcc 14400

ES 2 355 027 B2

	tcacaggggg	tttatcacat	tgcaccctga	cagtcgtcag	cctcacaggg	ggtttatcac	14460
	agtgcaccct	tacaatcatt	ccatttgatt	cacaattttt	ttagtctcta	ctgtgcctaa	14520
5	cttghtaagtt	aaatttgatc	agaggtgtgt	tcccagaggg	gaaaacagta	tatacagggg	14580
	tcagtactat	cgcatctcag	gcctccacct	gggtcttga	atgtgtcccc	cgaggggtga	14640
	tgactacctc	agttggatct	ccacaggtca	cagtgacaca	agataaccaa	gacacctccc	14700
10	aaggctacca	caatgggccg	ccctccacgt	gcacatggcc	ggaggaactg	ccatgtcgga	14760
	ggtgcaagca	cacctgcgca	tcagagtcct	tggtgtggag	ggagggacca	gcgagcttc	14820
15	cagccatcca	cctgatgaac	agaacctagg	gaaagccca	gttctactta	caccaggaaa	14880
	ggc						14883
	<210> 4						
20	<211> 14883						
	<212> DNA						
	<213> Secuencia artificial						
25	<220> misc_recomb						
	<223> p4696						
30	<400> 4						
	tggaagggct	aatttggctc	caaaaaagac	aagagatcct	tgatctgtgg	atctaccaca	60
	cacaaggcta	cttcctgat	tggcagaact	acacaccagg	gccagggatc	agatatccac	120
35	tgacctttgg	atgggtgctc	aagttagtac	cagttgaacc	agagcaagta	gaagaggcca	180
	aataaggaga	gaagaacagc	ttgttacacc	ctatgagcca	gcatgggatg	gaggaccggg	240
	agggagaagt	attagtgtgg	aagtttgaca	gcctcctagc	atttcgtcac	atggcccag	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	ccactgctta	agcctcaata	aagcttgctc	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	tgggtgagag	agcgtcggta	ttaagcgggg	gagaattaga	taaattgggaa	840
	aaaattcggt	taaggccagg	gggaaagaaa	caatataaac	taaaacatat	agtatgggca	900
	agcagggagc	tagaacgatt	cgcagttaat	cctggccttt	tagagacatc	agaaggctgt	960
60	agacaaatac	tgggacagct	acaacatcc	cttcagacag	gatcagaaga	acttagatca	1020
	ttatataata	caatagcagt	cctctattgt	gtgcatcaaa	ggatagatgt	aaaagacacc	1080
65	aaggaagcct	tagataagat	agaggaagag	caaaacaaaa	gtaagaaaaa	ggcacagcaa	1140
	gcagcagctg	acacaggaaa	caacagccag	gtcagccaaa	attaccctat	agtcagaaac	1200

ES 2 355 027 B2

ctccaggggc aaatggtaca tcaggccata tcacctagaa ctttaaagtc atgggtaaaa 1260
 gtagtagaag agaaggcttt cagcccagaa gtaataccca tgttttcagc attatcagaa 1320
 5 ggagccaccc cacaagattt aaataccatg ctaaacacag tggggggaca tcaagcagcc 1380
 atgcaaagt taaaagagac catcaatgag gaagctgcag aatgggatag attgcatcca 1440
 gtgcatgcag ggcctattgc accaggccag atgagagaac caaggggaag tgacatagca 1500
 10 ggaactacta gtacccttca ggaacaaata ggatggatga cacataatcc acctatccca 1560
 gtaggagaaa tctataaaaag atggataatc ctgggattaa ataaaatagt aagaatgtat 1620
 15 agccctacca gcattctgga cataagacaa ggaccaaagg aacccttag agactatgta 1680
 gaccgattct ataaaactct aagagccgag caagcttcac aagaggtaaa aaattggatg 1740
 acagaaacct tgttggcca aaatgcgaac ccagattgta agactatttt aaaagcattg 1800
 20 ggaccaggag cgacactaga agaaatgatg acagcatgtc agggagtggg gggacccggc 1860
 cataaagcaa gagttttggc tgaagcaatg agccaagtaa caaatccagc taccataatg 1920
 25 atacagaaag gcaattttag gaaccaaaga aagactgtta agtgtttcaa ttgtggcaaa 1980
 gaagggcaca tagccaaaaa ttgcagggcc cctaggaaaa agggctgttg gaaatgtgga 2040
 aaggaaggac accaaatgaa agattgtact gagagacagg ctaatttttt agggaagatc 2100
 30 tggccttccc acaaggaag gccagggaat tttcttcaga gcagaccaga gccaacagcc 2160
 ccaccagaag agagcttcag gtttggggaa gagacaacaa ctcccttca gaagcaggag 2220
 ccgatagaca aggaactgta tcctttagct tccttcagat cactctttgg cagcgacccc 2280
 35 tcgtcacaat aaagataggg gggcaattaa aggaagctct attagataca ggagcagatg 2340
 atacagtatt agaagaaatg aatttgccag gaagatggaa accaaaaatg atagggggaa 2400
 40 ttggaggttt tatcaaagta agacagtatg atcagatact catagaaatc tgccggacata 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 gcaggggtaa 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
 ggtggggatt taccacacca gacaaaaaac atcagaaaga acctccattc ctttggatgg 3240
 65 gttatgaact ccatcctgat aaatggacag tacagcctat agtgctgcca gaaaaggaca 3300

ES 2 355 027 B2

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

ES 2 355 027 B2

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
 aagggccaca gagggagcca tacaatgaat ggacactaga gcttttagag gaacttaaga 5640
 10 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 agtacatgta 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
 40 tataatcagt ttatgggatc aaagcctaaa gccatgtgta aaattaacc cactctgtgt 6600
 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 caaaggatc 6840
 ctttgagcca attcccatac attattgtgc cccggctggt tttgcgattc taaaatgtaa 6900
 50 taataagacg ttcaatggaa caggaccatg tacaatgtc agcacagtac aatgtacaca 6960
 tggaatcagg ccagtagtat caactcaact gctgttaa at ggcagtctag cagaagaaga 7020
 55 tgtagtaatt agatctgcca atttcacaga caatgctaaa accataatag tacagctgaa 7080
 cacatctgta gaaattaatt gtacaagacc caacaacaat acaagaaaaa gtatccgtat 7140
 ccagagggga ccagggagag catttgttac aataggaaaa ataggaaata tgagacaagc 7200
 60 acattgtaac attagtagag caaatggaa tgccacttta aaacagatag ctagcaaatt 7260
 aagagaacaa tttggaaata ataaaacaat aatctttaag caatcctcag gaggggacc 7320
 agaaattgta acgcacagtt ttaattgtgg aggggaattt ttctactgta attcaacaca 7380
 65 actgtttaat agtacttggg ttaatagtac ttggagtact gaagggtcaa ataactgta 7440

ES 2 355 027 B2

5 aggaagtgac acaatcacac tcccatgcag aataaaacaa tttataaaca tgtggcagga 7500
 agtaggaaaa gcaatgtatg cccctcccat cagtggacaa attagatgtt catcaaatat 7560
 10 tactgggctg ctattaacaa gagatgggtg taataacaac aatgggtccg agatcttcag 7620
 acctggagga ggcgatatga gggacaattg gagaagtgaa ttatataaat ataaagtagt 7680
 15 aaaaattgaa ccattaggag tagcacccac caaggcaaag agaagagtgg tgcaagagaga 7740
 aaaaagagca gtgggaatag gagctttggt ccttgggttc ttgggagcag caggaagcac 7800
 tatgggcgca gcgtcaatga cgctgacggt acaggccaga caattattgt ctgatatagt 7860
 20 gcagcagcag aacaatttgc tgagggctat tgaggcgcaa cagcatctgt tgcaactcac 7920
 agtctggggc atcaaacagc tccaggcaag aatcctggct gtggaaagat acctaaagga 7980
 tcaacagctc ctggggattt ggggttgctc tggaaaactc atttgcacca ctgctgtgcc 8040
 25 ttggaatgct agttggagta ataaatctct ggaacagatt tgggataaca tgacctggat 8100
 ggagtgggac agagaaatta acaattacac aagcttaata cactccttaa ttgaagaatc 8160
 gcaaaaccag caagaaaaga atgaacaaga attattggaa ttagataaat gggcaagttt 8220
 gtggaattgg tttaacataa caaattggct gtggtatata aaattattca taatgatagt 8280
 aggaggcttg gtaggtttta gaatagtttt tgctgtactt tctatagtga atagagttag 8340
 30 gcagggatat tcaccattat cgtttcagac ccacctcca atcccagggg gacccgacag 8400
 gcccgaagga atagaagaag aaggtggaga gagagacaga gacagatcca ttcgattagt 8460
 gaacggatcc ttagcactta tctgggacga tctgcgagc ctgtgcctct tcagctacca 8520
 35 ccgcttgaga gacttactct tgattgtaac gaggattgtg gaacttctgg gacgcagggg 8580
 gtgggaagcc ctcaaattt ggtggaatct cctacagtat tggagtcagg aactaaagaa 8640
 tagtgctggt aacttgctca atgccacagc catagcagta gctgagggga cagatagggg 8700
 40 tatagaagta ttacaagcag cttatagagc tattcgccac atacctagaa gaataagaca 8760
 gggcttggaaggattttgc tataagatgg gtggcaagtg gtcaaaaagt agtgtgattg 8820
 45 gatggcctgc tgtaaggaa agaatgagac gagctgagcc agcagcagat ggggtgggag 8880
 cagtatctcg agacctagaa aaacatggag caatcacaag tagcaataca gcagctaaca 8940
 atgtgcttg tgcttgctca gaagcacaag aggaggaaga ggtgggtttt ccagtcacac 9000
 50 ctcagggtacc tttaagacca atgacttaca aggagctgt agatcttagc cactttttaa 9060
 aagaaaaggg gggactggaa gggctaattc actcccaaag aagacaagat atccttgatc 9120
 55 tgtggatcta ccacacacaa ggctacttcc ctgattggca gaactacaca ccagggccag 9180
 gggtcagata tccactgacc tttggatggg gctacaagct agtaccagtt gagccagata 9240
 aggtagaaga ggccaataaa ggagagaaca ccagcttggt acaccctgtg agcctgcatg 9300
 60 gaatggatga ccctgagaga gaagtgttag agtggagggt tgacagccgc ctagcatttc 9360
 atcacgtggc ccgagagctg catccggagt acttcaagaa ctgctgacat cgagcttgct 9420
 65 acaagggact ttccgctggg gactttccag ggaggcgtgg cctgggcggg actggggagt 9480

ES 2 355 027 B2

5 ggcgagccct cagatgctgc atataagcag ctgctttttg cctgtactgg gtctctctgg 9540
 ttagaccaga tctgagcctg ggagctctct ggctaactag ggaaccact gcttaagcct 9600
 caataaagct tgccttgagt gcttcaagta gtgtgtgccc gtctgtttgtg tgactctggt 9660
 aactagagat ccctcagacc cttttagtca gtgtggaaaa tctctagcac cccccaggag 9720
 10 gtagaggttg cagtgagcca agatcgcgcc actgcattcc agcctgggca agaaaacaag 9780
 actgtctaaa ataataataa taagttaagg gtattaaata tatttataca tggagggtcat 9840
 aaaaatatat atatttgggc tgggcgagcgt ggctcacacc tgcgcccggc cttttgggag 9900
 15 gccgaggcag gtggatcacc tgagtttggg agttccagac cagcctgacc aacatggaga 9960
 aacccttct ctgtgtattt ttagtagatt ttattttatg tgtattttat tcacaggtat 10020
 ttctggaaaa ctgaaactgt ttttctcta ctctgatacc acaagaatca tcagcacaga 10080
 20 ggaagacttc tgtgatcaaa tgtggtggga gagggaggtt ttcaccagca catgagcagt 10140
 cagttctgcc gcagactcgg cgggtgtcct tcggttcagt tccaacaccg cctgcctgga 10200
 gagaggtcag accacagggg gagggctcag tcccaagac ataaacacc aagacataaa 10260
 caccaacag gtccacccc cctgctgcc aggcagagcc gattcaccaa gacgggaatt 10320
 25 aggatagaga aagagtaagt cacacagagc cggctgtgcg ggagaacgga gttctattat 10380
 gactcaaatc agtctccca agcattcggg gatcagagtt ttttaaggata acttagtggtg 10440
 tagggggcca gtgagttgga gatgaaagcg tagggagtcg aagggtgcct tttgcgccga 10500
 30 gtcagttcct ggggtggggc cacaagatcg gatgagccag tttatcaatc cgggggtgcc 10560
 agctgatcca tggagtgcag ggtctgcaa atatctcaag cactgattga tcttaggttt 10620
 tacaatagtg atgttacccc aggaacaatt tggggaaggc cagaatcttg tagcctgtag 10680
 40 ctgcatgact cctaaacat aatttctttt ttgtttttt ttttttattt ttgagacagg 10740
 gtctactct gtcacctagg ctggagtgc gtggtgcaat cacagctcac tgcagcctca 10800
 acgtcgtaag ctcaagcgt cctcccact cagcctgcct ggtagctgag actacaagcg 10860
 45 acgccccagt taatttttgt atttttggta gaggcagcgt tttgccgtgt ggccctggct 10920
 ggtctcgaac tcctgggctc aagtgatcca gcctcagcct cccaaagtgc tgggacaacc 10980
 ggggccagtc actgcacctg gccctaaacc ataatttcta atcttttggc taatttgta 11040
 50 gtctacaaa ggcagtctag tccccaggca aaaagggggg ttgtttcggg aaagggtgt 11100
 tactgtcttt gtttcaaact ataaactaag ttctcctaa acttagttcg gcctacacc 11160
 55 agaatgaac aaggagagct tggagggttag aagcacgatg gaattggta ggtcagatct 11220
 ctttactgt ctgagttata attttgcaat ggtggttcaa agactgccc cttctgacac 11280
 cagtcgctgc attaataat cggccaacgc gcggggagag gcggtttgcg tattggcgct 11340
 60 cttccgcttc ctcgctcact gactcgctgc gctcggtcgt tcggctgcgg cgagcggtat 11400
 cagctcactc aaaggcggtg atacggttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga 11460
 65 acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt 11520
 ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt 11580

ES 2 355 027 B2

5 ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc 11640
 gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa 11700
 5 gcgtggcgct ttctcaatgc tcacgctgta ggtatctcag ttcggtgtag gtcgttcgct 11760
 ccaagctggg ctgtgtgac gaaccccccg ttcagcccga ccgctgcgcc ttatccggta 11820
 actatcgtct tgagtccaac ccggttaagac acgacttatc gccactggca gcagccactg 11880
 10 gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac agagtcttg aagtgggtggc 11940
 ctaactacgg ctacactaga aggacagtat ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta 12000
 15 ccttcggaaa aagagttggt agctcttgat ccggcaaaca aaccaccgct ggtagcggtg 12060
 gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt 12120
 tgatcttttc tacggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa ctcacgtaa gggattttgg 12180
 20 tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt aaattaaana tgaagtttta 12240
 aatcaatcta aagtataat gagtaaactt ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg 12300
 aggcacctat ctcagcgtc tgtctatttc gttcatccat agttgcctga ctccccgtcg 12360
 25 tgtagataac tacgatacgg gagggcttac catctggccc cagtgtgca atgataccgc 12420
 gagaccacg ctcaccggct ccagatttat cagcaataaa ccagccagcc ggaagggccg 12480
 30 agcgcagaag tggctctgca actttatccg cctccatcca gtctattaat tgttgccggg 12540
 aagctagagt aagtagttcg ccagttaata gtttgcgcaa cgttgttgcc attgctacag 12600
 gcatcgtggt gtcacgctcg tcgtttggta tggcttcatt cagctccggt tccaacgat 12660
 35 caaggcgagt tacatgatcc cccatgttgt gcaaaaaagc ggtagctcc ttcggtcctc 12720
 cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgcag tgttatcact catggttatg gcagcactgc 12780
 40 ataattctct tactgtcatg ccatccgtaa gatgcttttc tgtgactggg gagtactcaa 12840
 ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgcggc gaccgagttg ctcttgcccg gcgtcaatac 12900
 gggataatac cgcgccacat agcagaactt taaaagtgct catcattgga aaacgttctt 12960
 45 cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc tgttgagatc cagttcgatg taaccactc 13020
 gtgcaccaa ctgatcttca gcatctttta ctttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa 13080
 caggaaggca aaatgccga aaaaagggaa taagggcgac acggaaatgt tgaatactca 13140
 50 tactcttcct ttttcaatat tattgaagca tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat 13200
 acatatttga atgtatttag aaaaataaac aatatggggg tccgcgcaca tttccccgaa 13260
 55 aagtgccacc tgacgtctaa gaaaccatta ttatcatgac attaacctat aaaaataggc 13320
 gtatcacgag gccctttcgt cttcaagaac tgcctcgcgc gtttcgggtga tgacggtgaa 13380
 aacctctgac acatgcagct cccggagacg gtcacagctt gtctgtaagc ggatgccggg 13440
 60 agcagacaag cccgtcaggg cgcgtcagcg ggtgttggcg ggtgtcgggg cgcagccatg 13500
 acccagtcac gtagcgatag cggagtgtac tggcttaact atgcggcatc agagcagatt 13560
 65 gtactgagag tgcacatat gcggtgtgaa ataccgcaca gatgcgtaag gagaaaatac 13620

ES 2 355 027 B2

cgcatcaggc gccattcgcc attcaggctg cgcaactggt ggggaagggcg atcgggtgcgg 13680
 gcctcttcgc tattacgcca gcgcggggag gcagagattg cagtaagctg agatcgcagc 13740
 5 actgcactcc agcctgggag acagagtaag actctgtctc aaaaataaaa taaataaatc 13800
 aatcagatat tccaatcttt tcctttattht atthtattttat tttctatthtt ggaaacacag 13860
 tccttcctta ttccagaatt acacatatat tctatthtttc tttatatgct ccagthttttt 13920
 10 ttagaccttc acctgaaatg tgtgtataca aaatctaggc cagtccagca gagcctaaag 13980
 gtaaaaaata aaataataaa aaataaataa aatctagctc actccttcac atcaaaatgg 14040
 15 agatacagct gtttagcatta aatacfaat aacctatctt gtcctcaata atthtaagcg 14100
 cctctctcca ccacatctaa ctctgtcaa aggcattgtc cccttccggg cgctctgctg 14160
 tgctgccaac caactggcat gtggactctg cagggctcct aactgccaag cccacagtg 14220
 20 tgccctgagg ctgccccttc cttctagcgg ctgccccac tcggctthtg tttccctagt 14280
 ttcagttact tgcgthcagc caaggtctga aactaggtgc gcacagagcg gtaagactgc 14340
 gagagaaaga gaccagctth acagggggtt tatcacagtg caccctgaca gtcgthcagcc 14400
 25 tcacaggggg tttatcacat tgcaccctga cagthcagc cctcacaggg ggtthtatcac 14460
 agthcacctt tacaatcatt ccattthgatt cacaaatthtt ttagthctcta ctgthcctaa 14520
 30 cttgtaagth aaatthgatc agaggtgtgt tcccagaggg gaaaacagta tatacagggth 14580
 tcagthactat cgcattthcag gcctccacct gggthcttgga atgtgtcccc cgaggggthga 14640
 tgactacctc agthtgatct ccacaggtca cagthgacaca agataaccaa gacacctccc 14700
 35 aaggthacca caatgggccc ccctccacgt gcacatggcc ggaggaactg ccatgthcggga 14760
 ggtgcaagca cacctgagca tcagagthct tggthgtggag ggagggacca gcgagcttc 14820
 40 cagccatcca cctgatgaac agaacctagg gaaagcccca gththactta caccaggaaa 14880
 ggc 14883

45 <210> 5
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> virus de la inmunodeficiencia humana
 50 <400> 5

tccacctatc ccagtaagga gaa 23

55 <210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 60 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana
 <400> 6

65 cttcctgcca taggagatgc 20

ES 2 355 027 B2

	<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 cgggcacca acag		24
	<210> 10		
50	<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 2 355 027 B2

	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220> primer_bind	
	<223> usado en la mutagénesis directa	
	<400> 11	
10	aggcatcgcc atatgatca 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
	<210> 13	
30	<211> 24	
	<212> DNA	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220> primer_bind	
	<223> Cebador para SEQ ID NO: 1	
40	<400> 13	
	acaaggaat tggaggaaat gaac	24
45	<210> 14	
	<211> 23	
	<212> DNA	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220> primer_bind	
	<223> Cebador para SEQ ID NO: 1	
55	<400> 14	
	ctcatgttct tcttggcct tat	23
60	<210> 15	
	<211> 16	
65	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	

ES 2 355 027 B2

<220> primer_bind
<223> Cebador para SEQ ID NO: 1

5 <400> 15

ttcttcttgg gcctta **16**

10 <210> 16
<211> 23
<212> DNA
15 <213> Secuencia artificial

<220> primer_bind
<223> Cebador para SEQ ID NO: 2

20 <400> 16

atgtcaagct aaaaggggaa gcc **23**

25 <210> 17
<211> 21
<212> DNA
30 <213> Secuencia artificial

<220> primer_bind
<223> Cebador para SEQ ID NO: 2

35 <400> 17

40 **gctgtttctt gccctgtctc t** **21**

<210> 18
<211> 17
45 <212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220> primer_bind
50 <223> Cebador para SEQ ID NO: 2

<400> 18

55 **tctagctgcc atattcc** **17**

<210> 19
60 <211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

65 <220> primer_bind
<223> Cebador para SEQ ID NO: 3

ES 2 355 027 B2

	<400> 19	
	tacagacaat ggcagcaatt tcac	24
5		
	<210> 20	
	<211> 21	
	<212> DNA	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220> primer_bind	
15	<223> Cebador para SEQ ID NO: 3	
	<400> 20	
20	atgccaaatt cctgcttgat t	21
	<210> 21	
	<211> 15	
25	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220> primer_bind	
30	<223> Cebador para SEQ ID NO: 3	
	<400> 21	
35	ttaaggccgc ctggtt	15
	<210> 22	
40	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220> primer_bind	
	<223> Cebador para SEQ ID NO: 4	
	<400> 22	
50	agcagagaca gggcaagaaa ca	22
	<210> 23	
55	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220> primer_bind	
	<223> Cebador para SEQ ID NO: 4	
65	<400> 23	
	ctgccatttg tactgctgtc ttaa	24

ES 2 355 027 B2

<210> 24

<211> 19

<212> DNA

5 <213> Secuencia artificial

<220> primer_bind

<223> Cebador para SEQ ID NO: 4

10

<400> 24

15

agtcaaggag taatagaat

19

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200802766

②② Fecha de presentación de la solicitud: 30.09.2008

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	TANG Y. et al. "Comparative evaluation of three commercial systems for nucleic acid extraction from urine specimens." Journal of Clinical Microbiology (2005) Vol. 43, páginas 4830-4833.	12
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.	1-14
A	ES 2244332 B1 (FUNCACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN Y LA PREVENCIÓN DEL SIDA EN ESPAÑA E INSTITUTO DE SALUD CARLOS III) 01.12.2007	1-14
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.	1-14
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.	1-14
A	ES 2246859 T3 (VIRCO BVBA) 13.03.2002	1-14
A	WO 0181624 A1 (VIRCO N.V.) 01.11.2001	1-14

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
1/5

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 1-11, 13-14	SI
	Reivindicaciones 12	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-11, 13-14	SI
	Reivindicaciones 12	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	TANG Y. et al. "Comparative evaluation of three commercial systems for nucleic acid extraction from urine specimens." <i>Journal of Clinical Microbiology</i> (2005) Vol. 43, páginas 4830-4833.	2005
D02	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" <i>Journal of Clinical Microbiology</i> (1998) Vol.36, páginas 569-572.	1998
D03	ES 2244332 B1 (FUNCACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN Y LA PREVENCIÓN DEL SIDA EN ESPAÑA E INSTITUTO DE SALUD CARLOS III)	01.12.2007
D04	SACHDEVA N., et al. "Frequency of drug-resistant variants of HIV-1 coexistent with wild-type in treatment-naïve patients of India." <i>Journal of the International AIDS Society</i> (2005) Vol. 7 páginas 1-7.	2005
D05	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." <i>Molecular Biotechnology</i> (2004) Vol. 28, páginas 87-95.	2004
D06	ES 2246859 T3 (VIRCO BVBA)	13.03.2002
D07	WO 01/81624 A1 (VIRCO N.V.)	01.11.2001

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 plásmido que comprende SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, una célula empaquetadora transfectada con el plásmido, un virión que contiene el ARN codificado por el plásmido y la célula reporter transfectada con el virión (reivindicaciones 1-4), y sus usos para evaluar la calidad de los sistemas de extracción de ADN o ARN, para clonar fragmentos del gen pol y de la proteasa del ADN del virus VIH-1 y para evaluar la resistencia de fenotipos del virus VIH-1 a antirretrovirales (reivindicaciones 5-10).

La presente solicitud de invención también consiste en el método de construcción del plásmido (reivindicación 11), y el método de evaluación de la calidad de los sistemas de extracción de ácidos nucleicos (reivindicaciones 12-13) y kit (reivindicación 14).

El documento D01 divulga una evaluación comparativa de tres sistemas comerciales de extracción de ácidos nucleicos (ver todo el documento).

El documento D02 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 D03 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 D03 también divulga un sistema de determinación de resistencias fenotípicas a fármacos antirretrovirales (ver página 16 y reivindicación 9).

El documento D04 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 D05 la construcción de un nuevo vector retroviral basado en el plásmido pNL4-3, que puede ser útil para facilitar el diseño de vectores *in 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 D06 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 fenotípica (ver página3, 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).

El documento D07 divulga un método para el análisis de la mutación del gen pol de viriones de VIH, que incluye la amplificación del virión RNA o DNA mediante PCR anidada (ver resumen y reivindicaciones).

1. NOVEDAD (Art 6 Ley 11/1986) Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8 Ley 11/1986).

1.1. REIVINDICACIÓN 12.

El documento D01 divulga un método de evaluación de la calidad de los sistemas de extracción de ácidos nucleicos que comprende obtener la mezcla estándar de ADN, aplicar la mezcla a un sistema de extracción de ADN, cuantificar la concentración de ADN extraído y comparar los resultados obtenidos con los valores de concentración nucleotídica de la mezcla estándar (ver todo el documento).

Las características de la reivindicación 12 ya son conocidas del documento IX. Por lo tanto la reivindicación 12 no es nueva y no implica actividad inventiva la vista del estado de la técnica conocido según los artículos 6 y 8 de la Ley 11/1986.

1.2. REIVINDICACIONES 1-11, 13-14.

La invención reivindicada difiere principalmente de los documentos citados en que ninguno de los documentos citados 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 1-11, 13-14 son nuevas y se considera que implican actividad inventiva según los artículos 6 y 8 de la Ley 11/1986.