

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①① Número de publicación: **2 356 322**

⑤① Int. Cl.:
C12N 15/86 (2006.01)
C12N 15/861 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑨⑥ Número de solicitud europea: **05750184 .3**
⑨⑥ Fecha de presentación : **18.05.2005**
⑨⑦ Número de publicación de la solicitud: **1760153**
⑨⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **07.03.2007**

⑤④ Título: **Un vector híbrido adenovirus-alfavirus para la administración eficaz y expresión de genes terapéuticos en células tumorales.**

③⑩ Prioridad: **20.05.2004 ES 200401219**

④⑤ Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.04.2011

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.04.2011

⑦③ Titular/es:
PROYECTO DE BIOMEDICINA CIMA, S.L.
Avda. Pío XII, 22 Oficina 1
31008 Pamplona, Navarra, ES

⑦② Inventor/es: **Qian, Cheng;**
Guan, Min;
Smerdou Picazo, Cristian y
Prieto Valtueña, Jesús

⑦④ Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 356 322 T3

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

DESCRIPCIÓN

Un vector híbrido adenovirus-alfavirus para la administración eficaz y expresión de genes terapéuticos en células tumorales.

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a vectores de expresión génica derivados de adenovirus, para la obtención de productos terapéuticos.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR A LA INVENCION

10 Uno de los principales problemas de la terapia convencional del cáncer es la falta de especificidad tumoral, lo que causa con frecuencia serios efectos secundarios y limita la dosis terapéutica. Aunque la terapia génica se mantiene como una promesa de gran potencial para la terapia del cáncer, también se enfrenta a un problema específico: dirigir la expresión transgénica al sitio del tumor. Varios estudios sugieren que cuando los vectores virales se administran de manera intralesional, aunque la expresión transgénica está esencialmente confinada a un área adyacente al tracto de la aguja, también puede ocurrir en otros tejidos. Por lo tanto un objetivo importante en la terapia génica del cáncer es dirigir la expresión de los genes terapéuticos a los tumores a través de la administración específica al tejido neoplásico ("objetivo tejido") y/o activación específica ("objetivo transcripcional") en el tejido neoplásico, sin afectar a las células sanas. El "objetivo tejido" se puede conseguir creando un vector dirigido mediante modificaciones de las interacciones receptor-ligando, permitiendo la infección de las células que expresan un receptor específico. El objetivo transcripcional se puede conseguir usando un promotor específico de tumor para controlar la expresión transgénica. Se han usado en estudios previos, distintos promotores específicos de tumores. Sin embargo tienen una limitación esencial, qué es que no conducen a un nivel elevado de expresión génica, y por tanto limitan la actividad antitumoral.

Una revisión de los últimos avances en el desarrollo de vectores virales para terapia génica se puede encontrar en Lundstrom K. "Latest development in viral vectors for gene therapy"; *Trends in Biotechnology*, 2003, 21:118-122.

25 Entre los vectores virales usados en la actualidad se encuentran los alfavirus. Los alfavirus son virus envueltos que contienen una molécula de una hebra simple de ARN positiva, como genoma. Se han diseñado y construido vectores de expresión derivados de los alfavirus Sindbis Virus (SIN), Semliki Forest Virus (SFV), y virus de encefalitis equina de Venezuela (VEE). Los vectores de alfavirus están basados en el uso de moléculas de ARN autoreplicativas derivadas de genomas de alfavirus, en las que las secuencias 5' y 3' necesarias para la replicación y el gen de la replicasa (Rep) se han mantenido, mientras que se han suprimido los genes que codifican para las proteínas virales estructurales y se han sustituido por un transgen. Después de la transfección de estos vectores en una célula, Rep será traducida y copiará el vector ARN en una hebra de ARN negativo, que será usada como molde para la amplificación del vector de ARN. Rep también puede reconocer un promotor subgenómico en la hebra de ARN negativo, de la cual hará un ARN subgenómico más pequeño, que puede ser traducido para producir proteínas heterólogas a niveles elevados. Los vectores de alfavirus se pueden usar directamente como ARN cuando son transcritos *in vitro* a partir de un promotor procariótico, tal como SP6 o T7, o bien como ADN cuando la secuencia del replicón se coloca bajo un promotor eucariótico tal como CMV. El vector de ARN puede ser empaquetado en partículas virales por cotransfección del mismo en células, junto con uno o más ARNs "ayudantes" que codifican para las proteínas estructurales virales. Los vectores de alfavirus tienen varias propiedades que los hacen atractivos para la terapia génica: un tropismo muy amplio, baja inmunogenicidad y un alto nivel de expresión de proteínas heterólogas. Esta expresión es, sin embargo, transitoria debido a la inducción de apoptosis en las células cuando tiene lugar la replicación. En el documento: Rayner J.O., Dryga S.A., Kamrud K.I. "Alphavirus vectors and vaccination"; *Rev. Med. Virol.* 2002;12 279-296, se describe el desarrollo de vectores de expresión basados en alfavirus para su uso en el campo de las vacunas.

45 Otro tipo de vectores virales son los basados en adenovirus. Existe amplia bibliografía sobre el uso de adenovirus, que se han desarrollado para superar algunos de los inconvenientes de la terapia génica y como fuente para crear vectores de expresión. Un documento que recoge los últimos avances en vectores adenovirales es: Volpers C, Kochanek S. "Adenoviral vectors for gene transfer and therapy"; *J Gene. Med.* 2004; 6: S164-S171. Los adenovirus tienen la ventaja de poseer una alta eficacia de transducción y capacidad de persistir en forma episomal. Sin embargo, la expresión de proteínas adenovirales induce fuertes respuestas inmunes, que limitan la duración de la expresión del transgén y causan toxicidad a las células infectadas por el vector. Se han desarrollado adenovirus vacíos para superar estos problemas. Dichos adenovirus vacíos están desprovistos de todos los genes adenovirales (las únicas secuencias conservadas son las dos secuencias terminales repetidas invertidas y las señales de empaquetamiento), y por lo tanto, las células transducidas no expresan ningún producto adenoviral y no provocan una respuesta inmune contra el vector. En suma, la eliminación de todos los genes adenovirales deja suficiente sitio para alojar grandes casetes de expresión y es por ello, por lo que a los adenovirus vacíos se les llama también vectores adenovirales de alta capacidad. Un documento que describe aspectos concretos de los vectores adenovirales, relacionados con la supresión de todas las secuencias codificantes de proteínas virales es el trabajo de Morsy MA et al. "An adenoviral vector deleted for all viral coding sequences results in enhanced safety and extended expression of a leptin transgene"; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95:7866-7871. El documento Schiedner G et al. "Variables Affecting In Vivo Performance of High-Capacity Adenovirus Vectors"; *J. Virol.* 2002, 76:1600-1609 describe el uso de ADN de relleno en los vectores de expresión basados en adenovirus vacíos, mostrando que la presencia de dicho ADN de relleno es esencial para conseguir un

incremento considerable de la expresión génica; y en general, que el diseño de vectores basados en adenovirus de alta capacidad (vacíos) puede variar sustancialmente el grado de expresión y la duración de la expresión de un gen.

Por otra parte el documento US-5.981.225 describe un vector para transferencia de genes basado en adenovirus, que comprende secuencias terminales invertidas repetidas (ITR), al menos una secuencia de señal de empaquetamiento y un gen adenoviral VAI1 y/o un gen adenoviral VAI2; y comprende un gen extraño al adenovirus operativamente unido a un promotor funcional en células diana para adenovirus.

El documento US-5.985.846 describe un vector de transferencia génica que comprende secuencias terminales invertidas repetidas (ITR) de adenovirus y partículas recombinantes de adenovirus que contienen dichas secuencias.

El documento US-6.566.093 describe vectores de ADNc derivado de alfavirus que consisten en ADN complementario de al menos parte del ARN de un alfavirus, esencial para la replicación del alfavirus, y ADNc heterólogo, por ejemplo, ADNc que codifica una sustancia deseada. Dicha sustancia deseada puede ser una proteína o polipéptido biológicamente activo, así como una proteína o polipéptido inmunogénico o antigénico, o una proteína o polipéptido terapéuticamente activo, o un RNA terapéuticamente activo.

El objetivo de la presente invención es mejorar la expresión transgénica y la inducción de apoptosis en células tumorales mediada por vectores híbridos *in vitro* e *in vivo*. Un objetivo adicional es mejorar la eficacia de la terapia de tumores en modelos animales mediante vectores híbridos.

Un objetivo adicional es además conseguir un método de terapia génica, en particular para el tratamiento del cáncer, mediante el uso de vectores híbridos.

Los objetivos de la presente invención se consiguen combinando en un único vector:

- una elevada capacidad de infección, por medio del uso de un sistema de liberación de adenovirus,
- un nivel elevado de expresión transgénica y la inducción de apoptosis, mediante el uso de un vector derivado de un alfavirus, tal como el SFV, y
- una especificidad tumoral mediante el uso de un promotor específico de tumores.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere en primer lugar a un vector híbrido adenoviral de expresión génica que comprende, al menos los siguientes elementos, orientados en dirección 5' a 3':

- i. una primera cadena de origen adenoviral que comprende una primera secuencia terminal invertida repetida (ITR) y una secuencia señal para el empaquetamiento del adenovirus;
- ii. una primera secuencia no codificante de relleno;
- iii. una secuencia correspondiente a un promotor específico de tejido;

i. una cadena de ADNc derivada de un alfavirus, cuya secuencia es parcialmente complementaria de un ARN alfaviral, que comprende al menos una secuencia codificante de un gen exógeno de interés en donde dicha cadena de ADNc comprende:

- a. una secuencia 5' necesaria para la replicación del alfavirus,
- b. una secuencia que codifica las proteínas no estructurales requeridas para la replicación del ARN alfaviral,
- c. al menos un promotor subgenómico del alfavirus, y
- d. una secuencia 3' necesaria para la replicación del alfavirus;

iv. una secuencia de poliadenilación, y

v. una segunda secuencia terminal invertida repetida (ITR) adenoviral.

De manera más específica, la presente invención se refiere a la construcción de un vector híbrido adenoviral, que comprende como elemento iv una cadena de ADNc derivada de un alfavirus, que es la secuencia de un replicón recombinante de SFV, bajo el control transcripcional de un promotor específico de tumor (elemento iii.), que es el promotor de alfa-fetoproteína (AFP). En esta construcción, un transgén puede ser insertado en el replicón de SFV, dirigido por el promotor subgenómico de SFV. Después de la infección de las células tumorales con este vector híbrido, el ARNm del replicón de SFV es transcrito a partir del promotor específico de tumor, y las proteínas no estructurales - nsPs - que constituyen el gen de la replicasa del SFV son traducidas a partir de dicho ARNm del replicón de SFV. Dichas proteínas nsPs - replicasa viral - inician la replicación del ARNm del replicón de SFV, para generar el ARN

subgenómico de SFV. Consecuentemente, el transgén puede ser expresado a un nivel elevado a partir del ARN subgenómico de SFV. Todo este proceso de replicación viral dará lugar a la producción de apoptosis en las células infectadas. En el caso de que este híbrido infecte células no tumorales, el ARNm del replicón de SFV no será transcrito a partir del promotor específico de tumor, el cual no será activo en estas células. Por lo tanto, no se producirá expresión del transgén, y no se producirá apoptosis en células normales infectadas por el vector híbrido.

Además, la presente invención se refiere a un método para obtener dicho vector híbrido adenoviral, que comprende ensamblar mediante técnicas de ingeniería genética los elementos i. a vi. del vector híbrido adenoviral definido anteriormente.

La presente invención se refiere también al uso de dicho vector híbrido para transferir material genético a una célula, y más particularmente para introducir y expresar genes extraños en células eucarióticas que puedan ser células diana para adenovirus.

De manera preferida la transferencia de material genético tiene como consecuencia la inducción de una respuesta inmune contra antígenos extraños en dicha célula.

La presente invención se refiere también a una composición farmacéutica que comprende dicho vector híbrido adenovirus-alfavirus y su uso en el tratamiento terapéutico del cáncer, que comprende administrar a un sujeto dicha composición farmacéutica.

La presente invención se refiere también a un método de tratamiento del cáncer mediante el uso del vector híbrido definido anteriormente, que comprende administrar a un sujeto dicho vector híbrido.

La presente invención se refiere a un vector híbrido adenoviral de expresión génica caracterizado porque comprende al menos los siguientes elementos orientados en dirección 5' a 3':

- i. una primera cadena de origen adenoviral que comprende una primera secuencia terminal invertida repetida (ITR) y una secuencia señal para el empaquetamiento del adenovirus;
- ii. una primera secuencia no codificante de relleno;
- iii. una secuencia correspondiente a un promotor específico de tejido;
- iv. una cadena de ADNc derivada de un alfavirus, cuya secuencia es parcialmente complementaria de un ARN alfaviral, que comprende al menos una secuencia que codifica un gen exógeno de interés en donde dicha cadena de ADNc comprende:
 - a. una secuencia 5' necesaria para la replicación del alfavirus,
 - b. una secuencia que codifica las proteínas no estructurales requeridas para la replicación del ARN alfaviral,
 - c. al menos un promotor subgenómico del alfavirus, y
 - d. una secuencia 3' necesaria para la replicación del alfavirus;
- v. una secuencia de poliadenilación; y
- vi. una segunda secuencia terminal invertida repetida (ITR) adenoviral.

La naturaleza del elemento i. en el vector híbrido alfavirus-adenovirus de la presente invención, es decir, la naturaleza de la cadena de origen adenoviral que comprende una primera secuencia terminal invertida repetida (ITR) y una secuencia señal para el empaquetamiento (ψ) del adenovirus, no es un aspecto crítico para la presente invención y puede proceder de cualquier serotipo de adenovirus. Dichos serotipos son bien conocidos en la técnica e incluyen por ejemplo Ad12 (subgénero A), Ad3 y Ad7 (subgénero B), Ad2 y Ad5 (subgénero C), Ad8 (subgénero D), Ad4 (subgénero E), Ad40 (subgénero F), y otros adenovirus no humanos conocidos que pueden proceder de especies como cerdo, ovejas, vacas y aves. Por lo tanto dicha primera secuencia terminal invertida repetida que puede contener aproximadamente entre 100 y 500 bp en longitud, puede variar según el serotipo de adenovirus utilizado. Del mismo modo, la secuencia señal para el empaquetamiento del adenovirus puede variar según el serotipo de adenovirus utilizado.

Según una realización particular preferida dicho vector adenoviral de expresión génica comprende un elemento i. que tiene la SEQ ID NO: 1, o cualquier otra secuencia con suficiente homología con SEQ ID NO: 1 para realizar la misma función.

La naturaleza del elemento ii. en el vector híbrido adenoviral de la presente invención no es un aspecto crítico de la misma. Dicho elemento ii., que tiene como función aumentar el tamaño total de la construcción, puede ser cualquier secuencia no codificante de relleno. Preferentemente dicha secuencia es una secuencia no codificante

humana. De manera más preferida aún dicha secuencia no codificante de relleno es la región intrón de la fosforribosiltransferasa de hipoxantina genómica humana (HPRT).

De manera preferente, el vector híbrido adenoviral definido comprende además un elemento vii. que es una segunda secuencia no codificante de relleno, localizada entre el elemento v. y el elemento vi. definidos anteriormente.

5 La naturaleza del elemento iii. en el vector híbrido adenoviral de la presente invención no es un aspecto crítico de la misma. De manera preferida el promotor específico de tejido iii. es un promotor específico de tumores. Como ejemplos se pueden citar como promotor específico de tumores, los promotores AFP, telomerasa TERT, PAP ("*pancreatic associated protein*"), E2F y HIF.

10 Según una realización particular preferida de la invención, el promotor específico de tumores tiene la secuencia SEQ ID NO: 7, que corresponde al promotor/potenciador AFP, (AFP p+e) o la secuencia SEQ ID NO: 15 correspondiente a telomerasa TERT, o cualquier otra secuencia con suficiente homología con la secuencia SEQ ID NO: 7 o con la secuencia SEQ ID NO: 15, para realizar la misma función, respectivamente.

15 La naturaleza del elemento iv. en el vector híbrido adenoviral de la presente invención no es un aspecto crítico de la misma. Preferentemente las secuencias alfavirales del elemento iv. se derivan del virus Semliki Forest (SFV). Sin embargo se podrían usar otras secuencias alfavirales derivadas de cualquiera de las especies pertenecientes a la familia *Togaviridae*, por ejemplo SIN, RRV y VEE.

Dicha cadena iv. de ADNc derivada de un alfavirus, cuya secuencia es parcialmente complementaria de un ARN alfaviral comprende preferentemente, (además de una secuencia que codifica al menos un gen exógeno de interés):

- a) una secuencia 5' necesaria para la replicación del alfavirus,
- 20 b) una secuencia codificante de las proteínas no estructurales necesarias para la replicación del ARN alfaviral,
- c) al menos un promotor subgenómico del alfavirus, y
- d) una secuencia 3' necesaria para la replicación del alfavirus;

25 De manera preferida el elemento iv. forma un replicón funcionalmente controlado por el promotor iii., y donde a su vez el promotor subgenómico alfaviral comprendido en iv.c) controla funcionalmente la expresión del gen exógeno de interés.

Según una realización particular especialmente preferida, las secuencias a) a c) del elemento iv. en su conjunto, tienen una secuencia seleccionada entre SEQ ID NO: 3 (SFV 5'-rep-Psg) o cualquier otra secuencia con suficiente homología con SEQ ID NO: 3 para realizar la misma función, y SEQ ID NO: 4 (SFV 5'-rep-Psg-enh) o cualquier otra secuencia con suficiente homología con SEQ ID NO: 4 para realizar la misma función.

30 Según una realización particular especialmente preferida, el elemento iv.d) tiene la secuencia SEQ ID NO: (SFV3'), o cualquier otra secuencia con suficiente homología con SEQ ID NO: para realizar la misma función.

35 En el elemento iv. del vector híbrido alfavirus-adenovirus de la presente invención, el gen exógeno de interés es preferentemente un gen terapéutico o un gen reportero, o una combinación de ambos. Sin que deba considerarse limitante, el gen terapéutico se selecciona preferentemente entre interleucina de mamífero - IL-12 -, el factor estimulante de colonias GM-CSF, interferón alfa y timidin-kinasa del virus herpes simple (tk).

El gen exógeno de interés en el elemento iv. puede ser además un gen reportero. Sin que deba considerarse limitante, el gen reportero puede ser uno seleccionado entre el LacZ, Luciferasa, tk y GFP.

De manera especialmente preferida el gen terapéutico es interleucina de mamífero IL-12, de forma más preferente aún el gen terapéutico es interleucina humana, hIL-12.

40 El vector híbrido adenoviral de expresión génica puede incluir en el elemento iv en serie uno o varios subconjuntos de (promotor subgenómico + gen exógeno de interés).

45 La naturaleza del elemento v. en el vector híbrido adenoviral de la presente invención no es un aspecto crítico de la misma. De manera preferida el elemento v. es una secuencia de poliadenilación de SV40. De manera especialmente preferida dicha secuencia de poliadenilación de SV40 es la secuencia SEQ ID NO: 6, o cualquier otra secuencia con suficiente homología con la secuencia SEQ ID NO: 6 para realizar la misma función.

La naturaleza del elemento vi. en el vector híbrido adenoviral de la presente invención, no es un aspecto crítico de la misma. Según una realización preferida dicho vector adenoviral de expresión génica comprende una secuencia terminal invertida repetida como elemento vi. que tiene la secuencia SEQ ID NO: 2, o cualquier otra secuencia con suficiente homología con SEQ ID NO: 2 para poder realizar la misma función.

La naturaleza del elemento vii. en el vector híbrido adenoviral de la presente invención no es un aspecto crítico de la misma. La segunda secuencia no codificante de relleno puede ser cualquiera. Preferentemente es una secuencia no codificante humana, y de manera especialmente preferida es una secuencia procedente del cósmido humano C346.

El vector híbrido adenoviral de expresión génica de la presente invención puede tener una longitud variable, y tiene preferentemente una longitud comprendida entre 27 y 38 kilobases.

Según una realización particular preferida el vector híbrido adenoviral comprende ITR 5', como primera secuencia terminal invertida repetida; HPRT, región intrón de la fosforribosiltransferasa de hipoxantina genómica humana como primera secuencia de relleno; AFP (p+e), promotor específico de tumores; una secuencia replicón de SFV que contiene mL-12, interleucina-12 de ratón; SV40 PoliA, secuencia de poliadenilación de SV40; C346, cósmido C346 genómico humano como segunda secuencia de relleno, y ITR 3' como segunda secuencia terminal invertida repetida.

Según una realización particular adicional preferida el vector híbrido adenoviral comprende ITR 5' como primera secuencia terminal invertida repetida; HPRT, región intrón de la fosforribosiltransferasa de hipoxantina genómica humana como primera secuencia de relleno; AFP (p+e), promotor específico de tumores; una secuencia replicón de SFV que contiene LacZ; SV40 PoliA, secuencia de poliadenilación de SV40; C346, cósmido C346 genómico humano como segunda secuencia de relleno, y ITR 3' como segunda secuencia terminal invertida repetida.

Según una realización adicional particularmente preferida el vector híbrido adenoviral comprende ITR 5' como primera secuencia terminal invertida repetida; HPRT, región intrón de la fosforribosiltransferasa de hipoxantina genómica humana como primera secuencia de relleno; AFP (p+e), promotor específico de tumores; una secuencia replicón de SFV que contiene hIL-12, interleucina-12 humana; SV40 PoliA, secuencia de poliadenilación de SV40; C346, cósmido C346 genómico humano como segunda secuencia de relleno, y ITR 3' como segunda secuencia terminal invertida repetida.

Según una realización particular preferida de la presente invención, el vector híbrido adenoviral de expresión génica tiene la secuencia SEQ ID NO: 8, o cualquier otra secuencia con suficiente homología con SEQ ID NO: 8 para realizar la misma función.

Según una realización particular adicional preferida de la presente invención, el vector híbrido adenoviral de expresión génica tiene la secuencia SEQ ID NO: 9, o cualquier otra secuencia con suficiente homología con SEQ ID NO: 9 para realizar la misma función.

Según una realización particular adicional preferida de la presente invención el vector híbrido adenoviral de expresión génica tiene la secuencia SEQ ID NO: 10, o cualquier otra secuencia con suficiente homología con SEQ ID NO: 10 para realizar la misma función.

Además la presente invención se refiere a un método para obtener dicho vector híbrido adenoviral, que comprende ensamblar mediante técnicas de ingeniería genética los elementos i. a vi., o i. a vii., del vector híbrido adenoviral definido anteriormente.

La presente invención se refiere también al uso de dicho vector híbrido para transferir material genético a una célula, y más particularmente para introducir y expresar genes extraños en células eucarióticas que puedan ser células diana para adenovirus. Dicho uso comprende administrar a un sujeto dicho vector híbrido.

La infección de células tumorales con un vector híbrido adenoviral según la invención, tiene como consecuencia que el ARNm del replicón del alfavirus SFV sea transcrito a partir del promotor específico de tumor, con lo que se traducirá el gen Rep y se amplificará el ARN de SFV. Rep también producirá un ARN subgenómico de SFV, a partir del cual será expresado el gen terapéutico o reportero en niveles elevados. El producto del gen terapéutico secretado por las células infectadas activará los inmunocitos en el sitio de infección. Además, la replicación de SFV inducirá apoptosis en las células infectadas, conduciendo a la liberación de antígenos de tumor por las células apoptóticas, que pueden ser tomados por células presentadoras de antígenos (APCs), activando de este modo la respuesta inmune contra el tumor. Sin embargo, si este vector híbrido infecta células no-tumorales, el ARNm del replicón SFV no será transcrito y por tanto no habrá expresión transgénica y no se producirá apoptosis.

De manera preferida las células tumorales se infectan con un vector híbrido adenoviral según la invención, de modo que el ARNm del replicón de SFV sea transcrito a partir del promotor específico de tumor AFP, con lo que se traducirá el gen Rep y se amplificará el ARN de SFV. Rep también producirá un ARN subgenómico de SFV, a partir del cual será expresado mL-12 o hIL-12 a niveles elevados. mL-12 o hIL-12 secretadas por células infectadas activarán los inmunocitos en el sitio de infección. Además, la replicación de SFV inducirá apoptosis en las células infectadas, conduciendo a la liberación de antígenos de tumor por las células apoptóticas, que pueden ser tomados por células presentadoras de antígenos, APCs, activando de este modo la respuesta inmune contra el tumor. Sin embargo, si este vector híbrido infecta células no tumorales, el ARNm del replicón de SFV no será transcrito y por tanto no habrá expresión transgénica y no se producirá apoptosis.

La presente invención tiene como objeto adicional el uso de un vector híbrido adenoviral definido anteriormente en un procedimiento para transferir material genético a una célula, preferentemente, una célula tumoral, y que comprende administrar a un sujeto dicho vector híbrido. De modo más preferido aún dicha célula es una célula tumoral

que expresa AFP.

Además, la presente invención también tiene como objeto el uso de un vector híbrido adenoviral definido para preparar un medicamento eficaz en el tratamiento de tumores, así como su uso para inducir una respuesta inmune contra antígenos extraños. Dicho uso comprende administrar a un sujeto dicho medicamento.

5 Además, la presente invención también tiene como objeto adicional una composición farmacéutica, que comprende al menos un vector híbrido adenoviral definido según la presente invención y el uso de la misma en un procedimiento para el tratamiento de tumores, o para inducir una respuesta inmune frente a antígenos extraños. De manera especialmente preferida dicha composición farmacéutica comprende un vector híbrido adenoviral según la presente invención, en el que el gen exógeno de interés es la interleucina de mamífero, IL-12, preferentemente interleucina humana hIL-12. Dicho uso comprende administrar a un sujeto la composición farmacéutica que comprende dicho vector híbrido.

La presente invención se refiere también a un método de tratamiento del cáncer mediante el uso del vector híbrido de acuerdo con la presente invención, comprendiendo dicho método la administración a un sujeto de dicho vector híbrido.

15 Por lo tanto según realizaciones preferidas de la presente invención, se ha elegido el AFP (p+e) como promotor específico de tumores, se han construido dos vectores híbridos adenovirales en los cuales el replicón SFV está controlado por el promotor AFP, y el gen reportero LacZ y el gen terapéutico IL-12 son insertados bajo el control del promotor subgenómico de SFV, respectivamente - Ad/AFP-SFV-LacZ y Ad/AFP-SFV-mIL-12 -, y como vectores control se han preparado dos vectores vacíos adenovirales que llevan LacZ y IL-12 de ratón directamente controlados por el promotor AFP - Ad/AFP-LacZ y Ad/AFP-mIL12-. Se ha mostrado que el vector híbrido de la presente invención funciona de manera más eficaz que los vectores control que se han venido utilizando hasta el momento.

20 De acuerdo con la presente invención se ha mostrado que el vector Ad/AFP-SFV-mIL-12 puede ser un vector útil en terapia de tumores HCC (hepatocarcinoma) que expresan AFP.

25 Se ha mostrado también que el uso de otros promotores de tumores como el promotor telomerasa - TERT - que es ampliamente activado en la mayor parte de los tumores malignos, para controlar SFV puede convertir el uso de un vector híbrido como el de la presente invención, en una estrategia general para el tratamiento de todo tipo de cáncer.

30 Además, de manera ventajosa, el vector híbrido de la presente invención funciona específicamente con células tumorales y mata células tumorales sin necesidad de incorporar un gen terapéutico. Y adicionalmente, se muestra que ventajosamente, el vector híbrido de la presente invención cuando incluye un gen terapéutico como IL-12 induce una potente actividad antitumoral.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

35 Figura 1. (A) muestra el diagrama de un vector híbrido según una realización de la invención, Ad-SFV, que contiene una secuencia de adenovirus vacío en la que se ha insertado un replicón SFV bajo el control del promotor/potenciador AFP (AFP (p+e), y que contiene el gen heterólogo mIL-12, el cual está colocado bajo el control del promotor subgenómico SFV (Pr sg). Figura 1 (B) muestra la actividad antitumoral del vector híbrido según la invención: después de infección de células tumorales de HCC con este vector híbrido (derecha), gracias a la presencia en el vector híbrido del replicón de SFV que comprende mIL-12, se producirá la expresión de mIL-12 a niveles elevados, lo cual activará los inmunocitos en el sitio de infección. Además, la replicación de SFV inducirá apoptosis en las células infectadas. Sin embargo, si este vector híbrido infecta células no tumorales, el ARNm del replicón SFV no será transcrito y por tanto no habrá expresión transgénica ni se producirá apoptosis. En esta figura:

- ITR, secuencias adenovirales terminales invertidas repetidas;
- ψ , señal de empaquetamiento adenoviral;
- HPRT y C346, secuencias de ADN de relleno procedentes de la región intrón de la fosforribosiltransferasa de hipoxantina genómica humana o del cósmido humano C346, respectivamente;
- 45 - PoliA, señal de poliadenilación (por ejemplo, de SV40);
- APCs, células presentadoras de antígeno.

50 La Figura 2 muestra la estructura de los vectores híbridos adenovirales vacíos y vectores adenovirales vacíos. AFP-SFV-lacZ y AFP-SFV-mIL-12 son vectores de adenovirus híbridos, en los que la secuencia del replicón de SFV está bajo control del promotor/potenciador AFP (AFP(p+e))y los genes heterólogos LacZ o mIL-12 han sido clonados bajo el control del promotor subgenómico de SFV (Pr sg), respectivamente. AFP-lacZ y AFP-mIL-12 son vectores adenovirales que contienen LacZ o mIL-12 dirigidos directamente por AFP (p+e). SFV nsp1-4, proteínas no estructurales de SFV.

La Figura 3 muestra La expresión específica de mL-12 *in vitro* en células de hepatocarcinoma que expresan AFP, HCC, (A), y no derivadas de HCC (B) después de la infección con los vectores híbridos de Ad-SFV: AFP-mL-12 (AFP-12), AFP-SFV-mL-12 (AFP-SFV-12) o con el vector control AdCMVmL-12 (CMV-12). Se ensayaron diferentes multiplicidades de infección "moi" (10, 100 y 1000). Hep3B, Huh-7, HepG2 y PLC/PRF/5: líneas de HCC; Hela, A549, MHC1, SK-Hep-1 y Clon 9: líneas no derivadas de HCC. En B solo se muestra la expresión correspondiente a moi 1000.

La Figura 4 muestra la expresión específica de β -gal en 4 líneas celulares de HCC (Hep3B, Huh-7, HepG2 y PLC/PRF/5) después de la infección *in vitro* con el vector híbrido AFP-SFV-lacZ o con el vector control AFP-LacZ a diferentes "moi" (10, 100, ó 1000).

La Figura 5 muestra el análisis de la expresión de β -gal en líneas celulares de HCC infectadas con AFP-LacZ y AFP-SFV-LacZ. Microfotografías de células infectadas con AFP-LacZ (A-C) o AFP-SFV-LacZ (D-F) y teñidas con X-Gal. A y D, Hep3B; B y E, Huh7; C y F, HepG2.

La Figura 6 muestra la cinética de la expresión de IL-12 en líneas celulares de HCC Hep3B (A) y Huh-7 (B), infectadas *in vitro* con vectores adenovirales AFP-mL-12 (AFP-12) o AFP-SFV-mL-12 (AFP-SFV-12), a una "moi" de 1000.

La Figura 7 muestra la inducción de muerte celular después de la infección de líneas celulares de HCC - Hep3B (A) y McA-RH7777 (B) - *in vitro* con los vectores AFP-IL-12 (AFP-12), AFP-SFV-IL-12 (AFP-SFV-12), AFP-LacZ, AFP-SFV-LacZ, o vector control Ad/CMVmL-12 (CMV-12). La supervivencia celular se muestra como el porcentaje de células vivas en pocillos infectados, comparado con las células vivas en pocillos control no infectados.

La Figura 8 muestra La expresión de SFV Rep en células HCC - Hep3B (A-D) y Huh-7 (E y F) - después de infección con vectores AFP-mL-12 (A y B) o AFP-SFV-mL-12 (C-F), a "moi" de 1000. Dos días después de la infección las células fueron fijadas y analizadas por inmunofluorescencia con un anticuerpo específico para Rep. Las células que expresan Rep fueron visualizadas en un microscopio de fluorescencia con un filtro FITC (A, C, y E) mientras que los núcleos teñidos con DAPI en todas las células fueron visualizados con un filtro UV (B, D, y F).

La Figura 9 muestra La transferencia génica con los vectores híbridos vacíos *in vivo*. (A-D), Eficiencia de la transferencia génica e inducción de apoptosis en tumores Huh-7. Tumores Huh-7 humanos establecidos en ratones inmunodeficientes "nude" fueron tratados por inyección intratumoral con los vectores de AFP-LacZ (n=4), o AFP-SFV-LacZ (n=4) a 1×10^{10} partículas virales/animal. Tres días después de la administración del virus los ratones fueron sacrificados y secciones del tumor fueron analizadas para estudiar la expresión del transgén por tinción con X-Gal (A-B) o para estudiar la inducción de apoptosis mediante TUNEL (C-D). A, C; Microfotografías de tumores que recibieron AFP-LacZ. B, D; Microfotografías de tumores que recibieron AFP-SFV-LacZ. (E-G), Especificidad de la expresión génica con los vectores híbridos vacíos. Ratones Balb/c sanos fueron inyectados por vía intravenosa con 1×10^{10} partículas virales de los vectores AFP-LacZ (E), AFP-SFV-LacZ (F) o Ad/CMV-LacZ (G). Se muestran micrografías de cortes de tejido hepático tomados tres días tras la inoculación y teñidos con X-Gal.

La Figura 10 muestra el tratamiento de tumores de HCC con vectores híbridos. Tumores HCC ortotópicos fueron establecidos mediante implantación de células McH-RH7777 en el hígado de rata. Cuando el tumor alcanzó un tamaño de 7-10 mm de diámetro, los animales fueron tratados con 10^{11} (A-C) o con 2×10^{11} (D-G) partículas virales de AFP-mL-12, AFP-SFV-mL-12, o solución salina como control. El tamaño del tumor fue medido a los días 15 y 30 después de la administración de solución salina (A y E), AFP-mL-12 (B y F) o AFP-SFV-mL-12 (C y G). G; Índice de supervivencia de animales.

La Figura 11 muestra el estudio de toxicidad en ratas inoculadas con vectores que expresan IL-12. Se determinó el nivel de las transaminasas (GPT, GOLT, y GGTL) (A) o de IL-12 (B) en el suero de ratas que portaban tumores HCC en hígado y que habían sido inoculadas intratumoralmente con los vectores de adenovirus AFP-SFV-IL-12, AFP-SFV-mL-12, de alfavirus SFV-IL-12 o con suero salino. La medición se hizo a los 4 y 8 días tras el tratamiento.

La Figura 12 muestra la tinción con hematoxilina/eosina de secciones hepáticas de ratas tratadas con los vectores híbridos adenovirales. Se trataron ratas portadoras de tumores de HCC mediante inyección intratumoral con suero salino (A), con los vectores adenovirales de AFP-IL-12 (B), o AFP-SFV-IL-12 (C), o con partículas virales de SFV-IL-12 (D). A los tres días tras el tratamiento se sacrificaron los animales, se extrajeron los hígados, se fijaron con formol y se obtuvieron secciones que se tiñeron con hematoxilina/eosina. Las flechas negras indican zonas con hepatocitos eosinófilos.

Las Figuras 13A y 13B muestran los mapas de restricción de los plásmidos pGL3/AFP y pBS/mL-12 respectivamente.

Las Figuras 14A y 14B muestran los mapas de restricción de los plásmidos pTGC3001 y pTGC3011 respectivamente.

Las Figuras 15A y 15B muestran los mapas de restricción de los plásmidos pTGC3012 y pTGC3013 respectivamente.

La Figura 16 muestra el mapa de restricción del plásmido pTGC3014.

MODOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

Plásmidos

pGEM-T "easy" y pCMVb fueron adquiridos de Promega, U.S.A y pBS-SK+ de Stratagene, U.S.A. pSTK120 fue donado por el Dr. Kochanek (Universidad de Ulm, Alemania). pBK-SFV-1 y pBK-SFV-3 han sido descritos en Berglund P. et al. "Enhancing immune responses using suicidal DNA vaccines". *Nature Biotechnology* 1998, 16:562-565. pGL3/AFP y pBS/mIL-12 (Yonglian Sun, Cheng Qian, Dacheng Peng and Jesús Prieto. 2000. Gene transfer to liver cancer cells of B7-1 in addition to IL-12 changes immunoeffecter mechanisms and suppress Th1 cytokine production induced by IL-12 alone. *Human Gene Therapy* 11:127-138) fueron producidos en nuestro laboratorio.

Para la construcción de pGL3/AFP, las regiones del promotor/potenciador de AFP (p+e) se obtuvieron mediante amplificación por PCR de ADN genómico humano. Los iniciadores ("primers") utilizados para la amplificación del promotor de AFP (AFP pro) fueron CTCTAGATTTTCTGCCCAAAGAGCTC y CGGGATCCTGTTATTGGCAGTGGTGGAA. Los iniciadores utilizados para la amplificación del potenciador de AFP (AFP "enhancer") fueron CGGAATTCGCCTGTCATACAGCTAATAA y CTCTAGACTGTCAAATAAGTGG CCTGG. Las secuencias del promotor (217 pares de bases) y del potenciador (785 pares de bases) se clonaron en plásmidos pGEM-T. Posteriormente se realizó una confirmación de los fragmentos amplificados mediante secuenciación. El promotor AFP se retiró del plásmido pGEM-T/AFP-p mediante restricción con *Xba I/BamHI* y se empalmó con extremos romos en un plásmido pGL3-basic digerido con *Sma I*. De este modo se obtuvo un plásmido pGL3/AFP-p. El potenciador de AFP se retiró del plásmido pGEM-T/AFP-e mediante restricción con *Xba I/Eco RI* y se empalmó con extremos romos en el plásmido pGL3/AFP-p digerido con *Nhe I*, para obtener finalmente el plásmido pGL3/AFP.

Líneas celulares y cultivos de tejidos

Las líneas celulares de HCC humanos Hep3B, PLC/PRF/5, HepG2 y SK-Hep-1, la línea celular Hela de adenocarcinoma epitelial cervical humano, la línea celular A549 de carcinoma de pulmón humano, la línea celular 293 de riñón de embrión humano, las líneas celulares de HCC de rata McA-RH7777, MHC1, y el Clon 9 de hepatocito normal de rata y la línea celular de HCC de ratón Hepa1-6, fueron obtenidas de la ATCC. Las células 293 que expresan Cre recombinasa (293Cre4) fueron obtenidas de Merck Research Laboratories. Las células Hep3B, PLC/PRF/5, Hela, SK-Hep-1, Clon 9, Huh-7 y Hepa1-6 fueron crecidas en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% inactivado por calentamiento y penicilina/estreptomocina. Las células HepG2 y A549 fueron crecidas en medio RPMI 1640 suplementado con FBS al 10% inactivado por calentamiento y penicilina/estreptomocina. Las células McH-RH7777 y MHC1 fueron crecidas en medio DMEM suplementado con suero de caballo al 20% y FBS al 5% FBS. Las células 293Cre4 fueron crecidas en medio DMEM suplementado con FBS al 10% y 0.4 mg/ml de G418.

Animales

Ratones hembras BALB/c inmunodeficientes "nude" de siete semanas de edad fueron adquiridos a Charles Rivers Laboratories (Barcelona, Spain). Ratas Buffalo macho de 4-6 semanas fueron obtenidas de CIFA (Instalación de Animales de la Universidad de Navarra). Ratones y ratas se mantuvieron en condiciones habituales en CIFA. Los ratones "nude" fueron alimentados con dieta irradiada y agua tratada en autoclave. La manipulación de los ratones "nude" se realizó siempre bajo en campana de flujo laminar. Todos los procedimientos con animales fueron realizados de acuerdo con protocolos y recomendaciones estandar para el cuidado y uso de animales de laboratorio.

Construcción de vectores

Construcción de casetes de expresión AFP-SFV

La secuencia 5' terminal de SFV (1-292 nt) fue amplificada por PCR usando el plásmido pBK-SFV-1 (que contiene la secuencia completa del replicón de SFV) como molde. El cebador 1 contenía un sitio de restricción Spe I en el extremo 5' terminal (subrayado) seguido de 50 nt de la secuencia del promotor de AFP y los primeros 20 nt de la secuencia de SFV (en cursiva) 5'-ACT AGT TAA CAG GCA TTG CCT GAA AAG AGT ATA AAA GAA TTTCAG CAT GAT TTT CCA TGG CGG ATG TGT GAC ATA C-3'. El cebador 2 contenía un sitio de restricción Xho I (subrayado) seguido de 19 nt de la secuencia de SFV (en cursiva): 5'-CTC GAG GAT ATC CAA GAT GAG TGT GT-3'. Se generó un fragmento de DNA de 342bp mediante PCR y se clonó directamente en el plásmido pGEM-T-easy, originando pGEM-Te-SFV-1. La ausencia de errores de PCR en este plásmido se confirmó mediante secuenciación. El fragmento de 342 bp se extrajo de pGEM-Te-SFV-1 por digestión con Spe I y Xho I, y fue clonado en pGL3/AFP digerido con las mismas enzimas para dar pGL3/AFP-SFV-1, el cual posee el promotor (217bp) y el potenciador (785bp) de AFP completos seguidos de la secuencia 5' terminal de SFV (SFV-1, que comprende 292bp). Se obtuvo un casete AFP-SFV-1 (1342bp) a partir de pGL3/AFP-SFV-1 mediante digestión con Mlu I/ Xho I, se trató con Klenow y se clonó en pBS-SK+ digerido con EcoR V, generando pBS/AFP-SFV1. El polyA tardío de SV40 (262bp) fue extraído de pGL3/AFP mediante digestión con Xba I/BamH I, romizado con Klenow e insertado en el sitio Sal I de pBS/AFP-SFV1, romizado también con Klenow, dando lugar a pBS/AFP-SFV-1-pA. Se insertó un "polylinker" que contenía los sitios únicos Apa I y Nru I, entre los sitios Bam HI y Xma I, en pBS/AFP-SFV-1-pA. La secuencia 3' terminal de SFV que comprende 7985bp fue extraída mediante

digestión con Spe I/Eco RV de pBK-SFV-1, se romizó con Klenow y se insertó en la posición EcoR V de pBS/AFP-SFV-1-pA, dando lugar a pBS/AFP-SFV-pA.

El gen reportero LacZ se obtuvo a partir de pCMVb mediante digestión con Not I, se trató con Klenow y se insertó en el sitio BamH I de pBS/AFP-SFV-pA tratado con klenow para formar pBS/AFP-SFV-lacZ-pA. Se separó de pBS/mL-12 un casete mL-12, que contenía los genes que codifican para las subunidades p35 y p40 unidas por un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES), mediante digestión con Spe I/Xho I, se trató con Klenow y se insertó en la posición BamHI de pBS/AFP-SFV-pA, también tratada previamente con Klenow, generándose el plásmido pBS/AFP-SFV-mIL-12-pA.

Construcción de vectores híbridos vacíos adenovirales

Cuatro vectores adenovirales vacíos han sido construidos, como se muestra en la Figura 2. AFP-SFV-LacZ y AFP-SFV-mIL-12 contienen una secuencia del replicón recombinante SFV, dirigida por el promotor y potenciador AFP. En estos vectores el gen reportero LacZ o el gen terapéutico mL-12 fueron clonados bajo el control del promotor subgenómico de SFV, respectivamente. AFP-lacZ y AFP-mIL-12 también son vectores de adenovirus vacíos, que contienen genes LacZ y mL-12, dirigidos directamente por el promotor/potenciador AFP, respectivamente. A continuación se describe el proceso seguido para la construcción de estos vectores. Con objeto de generar un vector de adenovirus con suficiente espacio de clonaje para albergar el casete de expresión de AFP-SFV-IL-12 se procedió a modificar el plásmido pSTK120 que contiene la secuencia de un adenovirus vacío. Para ello se eliminó un fragmento de 9 kb del plásmido pSTK120 mediante digestión con Apa I. Además en este nuevo plásmido se insertó un "polylinker" que contenía los sitios Asc I y Sbf I dando lugar a pTGC3001. Éste plásmido contiene la ITR izquierda, la señal de empaquetamiento, ADN de relleno procedente de HPRT y C346, y la ITR derecha. El casete AFP-SFV-LacZ se separó mediante digestión con Apa I de pBS/AFP-SFV-lacZ-pA y se insertó en el sitio Apa I de pTGC3001, dando lugar a pTGC3011. De manera similar, el casete AFP-SFV-mIL-12 fue liberado de pBS/AFP-SFV-mIL-12-pA por digestión con BssH II, tratado con Klenow e insertado en el sitio Asc I de pTGC3001, también tratado con Klenow para generar pTGC3012.

Construcción de vectores control

Construcción del vector adenoviral vacío AFP-LacZ

La secuencia del potenciador/promotor de AFP (AFPp+e) se separó de pGL3/AFP por digestión con Mlu I/Xho I, se trató con Klenow y se insertó en pCMVb, el cual había sido previamente digerido por EcoRI /Xho I y tratado con Klenow. De este modo el promotor temprano inmediato de CMV fue eliminado de pCMVb y sustituido por AFP (p+e) generándose pAFPb. A continuación se extrajo el casete AFP-LacZ (5077 bp) de pAFPb mediante digestión con Xba I/Nar I se trató con Klenow y se insertó en el sitio Swa I de pSTK120, también romizado con Klenow, dando lugar a pTGC3013.

Construcción del vector adenoviral vacío AFP-mIL-12

El casete mL-12 se extrajo de pBS/mL-12 mediante digestión por Xho I/Spe I, y se insertó en pGL3/AFP previamente digerido con Xho I/Xba I, lo cual eliminó el gen luciferasa de este último plásmido y dio lugar a pAFP-mIL-12. El casete AFP-mIL-12 (3760 bp) fue extraído a partir de pAFP-mIL-12 mediante digestión con BamH I/Sca I, tratado con Klenow e insertado en pSTK120 digerido por Swa I, y tratado también con Klenow para generar pTGC3014.

Recuperación de los vectores adenovirales vacíos

Después de la digestión con *Pme* I, extracción con fenol/cloroformo, y precipitación con etanol, se transfectaron 2 µg de ADN de pTGC3011, pTGC3012, pTGC3013, o pTGC3014 en células 293Cre4, respectivamente. Tras la transfección, las células fueron infectadas con el virus "ayudante" AdLC8cluc. A continuación se llevaron a cabo los pasos de amplificación y preparación a gran escala, como se ha descrito previamente (Philip Ng., Robin J. Parks, and Frank L. Graham. Preparation of helper-dependent adenoviral vectors. *Methods in Molecular Medicine*, Vol. 69, *Gene Therapy Protocols*, 2nd. Ed. 69, 371-88, 2002; H. Zhou, L. Pastore, A. L. Beaudet. Helper-dependent adenoviral vectors. *Methods in Enzymology*, vol, 346, 177-198, 2002; Hillgenberg M., et al. System for efficient helper-dependent minimal adenovirus constructions and rescue. *Hum Gene Ther.*, 12; 643-657, 2001). Todas las preparaciones de vectores fueron purificadas dos veces por centrifugación en gradiente de CsCl. Los vectores de ADN purificados se analizaron mediante digestión con enzimas de restricción, y no mostraron reordenamientos de secuencias. El título del adenovirus vacío y la contaminación por el virus "ayudante" se evaluaron mediante PCR cuantitativa. La proporción de las partículas virales totales frente a las unidades infecciosas (iu) fue 20:1. La contaminación por partículas de virus "ayudante" fue aproximadamente del 0.5-1%.

PCR cuantitativa

Para determinar el grado de contaminación por el virus "ayudante" se diseñaron una sonda y cebadores para PCR cuantitativa de la región Ad5 E4, mediante el programa TaqMan (TaqMan Probe #2) y fueron sintetizados por Sigma-Genosys Ltd (cebador) y Applied Biosystems (sonda). Para determinar el título de los adenovirus vacíos, se diseñaron sondas y cebadores para PCR cuantitativa de secuencias de LacZ y IL-12 de ratón, mediante el programa

TaqMan program (TaqMan Probe #2), y fueron sintetizados por Sigma-Genosys Ltd (cebador) y Applied Biosystems (sonda). Para determinar la contaminación por Ad de tipo silvestre, se diseñaron sondas y cebadores para PCR cuantitativa de la región E1 de Ad5 mediante el programa TaqMan program (TaqMan Probe #2), y fueron sintetizados por Sigma-Genosys Ltd (cebador) y Applied Biosystems (sonda).

5 Experimentos "in vitro"

Expresión transgénica en células infectadas con vectores adenovirales vacíos

Las líneas celulares derivadas de HCC (Hep3B, Huh7, HepG2 y PLC/PRF/5) y las líneas celulares no derivadas de HCC (A549, Hela, MHC1, y Clon 9) o derivadas de HCC pero que no expresan AFP (SK-Hep-1) fueron infectadas con cada uno de los 4 vectores adenovirales vacíos (AFP-LacZ, AFP-SFV-LacZ, AFP-mIL-12, o AFP-SFV-mIL-12) a "moi" 1000, 100, ó 10 (partícula/célula), respectivamente. Tres adenovirus de primera generación (Ad/CMV-mIL-12, Ad/CMV-LacZ, Ad/AFP-LacZ) fueron usados como control. Se recogieron en pocillos por duplicado los sobrenadantes de las células infectadas con los vectores mIL-12, y los lisados de las células infectadas con vectores LacZ, para la determinación de mIL-12 y β -galactosidasa (β -gal), respectivamente. Las células infectadas con vectores LacZ fueron también teñidas con X-gal. El nivel de mIL-12 (p70) fue medido con un kit ELISA (Pharmingen, San Diego, CA). El nivel de β -gal fue medido con un kit ELISA (Roche,). La cinética de expresión de IL-12 fue evaluada en células de HCC (Hep3B y Huh7) después de la infección con AFP-mIL-12, AFP-SFV-mIL-12, o con el vector control Ad/CMV-mIL-12 a "moi" de 1000. Los sobrenadantes se recogieron diariamente hasta los 5 días postinfección.

Análisis de la especificidad de la expresión transgénica usando vectores híbridos Ad-SFV in vitro

Para examinar la especificidad de la expresión transgénica con los vectores recombinantes descritos anteriormente, se infectaron 4 líneas celulares de HCC humanas (Hep3B, HepG2, Huh-7 y PLC/PRF/5) y 5 líneas celulares humanas no derivadas de HCC (Hela, A549, , MHC1, y Clon 9) o derivadas de HCC que no expresaban AFP (SK-Hep-1) con AFP-mIL-12, AFP-SFV-mIL-12 o Ad-CMVmIL-12 como control positivo, a diferentes "mois" (10, 100, ó 1000). Después de dos días de la infección, el sobrenadante fue recogido y se determinó la cantidad de mIL-12 en el mismo. Los resultados se muestran en la Figura 3 (A) y (B). No se observó expresión de mIL-12 en las células HCC humanas cuando se infectaron con AFP-mIL-12 a "moi" 10 ó 100, y sólo a "moi" 1000 se pudo observar un nivel muy bajo de mIL-12 en algunas líneas celulares (Figura 3A). En contraste, la infección de estas células con AFP-SFV-mIL-12 a "mois" 10, 100, ó 1000 dio como resultado la expresión de mIL-12 en un modo dependiente de la dosis (Figura 3A). El nivel de expresión de mIL-12 en células infectadas con "moi" 10 de AFP-SFV-mIL-12, fue comparable al nivel obtenido en células infectadas con AFP-mIL-12 a moi 1000. Además, el nivel de mIL-12 en células de HCC infectadas con AFP-SFV-mIL-12 a diferentes "mois" fue comparable al obtenido con el vector control AdCMVmIL-12. Sin embargo, la infección de células que no expresan AFP con AFP-mIL-12 o AFP-SFV-mIL-12, no produjo niveles detectables de mIL-12, incluso cuando se usó la "moi" más elevada (1000) (Figura 3B). En estas células, sólo el vector control Ad-CMV-mil-12 fue capaz de producir un alto nivel de expresión de mIL-12.

Por otro lado, se infectaron 4 líneas celulares de HCC (Hep3B, Huh-7, HepG2 y PLC/PRF/5) con vectores híbridos de LacZ - AFP-lacZ, o AFP-SFV-lacZ - a diferentes "mois" (10, 100, ó 1000), y se determinó la expresión específica de β -gal. Datos similares se observaron también en este caso, cuyos resultados se muestran en la Figura 4.

En la Figura 5 se muestran microfotografías de células de HCC infectadas con los vectores vacíos adenovirales de AFP-lacZ y AFP-SFV-lacZ, seguidas de tinción con X-gal. La infección de células de HCC con AFP-lacZ dio como resultado un bajo nivel de expresión en las células infectadas, las cuales mostraron una tinción débil. En contraste, la infección de células HCC con AFP-SFV-lacZ produjo un alto nivel de expresión de β -gal que se tradujo en una fuerte tinción con X-gal. Este dato indica que un vector híbrido Ad-SFV que lleva un replicón SFV bajo el control del promotor AFP, puede dar lugar en alto grado a una fuerte expresión transgénica en células tumorales que expresan AFP.

Cinética de la expresión de mIL-12 en células de HCC in vitro

Para estudiar la producción de mIL-12 a diferentes tiempos tras la infección con los vectores híbridos de Ad-SFV, 2 líneas celulares de HCC (Hep3B y Huh-7) fueron infectadas con AFP-mIL-12 o con AFP-SFV-mIL-12, y los sobrenadantes fueron recogidos diariamente hasta 5 días después de la infección. La Figura 6 muestra los resultados obtenidos para la expresión transgénica tras la infección de las células mencionadas. Dichos resultados muestran que hay un aumento constante de la expresión de mIL-12 del día 1 al día 4 post-infección en células infectadas con AFP-SFV-mIL-12 (Figura 6). Sin embargo en el día 5 después de la infección el nivel de mIL-12 se redujo ligeramente. En las células infectadas con AFP-mIL-12, los niveles de expresión fueron muy bajos y sólo se observó un ligero aumento de la producción de mIL-12 a lo largo del tiempo.

Ensayo de citotoxicidad - ensayo de proliferación celular mediante incorporación de MTT.

Células de HCC (Hep3B, Huh7, MCH-RH7777, Hep1-6) fueron infectadas con AFP-LacZ, AFP-SFV-LacZ, AFP-mIL-12, AFP-SFV-mIL-12, o Ad/CMV-mIL-12 a "moi" 1000. Cinco días después de la infección, se determinó la supervivencia celular mediante un ensayo de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazolil)-2,5-difeniltetrazolio) Mosmann, T. (1983) *J. Immunol. Meth.* 65, 55-63; Tada, H. et al. (1986) *J. Immunol. Meth.* 93, 157-65. Brevemente, las células se

lavaron una vez con PBS, y se añadieron por cada pocillo 200 μ l de solución de colorante MTT recién preparada (en bandejas de 48-pocillos). Las células fueron crecidas adicionalmente durante 3-4 horas, seguido de la adición de 500 μ l de tampón de solubilización. Se tomaron 100 μ l de cada muestra para la medida en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm.

5 *Inducción de muerte celular después de infección de células HCC con vectores híbridos Ad-SFV in vitro*

10 Se ha descrito que la replicación de vectores SFV induce la muerte celular mediada por apoptosis en la mayoría de las células de origen vertebrado. Para analizar si también es este el caso de células HCC infectadas con vectores híbridos de Ad-SFV, se infectaron células Hep3B y Huh-7 con estos vectores y se determinó la supervivencia celular en el día 5 después de la infección. Como se muestra en la Figura 7, la supervivencia a este tiempo postinfección fue menor del 20% en células infectadas con AFP-SFV-mIL-12, o con AFP-SFV-lacZ. Sin embargo, la infección de las mismas células con AFP-mIL-12, o AFP-lacZ, o con el vector control AdCMV-mIL-12, no afectó a la supervivencia de las células. Estos resultados indican que hay replicación de SFV en células infectadas con vectores AFP-SFV.

Detección de SFV Rep mediante inmunofluorescencia

15 Células de HCC (Hep3B, Huh7, MCH-RH7777) fueron sembradas sobre cubreobjetos de vidrio, en bandejas de 6- pocillos (1x10⁵ células/pocillo), e infectadas con AFP-mIL-12, AFP-SFV-mIL-12, o Ad/CMV-mIL-12 a "moi" 1000. Dos días después de la infección las placas fueron lavadas dos veces con PBS, y las células fueron fijadas con metanol a -20°C durante 6 min. Las placas se lavaron de nuevo 3 veces con PBS y se incubaron a temperatura ambiente (RT) durante 30 min con PBS que contenía 0.5% gelatina y 0.25% BSA para bloquear las uniones no específicas. A continuación el tampón bloqueante fue reemplazado por el anticuerpo primario (MAb anti-replicasa) diluido 1:10 en tampón bloqueante, y fue incubado a RT durante 30 min. Las células fueron lavadas de nuevo 3 veces con PBS-0.25% BSA, e incubadas durante 30 minutos a RT con el anticuerpo secundario (suero de conejo antiratón conjugado con FITC, Sigma) diluido 1:250 en tampón bloqueante. Finalmente, las células fueron lavadas 3 veces con PBS-0.25%BSA, una vez con agua, y dispuestas sobre portaobjetos de vidrio usando medio de montaje Vecta-Shield con Dapi para teñir los núcleos celulares.

25 *Expresión de SFV Rep en células de HCC infectadas con vectores híbridos Ad-SFV in vitro*

La expresión de SFV Rep fue examinada en células de HCC infectadas con vectores híbridos Ad-SFV mediante inmunofluorescencia con un anticuerpo monoclonal específico para esta proteína. La Figura 8 muestra que las células HCC infectadas con AFP-SFV-mIL-12 o AFP-SFV-lacZ mostraron una fuerte tinción citoplásmica para Rep. Las células infectadas con AFP-mIL-12 o AFP-lacZ no mostraron ninguna tinción.

30 *Experimentos in vivo*

Inducción de xeno-injertos de HCC y estudio de la eficacia y especificidad de la transferencia génica in vivo.

35 Células Huh7 fueron recogidas y lavadas dos veces con un medio exento de suero. 2 x 10⁶ células fueron resuspendidas en 100 μ l de suero salino e inyectadas subcutáneamente (s.c.) en el flanco derecho de ratones inmunodeficientes Balb/c ("nude"). Cuatro semanas después de la inoculación de las células, y cuando los nódulos tumorales alcanzaron 6-8 mm de diámetro, se inyectaron intratumoralmente 1x10¹⁰ partículas virales de AFP-LacZ (n=4) o de AFP-SFV-LacZ (n=4) diluidos en 80 μ l de suero salino. Los animales control (n=3) fueron inyectados intratumoralmente con 80 μ l de suero salino. Los ratones fueron sacrificados a día 3 ó 6 después de la inoculación. En ese momento se extrajeron los tumores y el hígado de cada animal, se sumergieron en O.C.T. (Sakura, Holand), y se congelaron a -80°C. Los tejidos congelados fueron cortados y colocados en portaobjetos de vidrio para ser teñidos con X-gal o analizados por TUNEL. Para estudiar la especificidad de la infección con el vector híbrido in vivo se inyectaron por vía intravenosa ratones Balb/c normales con AFP-LacZ (n=4), AFP-SFV-LacZ (n=4) o Ad/CMV-LacZ a razón de 10¹⁰ partículas virales/ratón. Al tercer día tras la inoculación se sacrificaron los animales y se recogieron los órganos principales para analizar la expresión de LacZ mediante tinción con X-gal.

45 *Eficacia de la transferencia génica de los vectores híbridos Ad-SFV en xeno-injertos HCC humanos en ratones inmunodeficientes "nude".*

50 Para estudiar la eficacia de la transducción de vectores híbridos vacíos in vivo, se usó un modelo de HCC humano basado en células Huh7 que pueden expresar AFP. Las células Huh7 fueron inoculadas subcutáneamente en ratones inmunodeficientes "nude" Balb/c, y tras la generación de nódulos tumorales a los 30 días, los animales fueron inyectados intratumoralmente con 1x10¹⁰ partículas virales de AFP-SFV-LacZ o AFP-LacZ como control. Los ratones fueron sacrificados 3 ó 6 días después de la inyección del virus, y tanto el tumor como el hígado se recogieron y se analizaron por tinción con X-gal. Como se muestra en la Figura 9A, hay una débil expresión transgénica en secciones de tumores de animales que han recibido AFP-lacZ. En contraste, hay una fuerte expresión de LacZ en secciones de tumores de animales que habían recibido AFP-SFV-LacZ (Figura 9B). No se observó expresión transgénica en secciones de hígado de animales que recibieron o bien AFP-lacZ o AFP-SFV-lacZ, indicando que los vectores probablemente quedaron confinados en el sitio de inoculación (datos no mostrados). Con objeto de estudiar si los vectores híbridos Ad-SFV inducen apoptosis en las células tumorales infectadas se analizaron secciones de los tumores tratados mediante la técnica de TUNEL. No se observó apoptosis en las muestras procedentes de ratones inoculados

con AFP-LacZ (Figura 9C). Sin embargo se observó una abundante cantidad de células apoptóticas en los tumores de los animales que habían recibido AFP-SFV-LacZ (Figura 9D). Estos datos indican que los vectores híbridos de Ad-SFV no sólo inducen expresión génica de forma específica en tumores sino que además inducen muerte celular selectiva por apoptosis en estas mismas células.

5 *Especificidad de los vectores híbridos Ad-SFV in vivo.*

10 Para demostrar la especificidad de los vectores híbridos, se administraron 10^{10} partículas virales de AFP-LacZ, AFP-SFV-LacZ o del vector control Ad/CMV-LacZ por vía intravenosa en ratones Balb/c. Tres días tras la administración de los vectores se analizó la expresión de β -galactosidasa en hígado. Como se muestra en la Figura 9 (E-F) ni AFP-LacZ ni AFP-SFV-LacZ fueron capaces de inducir expresión detectable del transgén en el hígado. Sin embargo en aquellos animales que recibieron Ad/CMV-LacZ se observó una alta proporción de células positivas para β -galactosidasa en secciones del tejido hepático (Figura 9G). Estos datos confirman que la expresión mediada por los vectores híbridos es específica de células del tumor.

Inducción de HCC ortotópico y terapia génica in vivo.

15 5×10^5 células McA-RH7777 fueron inoculadas en el lóbulo izquierdo del hígado de ratas Buffalo. 10 días después de la inoculación de las células tumorales se observó la aparición de un único nódulo de tumor de 7-10 mm de diámetro en cada animal. Los tumores fueron tratados con 10^{11} ó 2×10^{11} partículas virales de AFP-mIL-12, AFP-SFV-mIL-12, o con suero salino como control. Dos y 4 semanas después del tratamiento, los animales fueron anestesiados y sometidos a laparotomía para observar la evolución del tumor. Asimismo se analizó la supervivencia de los animales. El tamaño de los tumores se determinó mediante la medida de la longitud y anchura de cada nódulo y aplicando la fórmula: Volumen de tumor = (longitud en mm) X (anchura en mm)² X 0.5236 (Janik et al., 1975).

Eficacia del tratamiento en HCC ortotópico en ratas Buffalo

25 Para investigar la eficacia antitumoral del vector híbrido de Ad-SFV que lleva interleucina-12, tumores de HCCs ortotópicos fueron establecidos en ratas mediante la implantación de células McH-RH7777 de rata en el hígado. Este modelo fue elegido porque se ha demostrado que las células McH-RH7777 expresan AFP. En un primer experimento los animales fueron tratados con una única inyección intratumoral de 1×10^{11} partículas virales de AFP-mIL-12, AFP-SFV-mIL-12, o con suero salino como control (Figura 10A-C). Los animales que recibieron AFP-mIL-12 mostraron un tamaño de tumor reducido comparado con los animales control, que sufrieron un aumento constante del tamaño del tumor a lo largo del experimento (Figura 10A-B). Sin embargo, el tratamiento con AFP-SFV-mIL-12 dio como resultado una regresión completa del tumor en 1 de 4 ratas tratadas, estabilización de la enfermedad en 2, y ausencia de respuesta en 1 animal (Figura 10C). Con objeto de comprobar si dosis mayores del vector híbrido podían aumentar el efecto antitumoral se ha realizado un segundo experimento en el que los animales han sido tratados intratumoralmente con una dosis de 2×10^{11} partículas virales de AFP-mIL-12, AFP-SFV-mIL-12, o con suero salino como control (Figura 10 D-G). Al igual que en el experimento anterior los animales que recibieron el vector AFP/IL-12 experimentaron una ligera respuesta antitumoral que se tradujo en una única remisión completa, 4 animales con tumores con crecimiento más lento que los controles y 7 animales en los que no hubo respuesta, de un total de 12 animales tratados (Figura 10E). Sin embargo, el tratamiento con el vector AFP/SFV-IL-12 tuvo un efecto mucho más potente, induciéndose regresión tumoral completa en 4 animales (33%), regresión tumoral parcial en 6 animales (50%), retraso en el crecimiento tumoral en 2 animales (16%) y ausencia total de respuesta en otros 2 animales (16%) de un total de 12 animales tratados (Figura 10F). En este segundo estudio el vector AFP/SFV-IL-12 permitió la supervivencia del 50% de los animales tratados, frente a un 0% de supervivencia en los animales tratados con AFP-IL-12o con suero salino (Figura 10G).

Estudio de toxicidad in vivo: determinación de niveles de transaminasas e IL-12 en suero, y estudios histológicos en hígado

45 Se tomaron muestras de sangre de las ratas tratadas intratumoralmente con los vectores adenovirales AFP-SFV-IL-12 o AFP-IL-12 a dosis de 2×10^{11} , o con suero salino, a los 4 y 8 días postinoculación. También se incluyeron en este estudio ratas inoculadas con 10^8 partículas del alfavirus SFV-IL-12. Se separó el suero de la sangre mediante centrifugación a 2000 rpm durante 15 minutos. La determinación de los niveles de transaminasas se hizo mediante un analizador automático Hitachi 911 Automatic Analyzer (Boehringer Mannheim, Alemania). Los niveles de IL-12 se determinaron mediante ELISA. El estudio histológico se realizó mediante la extracción del hígado en los animales inoculados tres días tras el tratamiento. Se fijó el órgano en formol, se procesó incluyéndolo en parafina y se realizaron cortes de 6 micras con un microtomo. Estos cortes se tiñeron con hematoxilina/eosina.

Estudio de la toxicidad de los vectores híbridos de Ad-SFV en rata

55 Para evaluar la toxicidad asociada con la administración del vector híbrido de AFP-SFV-IL-12 se determinaron los niveles de transaminasas (GOT, GPT y GGTL) en el suero de las ratas tratadas por vía intratumoral con 2×10^{11} partículas virales de los diferentes vectores (ver apartado anterior). En este estudio se incluyó además un grupo de ratas inoculadas también intratumoralmente con 10^8 partículas virales del vector alfaviral SFV-IL-12 (Figura 11A). Las ratas que habían sido inoculadas con los vectores adenovirales de AFP-SFV-IL-12 o de AFP-IL-12 mostraron niveles de transaminasas muy bajos, que eran muy similares a los de los animales control que habían sido inoculados con suero salino. Sin embargo, los niveles de transaminasas en los animales tratados con las partículas de SFV-IL-12 fueron

5 significativamente más altos que en los otros grupos ($p < 0.05$). En este estudio también se determinó el nivel de IL-12 presente en el suero de los animales a los mismos tiempos. No se detectó IL-12 en el suero de los animales que habían sido inoculados con los vectores de Ad AFP-SFV-IL-12 o AFP-IL-12 o con suero salino (Figura 11B), indicando que la expresión del transgén en estos vectores está restringida a los tumores y sugiriendo que la toxicidad del vector híbrido de Ad-SFV es muy baja. El tratamiento con las partículas virales de SFV-IL-12, sin embargo, indujo altos niveles séricos de IL-12 a tiempos cortos, lo cual podría producir toxicidad hepática. Finalmente, el estudio de toxicidad se completó con un análisis histológico de secciones hepáticas teñidas con hematoxilina/eosina procedentes de ratas tratadas intratumoralmente con los mismos vectores y a las mismas dosis ya descritas (Figura 12). Este estudio mostró que no había diferencias histológicas entre las ratas que recibieron suero salino y aquellas que recibieron los vectores adenovirales de AFP-SFV-IL-12 o de AFP-IL-12. Sin embargo en secciones hepáticas de ratas tratadas con las partículas virales de SFV-IL-12 si se observaron zonas con hepatocitos eosinófilos así como fusiones de estos hepatocitos, indicando un cierto grado de toxicidad (flechas negras, Figura 12D).

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Proyecto de Biomedicina CIMA S.L.
 15 <120> UN VECTOR HÍBRIDO ADENOVIRUS-ALFAVIRUS PARA LA ADMINISTRACIÓN EFICAZ Y EXPRESIÓN DE GENES TERAPÉUTICOS EN CÉLULAS TUMORALES

<160> 15
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 20 <211> 438
 <212> DNA
 <213> Adenovirus
 <400> 1
 aaacatcatc aataataac ctattttgg attgaagcca atatgataat gagggggtgg 60
 25 agttgtgac gtggcgggg gcgtggaac gggcggggtg acgtagtagt gtggcgaag 120
 tgtgatgtg caagtgtgc ggaacacatg taagcgacgg atgtggcaaa agtgacgttt 180
 ttggtgtgc cgggtgtaca caggaagtga caattttcgc gcggttttag gcggtatgtg 240
 tagtaaat tggcgtaacc gagtaagatt tggccattt cgcgggaaaa ctgaataaga 300
 ggaagtga tctgaataa tttgtttac tcatagcgcg taatattgt ctagggccgc 360
 30 ggggacttg accgtttacg tggagactcg cccaggtgt tttctcaggt gtttccgcg 420
 ttccgggtca aagttggc 438

<210> 2
 <211> 161
 <212> DNA
 35 <213> Adenovirus
 <400> 2
 caagcttatc gataccgtcg agacctcgag ggggggcatc actccgccct aaaacctacg 60
 tcacccgcc cggtccacg ccccgccca cgtcacaac tccacccct cattatcata 120
 ttggctcaa tccaaaataa ggtatattat tgatgatgt t 161
 40 <210> 3
 <211> 7412

ES 2 356 322 T3

<212> DNA

<213> Virus Semliki Forest (SFV)

<400> 3

gatggcggat gtgtgacata cacgacgcca aaagattttg ttccagctcc tgccacctcc 60
5 gctacgcgag agattaacca cccacgatgg ccgccaagt gcatgttgat attgaggctg 120
acagcccatt catcaagtct ttgcagaagg catttccgtc gttcgaggtg gagtcattgc 180
aggtcacacc aatgacat gcaaatgcca gagcatttc gcacctggct accaaattga 240
tcgagcagga gactgacaaa gacacactca tcttgatat cggcagtgcg ccttcagga 300
gaatgatgtc tacgcacaaa taccactgcg tatgccctat gcgcagcgcga gaagaccccg 360
10 aaaggctcga tagctacgca aagaaactgg cagcggcctc cgggaagggtg ctggatagag 420
agatcgcagg aaaaatcacc gacctgcaga ccgtcatggc tacgccagac gctgaatctc 480
ctacctttg cctgcataca gacgtcacgt gtcgtacggc agccgaagtg gccgtatacc 540
aggacgtgta tgctgtacat gcaccaacat cgctgtacca tcaggcgatg aaagggtgca 600
gaacggcgta ttgattggg ttgacacca ccccgttat gttgacgcg ctagcaggcg 660
15 cgtatccaac ctacgccaca aactgggccg acgagcaggt gttacaggcc aggaacatag 720
gactgtgtgc agcatcctg actgagggaa gactcggcaa actgtccatt ctccgcaaga 780
agcaattgaa acctgcgac acagtcatgt tctcgttagg atctacattg tacactgaga 840
gcagaaagct actgaggagc tggcacttac cctccgtatt ccacctgaaa ggtaaacaat 900
cctttacctg taggtgcgat accatcgtat catgtgaagg gtacgtagtt aagaaatca 960
20 ctatgtgcc cgccctgac ggtaaacgg taggttacgc cgtgacgtat cacgcggagg 1020
gattcctagt gtgcaagacc acagacactg tcaaaggaga aagagtctca ttcctgtat 1080
gcacctacgt cccctcaacc atctgtgatc aaatgactgg catactagcg accgacgtca 1140
caccggagga cgcacagaag ttgttagtgg gattgaatca gaggatagtt gtgaacggaa 1200
gaacacagcg aaactaact acgatgaaga actatctgct tccgattgtg gccgtgcat 1260
25 ttagcaagtg ggcgagggaa tacaaggcag acctgatga tgaaaaacct ctgggtgtcc 1320
gagagaggtc acttactgct tgctgctgt gggcatttaa aacgaggaag atgcacacca 1380
tgtacaagaa accagacacc cagacaatag tgaagggtcc ttcagagttt aactcgttcg 1440
tcatcccag cctatgtct acaggcctcg caatcccagt cagatcacgc attaagatgc 1500
ttttgccaa gaagaccaag cgagagttaa tacctgttct cgacgcgtcg tcagccaggg 1560
30 atgtgaaca agaggagaag gagaggttg aggccgagct gactagagaa gccttaccac 1620
ccctgtccc catcgcgcc ggcgagacgg gagtcgtcga cgtcgacgtt gaagaactag 1680
agtatcacgc aggtgcaggg gtcgtggaaa cacctcgag cgcgttgaaa gtcaccgcac 1740
agccgaacga cgtactacta ggaaattacg tagttctgtc cccgcagacc gtgctcaaga 1800
gctccaagtt ggccccgtg caccctctag cagagcaggt gaaaataata acacataacg 1860
35 ggagggccgg ccgttaccag gtcgacggat atgacggcag ggtcctacta ccatgtggat 1920
cggccattcc ggtccctgag ttcaagctt tgagcgagag cgccactatg gtgtacaacg 1980

ES 2 356 322 T3

aaagggagtt cgtaacacagg aaactatacc atattgccgt tcacggaccg tcgctgaaca 2040
 ccgacgagga gaactacgag aaagtcagag ctgaaagaac tgacgccgag tacgtgttcg 2100
 acgtagataa aaaatgctgc gtcaagagag aggaagcgtc gggtttggtg ttggtgggag 2160
 agctaaccaa cccccgttc catgaattcg cctacgaagg gctgaagatc aggccgtcgg 2220
 5 caccatataa gactacagta gtaggagtct ttgggttcc gggatcaggc aagtctgcta 2280
 ttattaagag cctcgtgacc aaacacgatc tggtcaccag cggcaagaag gagaactgcc 2340
 aggaaatagt taacgacgtg aagaagcacc gcgggaaggg gacaagtagg gaaaacagtg 2400
 actccatct gctaaacggg tgcgtcgtg ccgtggacat cctatatgtg gacgaggctt 2460
 tcgcttgcca ttccggtact ctgctggccc taattgctct tgtaaacct cggagcaaag 2520
 10 ttggtttatg cggagacccc aagcaatgcg gattcttcaa tatgatgcag ctaaggtga 2580
 actcaacca caacatctgc actgaagtat gtcataaaag tatatccaga cgttcacgc 2640
 gtccagtcac ggccatcgtg tctacgttc actacggagg caagatgcbc acgaccaacc 2700
 cgtgcaacaa acccataatc atagacacca caggacagac caagcccaag ccaggagaca 2760
 tcgtgtaac atgcttccga ggctgggcaa agcagctgca gttggactac cgtggacacg 2820
 15 aagtcatgac agcagcagca tctcagggcc tcacccgcaa aggggtatac gccgtaaggc 2880
 agaaggtaa tgaaaatccc ttgatgccc ctgcgtcggg gcacgtgaat gtactgtgta 2940
 cgcgactga ggataggctg gtgtggaaaa cgctggccgg cgatccctgg attaaggctc 3000
 tatcaaacat tccacaggtt aactttacgg ccacattgga agaattggca gaagaacacg 3060
 acaaaaataat gaaggtgatt gaaggaccgg ctgcbcctgt ggacgcgttc cagaacaaag 3120
 20 cgaacgtgtg ttggcgaaa agcctgtgtc ctgtcctgga cactgccgga atcagattga 3180
 cagcagagga gtggagcacc ataattacag catttaagga ggacagagct tactctccag 3240
 ttgtggcctt gaatgaaatt tgcaccaagt actatggagt tgacctggac agtggcctgt 3300
 ttctgcccc gaaggtgtcc ctgtattacg agaacaacca ctgggataac agacctgtgt 3360
 gaaggatgta tggattcaat gccgcaacag ctgccaggct ggaagctaga cataccttc 3420
 25 tgaaggggca gtggcatacg ggcaagcagg cagtatcgc agaaagaaaa atccaaccgc 3480
 ttctgtgct ggacaatgta attcctatca accgcaggct gccgcacgcc ctggtggctg 3540
 agtacaagac ggttaaaggc agtaggggtg agtggctggt caataaagta agaggttacc 3600
 acgtcctgct ggtgagttag tacaacctgg cttgcctcg acgcagggtc acttggtgt 3660
 caccgtgaa tgcacaggc gccgataggt gctacgacct aagtttagga ctgccggctg 3720
 30 acgccggcag gttcgacttg gtctttgta acattcacac ggaattcaga atccaccact 3780
 accagcagtg tgcgaccac gccatgaagc tgcagatgct tgggggagat gcgctacgac 3840
 tgctaaaacc cggcggcagc ctcttgatga gagcttacgg atacgccgat aaaatcagcg 3900
 aagccgtgtt ttctcctta agcagaaagt tctcgtctgc aagagtgtg cgccccgatt 3960
 gtgtcaccag caatacagaa gtgttctgc ttttccaa cttgacaac ggaagagac 4020
 35 cctctacgct acaccagatg aataccaagc tgagtccgtg gtatgccgga gaagccatgc 4080
 acacggccgg gtgtgcacca tctacagag ttaagagagc agacatagcc acgtgcacag 4140

ES 2 356 322 T3

aagcggctgt ggftaacgca gctaacgccc gtggaactgt aggggatggc gtatgcaggg 4200
 ccgtggcgaa gaaatggccg tcagccttta agggagaagc aacaccagtg ggcacaatta 4260
 aaacagtcat gtgcggtctg taccctgca tccacgctgt agcgcctaatt tctctgcca 4320
 cgactgaagc ggaaggggac cgcgaattgg ccgctgtcta ccgggcagtg gccgccgaag 4380
 5 taaacagact gtcactgagc agcgtagcca tcccgtgct gtccacagga gtgttcagcg 4440
 gcggaagaga taggctgcag caatccctca accatctatt cacagcaatg gacgccacgg 4500
 acgctgacgt gaccatctac tgcagagaca aaagttggga gaagaaaatc caggaagcca 4560
 tagacatgag gacggctgtg gaggttgcta atgatgacgt ggagctgacc acagacttg 4620
 tgagagtga cccggacagc agcctgggtg gtcgtaagg ctacagtacc actgacgggt 4680
 10 cgctgtactc gtactttaa ggtacgaaat tcaaccaggc tgctattgat atggcagaga 4740
 tactgacgtt gtggcccaga ctgcaagagg caaacgaaca gatatgccta tacgcgctgg 4800
 gcgaaacaat ggacaacatc agatccaaat gtccggtgaa cgattccgat tcatcaacac 4860
 ctcccaggac agtgcctcgc ctgtgccgt acgcaatgac agcagaacgg atgccccgc 4920
 ttaggtcaca ccaagttaa agcatggtg tttgctcacc tttcccctc ccgaaatacc 4980
 15 atgtagatgg ggtgcagaag gtaaagtgcg agaaggttct cctgttcgac ccgacggtac 5040
 cttcagtgt tagtccgcy aagatgccc catctacgac ggaccactca gatcggctgt 5100
 tacgaggggt tgacttgac tggaccaccg actcgtctc cactgccagc gataccatgt 5160
 cgctaccag tttgagctg tgtgacatc actcgtatc cgagccaatg gctcccatag 5220
 tagtgacggc tgacgtacac cctgaaccgg caggcatcgc ggacctggcg gcagatgtgc 5280
 20 accctgaacc cgcagacct atggacctcg agaaccgat tctccaccg cgcgccgaaga 5340
 gagctgcata cctgctcc cgcgcggcgg agcagaccgt gccggcgccg agaaagccga 5400
 cgcctgcccc aaggactgcy ttaggaaca agctgcctt gacgttcggc gactttgacg 5460
 agcacgaggt cgatcggtg gcctccggga ttactttcg agacttcgac gacgtcctgc 5520
 gactaggccg cgcgggtgca tatatttct cctcggacac tggcagcggga catttacaac 5580
 25 aaaaatccgt taggcagcac aatctccagt gcgcacaact ggatgcggtc caggaggaga 5640
 aaatgtacc gccaaaattg gatactgaga gggagaagct gttgctgctg aaaatgcaga 5700
 tgcaccatc ggaggtaat aagagtcgat accagtctc caaagtgag aacatgaaag 5760
 ccacggtgt ggacaggctc acatcggggg ccagattgta cacgggagcg gacgtaggcc 5820
 gcataccaac ataccggtt cgtaccccc gccccgtgta ctcccctacc gtgatcgaag 5880
 30 gatttcaag ccccgatgta gcaatcgag cgtgcaacga atacctatcc agaaattacc 5940
 caacagtggc gtgtaccag ataacagatg aatagcagc atacttgac atggttgacg 6000
 ggtcggatag ttgcttgac agagcgacat tctgccggc gaagctccgg tgctaccga 6060
 aacatcatg gtaccaccag ccgactgtac gcagtgccgt cccgtcacc ttcagaaca 6120
 cactacagaa cgtgctagcg gccgccacca agagaaactg caacgtcacg caaatgcgag 6180
 35 aactaccac catggactcg gcagtgtca acgtggagt ctcaagcgc tatgctgct 6240
 ccggagaata ttggaagaa tatgtaaac aacctaccg gataaccact gagaacatca 6300

ES 2 356 322 T3

ctacctatgt gaccaaattg aaaggcccga aagctgctgc ctgttcgct aagaccaca 6360
 acttggtcc gctgcaggag gttcccatgg acagattcac ggctgacatg aaacgagatg 6420
 tcaaagtac tcaggagcag aaacacacag aggaaagacc caaagtccag gtaattcaag 6480
 cagcggagcc attggcgacc gcttacctgt gcggcatcca caggaatta gtaaggagac 6540
 5 taaatgctgt gttacgcct aacgtgcaca cattgttga tatgtcggcc gaagactttg 6600
 acgcgatcat cgcctctcac ttccaccag gagaccgggt tctagagacg gacattgcat 6660
 cattcgacaa aagccaggac gactcctgg ctcttacagg ttaaatgac ctcgaagac 6720
 taggggtgga tcagtacctg ctggactga tcgaggcagc cttggggaa atatccagct 6780
 gtcacctacc aactggcacg cgctcaagt tcggagctat gatgaaatcg ggcattttc 6840
 10 tgactttgt tattaacact gtttgaaca tcacatagc aagcagggta ctggagcaga 6900
 gactcactga ctccgctgt gcggcctca tcggcgacga caacatcgtt cacggagtga 6960
 tctccgacaa gctgatggcg gagaggtgcg cgtcgtgggt caacatggag gtgaagatca 7020
 ttgacgctgt catggcgaa aaaccccat attttggg gggattcata gttttgaca 7080
 gcgtcacaca gaccgcctgc cgtgttcag acccactta gcgcctgttc aagtgggta 7140
 15 agccgctaac agctgaagac aagcaggacg aagacaggcg acgagcactg agtgacgagg 7200
 ttagcaagtg gttccggaca ggctggggg ccgaactgga ggtggcacta acatctaggt 7260
 atgaggtaga gggctgcaaa agtatccta tagccatggc cacctggcg agggacatta 7320
 aggcgttaa gaaattgaga ggacctgta tacacctta cggcgtcct agattggtc 7380
 gtaatacac agaattctga ttgatcccg gg 7412
 20 <210> 4
 <211> 7521
 <212> DNA
 <213> Virus Semliki Forest (SFV)
 <400> 4
 25 gatggcggat gtgtgacata cacgacgcca aaagatttg ttccagctcc tgccacctcc 60
 gctacgcgag agattaacca cccacgatgg ccgcaaaagt gcatgtgat attgaggctg 120
 acagcccatt catcaagtct ttgagaagg catttccgtc gttcgagggt gagtcattgc 180
 aggtcacacc aatgacat gcaaatgcca gagcatttc gcacctggct accaaattga 240
 tcgagcagga gactgacaaa gacacactca tcttgatat cggcagtgcg cctccagga 300
 30 gaatgatgtc tacgcacaaa taccactgcg tatgccctat gcgcagcgca gaagaccccg 360
 aaaggctcga tagctacgca aagaaactgg cagcggcctc cggaagggtg ctggatagag 420
 agatcgcagg aaaaatcacc gacctgcaga ccgtcatggc tacgccagac gctgaatctc 480
 ctacctttg cctgataca gacgtcacgt gtcgtacggc agccgaagtg gccgtatacc 540
 aggacgtgta tgctgtacat gcaccaacat cgctgtacca tcaggcagat aaagggtgca 600
 35 gaacggcgta ttgattggg ttgacacca cccgtttat gttgacgcg ctacgagcg 660
 cgtatcaac ctacgcaca aactgggccc acgagcaggt gttacaggcc aggaacatag 720

ES 2 356 322 T3

gactgtgtgc agcatcctg actgagggaa gactcggcaa actgtccatt ctccgcaaga 780
 agcaattgaa accttgcgac acagtcatgt tctcggtagg atctacattg tacactgaga 840
 gcagaaagct actgaggagc tggcacttac cctccgtatt ccacctgaaa ggtaaacaat 900
 cctttacctg taggtgcat accatcgtat catgtgaagg gtacgtagtt aagaaatca 960
 5 ctatgtgcc cggcctgtac ggtaaacgg taggttacgc cgtgacgtat cacgaggagg 1020
 gattcctagt gtgcaagacc acagacactg tcaaaggaga aagagtctca ttcctgtat 1080
 gcacctacgt cccctcaacc atctgtgatc aaatgactgg catactagcg accgacgtca 1140
 caccggagga cgcacagaag ttgttagtgg gattgaatca gaggatagtt gtgaacggaa 1200
 gaacacagcg aaactaac acgatgaaga actatctgct tccgatttg gccgtcgcac 1260
 10 ttagcaagtg ggcgagggaa tacaaggcag accttgatga tgaaaaacct ctgggtgtcc 1320
 gagagagtc acttactgc tgctgctgt gggcattaa aacgaggaag atgcacacca 1380
 tgtacaagaa accagacacc cagacaatag tgaagggtcc ttcagagttt aactcgttcg 1440
 tcatcccag cctatgtct acaggcctcg caatcccagt cagatcacgc attaagatgc 1500
 tttggccaa gaagaccaag cgagagttaa tacctgttct cgacgcgtcg tcagccaggg 1560
 15 atgtgaaca agaggagaag gagaggttg aggccgagct gactagagaa gccttaccac 1620
 ccctcgtccc catcgcgccg gcggagacgg gagtcgtcga cgtcgcgctt gaagaactag 1680
 agtatcacgc aggtgcaggg gtcgtggaaa cacctcgag cgcgttgaaa gtcaccgcac 1740
 agccgaacga cgtactacta ggaaattacg tagttctgtc cccgcagacc gtgctcaaga 1800
 gctccaagtt ggccccgtg cacccttag cagagcaggt gaaaataata acacataacg 1860
 20 ggagggccgg cggttaccag gtcgacggat atgacggcag gtcctacta ccatgtgat 1920
 cggccattcc ggtccctgag ttcaagctt tgagcgagag cgccactatg gtgtacaacg 1980
 aaagggagtt cgtcaacagg aaactatacc atattgccgt tcacggaccg tcgctgaaca 2040
 ccgacgagga gaactacgag aaagtcagag ctgaaagaac tgacgccgag tacgtgttcg 2100
 acgtagataa aaaatgctgc gtcaagagag aggaagcgtc gggtttggtg ttggtgggag 2160
 25 agctaaccaa cccccgttc catgaattcg cctacgaagg gctgaagatc aggccgtcgg 2220
 cacatataa gactacagta gtaggagtct ttgggttcc gggatcaggc aagtctgcta 2280
 ttattaagag cctcgtgacc aaacacgatc tggtcaccag cggcaagaag gagaactgcc 2340
 aggaaatagt taacgacgtg aagaagcacc gcgggaagg gacaagtagg gaaaacagtg 2400
 actccatct gctaaacggg tgcgtcgtg ccgtggacat cctatatgtg gacgaggctt 2460
 30 tcgcttgcca ttcgggtact ctgctggccc taattgctct tgttaaacct cggagcaaag 2520
 ttggtttatg cggagacccc aagcaatgcg gattcttcaa tatgatcag cttaaagtga 2580
 acttaacca caacatctgc actgaagtat gtcataaaag tataccaga cgttgcacgc 2640
 gtccagtcac ggccatcgtg tctacgttg actacggagg caagatgcgc acgaccaacc 2700
 cgtgcaacaa acccataatc atagacacca caggacagac caagcccaag ccaggagaca 2760
 35 tcgtgtaac atgctccga ggctgggcaa agcagctgca gttggactac cgtggacacg 2820
 aagtcagac agcagcagca tctcagggcc tcacccgcaa aggggtatac gccgtaaggc 2880

ES 2 356 322 T3

agaagtgaa tgaaaatccc ttgatgccc ctgctcgga gcacgtgaat gtactgctga 2940
 cgcgactga ggataggctg gtgtggaaa cgctggccgg cgatccctgg attaaggctc 3000
 tatcaaacat tccacaggtt aactttacgg ccacattgga agaatggcaa gaagaacacg 3060
 acaaaataat gaaggtgatt gaaggaccgg ctgctgctgt ggacgcgttc cagaacaaag 3120
 5 cgaacgtgtg ttgggcgaaa agcctgtgtc ctgtctgga cactgccgga atcagattga 3180
 cagcagagga gtggagcacc ataattacag catttaagga ggacagagct tactctccag 3240
 tgggtgcctt gaatgaaatt tgcaccaagt actatggagt tgacctggac agtggcctgt 3300
 ttctgcccc gaaggtgctc ctgtattacg agaacaacca ctgggataac agacctgggt 3360
 gaaggatga tggattcaat gccgcaacag ctgccaggct ggaagctaga cataccttc 3420
 10 tgaaggggca gtggcatacg ggcaagcagg cagtatcgc agaaagaaaa atccaaccgc 3480
 ttctgtgct ggacaatga attcctatca accgcaggct gccgcacgcc ctggtggctg 3540
 agtacaagac ggttaaaggc agtaggggtg agtggctgtt caataaagta agagggtacc 3600
 acgtctgct ggtgagttag tacaacctgg cttgcctcg acgcagggtc acttggtgt 3660
 caccgctgaa tgcacaggc gccgataggt gctacgacct aagtttagga ctgccggctg 3720
 15 acgccggcag gttcgacttg gtcttttga acattcacac ggaattcaga atccaccact 3780
 accagcagtg tgtcgaccac gccatgaagc tgcagatgct tgggggagat gcgctacgac 3840
 tgctaaaacc cggcggcatc ttgatgagag cttacggata cgccgataaa atcagcgaag 3900
 ccgtgtttc ctcttaagc agaaagtct cgtctgcaag agtgttgcgc ccggattgtg 3960
 tcaccagcaa tacagaagtg ttctgtgtt tctccaact tgacaacgga aagagacct 4020
 20 ctacgtaca ccagatgaat accaagctga gtgccgtgta tgccggagaa gccatgcaca 4080
 cggccgggtg tgcaccatcc tacagagtta agagagcaga catagccacg tgcacagaag 4140
 cggctgtgtt taacgcagct aacgcccgtg gaactgtagg ggtggcgta tgcagggccg 4200
 tggcgaagaa atggccgtca gccttaagg gagcagcaac accagtgggc acaattaa 4260
 cagtcatgtg cggctctac cccgtcatcc acgctgtagc gcctaattc tctgccacga 4320
 25 ctgaagcggg aggggaccgc gaattggccg ctgtctaccg ggcagtggcc gccgaagtaa 4380
 acagactgtc actgagcagc gttagcatcc cgctgctgtc cacaggagtg ttcagcggcg 4440
 gaagagatag gctgcagcaa tccctcaacc atctattcac agcaatggac gccacggacg 4500
 ctgacgtgac catctactgc agagacaaaa gttgggagaa gaaaatccag gaagccattg 4560
 acatgaggac ggtgtggag ttgtcaatg atgacgtgga gctgaccaca gacttggtga 4620
 30 gagtgcaccc ggacagcagc ctggtgggtc gtaagggcta cagtaccact gacgggtcgc 4680
 tgtactgta cttgaaggt acgaaattca accaggctgc tattgatatg gcagagatac 4740
 tgacgtgtg gccagactg caagaggcaa acgaacagat atgcctatac gcgctggcg 4800
 aaacaatga caacatcaga tccaaatgc cgtgaacga ttccgattca tcaacacctc 4860
 ccaggacagt gccctgcctg tgccgctacg caatgacagc agaacggatc gcccgctta 4920
 35 ggtcacacca agttaaagc atggtggtt gctcatctt tcccctccg aaataccatg 4980
 tagatgggtg gcagaagga aagtgcgaga aggttctct gttcgaccg acggtacct 5040

ES 2 356 322 T3

cagtggtag tccgcggaag tatgccgat ctacgacgga cactcagat cggtcgttac 5100
 gagggttga ctggactgg accaccgact cgtctccac tgccagcgt accatgtcgc 5160
 taccagttt gcagtcgtg gacatcgact cgatctacga gccaatggct cccatagtag 5220
 tgacggctga cgtacacct gaacccgcag gcatcgcgga cctggcgga gatgtgcacc 5280
 5 ctgaaccgc agaccatgtg gacctgaga acccgattcc tccaccgcg cgaagagag 5340
 ctgcatact tgcctcccgc gcgggcgagc gaccgggtcc ggcgccgaga aagccgacgc 5400
 ctgccccaa gactgcgtt aggaacaagc tgctttgac gttcggcgac ttgacgagc 5460
 acgaggtcga tgcgttgcc tccgggatta ctctcgaga ctccgacgac gtctcgcac 5520
 taggccgcgc ggtgtcatat atttctct cggacactgg cagcggacat ttacaacaaa 5580
 10 aatccgttag gcagcacaat ctccagtgcg cacaactgga tgcggtccag gaggagaaaa 5640
 tgtaccgcc aaaattggat actgagagg agaagctgt gctgctgaaa atgcagatgc 5700
 acccatcga ggctaataag agtcgatacc agtctcga agtgagaa atgaaagcca 5760
 cgggtgtgga caggctcaca tcggggcca gattgtacac gggagcggac gtaggccgca 5820
 taccaacata cgcggtcgc tacccccgc ccgtgtact cctaccgtg atcgaaagat 5880
 15 tctcaagccc cgatgtagca atcgacgct gcaacgaata cctatccaga aattaccaa 5940
 cagtggcgtc gtaccagata acagatgaat acgacgata ctggacatg gttgacgggt 6000
 cggatagttg ctggacaga gcgacattct gcccgcgaa gctccggtgc taccgaaac 6060
 atcatcgta ccaccagcc actgtacga gtgccgtccc gtcaccctt cagaacacac 6120
 tacagaacgt gtagcggcc gccaccaaga gaaactgca cgtcacgca atcgagaaac 6180
 20 taccaccat ggactcgga gtgtcaacg tggagtgtt caagcgtat gcctgtccg 6240
 gagaatattg ggaagaatat gtaaacaac ctatccgat aacctgag aacatcacta 6300
 cctatgtac caaatgaa ggcccgaag ctgtgcctt gttcgtaa acccacaact 6360
 tggttccgt gcaggaggt cccatggaca gattcacgt cgacatgaa cgagatgtca 6420
 aagtactcc agggacgaaa cacacagag aaagaccaa agtccagga attcaagcag 6480
 25 cggagccatt ggcgaccgt tacctgtgc gcatccacag ggaattagta aggagactaa 6540
 atgtgtgtt acgccctaac gtgcacacat tgttgatat gtcggccgaa gacttgacg 6600
 cgatcatgc ctctactc caccaggag acccggtct agagacggac attgcatcat 6660
 tcgacaaaag ccaggacgac tcttggtc ttacaggtt aatgatctc gaagatctag 6720
 ggggtgatca gtacctgtg gactgtatg aggcagcct tggggaata tccagctgtc 6780
 30 acctaccaac tggcagcgc tcaagttc gagctatgat gaaatcggc atgttctga 6840
 cttgtttat taactgtt tgaacatca ccatagcaag cagggtactg gagcagagac 6900
 tctactgact cgctgtgcg gcctcatcg gcgacgaca catcgttac ggagtgtct 6960
 ccgacaagct gatggcgag aggtgcgct cgtgggtcaa catggagtg aagatcattg 7020
 acgctgtcat gggcgaaaa ccccatatt ttgtggggg atcatagtt ttgacagc 7080
 35 tcacacagac cgctgccgt gttcagacc cactaagcg cctgttcaag ttggtaagc 7140
 cgtaacagc tgaagacaag caggacgaag acaggcgac agcactgagt gacgagtt 7200

ES 2 356 322 T3

gcaagtgggt cggacaggc ttgggggccg aactggaggt ggcactaaca tctaggtatg 7260
 ggtagaggg ctgcaaaagt atcctcatag ccatggccac ctggcgagg gacattaagg 7320
 cgttaagaa attgagagga cctgttatac acctctacgg cggctctaga ttggtgcgtt 7380
 aatacacaga attctgatta tagcgcacta ttatagcacc atgaattaca tccctacgca 7440
 5 aacgttttac ggccgccggt ggcgcccgcg cccggcggcc cgtccttggc cgttgcaggc 7500
 cactccggtg gctcccgtcg t 7521
 <210> 5
 <211> 841
 <212> DNA
 10 <213> Virus Semliki Forest (SFV)
 <400> 5
 attacatccc tacgcaaacg tttacggcc gccggtggcg cccgcgcccg gcggccgctc 60
 cttggccgtt gcaggccact ccggtggctc ccgtcgtccc cgacttccag gccagcaga 120
 tgcagcaact catcagcgcc gtaaattgccc tgacaatgag acagaacgca attgctcctg 180
 15 ctaggcctcc caaaccaaag aagaagaaga caaccaaacc aaagccgaaa acgcagccca 240
 agaagatcaa cggaaaaacg cagcagcaaa agaagaaaga caagcaagcc gacaagaaga 300
 agaagaaacc cggaaaaaga gaaagaatgt gcatgaagat tgaaaatgac tgtatcttcg 360
 tatgcggcta gccacagtaa cgtagtgtt ccagacatgt cgggcaccgc actatcatgg 420
 gtgcagaaaa tctcgggtgg tctgggggcc ttcgcaatcg gcgctatcct ggtgctggtt 480
 20 gtgtcactt gcattgggct ccgagataa gttagggtag gcaatggcat tgatatagca 540
 agaaaattga aaacagaaaa agttagggtg agcaatggca tataaccata actgtataac 600
 ttgtaacaaa gcgcaacaag acctgcgcaa ttggccccgt ggtccgcctc acggaaacctc 660
 ggggcaactc atattgacac altaattggc aataattgga agcttacata agcttaattc 720
 gacgaataat tggattttta ttttatttg caattggtt ttaatatttc caaaaaaaaa 780
 25 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 840
 a 841
 <210> 6
 <211> 260
 <212> DNA
 30 <213> Virus SV40
 <400> 6
 agagtcgggg cggccggccg cttcgagcag acatgataag atacattgat gagtttgac 60
 aaaccacaac tagaatgcag tgaaaaaaat gctttatttg tgaaatttgt gatgctattg 120
 ctttattgt aaccattata agctgcaata aacaagttaa caacaacaat tgcaattcatt 180
 35 ttatgttca ggttcagggg gaggtgtggg aggttttta aagcaagtaa aacctctaca 240
 aatgtggtaa aatcgataag 260

<210> 7
 <211> 940
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 7
 aattcgctg tcatacagct aataatgac cataagacaa ttagattaa attagtttg 60
 aatcttcta ataccaaagt tcagtttact gttccatgtt gcttctgagt ggcttcacag 120
 acttatgaaa aagtaaaccg aatcagaatt acatcaatgc aaaagcattg ctgtgaactc 180
 tgtacttagg actaaacttt gagcaataac acacatagat tgaggattgt ttgctgtag 240
 10 catacaact ctgggtcaaa gctcctcttt attgctgtc ttggaaaatt tgctgttct 300
 catggttct ctttctact ctatctatt ttctcaacca ctcatatggc tacaataact 360
 gtctgcaagc ttatgattcc caaatatcta tcttagcct caatctgtt ccagaagata 420
 aaaagtagta ttcaaatgca catcaacgct tccactgga gggcttaaag acgtttcaac 480
 atacaaaccg gggagtttg cctggaatgt ttctaaaat gtgtcctgta gcacataggg 540
 15 tcctctgtt ccttaaaatc taattacttt tagcccagtg ctcatccac ctatggggag 600
 atgagagtga aaaggagacc tgattaataa ttactaag tcaataggca tagagccagg 660
 actgtttggg taaactggc actttatctt aaactaata tatccaaaac tgaacatgta 720
 cttagtact aagtcttga ctttatctca ttcataccac tcagcttat ccaggccact 780
 tatttgacag tctagctagc ccttagattt tctgccccaa agagctctgt gtcctgac 840
 20 ataaaataca aataaccgt atgtgtftaa ttattggcaa atgtccatt ttaacctaa 900
 ggaaatacca taaagtaaca gatataccea caaaaggta 940
 <210> 8
 <211> 28892
 <212> DNA
 25 <213> Quimérico
 <220>
 <221> 5' ITR
 <222> (1)..(438)
 <223> Primera secuencia terminal invertida repetida y señal de
 30 empaquetamiento
 <220>
 <221> Relleno
 <222> (439)..(10990)
 <223> Primera secuencia no codificante de relleno
 35 <220>
 <221> AFP(p+e)

<222> (10991)..(11930)
 <223> Promotor de alfa feto proteína (AFP). Incluye la región del promotor (p) y del potenciador (e)
 <220>
 5 <221> SFV
 <222> (12257)..(19366)
 <223> Región del replicón procedente del virus SFV
 <220>
 <221> mL-12
 10 <222> (19389)..(21722)
 <223> Secuencia correspondiente al gen de la interleucina-12 (IL12) de ratón (Gen exógeno)
 <220>
 <221> PoliA
 15 <222> (22621)..(22880)
 <223> Secuencia de poliadenilación derivada del virus SV40
 <220>
 <221> Relleno
 <222> (22881)..(28731)
 20 <223> Segunda secuencia no codificante de relleno
 <220>
 <221> 3' ITR
 <222> (28732)..(28892)
 <223> Segunda secuencia terminal invertida repetida
 25 <400> 8
 aaacatcatc aataatatac cttattttgg attgaagcca atatgataat gagggggtgg 60
 agttgtgac gtggcgcggg gcgtgggaac ggggcgggtg acgtagtagt gtggcgaag 120
 tgtgatgttg caagtgtggc ggaacacatg taagcgacgg atgtggcaaa agtgacgttt 180
 ttggtgtgcg ccggtgtaca caggaagtga caattttcgc gcggttttag gcggatgttg 240
 30 tagtaaattt gggcgtaacc gagtaagatt tggccatttt cgcgggaaaa ctgaataaga 300
 ggaagtgaaa tctgaataat tttgtgttac tcatagcgcg taatattgt ctagggccgc 360
 ggggactttg accgtttacg tggagactcg cccaggtgtt tttctcaggt gtttccgcg 420
 ttccgggtca aagttggcgt tttgatatca agcttatcga taccgtcaaa caagtcttta 480
 attcaagcaa gactttaaca agttaaagg agcttatggg taggaagtag tgttatgatg 540
 35 tatgggcata aagggtttta atgggatagt gaaaatgtct ataataatac taaatggct 600
 gcccaatcac ctacaggatt gatgtaaaca tggaaaaggt caaaaacttg ggtcactaaa 660

ES 2 356 322 T3

atagatgatt aatggagagg atgaggtga tagttaaag tagataagtg gtcttattct 720
 caataaaaa gtgaacataa ggcgagttc tacaagatg gacaggactc atcatgaaa 780
 cagcaaaaac tggacattg ttctaactt tgaagatg gaaaaattc tattttaaag 840
 gtaaacagt aactcacagg aaataccaac ccaacataaa atcagaaaca atagtctaaa 900
 5 gtaataaaaa tcaaacgttt gcacgatcaa attatgaatg aaattcacta ctaaaattca 960
 cactgatttt gttcatcca cagtgtaaat gttgtgatgc attcaattg tgtgacacag 1020
 gcagactgtg gatcaaaagt ggtttctggt gcgacttact ctctgagta tacctgcagt 1080
 cccctttctt aagtgtgta aaaaaaagg gggatttctt caattcgcca atactctagc 1140
 tctccatggt cttctagga aacaagtgtt aaccacctt attgtcaaa cctagctcca 1200
 10 aaggactttt gactccccac aaaccgatgt agctcaagag agggatctg tcaccagtat 1260
 gtatagtgaa aaaagtatcc caagtccaa cagcaattcc taaaaggagt ttattaaaa 1320
 aaccacacac acctgtaaaa taagtatata tcctcaagg tgactagttt taaaaaaca 1380
 gtattggctt tgatgtaaag tactagtgaa tatgttagaa aaatctcact gtaaccaagt 1440
 gaaatgaaag caagtatggt ttgcagagat tcaaagaaaa tataagaaaa cctactgttg 1500
 15 ccactaaaaa gaatcatata ttaaataac tcacacaata gctcttcagt ctgataaaat 1560
 ctacagtcac aggaatggat ctatcactat ttctattcag tgctttgatg taatccagca 1620
 ggtcagcaaa gaatttatag cccccctga gcacacagag ggctacaatg tgatggcctc 1680
 ccatctcctt catcacatct cgagcaagac gttcagctct acagaaataa aatcaggaat 1740
 ttaatagaaa gttcataca taaacttta taacaacac ctctagtca taaacttcc 1800
 20 acaccaacct gggcaatata gtgagacccc atgcctgcaa aaaaaaaaaa attagccagg 1860
 catggtagca tgtacctgta gtcccagcta cttgagaggt gaggtgggaa aatcacttta 1920
 gtgcaggatg ttgaggctgg agtgaactgt gattgtgcca ctgcactcca gcctggacaa 1980
 tagagcaaga cctgtctca aaaaaatgca taaaaattt ttttaaatac ttccacgat 2040
 cacatcttt gccctcatgt ttcaaatgt aaaaaattg atacctcaa aaaaaccaag 2100
 25 cataccta tcataattt tttaaatgc aaataaaaac aagataccat ttcacctat 2160
 cagactggca gttctgatt aaatgaaatt ttctggataa tatacaatat taagagagac 2220
 ttagaaact gggccagtg ctcatgcctg taatcccagc actttgggag gctgggtaac 2280
 atggcgaacc ctgtttctac aaaataaaaa tattagctgg gagtgggtgc gcacacctat 2340
 agtcccagct actcaggagg ctgaggtgga aggatcgctt gaaccagga ggtgagact 2400
 30 gcagtgaact gtgatcattc tgctgcactg caccagcc tgggcaacag agacctgtc 2460
 tcaaaaaaaaa aaaaaaaga gacaaattg gaagagaaag gtactctcat ataacatcag 2520
 gagtataaaa tgattcaact tcttagagga aaattggca ataccaaaat attcaataaa 2580
 ctctttccc tfgaccaga aattccactt gaataaagct gaacaagtac caaacatgta 2640
 aaagaatgtt tctctagta cagtcggtaa gaacaaaata gtgtctatca atagtgact 2700
 35 ggttaaatca gttatggtat ctccataaga cagaatgcta tgcaacctt aaaatatatt 2760
 agatagctct agacacacta atattaaaag tgccaataa catttaaac tatactcata 2820

cgftaaaata taaatgtata tatgtacttt tgcatatagt atacatgcat aggccagtgc 2880
 ttgagaagaa atgtgtacag aaggctgaaa ggagagaact ttagtcttct tgtttatggc 2940
 ctccatagtt agaataattt ataacacaaa tattttgata ttataattt aaaataaaaa 3000
 cacagaatag ccagacatac aatgcaagca ttcaatacca ggtaagggtt ttcactgtaa 3060
 5 ttgacttaac agaaaatfff caagctagat gtgcataata ataaaaatct gaccttgctc 3120
 tcatgtgatt cagccccagt ccattaccct gtttaggact gagaaatgca agactctggc 3180
 tagagttcct tcttccatct ccttcaatg tttactttgt tctgtccct acagagtccc 3240
 actataccac aactgatact aagtaattag taaggccctc ctcttttatt tftaataaag 3300
 aagattttag aaagcatcag ttatttaata agttggccta gtttatgttc aaatagcaag 3360
 10 tactcagaac agctgctgat gttgaaatt aacacaagaa aaagtaaaaa acctcatttt 3420
 aagatcttac ttactgtcc ataattagtc catgaggaat aaacaccctt tccaaatcct 3480
 cagcataatg attaggtatg caaaataaat caaggtcata acctggttca tcatcactaa 3540
 tctgaaaaag aaatatagct gtttcaatga gagcattaca ggatacaaac atttgattgg 3600
 attaagatgt taaaaaataa ccttagtcta tcagagaaat ttagggtgtaa gatgatatta 3660
 15 gtaactgtta actttgtagg tatgataatg aattatgtaa gaaaacaaca ggccggggcgg 3720
 gttggttcac acgtgtaac ccagcacttt gggaggctga ggcaggcaga ctgcctgagc 3780
 tcaggagttc gagaccagcc tgggcaacac ggtgaaatcc cgctctact aaaaatacaa 3840
 aaaaattagc cgggtgtggt gacacatgcc ttagtccca gctactggg aggctgaggc 3900
 aggagaatca ctgaaacctg ggaggtgaag gttgcagtga gccaaatgg caccacttca 3960
 20 ctccagcctg gaaacagag caagactctg tctctgagct gagatggcac cacttactc 4020
 cagcctggga aacagagcaa gactctgtct caaaaaaac aaaacacaca acaaaaaaaa 4080
 caggctgggc cgggtggctc acgcctgtaa tcccagcact ttgggaggcc gaggcgggtg 4140
 gatcacctga ggtcaggagt tccagaccag cttgtcaac atggtgaaac ctccccccgc 4200
 cgctctact aaaaatacaa aaattagcca ggcgtggtgg caggagcctg taatcccagc 4260
 25 tacttgggag gctgaggcag gagaatcgct tgtaccaga aggcagaggt tgcactgagc 4320
 tgagatggca ccattgcact ccagcctggg ggacaagagc gagatttctg ctttaaaaaa 4380
 caaaaacaaa acaaaaacc atgtaactat atgtctagt catcttagtc aagaatgtag 4440
 aagtaaagtg ataagatag gaatttcctt taggtcaca agagaaaaag aaaaatttta 4500
 aagagctaag acaaacgcag caaaatctt atatttaata atattctaaa catgggtgat 4560
 30 gaacatacgg gtattcatta tactattctc tccactttg agtatgttg aaaatttagt 4620
 aaaacaagtt ttaacacact gtagtctaac aagataaat atcacactga acaggaaaaa 4680
 ctggcatggt gtggtggctc acactgtaa tcccagtct tgggaggct gagacaggag 4740
 agttgcttga ggccaggagt tcaagaccga catggggaat gtagcaagac cccgtcccta 4800
 caaaaaactt tgtaaaaatt tgccaggat ggtggtgcat acctgtagc ccagctactc 4860
 35 gggaggcggg ggcagaagga atcactgag cccaggagtt ttaggctgca gtgagctacg 4920
 atcataccac agcactccag cgtggacaac agagtaagac cctatctcaa aaacaaaaca 4980

aaacaaaaca aacaaaaaaa accacaagaa aaactgctgg ctgatgcagc ggctcatgcc 5040
 tgtaatccca gtatttggg aggccagggt gggcgatca cctgaggta ggagttagag 5100
 accagcctgg ccaacatggt gaaacccat ctctactaaa aatacaaat tagccaggca 5160
 tgtggcagc gcctgtatc ccagtactg ggaggctgaa gcaggaggat cacctgagcc 5220
 5 cgggagggtg aggttgcaat gagccgagat cacaccactg cactccagcc tgggtgacac 5280
 agcaataccc tacctcaaaa taaaaaagaa aaagaaaaga aaagttgctg tccccgctac 5340
 cccaatccca aatccaaaca gcctctctca tctcacagta agggggaaaa atcacccaaa 5400
 aaagctaagt gatctttga aaacccaaac tcttagaagt ctaagattat tatagtcaac 5460
 tcatgaagtg tcatcataaa agatactcta atattatta agtagaacca catattggtt 5520
 10 gtcttggtat gtctagcccc tggcatacaa aatattaat aactgata tggtagctgt 5580
 gatgtgaaaa tgtactatga gtacagcttt ataatacta tatatgtacc tatatacaga 5640
 aaaaaataca acaaatcat aaaagcactt atcttgaaa gaggagtac agcaattta 5700
 tttagttctt tattgcttg ctatatattc taaattttt tcaatgaata tatatcactt 5760
 ttaaaaaat tcaatggtct ttctataaa ttactttgg cagcatgctt tttatatat 5820
 15 acatataaaa tgtatgggaa attttaaaag gatacattaa attaaagcaa aatatacaaa 5880
 caaaaaatca gaatacaaaa agataaaaag attgggaagg gagggaggga gtaaggagga 5940
 aggggtgggtg ggtatagaga aatataccaa ataatggtaa gaagtgggtg cttgacactt 6000
 tctacacttt ttttaataa aaaaaatttt ttctctctc tttttttt ttagagacga 6060
 agtctcgcta tgtgcccag gctggtcttg aactcctggg atcaagagat cctctgcct 6120
 20 cagcctccca aggtgcttg attacagggt tgagccacca cgcctgtca ctttctacac 6180
 ttaatatat atatttttc atttcaatg tcaatttat tagttaattt ataataccca 6240
 ttaccatta tattcaagt ctattgaag aaataacca gaaagaatga aatactctag 6300
 ctcatgct attcaatact aaattacctt tcaaatcaca ttcaagaagc tgatgatta 6360
 agctttggcg gttccaata aatattggtc aaaccataat taaatctcaa tatatcagtt 6420
 25 agtacctatt gagcatctcc tttacaacc taagcattgt attaggtgct taaatacaag 6480
 cagcttgact ttaatacat taaaaaatac atatttaaga cttaaaatct tatttatgga 6540
 attcagttat atttgagggt ttccagtgct gagaaatttg aggtttgtgc tgccttcag 6600
 tcccaaagc tcagttctga gttctcagac ttggtggaa ctcatgtat tgcaggttg 6660
 gcccgaata cctgtgggac aactcagcc cctgtgcaca tggccaggag gctggttgca 6720
 30 aacatttca ggtaggtgga ccaggacatg cccctgtca tggccagggtg gagcatagt 6780
 gctatacagc aggcagaagt caatattgat ttgttttaa agaaacatgt actacttca 6840
 taagcagaaa aaattctat tcttggggga aaagattatg ccagatcctc taggattaaa 6900
 tgctgatgca tctgctaaac cttcacatat cagaacatat ttactataga aagaatgaaa 6960
 atgggacatt tgtgtgcac ctatgtgaac attcaaaaa tattttacaa caactaagta 7020
 35 tttataaat tttatgaact gaaatttagt tcaagttcta ggaaaataca aacctgcta 7080
 gatattataa aatgatata atatatattc attcaggct catcagaata tatctgttat 7140

ES 2 356 322 T3

cacttgacaa gaatgaaaaat gcaccattht gtagtgcttt aaaatcagga agatccagag 7200
 tactaaaaat gacttcttcc ttgaagctta ctaccaact tctcccagc tactactgc 7260
 ttctgccaca agcataaact aggaccagc cagaactccc ttgaatata cacttgcaac 7320
 gattactgca tctatcaaaa tggttcagtg cctggctaca ggttctgcag atcgactaag 7380
 5 aattgaaaa gtctgttta ttcaaagga agcccatgtg aattctgcc agagttcatc 7440
 ccagatatgc agtctaagaa tacagacaga tcagcagaga tgtattctaa aacaggaatt 7500
 ctggcaatat acaaaattga ttccaatca aaacagattt acataccata ctatgtcaa 7560
 gaagttgttt tgtttattg catcctagat tttatthtt tgatttatgg ttactthaa 7620
 gcataaaaaa ttgtcaata caactcttcc caaaaggcat aaacaaaaat tcataaaact 7680
 10 tgcatcactt gagatacttc aggtatgaat tcacaactt gtacaactt actatata 7740
 tgcacacata tatatatatt tgggtatatt gggggggctc taatttaaga aatgcataat 7800
 tggctataga cagacagttg tcagaactg gcaatgggta cgtgcaggtt cattatacca 7860
 agtctactg tagttgtca aaatgtatca taatacaagg cggggcgagg tctcacgcc 7920
 tgaatccca gcatttggg aggctaaggc aggaggattg ctgaggta ggagttgtg 7980
 15 accagcctgg gcaacagagc aagaccctgt ctccaaaag aaaaaaata atthtttaca 8040
 aaataaaaaac aaaatgtatc atcagacgaa ataaataag aggcaattca thaaatgac 8100
 aactthtccc agcttgacat ttaacaaaaa gtctaagtc tctaattca tattaatga 8160
 tcaaatatca aataactaatt thttthttt gagacggagt ctgctctgt 8220
 cgcccaggct ggagtgcatg ggcgcatcc tggctactg caagctccgc ctcccgggtt 8280
 20 cagccattc tctgctca gctcccag tagctggat tacagacatg cgccaccag 8340
 cccggctaat ttgtattht tagtagagat ggggttctc catgttgctc aggctgtct 8400
 tgaattccc acctcagtg atctgctgc ctacgctca caaagcagta gctgggacta 8460
 caggcaccca ccaccactt tggtaattc thttgtatt thttgtaaa gacgggattt 8520
 caccatgta gccagatgg tctgatctc ctgatctat gatccgccg cctcagctc 8580
 25 ccaaagtgtc gggattacag gcgtgagcca cccgcccgg ccatcaata ctaattcta 8640
 aatggtaagg acccactatt cagaactgt atcctatca ctaatatga aatatttatt 8700
 gaatactac tatgtcatg atactagaga gagttagata aattgatac agtaccctc 8760
 acagaacta cagtgaata gatggcatga catgtacatg agtaactgtg aacagtgta 8820
 aattgtatt taaaaaaaaa gacggctggg cgctgtggct catgctgta atcccagcac 8880
 30 thttggaggc caaggcaagt tgatcgtcg aggtcaagag ttcgagacca gcttgccaa 8940
 cgttgtaaaa cccctctct actaaaaata caaaaaaaaaa attagccagg catgttgga 9000
 caggcctgta atcccagcta ctaggaggc tgagacatgg agaactgctt gaatccagga 9060
 ggcagaggtt acagtgagcc gagatcacac cactacactc cagcctgagt gacagagcga 9120
 gactcctgtc taaaaaaaaa aaaaaaaaaa aagatacagg ttaagtgta tggtagtga 9180
 35 agagagaact caaactctgt ctcagaagcc tcaattgcat gtggaccact gatatgaaat 9240
 aatataaata ggtataattc aataaatagg aactcagtt ttaatcatcc caaacacaa 9300

ES 2 356 322 T3

aacttctat caaacaggtc caataaactc aatctctata agagctagac agaaatctac 9360
 ttggtggcct ataatcttat tagcccttac ttgtcccatc tgatattaat taaccccatc 9420
 taatatggat tagttaacaa tccagtggtc gctttgacag gaacagttgg agagagttgg 9480
 ggattgcaac atattcaatt atacaaaaat gcattcagca tctaccttga ttaaggcagt 9540
 5 gtgcaacaga attgacagga gagtaaaaga atgattataa atttacaacc cttaaagagc 9600
 tatagctggg cgtgggtgct catgcctgta aatcccagca cttggggagg ctgaggcggg 9660
 tggatcacct gaggccagaa gttcaagacc agcctagcca acatggcga accctgtctc 9720
 taaaaaaaa acaaaaaatta gccgggtgtg gtggcacgtg cctgtagtcc cagtacttg 9780
 ggaggccgag gcaggagaat cgcttgaacc taggaggtgg aggctgcagt gagccgagat 9840
 10 tgtgccactg cactccactt cagcctgggc gacaagagca agactccgtc aaaaaaaaa 9900
 aaaaaaaaaa aaagctaaa atctagtggg aaaggcatat atacataca ctaactgtat 9960
 agcataataa agctcataat ctgtaacaaa atctaattcg acaagcccag aaactgtga 10020
 ttaccaaaa acagttatat atacacaaaa agtaaacta gaacccaaag ttaccagca 10080
 ccaatgattc tctccctaag cagtatcaag tttaaagcag tgattacatt ctactgccta 10140
 15 gattgtaaac tgagtaaagg agaccagcac ctttctgcta ctgaactagc acagccgtgt 10200
 aaaccaacaa ggcaatggca gtgcccaact ttctgtatga atataagta catctgtttt 10260
 attattgtg acttggtgtt gcatgtggtt attatcaaca cttctgaaa gaacaactac 10320
 ctgctcaggc tgccataaca aaataccaca gactgagtga cttaacagaa acttattct 10380
 cacagtttg gaggctggga agtccaaaat taaggtacct gcaaggtagg ttcaatctc 10440
 20 aggcctcttc ttggcttga aggtcttcta actgtgtgct cacatgacct cttaacaa 10500
 gctctctgtt gtctctttt tttttttt ctttttgag acagagtctc actctgtcac 10560
 ccaggctgga gtacagtggc acaatctggg ctactgcaa cctccaactc ccgggtcaa 10620
 gtgatttca tgcctcacc tccgagtag cttggatgac aggagcccgc taccacacc 10680
 agctaattt tgattttta gtgagatgg tgttcacta cattggccag gctggctca 10740
 25 aactcctgac ctcgatcc acccacctg gctcccaaa gtgctgggat tacaggtgtg 10800
 agccactgag cccgtcctg gtgttttca tataagggca ctaatccaat cagacctggg 10860
 cccgctgagc aattaaccct cactaaaggg acaaaaagct ggagctccac cgcggtggc 10920
 gccgctctag aactagtga tggggccga gctctcga cgggctgca ggaattcgat 10980
 cgcgtgtag aattcgcctg tcatagct aataattgac cataagacaa ttagattaa 11040
 30 attagtttg aatcttcta ataccaaagt tcagtttact gttccatgtt gctctgagt 11100
 ggcttcacag acttatgaaa aagtaaagg aatcagaatt acatcaatgc aaaagcattg 11160
 ctgtgaactc tgtacttag actaaactt gagcaataac acacatagat tgaggattgt 11220
 ttgtgttag cataaaact ctggttcaa gtcctctt attgctgtc ttgaaaatt 11280
 tgctgttct catggttct ctttctag ctatctatt ttctcaacca ctacatggc 11340
 35 tacaataact gtctgaagc ttatgattcc caaatatcta tcttagcct caatctgtt 11400
 ccagaagata aaaagtagt ttcaatgca catcaacgtc tccactgga gggctaaag 11460

acgtttcaac atacaaaccg gggagtttg cctggaatgt ttctaaaat gtgtcctgta 11520
 gcacataggg tcctctgtt ccttaaaatc taattacttt tagcccagtg ctcatccac 11580
 ctatggggag atgagagtga aaaggagcc tgattaataa ttactaag tcaataggca 11640
 tagagccagg actgttggg taaactgtc actttatctt aaactaaata tatccaaaac 11700
 5 tgaacatgta cttagttact aagtcttga ctttatctca ttcataccac tcagctttat 11760
 ccaggccact tattgacag tctagctagc ccttagattt tctgcccac agagctctgt 11820
 gtcttgaac ataaaataca aataaccgct atgctgttaa ttattggcaa atgtccatt 11880
 ttcaacctaa ggaaatacca taaagtaaca gatataccaa caaaaggta ctagttaaca 11940
 ggcattgctt gaaaagagta taaaagaatt tcagcatgat ttccatggc ggatgtgta 12000
 10 catacacgac gccaaaagat ttgttccag ctctgccac ctccgctacg cgagagatta 12060
 accaccacg atggccgca aagtcatgt tgatattgag gctgacagcc cattcatca 12120
 gtcttgcag aaggcattc cgtcgtcga ggtggagtca tgcaggta caccaatga 12180
 ccatgcaaat gccagagcat ttgcacct ggctaccaa ttgatcgagc aggagactga 12240
 caaagacaca ctcatctgg atatcggcag tgcgcctcc aggagaatga tgtctacgca 12300
 15 caaataccac tgcgtatgcc ctatgcgag cgcagaagac cccgaaaggc tcgtatgcta 12360
 cgcaaagaaa ctggcagcgg cctccgggaa ggtgctggat agagagatcg caggaaaaat 12420
 caccgacctg cagaccgta tggctacgcc agacgctgaa tctctacct ttgcctgca 12480
 tacagacgtc acgtgctga cggcagccga agtgccgta taccaggacg tgtatgctgt 12540
 acatgcacca acatcgtgt accatcaggc gatgaaagg gtcagaacgg cgtattggat 12600
 20 tgggttgac accacccgt ttatgttga cgcgtagca ggcgctatc caactacgc 12660
 caaaaactgg gccgacgagc aggtgttaca ggccaggaac ataggactgt gtgcagcatc 12720
 cttgactgag ggaagactcg gcaactgtc cattctccg aagaagcaat tgaaccttg 12780
 cgacacagtc atgttctcg taggatctac attgtacct gagagcagaa agctactgag 12840
 gagctggcac ttacctccg tattccacct gaaaggtaaa caatcctta cctgtagggt 12900
 25 cgataccatc gtatcatgt aagggtactg agttaagaaa atcactatgt gccccgcct 12960
 gtacggtaaa acggtagggt acgccgtgac gtatcacgc gagggattcc tagtgtgca 13020
 gaccacagac actgcaaag gagaagagc ctattccct gtatcacct acgtcccctc 13080
 aaccatctgt gatcaatga ctggcact agcagccgac gtcacaccgg aggacgcaca 13140
 gaagttgta gtgggattga atcagaggat agttgtgaa ggaagaacac agcgaacac 13200
 30 taacacgatg aagaactatc tgcctccgat tgggcccgtc gcatttagca agtggcgag 13260
 ggaatacaag gcagacctg atgatgaaa acctctgggt gtccgagaga ggtcacttac 13320
 ttgctgctc ttgtggcat taaaacgag gaagatgac accatgtaca agaaaccaga 13380
 caccagaca atagtgaagg tgcctcaga gtttaactc ttcgtatcc cgagcctatg 13440
 gtctacaggc ctgcaatcc cagtcatc acgcattaag atgcttttg ccaagaagac 13500
 35 caagcgagag ttaatacctg ttctcagc gtcgtcagcc aggatgctg aacaagagga 13560
 gaaggagagg ttgaggccg agctgactag agaagccta ccaccctcg tccccatcg 13620

ES 2 356 322 T3

gccggcggag acgggagtcg tcgacgtcga cgtgaagaa cttagatc acgcaggtgc 13680
 aggggtcgtg gaaacacctc gcagcgcgtt gaaagtcacc gcacagccga acgacgtact 13740
 actaggaat tacgtagttc tgccccgca gaccgtgctc aagagctcca agttggcccc 13800
 cgtgcacct ctgacagagc aggtgaaaa aataacacat aacgggaggg ccggcggtta 13860
 5 ccaggtcgac ggatagcag gcagggctct actacatgt ggatcgcca ttccgtccc 13920
 tgagttca gcttgagcg agagcggccac tatggtgtac aacgaaaggg agttcgtca 13980
 caggaaacta taccatattg ccgttcacgg accgtcgtg aacaccgacg aggagaacta 14040
 cgagaaagtc agagctgaaa gaactgacgc cgagtacgtg ttcgacgtag ataaaaatg 14100
 ctgcgtcaag agagaggaag cgtcgggtt ggtgttggtg ggagagctaa ccaaccccc 14160
 10 gttccatgaa ttcgctacg aagggtgaa gatcaggccg tcggcacat ataagactac 14220
 agtagtagga gtcttgggg ttccgggatc aggcaagtct gctattatta agagcctctg 14280
 gaccaaacac gatctgtca ccagcggcaa gaaggagaac tgccaggaaa tagttaacga 14340
 cgtgaagaag caccgcggga aggggacaag tagggaaaac agtgactcca tctgctaaa 14400
 cgggtgtcgt cgtgccgtg acatcctata tgtggacgag gcttcgctt gccattccg 14460
 15 tactctgctg gccctaattg ctctgttaa acctcggagc aaagtgtgt tatcgggaga 14520
 cccaagcaa tgcggattct tcaatatgat gcagcttaag gtgaactca accacaacat 14580
 ctgcactgaa gtatgcata aaagtatatc cagacgttc acgcgtccag tcacggccat 14640
 cgtgtctacg ttcactacg gaggaagat gcgcacgacc aaccctgca acaaaccat 14700
 aatcatagac accacaggac agaccaagcc caagccagga gacatcgtgt taacatgctt 14760
 20 ccgaggctgg gcaaagcagc tgcagttgga ctaccgtgga cacgaagtca tgacagcagc 14820
 agcatctcag ggcctcacc gcaaaggggt atacgccgta aggcagaagg tgaatgaaa 14880
 tccctgtat gccctgctg cggagcacgt gaatgtactg ctgacgcgca ctgaggatag 14940
 gctggtgtgg aaaacgctgg ccggcgatcc ctggattaag gtcctatca acattccaca 15000
 gggtaacttt acggccacat tggaagaatg gcaagaagaa cagcaaaaa taatgaaggt 15060
 25 gattgaagga ccggctgctg ctgtggacgc gttccagaac aaagcgaacg tgtgtgggc 15120
 gaaaagcctg gtgcctgtcc tggactcgc cggaatcaga ttgacagcag aggagtggag 15180
 caccataatt acagattta aggaggacag agcttactct ccagtgtgg cctgaaatga 15240
 aattgcacc aagtactatg gagttgacct ggacagtggc ctgtttctg cccgaaggt 15300
 gtcctgtat tacgagaaca accactggga taacagacct ggtggaagga tgtatggatt 15360
 30 caatgccga acagctgcca ggctggaagc tagacatacc ttctgaagg ggcagtggca 15420
 tacgggcaag caggcagttc tcgagaaaag aaaaatccaa ccgctttctg tgctggacaa 15480
 tgtaattct atcaaccgca ggctgccgca cgcctgtgt gctgagtaca agacggttaa 15540
 aggcagtagg gttgagtgcc tggtaataa agtaagaggg taccacgtcc tgctggtgag 15600
 tgagtacaac ctggcttgc ctgacgcag ggtcactgg ttgtcaccgc tgaatgtcac 15660
 35 aggcgccgat aggtgtacg acctaaagtt aggactgccg gctgacgccg gcaggttcga 15720
 cttggtctt gtgaacattc acacggaatt cagaatccac cactaccagc agtgtgtcga 15780

ccacgccatg aagctgcaga tgcttggggg agatgcgcta cgactgctaa aacccggcgg 15840
 catcttgatg agagcttacg gatacggcga taaatcagc gaagccgttg tttcctcctt 15900
 aagcagaaag ttctcgtctg caagagtgtt gcgcccggat tgtgtcacca gcaatacaga 15960
 agtgttcttg ctgttctcca actttgacaa cggaaagaga ccctctacgc tacaccagat 16020
 5 gaataccaag ctgagtgccg tgtatgccgg agaagccatg cacacggccg ggtgtgcacc 16080
 atcttacaga gtaagagag cagacatagc cacgtgcaca gaagcggtg tggtaacgc 16140
 agtaacgcc cgtggaactg taggggatgg cgtatgcagg gccgtggcga agaaatggcc 16200
 gtcagccttt aaggggagcag caacaccagt gggcacaatt aaaacagtca tgtgcggctc 16260
 gtaccccgct atccacgctg tagcgcctaa tttctctgcc acgactgaag cggaagggga 16320
 10 ccgcaattg gccgctgtct accgggcagt ggccgccgaa gtaaacagac tgtcactgag 16380
 cagcgtagcc atcccgctgc tgtccacagg agtgttcagc ggcggaagag ataggctgca 16440
 gcaatccctc aaccatctat tcacagcaat ggacgccacg gacgctgacg tgaccatcta 16500
 ctgcagagac aaaagtggg agaagaaaat ccaggaagcc atgacatga ggacggctgt 16560
 ggagttgctc aatgatgacg tggagctgac cacagacttg gtgagagtgc acccggacag 16620
 15 cagcctggtg ggtcgtgaag gctacagtac cactgacggg tcgctgtact cgtactttga 16680
 aggtacgaaa ttaaccagg ctgctattga tatggcagag atactgacgt tgtggcccag 16740
 actgcaagag gcaaacgaac agatatgcct atacgcgctg ggcgaaacaa tggacaacat 16800
 cagatccaaa ttgccggtga acgattccga tcatcaaca cctcccagga cagtgccttg 16860
 cctgtgccg tacgcaatga cagcagaacg gatcgcccgc cttaggtcac accaagttaa 16920
 20 aagcatggtg gtttctcat ttttcccct cccgaaatac catgtagatg gggtcagaa 16980
 ggtaaagtgc gagaaggctc tctgttcga cccgacggta cttcagtgg ttagtcccg 17040
 gaagtatgcc gcatctacga cggaccactc agatcggtcg ttacgagggt ttgactgga 17100
 ctggaccacc gactcgtctt cactgccag cgataccatg tcgctacca gtttcagtc 17160
 gtgtgacatc gactcgtatc acgagccaat ggctccata gtgtgacgg ctgacgtaca 17220
 25 ccctgaacc gcaggcatcg cggacctggc ggcagatgtg caccctgaac ccgagacca 17280
 tgtggacctc gagaaccgga ttctccacc gcgcccgaag agagctgcat acctgcctc 17340
 ccgcgcgcg gagcgaccgg tgccggcgcc gagaaagccg acgcctgcc caaggactgc 17400
 gtttagaac aagctgcctt tgacgttcgg cgactttgac gagcagagg tcgatcggt 17460
 ggctccggg attaccttcg gagactcga cgacgtctg cgactaggcc gcggggtgc 17520
 30 atatatctc tcctcggaca ctggcagcg acatttaca caaaaatccg ttaggcagca 17580
 caatctccag tgcgcacaac tggatcgggt ccaggaggag aaaatgtacc cgccaaaatt 17640
 ggatactgag agggagaagc tgttctgct gaaaatgcag atgcacccat cggaggctaa 17700
 taagagtcca taccagtctc gcaaagtga gaacatgaaa gccacgggtg tggacaggct 17760
 cacatcgggg gccagattgt acacgggagc ggacgtaggc cgcataccea catacgggt 17820
 35 tcggtacccc cgccccgtg actcccctac cgtgatcga agatttcaa gccccgatg 17880
 agcaatcgca cgtgcaacg aatactatc cagaaattac ccaacagtgg cgtcgtacca 17940

ES 2 356 322 T3

gataacagat gaatacgacg catacttga catggtgac gggtcggata gttgcttga 18000
 cagagcgaca ttctgcccg cgaagctccg gtgctacccg aaacatcatg cgtaccacca 18060
 gccgactgta cgagtgccg tcccgacc cttcagaac aactacaga acgtgctagc 18120
 ggccgccacc aagagaaact gcaacgtcac gcaaatgcga gaactacca ccatggactc 18180
 5 ggcagtggtc aacgtggagt gctcaagcg ctatgcctgc tccggagaat attggaaga 18240
 atatgctaaa caacatcc ggataaccac tgagaacatc actacatg tgaccaaatt 18300
 gaaaggcccg aaagctgctg cctgttgc taagaccac aactgggtc cgctgcagga 18360
 ggttcccatg gacagattca cgctgcacat gaaacgagat gtcaaagtca ctccaggac 18420
 gaaacacaca gaggaaagac ccaaagtcca ggtaattca gcagcggagc cattggcgac 18480
 10 cgcttacctg tgcggcatcc acaggaatt agtaaggaga ctaaatgctg tgttacgcc 18540
 taacgtgac acattgttg atatgtcgc cgaagactt gacgcatca tgcctctca 18600
 ctccacca ggagaccgg ttctagagac ggacattgca tcattgaca aaagccagga 18660
 cgactcctg gctctacag gtttaatgat cctcgaagat ctagggtg atcagtacct 18720
 gctggactg atcgaggcag ccttgggga aatatccagc tgcacctac caactggcac 18780
 15 gcgctcaag ttcggagcta tgatgaaatc gggcatgtt ctgacttgt ttattaacac 18840
 tgtttgaac atccatag caagcagggt actggagcag agactcactg actccgctg 18900
 tgcggcctc atcggcgacg acaacatcgt tcacggagtg atctccgaca agctgatggc 18960
 ggagaggtgc cgctgtggg tcaacatgga ggtgaagatc atgacgctg tcatgggcca 19020
 aaaacccca tattttgtg ggggattcat agttttgac agcgtcacac agaccgctg 19080
 20 ccgtttca gaccactta agcgcctgt caagtgggt aagccgctaa cagctgaaga 19140
 caagcaggac gaagacaggc gacgagcact gagtgacgag gttagcaagt ggtccggac 19200
 aggctgggg gccgaactgg aggtggcact aacatctagg tatgagtag agggctgcaa 19260
 aagtatcctc atagccatg ccaactggc gagggacatt aaggcgtta agaaattgag 19320
 aggactgtt atacactct acggcggtc tagattggtg cgtaataca cagaattctg 19380
 25 attgatctc gaggtcgacg gtatcgataa gcttgggctg caggtcgatc gacttagag 19440
 gatcgatccc caccatgggt caatcacgct acctcctt ttggccacc ctgacctcc 19500
 taaaccacct cagttggcc aggtcattc cagtctctg acctgccagg tgtcttagcc 19560
 agtccgaaa cctgctgaag accacagatg acatggtgaa gacggccaga gaaaaactga 19620
 aacattattc ctgactgct gaagacatg atcatgaaga catcacacgg gaccaaacca 19680
 30 gcacattgaa gacctgtta cactggaac tacacaagaa cgagagttgc ctggctacta 19740
 gagagactc ttccacaaca agaggagct gcctgcccc acagaagacg tcttgatga 19800
 tgacctgtg ccttgtagc atctatgagg actgaagat gtaccagaca gattccagg 19860
 ccatcaacgc agcactcag aatcacaacc atcagcagat cattctagac aaggcctgc 19920
 tggggccat cgatgagctg atgcagtctc tgaatcataa tggcgagact ctgcccaga 19980
 35 aacctcctg gggagaagca gaccctaca gagtgaaaat gaagctctg atcctgctc 20040
 acgctcag caccgcgct gtgacctca acaggtgat gggctatctg agctccgct 20100

gagaattccg ccctctccc tcccccccc ctaacgttac tggccgaagc cgcttgaat 20160
 aaggccggtg tgcgtttgc tatatgtat ttccacat atgcccgtct ttggcaatg 20220
 tgagggcccg gaaacctggc cctgtctct tgacgagcat tctaggggt cttcccctc 20280
 tcgcaaagg aatgaaggt ctgttgaatg tcgtgaagga agcagttcct ctggaagctt 20340
 5 ctggaagaca aacaactgt gtagcgacct ttgcaggca gcggaacccc ccacctggcg 20400
 acaggtgctt ctgggccaa aagccactgt tataagatac acctgcaaag gcggcacaac 20460
 cccagtgcc cgttgtgagt tggatagtg tggaaagagt caaatggctc tctcaagcg 20520
 tattcaaca ggggctgaag gatgccaga aggtaccca ttgatggga tctgatctgg 20580
 ggctcgggtg cacatgctt acatgtttt agtcgaggtt aaaaaacgc taggcccccc 20640
 10 gaaccacggg gacgtggtt tctttgaaa aacacgatga taatatggcc acaacctg 20700
 gtctcagaa gtaaccatc tctggttg ccatgctt gctgtgtct cactcatg 20760
 ccatgtggga gctggagaaa gacgttatg tttagaggt ggactggact cccgatgcc 20820
 ctggagaaac agtgaacct acctgtgaca gcctgaaga agatgacatc acctggacct 20880
 cagaccagag acatggagtc ataggctctg gaaagacct gaccatcact gtcaaagagt 20940
 15 ttctagatgc tggccagtac acctgccaca aaggaggcga gactctgagc cactcacatc 21000
 tgctgtcca caagaaggaa aatggaattt ggtccactga aatttaaaa aattcaaaa 21060
 acaagactt cctgaagtgt gaagaccaa attactccg acggttcacg tgctcatggc 21120
 tgggcaaag aaacatggc tgaagtta acatcaagag cagtagcagt tcccctgact 21180
 ctgggagcgt gacatgtga atggcgtct tctctcaga gaagtcaca ctggacaaa 21240
 20 gggactatga gaagtattca gtgtctgcc aggaggatgt cacctgccca actgccgagg 21300
 agaccctgcc cattgaactg gcgttgaag cacggcagca gaataaatat gagaactaca 21360
 gcaccagctt ctcatcagg gacatcatca aaccagacct gcccaagaac ttgcagatga 21420
 agccttgaa gaactcacag gtggaggta gctgggagta cctgactcc tggagcactc 21480
 cccattccta cttctccct aagtctttg ttcgaatcca gcgcaagaaa gaaaagatga 21540
 25 aggagacaga ggaggggtgt aaccagaaag gtgcgttct cgtagagaag acatctaccg 21600
 aagtccaatg caaaggcggg aatgtctgctg tgaagctca gcatcgtat tacaattcct 21660
 catgcagcaa gtggcagtgt gttcctgca ggtccgatc ctagaattca ttgatccact 21720
 aggatcccgg gtaattaatt gaattacatc cctacgaaa cgtttacgg ccgccggtgg 21780
 cgcccggcc cgccggccc tcttggcc ttgcaggcca ctccggtggc tcccgtctc 21840
 30 cccgactcc aggccagca gatgcagcaa ctcatcagcg ccgtaaatgc gctgacaatg 21900
 agacagaacg caattgtct tgctaggct cccaaacca agaagaaga gacaacaaa 21960
 ccaaagccga aaacgcagcc caagaagatc aacggaaaaa cgcagcagca aaagaagaaa 22020
 gacaagcaag ccgacaagaa gaagaagaaa cccggaaaaa gagaagaat gtgcatgaag 22080
 attgaaaatg actgtatct cgtatcgcc tagccacagt aacgtagtgt ttccagacat 22140
 35 gtcgggcacc gcactatcat ggtgcagaa aatctcgggt ggtctgggg ccttcgcaat 22200
 cggcgctatc ctggtgctg ttgtgtcac tgcattggg ctccgagat aagttagggt 22260

aggcaatggc attgatatag caagaaaatt gaaaacagaa aaagttaggg taagcaatgg 22320
 catataacca taactgtata acttgaaca aagcgcaaca agacctgctg aattggcccc 22380
 gtgtccgcc tcacggaac tcggggcaac tcatattgac acattaattg gcaataattg 22440
 gaagcttaca taagctaat tcgacgaata attggatfff tttttattf tgcaattggt 22500
 5 ttttaattt tccaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 22560
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaactagatc ctcgaatcaa gcttatcgat accgtcgact 22620
 agagtcgggg cgccggccg ctcgagcag acatgataag atacattgat gagtttgac 22680
 aaaccacaac tagaatgcag tgaaaaaaat gctttattg tgaatttgt gatgctattg 22740
 ctttattgt aaccattata agctgcaata aacaagtaa caacaacaat tgcaattcatt 22800
 10 ttatgttca ggttcagggg gaggtgtggg aggttttta aagcaagtaa aacctctaca 22860
 aatgtgtaa aatcgataag gatctcgacc tcgagggggg gcccggtacc caattcgccc 22920
 tatagtgagt cgtattacgc gcgccctgc agggggccct gtaccgggct ctgctgagg 22980
 ctctgctgc ccagcaggct gaagctgggg ttgtggcca gggcacttg tgtcccatc 23040
 gcagcgggca cttgtcctc ccaatcagat ggctctgaa ggcaggcctg gccagaaggt 23100
 15 gagtgcctg gaacgtatt atccattgg ctgaggggtg tttccccga aactgctgtg 23160
 gtacacgctg ctgccgctg gacctatga gattgtga acgcagtggt cattcttgc 23220
 acactaggcc gtctgagctg gtggggactc aaggactggg tgcccaggga gctgggacag 23280
 aaccaggca gggcacttc tgggggggtg gcctggggc tctcatatg ctggcagaca 23340
 gagtcaagtc tgcccagggt agtctggcct gagtggaga ggatgggaca ctgggggctg 23400
 20 gagtgaaaa ttctgccc cttcccaga gttgtgaga tcaactccat gcctcgag 23460
 ctctgtgccc tggtagtg gatcattcct ggactcagat tgttgaag aagcccagtt 23520
 ctgggtgcca tcaagtct gctagatggg gggcttgcct tgatccgct acactggag 23580
 gtgactgtt ctggacggc tacatacaga aagagagaag tgggatgag ttcaaaggc 23640
 atctcagct tcgctgtg ccaccggag gtactcctg gcccaacacg gacttctac 23700
 25 ctcccgcct tggctctta ctgactccc ccctgctccc caattcctg ccattcccct 23760
 catttctg ccctcagcct ggactcagat tctctggga agctgcccc actccctagg 23820
 tctgtctca ccaagagcag atcacactg actgaaatgc cagctgattt gtcttcaa 23880
 gaaaattgga agctcctgga ggtcagggtc catgtctgct ttactactca gtctctgta 23940
 tgcaggcctg gactgccc cccttgaca ggtgtgcat atttgtaga aggaaggaag 24000
 30 gggccagggt ggtgggctg ggctgtggtc gggagctagc tcagcctctt agattctcta 24060
 cccgatgat gtgacctgg acagcaagt agtgtgtgta gtgagtcag acggtgcttt 24120
 gttcccctct tctctcatag cctagatggc ctctgagccc agatctgggg ctgagacaac 24180
 attgttcaa ctgaacggt atgggttcc tttctgaagg ctgaaatctg ggagctgaca 24240
 ttctggact cctgagttct gaagagcctg gggatggaga gacacggagc agaagatgga 24300
 35 aggtagagtc ccaggctcct aagatgggga atacatctcc cctcattgtc atgagagtc 24360
 actctagctg atactactg tggccaatat ctaccgtac tttttggg tggaactga 24420

ES 2 356 322 T3

gtcatgcagc agtcttatgg ttacccaag gtcaggtagg ggagacagtg cagtcagagc 24480
 acaagcccag tgtgtctgac ccaccaaga atccatgctc gtatctacaa aaatgatttt 24540
 ttctctgta atgggccta ggttcttta ttatcatggc atgtgtatgt tttcaacta 24600
 ggttacaatc tggcctata aggttaacct cctggaggcc accagccttc ctgaaacttg 24660
 5 tctgtgctgt cctgcaact ggagtgtgcc tgatgtggca ctccagcctg gacaagtggg 24720
 acacagactc cgctgttacc aggccaaag atgtctcca taagaccaga agagcaatgg 24780
 tgtagagggt tcatgggcta caataaagat gctgacctcc tgtctgaggg caagcagcct 24840
 cttctggccc tcagacaaat gctgagtgtt cccaagacta ccctcggcct ggtccaatct 24900
 catcccactg gtgcgaagg gttgctgaac tcatgacttc ttggctagcc tgcaacctcc 24960
 10 acggagtggg aactacatca ggcattttgc taactgctgt atcctaggcc aataaatgtt 25020
 gatcacattt atagctgcca tggtaggggt gggaccctg ctatctatct gtggaggctc 25080
 tgggagcccc tgacacaaac ttctgaagc agagcctccc caacccttt tccattccct 25140
 atacctgaca gatggcccag gaaccatta gaaatggaag gtcactgcag cagtatgtga 25200
 atgtgcgtgt gggagaaggg caggatcaga gccctggggg tgtggcagcc cccaagtgat 25260
 15 tctaaccag atcctagggt tgttccctg tcccattgaa atagctgctt taaggggctc 25320
 gactcaggga aatcagctc tgaattaag tggtgatttt ggagtcattt agaccaggcc 25380
 ttcaattggg atcctgctct tagagttgga tgaattattt aactgatttt cagatctcct 25440
 ctttctaat gctttcagaa gcacagtaac tgcttactct gaaatgaatt ctaccccac 25500
 ttccacatat gcacccttg cccaccctt tgggaacct ggccttaact gcttaccttc 25560
 20 aatggactc atctgttggg agatatatgc attctgccgt tcaggggtca ttgccataag 25620
 acctgatctc tgttctctt gctaaacaga agatgaaaaa gacaaattag attacagcta 25680
 ccaattaata attagcctta ggatcgtgc gtggggacct aggactggc ttgtgtcag 25740
 cagaaagcat gaataaacac accagcatic actcgcagtc atgccccacc ctctcgagca 25800
 aaattccaca ggtataaata aagtaagatt ctgcacctgg gttaaaaaca caactgcaac 25860
 25 agcatagaat ggggaggag agacagaact taatagcaag agcacacaga aaaaagtttt 25920
 aggcattttg gatgtccatc tgctcaggat gggtcagcag tgagatgctg tcaccaaag 25980
 aacaaatgta acattaggct gcattaatag aagcagagta ttagaagga gggaggtgac 26040
 agtctatgc taactctgcc ttggccagac tataaccaca ggagtctggg catgccagtc 26100
 tcaggagagac ccagacagac ttgctgcatf cagaggatgg taagtaatga gagtggggat 26160
 30 tggactcaa actaccaga caaagaatgg ctgagcaagc caaggatgct gtggctgggg 26220
 cagagcagac tgtgggctat gtagtgggtg atacctagcc tctgcagggc tctcataggg 26280
 aaaggacatt gagaagagga ctgaggcttg ttctggtgg tcctggcatg aacggccaga 26340
 tgatcacatg gtcagggtga cacagtctcc aacctggga gtagccaaac acttactgcc 26400
 aacctccgc ctttctctg actagtgtca gcataggcaa ttggaggag cttctgtct 26460
 35 ccatctgaaa gctggctggg tgggcagggg gaggagcgag ccaagttca agcccgagc 26520
 ttcagcactc agtctgggat cggctcaagg agcaaagggg aagaacatag ccaggaggga 26580

ataacatgaa ggccccaga cccagaaaag gcatgacttg ctctgagacc ctacagccggt 26640
 tgggtgcagg ttgtgactcg gatccaggct tgactcccag tccagtgtt gaagcctcac 26700
 cccacacagt gaggggagcc cggccatctc tgctcaactg ctgccatctc tctcccctc 26760
 tcaaccacca aggcagctct gtctgggagc acaagctcca agtccacttt ctggctgtg 26820
 5 tccccccaa gatgccagag gacttgctc tacaacacgg gctgcccggt cagtgcctgc 26880
 tttccagca aagggtctt ggaaccctt ctctgactc agtggggctg gtgggagtgg 26940
 ggccgggtag cgaccagtg ctgggactg tgcccagctc tcaggcctgg cagcagttcc 27000
 tggccttgg tctgccaag gcagagagga caaacacatg gcaccgggaa gactacacca 27060
 gaagcgattc caccagactg gggttgctt ttctatccc ccctagcct gcttctgtc 27120
 10 ctggtccctg cctcccctc cactggagct gccgtgtgg cagtgagggg ctgttttca 27180
 gctgccctat ggagtgccc tctccctgcc aaagcattg caaggcggca aggggtgggg 27240
 gtgggatgg ggggtggat ctgcctctc aagctctcat tatactgagc acgtctcacc 27300
 cattattta tgcctctag caacaccca tgtggactg gaggagcatg ggggtcacat 27360
 gaccactgcc caaggccaca ccatccgat ctgcctgaga tggtcagggt tggcagccat 27420
 15 ttctgaagg agtctttcg ctttgctct tctgtacca gtctcaggac atcagggcag 27480
 aagatctaca gtcccagct tactgatgtg acagcagagg ctacagaggg ttaatgact 27540
 tgccaaggt gacacggcta agaagtacag tatctcctaa ctgcagacca ggtgcttctg 27600
 ctgctctgg ggacagatt ctgcgtggct ggtaggtct aaacggctt taactccatc 27660
 cccaccggt gctgcattag ttcatcaaa taacacagtt gtacagaggt aggggttcag 27720
 20 gggcaggggc agatggaggc tggagagtgt gactaaggaa acagcagggg aagtgcggtg 27780
 aagtcgaag ggagggacgg aaagagaaag ccaagcccag gggcgtgcca gacaaaagga 27840
 aaggccacgc cggggcaggg caggctcag cgggtgctgg ggcgtctca tcccgggaag 27900
 cacacattcc agaggacccc ggagtctaat gaaaagctg gccagcctat cactatggaa 27960
 actgccaagg ccacacagcg ctgctgacac ccagcctggg tgccggtggc cagctctgca 28020
 25 ggatctcaa gtctggggtg ccaccagcaa gcgacgtcc tccatgggtc cttcacctta 28080
 cggcagtgct cagaggcacc gccagcctc tgctcctat ctggtcctgc tgccctggc 28140
 aaaaggagcc agagcattct ctccaggct cccgaggagg ctgctcctt tgtttgagc 28200
 atggaggctc ccatccttg ttctgaatca atgtgctca aagataagcc ccaagaaaac 28260
 agttgtgccc tttgacact gacaattaga atcgttggaa aatggagaaa acaggaaatg 28320
 30 gcaaatggtt tcagtacca ggaggaaacc gtgcctgaaa gttgctgctt agtgactggg 28380
 acactgctt tctgtctt tatgaaggac agcctagccc gtgtggcctt ttataaaca 28440
 agctatgaag gggctgctaa attttctagg gctgcaactg tggcactacg tctgttgtg 28500
 ccaggtgaca ctgacaagca gcaactgatt ctatgcaagc ccagggtgct tctctcatg 28560
 gtgacccca gagaactaag gccagctct tctctgtca cacccctccc agccccact 28620
 35 gtcagacaag ggaccacatt cacagacagt ctacgcaag atggcaacct tgaagtctt 28680
 ggggatgctt tttagaagc tcgcgccct agggccggc ctaattaaa tcaagcttat 28740

cgataccgtc gagacctcga gggggggcat cactccgccc taaaacctac gtcaccgcc 28800

ccgttccac gccccgcgcc acgtcacaaa ctccacccc tcattatcat attggctca 28860

atccaaaata aggtatatta ttgatgatgt tt 28892

<210> 9

5 <211> 29511

<212> DNA

<213> Quimérico

<220>

<221> 5' ITR

10 <222> (1)..(438)

<223> Primera secuencia terminal invertida repetida y señal de empaquetamiento

<220>

<221> Relleno

15 <222> (439)..(10905)

<223> Primera secuencia no codificante de relleno

<220>

<221> AFP(p+e)

<222> (10906)..(11845)

20 <223> Promotor de alfa feto proteína (AFP). Incluye la región del promotor (p) y del potenciador (e)

<220>

<221> SFV

<222> (12175)..(19281)

25 <223> Región del replicón procedente del virus SFV

<220>

<221> LacZ

<222> (19325)..(22397)

30 <223> Secuencia correspondiente al gen LacZ de Escherichia coli (Gen exógeno como gen reportero)

<220>

<221> PoliA

<222> (23295)..(23554)

<223> Secuencia de poliadenilación derivada del virus SV40

35 <220>

<221> Relleno

<222> (23555)..(29350)

<223> Segunda secuencia no codificante de relleno

<220>

<221> 3' ITR

5 <222> (29351)..(29511)

<223> Segunda secuencia terminal invertida repetida

<400> 9

aaacatcatc aataatatac cttattttgg attgaagcca atatgataat gagggggtgg 60
 agtttgtgac gtggcgcggg gcggtgggaac ggggcgggtg acgtagtagt gtggcgggaag 120
 10 tgtgatgttg caagtgtggc ggaacacatg taagcgacgg atgtggcaaa agtgacgttt 180
 ttggtgtgcg ccggtgtaca caggaagtga caattttcgc gcggttttag gcggatgttg 240
 tagtaaattt gggcgtaacc gagtaagatt tggccatttt cgcgggaaaa ctgaataaga 300
 ggaagtgaaa tctgaataat tttgtgttac tcatagcgcg taatattgt ctagggccgc 360
 ggggacttg accgtttacg tggagactcg cccaggtgtt tttctcaggt gtttccgcg 420
 15 ttccgggtca aagttggcgt tttgatatca agcttatcga taccgtcaaa caagtcttta 480
 attcaagcaa gactttaaca agttaaagg agcttatggg taggaagtag tgttatgatg 540
 tatgggcata aagggtttta atgggatagt gaaaatgtct ataataatac ttaatggct 600
 gcccaatcac ctacaggatt gatgtaaaca tggaaaagg caaaaactg ggtcactaaa 660
 atagatgatt aatggagagg atgaggtga tagttaaag tagataagtg gtctattct 720
 20 caataaaaa gtgaacataa ggcgagtttc tacaagatg gacaggactc attcatgaaa 780
 cagcaaaaac tggacattg ttctaactt tgaagatgata gaaaaattcc tattttaaag 840
 gtaaaacagt aactcacagg aaataccaac ccaacataaa atcagaaaca atagtctaaa 900
 gtaataaaaa tcaaactgtt gcacgatcaa attatgaatg aaattcacta ctaaaattca 960
 cactgatttt gtttcatcca cagtgtcaat gttgtgatgc attcaattg tgtgacacag 1020
 25 gcgactgtg gatcaaaaagt ggtttctggt gcgacttact ctctgagta tacctgcagt 1080
 ccccttctt aagtgtgta aaaaaaagg gggatttct caattcgcca atactctagc 1140
 tctccatggt ctttctagga aacaagtgtt aaccacctt atttgtcaaa ctagctcca 1200
 aaggactttt gactccccac aaaccgatgt agctcaagag agggatctctg tcaccagtat 1260
 gtatagttaa aaaagtatcc caagtccaa cagcaattcc taaaaggagt ttatttaaaa 1320
 30 aaccacacac acctgtaaaa taagtatata tcctccaagg tgactagttt taaaaaaca 1380
 gtattggctt tgatgtaaag tactagttaa tatgttagaa aaatctcact gtaaccaagt 1440
 gaaatgaaag caagtatggt ttgcagagat tcaaagaaaa tataagaaaa cctactgttg 1500
 ccactaaaaa gaatcatata tfaaatatac tcacacaata gctcttcagt ctgataaaat 1560
 ctacagtcac aggaatggat ctatcactat ttctattcag tgctttgatg taatccagca 1620
 35 ggtcagcaaa gaatttatag cccccctga gcacacagag ggctacaatg tgatggcctc 1680
 ccatctcctt catcacatct cgagcaagac gttcagctct acagaaataa aatcaggaat 1740

ttaatagaaa gttcataca ttaaacttta taacaacac ctcttagtca ttaaactcc 1800
 acaccaacct gggcaatata gtgagacccc atgcctgcaa aaaaaaaaaa attagccagg 1860
 catggtagca tgcacctga gtcccagcta ctgagaggt gaggtgggaa aatcacttta 1920
 gtgcaggatg ttgaggctgg agtgaactgt gattgtgcca ctgactcca gcctggacaa 1980
 5 tagagcaaga cctgtctca aaaaaatgca ttaaaaattt ttttaaatc ttccacgtat 2040
 cacatccttt gccctcatgt ttcataaggt aaaaaatttg atacctcaa aaaaaccaag 2100
 catacacta tcataatttt ttttaaatgc aaataaaaac aagataccat ttccacctat 2160
 cagactggca gtttctgatt aatgaaatt ttctggataa tatacaatat taagagagac 2220
 tgtagaaact gggccagtggt ctcactgctg taatcccagc actttgggag gctgggtaac 2280
 10 atggcgaacc ctgtttctac aaaataaaaa tattagctgg gagtgggtgc gcacacctat 2340
 agtcccagct actcaggagg ctgaggtgga aggatcgctt gaaccagga ggttgagact 2400
 gcagtgaact gtgatcattc tctgactg caccagcc tggcaacag agacctgtc 2460
 tcaaaaaaaaa aaaaaaaga gacaaattgt gaagagaaag gtactctcat ataactcag 2520
 gagtataaaa tgattcaact tcttagagga aaattggca ataccaaaat attcaataaa 2580
 15 ctctttccc ttgaccaga aattccact gaataaagct gaacaagtac caacatgta 2640
 aaagaatgtt tctctagta cagtcggtaa gaacaaaata gtgtctatca atagtggact 2700
 ggttaaatca gttatggtat ctccataaga cagaatgcta tgcaacctt aaaatatatt 2760
 agatagctct agacacacta atattaaaag tgcataata catttaaac tatactcata 2820
 cgttaaaata taaatgtata tatgtactt tgcatatagt atacatgat aggccagtgc 2880
 20 ttgagaagaa atgtgtacag aaggctgaaa ggagagaact ttagtctct tgttatggc 2940
 ctccatagtt agaataattt ataacacaaa tttttgata ttataattt aaaaaa 3000
 cacagaatag ccagacatac aatgcaagca ttcaatacca ggtaagggtt ttactgtaa 3060
 ttgactaac agaaaattt caagctagat gtgcataata ataaaaatct gacctgct 3120
 tcatgtgatt cagccccagt ccattacct gtttaggact gagaaatgca agactctggc 3180
 25 tagagttcct tctccatct ccttcaatg ttactttgt tctggtccct acagagtccc 3240
 actataccac aactgatact aagtaattag taaggccctc ctctttatt ttaataaag 3300
 aagatttag aaagcatcag ttatttaata agttggccta gtttatgtc aaatagcaag 3360
 tactcagaac agctgctgat gttgaaatt aacacaagaa aaagtaaaaa acctcattt 3420
 aagatctac ttactgtcc ataattagtc catgaggaat aaacacctt tccaaatcct 3480
 30 cagcataatg attaggtatg caaaataaat caaggtcata acctggtca tcatcactaa 3540
 tctgaaaaag aaatagact gttcaatga gagcattaca ggatacaaac atttgattgg 3600
 attaagatgt taaaaataa ccttagtcta tcagagaaat ttaggtgtaa gatgatatta 3660
 gtaactgta actttgtagg tatgataatg aattatgtaa gaaacaaca ggccggcgg 3720
 gttggtcac acgtgtaac ccagcactt gggaggctga ggcaggcaga ctgcctgagc 3780
 35 tcaggagttc gagaccagcc tgggcaacac ggtgaaatcc cgtcttact aaaaatacaa 3840
 aaaaattagc cgggtgtggt gacacatgcc ttagtccca gctactggg aggtgaggc 3900

ES 2 356 322 T3

aggagaatca cttgaacctg ggaggtgaag gttgcagtga gccaaatgg caccactca 3960
 ctccagcctg ggaacacagag caagactctg tctctgagct gagatggcac cacttcactc 4020
 cagcctggga aacagagcaa gactctgtct caaaaaaac aaaacacaca acaaaaaaa 4080
 caggctgggc gcggtggctc acgcctgtaa tcccagcact ttgggaggcc gaggcgggtg 4140
 5 gatcacctga ggtcaggagt tccagaccag ccttgtcaac atggtgaaac ctccccccgc 4200
 cgtctctact aaaaatacaa aaattagcca ggcgtggtgg caggagcctg taatcccagc 4260
 tacttgggag gctgaggcag gagaatcgt tgtaccaga aggagaggt tgcactgagc 4320
 tgagatggca ccattgcact ccagcctggg ggacaagagc gagatttctg ctttaaaaa 4380
 caaaaaaaa acaaaaaacc atgtaactat atgtctagt catcttagtc aagaatgtag 4440
 10 aagtaaagtg ataagatatg gaatttcct taggtcacia agagaaaaag aaaaattta 4500
 aagagctaag acaaacgag caaaatctt atattaata atattctaa catgggtgat 4560
 gaacatacgg gtattcatta tactattctc tccactttg agtatgttg aaaatttagt 4620
 aaaacaagtt ttaacacact gtagttaac aagataaat atcacactga acaggaaaa 4680
 ctggcatggt gtggtggctc acactgtaa tcccagtgtc ttgggaggct gagacaggag 4740
 15 agttgcttga ggccaggagt tcaagaccga catggggaat gtagcaagac cccgtcccta 4800
 caaaaaactt tgtaaaaatt tgccaggat ggtggtgcat acctgtagtc ccagctactc 4860
 gggaggcggga ggcagaagga atcacttgag cccaggagtt tgaggctgca gtgagctacg 4920
 atcataccac agcactccag cgtggacaac agagtaagac cctatctca aaacaaaaca 4980
 aaacaaaaca acaaaaaaaa accacaagaa aaactgctgg ctgatgcagc ggctcatgcc 5040
 20 tgtaatccca gtattttggg aggccagggt gggcgtatca cctgaggta ggagttagag 5100
 accagcctgg ccaacatggt gaaacccat ctctactaa aatacaaat tagccaggca 5160
 tgtggcacgc gcctgtagtc ccagtactg ggaggctgaa gcaggaggat cacctgagcc 5220
 cgggagggtg aggttgagt gagccgagat cacaccactg cactccagcc tgggtgacac 5280
 agcaatacc tacctcaaaa taaaaaagaa aaagaaaaga aaagttgctg tccccgctac 5340
 25 cccaatccca aatccaaaca gcctctctca tctcacagta agggggaaaa atcacccaaa 5400
 aaagctaagt gatctttga aaacccaac tcttagaagt ctaagattat tatagcaac 5460
 tcatgaagt tcatcataaa agatactcta atattatta agtagaacca catattggtt 5520
 gtcttggtat gtctagcccc tggcatacaa aatatttaac aactgata tggtagctgt 5580
 gatgtgaaaa tctactatga gtacagcttt ataatacta tatatgtacc tatatacaga 5640
 30 aaaaaataca acaaaatcat aaaagcactt atcttgaaa gaggagttac agcaattta 5700
 tttagttctt tattgctttg ctatatattc taaattttt tcaatgaata tatatcactt 5760
 ttaaaaaaat tcaatggtct ttctataaa ttactttgg cagcatgctt tttatata 5820
 acatataaaa tctatgggaa atttttaag gatacattaa attaaagcaa aatatacaaa 5880
 caaaaaatca gaatacaaaa agataaaaag attgggaagg gagggagga gtaaggagga 5940
 35 aggggtgggtg ggtatagaga aatatacaaa ataaggtgaa gaagtggtt cttgacactt 6000
 tctacacttt ttttaataa aaaaaattt ttctctctc tttttttt ttagagacga 6060

agtctcgcta tgtgcccag gctggcttg aactcctggg atcaagagat cctcctgcct 6120
 cagcctccca aggtgcttg attacaggg tgagccacca cgcctgtgca cttctacac 6180
 ttaatatat atatttttc atttcaatg tcattttat tagttaatt ataataccca 6240
 ttaccatta tattcaaagt ctatttgaag aaataaacca gaagaatga aataacttag 6300
 5 ctccatgct attcaatact aaattacct tcaaatcaca ttcaagaagc tgatgatta 6360
 agctttggcg gttccaata aatattggc aaaccataat taaatctcaa tatatcagtt 6420
 agtacctatt gagcatcctc tttacaacc taagcattgt attagggtct taaatacaag 6480
 cagcttgact ttaatacat ttaaaaatac atatttaaga cttaaaatct tatttatgga 6540
 attcagttat atttgaggt ttccagtgct gagaaattg aggtttgtgc tgccttcag 6600
 10 tcccaaaagc tcagttctga gttctcagac ttgggtggaa ctccatgtat tgcagggtg 6660
 gcccgaata cctgtgggac aactcagcc cctgtgcaca tggccaggag gctggtgca 6720
 aacatttca ggtaggtgga ccaggacatg cccctgtgca tggccagggtg gaggcatagt 6780
 gctatacagc aggcagaagt caatattgat ttgttttaa agaaacatgt actacttca 6840
 taagcagaaa aaatttctat tctggggga aaagattatg ccagatcctc taggattaaa 6900
 15 tgctgatgca tctgctaaac ctccacatag cagaacatag ttactataga aagaatgaaa 6960
 atgggacatt tgtgtgtcac ctatgtgaac attccaaaaa tattttaca caactaagta 7020
 tttataaat tttatgaact gaaatttagt tcaagttcta ggaaaataca aacctgcta 7080
 gatattataa aaatgataca atatatact attcaggct catcagaata tatctgtat 7140
 cacttgacaa gaatgaaaat gcaccatttt gtagtgcttt aaaatcagga agatccagag 7200
 20 tactaaaaat gactcttcc ttgaagctta ctaccaact tctcccagtt tactactgc 7260
 ttctgccaca agcataaact aggaccagc cagaactccc ttgaatata cactgcaac 7320
 gattactgca tctatcaaaa tggttcagtg cctggctaca ggttctgcag atcgactaag 7380
 aattgaaaa gtctgttta ttcaaagga agcccatgtg aattctgcc agagttcatc 7440
 ccagatagc agtctaagaa tacagacaga tcagcagaga tgtattctaa aacaggaatt 7500
 25 ctggcaatat acaaaattga ttccaatca aaacagattt acataccata ctatgtcaa 7560
 gaagttgttt tgtttattg catcctagat tttattttt tgatttatgg ttactttaa 7620
 gcataaaaaa ttgtcaata caactcttc caaaaggcat aaacaaaaat tcataaaact 7680
 tgcactact gagatactc aggtatgaat tcacaactt gttacaact actatatata 7740
 tgcacacata tatatatatt tgggtatatt gggggggttc taatttaaga aatgcataat 7800
 30 tggctataga cagacagttg tcagaactg gcaatgggta cgtgcaggtt cattatacca 7860
 agtctactg tagttgtca aaatgtatca taatacaagg cggggcgagg tctcagcc 7920
 tgtaatccca gcattttgg aggctaaggc aggaggattg cttgaggta ggagttgtg 7980
 accagcctgg gcaacagagc aagaccctgt ctcaaaaag aaaaaaata atttttaca 8040
 aaataaaaac aaaatgtatc atcagacgaa attaaataag aggcaattca tttaaatgac 8100
 35 aactttccc agctgacat ttaacaaaa gtctaagtc tcttaattca tattaatga 8160
 tcaaatatca aatactaatt tttttttt tttttttt gagacggagt ctgcctctgt 8220

ES 2 356 322 T3

cgcccaggct ggagtgcaat ggcgcgatcc tggctcactg caagctccgc ctcccgggtt 8280
 cagccattc tctgcctca gcctcccag tagctgggat tacagacatg cgccaccacg 8340
 cccggctaatt tttgtattt tagtagagat ggggtttctc catgttggtc aggctgttct 8400
 tgaattccc acctcagggt atctgcctc ctcagcctca caaagcagta gctgggacta 8460
 5 caggcaccca ccaccacact tggtaattc tttgtattt ttttgtaaa gacgggattt 8520
 caccatgta gccaggatgg tctgatctc ctgatctcat gatccgcccg cctcagcctc 8580
 ccaaagtgtc gggattacag gcgtgagcca ccccgcccgg ccatcaaata ctaattctta 8640
 aatgtaagg acccactatt cagaacctgt atccttatca ctaatatgca aatatttatt 8700
 gaatactac tatgtcatgc atactagaga gagttagata aatttgatc agctaccctc 8760
 10 acagaacta cagtgaata gatggcatga catgtacatg agtaactgtg aacagtgtta 8820
 aattgtatt taaaaaaaa gacggctggg cgctgtggct catgcctgta atcccagcac 8880
 tttgggaggc caaggcaagt tgatcgtcg aggtcaagag ttcgagacca gcctggccaa 8940
 cgtgtaaaa cccctctct actaaaaata caaaaaaaaa attagccagg catgtggca 9000
 caggcctgta atcccagcta ctaggaggc tgagacatgg agaactgctt gaatccagga 9060
 15 ggagaggtt acagtgagcc gagatcacac cactacactc cagcctgagt gacagagcga 9120
 gactcctgtc taaaaaaaa aaaaaaaaa aagatacagg ttaagtgtta tggtagtga 9180
 agagagaact caaactctg ctcagaagcc tcaactgcat gtggaccact gatatgaaat 9240
 aatataata ggtataattc aataaatagg aactcagtt ttaatcatcc caaacaccaa 9300
 aacttctat caaacaggc caataaactc aatctctata agagctagac agaatctac 9360
 20 ttgtggcct ataatttat tagcccttac ttgtccatc tgatattaat taaccctac 9420
 taatatgat tagttaacaa tccagtggtc gcttgacag gaacagttg agagagttg 9480
 ggattgcaac atattcaatt atacaaaaat gcattcagca tctacctga ttaaggcagt 9540
 gtgcaacaga attgacagga gagtaaaaga atgattataa atttacaacc ctaaagagc 9600
 tatagctggg cgtgtggct catgcctgta aatcccagca ctttgggagg ctgaggcggg 9660
 25 tggatcacct gaggccagaa gtcaagacc agcctagcca acatggcgaa accctgtctc 9720
 tacaaaaat acaaaaatta gccgggtgtg gtggcacgtg cctgtagtcc cagttactg 9780
 ggaggccgag gcaggagaat cgctgaacc taggaggtg aggctcagt gagccgagat 9840
 tgtccactg cactccact cagcctggc gacaagagca agactccgtc aaaaaaaaa 9900
 aaaaaaaaa aaagctaaa atctagtggtg aaaggcatat atacataca ctaactgtat 9960
 30 agcataata agctcataat ctgtaacaaa atctaattcg acaagcccag aaactgtga 10020
 ttaccaaaa acagttatat atacacaaaa agtaaaccta gaaccaaag ttaccagca 10080
 ccaatgattc tctccctaa cagtatcaag tttaaagcag tgattacatt ctactgccta 10140
 gattgtaaac tgagtaaagg agaccagcac ctttctgcta ctgaactagc acagccgtgt 10200
 aaaccaacaa ggcaatggca gtgcccaact ttctgtatga atataagta catctgttt 10260
 35 attattgtg actggtgtt gcattgggtt attatcaaca cctctgaaa gaacaactac 10320
 ctgctcaggc tgccataaca aaataccaca gactgagtga ctaacagaa acttattct 10380

ES 2 356 322 T3

cacagtttg gaggctggga agtccaaaat taaggtacct gcaaggtagg ttcaatctc 10440
aggcctcttc ttggcttga aggtcttcta actgtgtgct cacatgacct ctctaaca 10500
gctctctggt gtctctttt tttttttt ctttttgag acagagtctc actctgtcac 10560
ccaggctgga gtacagtggc acaatctggg ctcaactgcaa cctccaactc ccgggttcaa 10620
5 gtgatttca tgcctcacc tcccgagtag cttggatgac aggagcccgc taccacacc 10680
agctaattt tgtatttta gtagagatgg tgttcacta cattggccag gctggttca 10740
aactctgac ctggtgatcc acccacttg gcctccaaa gtgctgggat tacaggtgtg 10800
agccactcg cccgtcctgg tgtctttca tataaggga ctaatccaat cagacctggg 10860
cccagctct cgcgaccggg ctgcaggaat tcgatcgcgt gctagaattc gcctgcata 10920
10 cagctaataa tgaccataa gacaattaga tttaaattag tttgaatct ttctaatacc 10980
aaagttcagt ttactgttc atgttcttc tgagtggctt cacagactta tgaaaagta 11040
aacggaatca gaattacatc aatgcaaaag cattgctgtg aactctgtac ttaggactaa 11100
actttgagca ataacacaca tagattgagg attgttctg gtagcatac aaactctggt 11160
tcaaagctcc tctttattg ttgtcttga aaattgctg ttctcatgg ttctctttt 11220
15 cactgtatc ttttttct aaccactcac atggctacaa taactgtctg caagcttatg 11280
attcccaaat atctatctc agcctcaatc ttgtccaga agataaaaag tagtattcaa 11340
atgcacatca acgtctccac ttggagggtc taaagacgtt tcaacataca aaccggggag 11400
tttgcctgg aatgttctc aaaatgtgtc ctgtagcaca tagggctcct ttgttcctta 11460
aaatctaatt acttttagcc cagtgtcat cccacctatg gggagatgag agtgaaaagg 11520
20 gaggctgatt aataattaca ctaagtcaat aggcataag ccaggactgt ttgggtaaac 11580
tggtcacttt atctaaact aaatatacc aaaactgaac atgtacttag ttactaagtc 11640
tttgacttta tctcattcat accactcagc ttatccagg ccacttatt gacagtctag 11700
ctagccccta gattttctgc cccaaagagc tctgtgtct tgaacataaa atacaataa 11760
ccgctatgct gtaattatt ggcaaatgtc ccaatttcaa cctaaggaaa taccataaag 11820
25 taacagatat accaacaataa ggtfactagt taacaggcat tgctgaaaa gagtataaaa 11880
gaatttcagc atgatttcc atggcggatg tggacatac acgacgcaa aagattttgt 11940
tccagctct gccacctccg ctacgcgaga gattaaccac ccacgatggc cgccaaagt 12000
catgttgata ttgaggctga cagccattc atcaagtctt gcagaaggc atttccgtcg 12060
ttcgaggagg agtcattgca ggtcacacca aatgacctg caaatgccag agcattttcg 12120
30 cacctggcta ccaattgat cgagcaggag actgacaaag acacactcat cttggatc 12180
ggcagtgcc cttccaggag aatgatgtct acgcacaaat accactgcgt atgccctatg 12240
cgcagcgcag aagaccccga aaggctcgtg tgctacgcaa agaaactggc agcggcctcc 12300
gggaagggtc tggatagaga gatcgcagga aaaatcaccg acctgcagac cgctatggct 12360
acgccagacg ctgaatctcc taccttttc ctgcatacag acgtcacgtg tcgtacggca 12420
35 gccgaagtgg ccgtatacca ggacgtgtat gctgtacatg caccaacatc gctgtacat 12480
caggcgatga aagggtcag aacggcgtat tggattgggt ttgacaccac cccgtttatg 12540

ttgacgcg tagcagcg gtagcgaac tacgccaca actgggccga cgagcagtg 12600
 ttacaggcca ggaacatagg actgtgtgca gcatcctga ctgagggaag actcggcaaa 12660
 ctgtccattc tccgaagaa gcaattgaaa ccttgcgaca cagtcatgtt ctcggttaga 12720
 tctacattgt aactgagag cagaaagcta ctgaggagct ggcacttacc ctccgtattc 12780
 5 cacctgaaag gtaaacatc cttacctgt aggtgagata ccatcgtatc atgtgaagg 12840
 tacgtagtta agaaaatcac tatgtgcccc ggctgtacg gtaaacggg aggttacgcc 12900
 gtgacgtatc acgaggaggg attcctagtg tgcaagacca cagacactgt caaaggagaa 12960
 agagtctcat tccctgatg cacctacgtc ccctcaacca tctgtgatca aatgactggc 13020
 atactagcga ccgacgtcac accggaggac gcacagaagt tgtagtggg attgaatcag 13080
 10 aggatagtgt tgaacggaag aacacagcga aacactaaca cgatgaagaa ctatctgctt 13140
 ccgattgtgg ccgtgcatt tagcaagtgg gcgagggaat acaaggcaga cctgatgat 13200
 gaaaaacctc tgggtgtccg agagaggta cttactgtc gctgctgtg ggcatttaa 13260
 acgaggaaga tgacacccat gtacaagaaa ccagacacc agacaatagt gaaggtgcct 13320
 tcagagtta actcgttctg catcccagc ctatgttcta caggcctcgc aatcccagtc 13380
 15 agatcacgca ttaagatgt tttggccaag aagaccaagc gagagtaat acctgttctc 13440
 gacgcgtcgt cagccaggga tgctgaacaa gaggagaagg agaggttga ggccgagctg 13500
 actagagaag ccttaccacc cctcgtcccc atcgcgccg cgagacggg agtcgtcagc 13560
 gtcgacgttg aagaactaga gtatcacgca ggtgcagggg tcgtgaaac acctcgcagc 13620
 gcgttgaag tcaccgcaca gccgaacgac gtactactag gaaattacgt agttctgtcc 13680
 20 ccgagaccg tgctcaagag ctcaaagtg gccccgtgc accctctagc agagcaggtg 13740
 aaaataataa cacataacgg gagggccggc ggttaccagg tcgacggata tgacggcagg 13800
 gtctactac catgtggatc ggccattccg gtcctgagt ttcaagctt gagcgagac 13860
 gccactatgg tgtacaacga aaggaggtc gtcaacagga aactatacca tattgccgtt 13920
 cacggaccgt cgctgaacac cgacgaggag aactacgaga aagtcagagc tgaagaact 13980
 25 gacgccgagt acgtgttca ctagataaa aaatgctgc tcaagagaga ggaagcgtc 14040
 ggttggtgt tgggtggaga gtaaccaac cccccgtcc atgaattcg ctacgaagg 14100
 ctgaagatca ggccgtcggc accatataag actacagtag taggagtctt tgggttccg 14160
 ggatcaggca agtctgctat tattaagagc ctctgacca aacacgatct ggtcaccagc 14220
 ggcaagaagg agaactgcca ggaatagtt aacgacgta agaagcaccg cggaagggg 14280
 30 acaagtaggg aaaacagta ctccatcctg ctaaaccggg gtcgtcgtc cgtggacatc 14340
 ctatatgtgg acgaggctt cgctgccat tccgtactc tgctggccct aattgctt 14400
 gttaacctc ggagcaaat ggtgttatgc ggagaccaca agcaatgagg attctcaat 14460
 atgatgcagc ttaaggtaa ctcaaccac aacatctgca ctgaagatg tcaaaaagt 14520
 atatccagac gttgacgag tccagtcag gccatcgtg ctacgttga ctacggaggc 14580
 35 aagatgagca cgaccaacc gtgcaacaaa ccataatca tagacaccac aggacagacc 14640
 aagccaagc caggagacat cgtgtaaca tgctccgag gctgggcaaa gcagctcag 14700

ES 2 356 322 T3

ttggactacc gtggacacga agtcatgaca gcagcagcat ctgagggcct cacccgcaaa 14760
 ggggtatacg ccgtaaggca gaaggtgaat gaaaatccct tgtatgcccc tgcgtcggag 14820
 cacgtgaatg tactgctgac gcgcactgag gataggctgg tgtggaaaac gctggccggc 14880
 gatccctgga ttaaggtcct atcaaacatt ccacagggta actttacggc cacattggaa 14940
 5 gaatggcaag aagaacacga caaaataatg aaggtgattg aaggaccggc tgcgcctgtg 15000
 gacgcgttcc agaacaaagc gaacgtgtgt tgggcgaaaa gcttgggtcc tgtcctggac 15060
 actgccggaa tcagattgac agcagaggag tggagcacca taattacagc atttaaggag 15120
 gacagagctt actctccagt ggtggccttg aatgaaattt gcaccaagta ctatggagtt 15180
 gacctggaca gtggcctgtt ttctgccccg aaggtgtccc tgtattacga gaacaaccac 15240
 10 tgggataaca gacctggtgg aaggatgtat ggattcaatg ccgcaacagc tgccaggctg 15300
 gaagctagac ataccttctt gaagggcgag tggcatacgg gcaagcaggc agttatcgca 15360
 gaaagaaaaa tccaaccgct ttctgtgctg gacaatgtaa ttctatcaa ccgacggctg 15420
 ccgcacgccc tgggtgctga gtacaagacg gttaaaggca gtagggttga gtggctggtc 15480
 aataaagtaa gagggtacca cgtcctgctg gtgagtgagt acaacctggc ttgcctcga 15540
 15 cgcagggtca cttggtgtc accgctgaat gtcacaggcg ccgatagggt ctacgacctt 15600
 agtttaggac tgccggctga cgccggcagg ttcgacttgg tctttgtgaa cattcacagc 15660
 gaattcagaa tccaccacta ccagcaggtg gtcgaccacg ccatgaagct gcagatgctt 15720
 gggggagatg cgctacgact gctaaaacct ggccgcatct tgatgagagc ttacggatac 15780
 gccgataaaa tcagcgaagc cgtgtttcc tccttaagca gaaagtctc gtctgcaaga 15840
 20 gtgttgccc cgattgtgt caccagcaat acagaagtgt tctgtgtt ctccaactt 15900
 gacaacggaa agagaccctc tacgctacac cagatgaata ccaagctgag tgccgtgtat 15960
 gccggagaag ccatgcacac ggccgggtgt gcaccatcct acagagttaa gagagcagac 16020
 atagccacgt gcacagaagc ggctgtggtt aacgcagcta acgcccgtgg aactgtaggg 16080
 gatggcgtat gcagggccgt ggcaagaaa tggccgtcag cctttaaggg agcagcaaca 16140
 25 ccagtgggca caaftaaac agtcatgtgc ggctcgtacc ccgcatcca cgctgtagcg 16200
 cctaatttct ctgccacgac tgaagcggaa ggggaccgag aattggccgc tgtctaccgg 16260
 gcagtggccg ccgaagtaa cagactgtca ctgagcagcg tagccatccc gctgctgtcc 16320
 acaggagtgt tcagcggcgg aagagatagg ctgcagcaat ccctcaacca tctattcaca 16380
 gcaatggacg ccacggacgc tgacgtgacc atctactgca gagacaaaag ttgggagaag 16440
 30 aaaatccagg aagccattga catgaggacg gctgtggagt tgctcaatga tgacgtggag 16500
 ctgaccacag acttggtag agtgcacccc gacagcagcc tgggtgggtcg taagggtctac 16560
 agtaccactg acgggtcgt gctactgtac ttgaaggta cgaaattcaa ccaggctgct 16620
 attgatattg cagagatact gacgtgtgg ccagactgc aagaggcaaa cgaacagata 16680
 tgctatacg cgctgggca aacaatggac aacatcagat ccaaattgcc ggtgaacgat 16740
 35 tccgattcat caacacctcc caggacagtg ccctgcctgt gccgctacgc aatgacagca 16800
 gaacggatcg cccgccttag gtcacaccaa gttaaaagca tgggtggttg ctcatctttt 16860

ES 2 356 322 T3

cccctcccg aataccatgt agatggggtg cagaaggtaa agtgcgagaa ggttctcctg 16920
 ttcgacccga cggtagcttc agtggtagt ccgcggaagt atgccgcatc tacgacggac 16980
 cactcagatc ggtcgttacg agggttgac ttgactgga ccaccgactc gtctccact 17040
 gccagcgata ccatgtcgt acccagttg cagtcgtgtg acatcgactc gatctacgag 17100
 5 ccaatggctc ccatagtagt gacggctgac gtacaccctg aaccgcagg catcgcgac 17160
 ctggcggcag atgtgaccc tgaaccgcga gaccatgtgg acctcgagaa cccgattcct 17220
 ccaccgcgcc cgaagagagc tgcatacctt gcctcccgcg cggcggagcg accggtgccg 17280
 gcgccgagaa agccgacgcc tgcccgaagg actgcgttta ggaacaagct gcctttgacg 17340
 ttcggcgact ttgacgagca cgaggctgat gcgttgccct ccgggattac ttcggagac 17400
 10 ttcgacgacg tctcgcgact aggccgcgcg ggtgcatata tttctcctc ggactgctc 17460
 agcggacatt tacaacaaa atccgttagg cagcacaatc tccagtgcgc acaactggat 17520
 gcggtccagg aggagaaaat gtaccgcga aaattgata ctgagagga gaagctgtg 17580
 ctgctgaaaa tgcagatgca cccatcgag gctaataaga gtcgataca gtctcga 17640
 gtggagaaca tgaagccac ggtggtggac aggtcacat cgggggccag attgtacag 17700
 15 ggagcggcag taggccgat accaacatac gcggttcggt acccccgcc cgtgtactcc 17760
 cctaccgtga tcgaaagatt ctcaagcccc gatgtagcaa tgcagcgtg caacgaatac 17820
 ctatccagaa attaccaac agtggcgtcg taccagataa cagatgaata cgacgcatac 17880
 ttggacatgg ttgacgggtc gtagatgtg ttggacagag cgacattctg cccggcgaag 17940
 ctccggtgct acccgaaca tcatgcgtac caccagccga ctgtacgcag tgccgtccc 18000
 20 tcacccttc agaacacact acagaacgtg ctagcggccg ccaccaagag aaactgcaac 18060
 gtcacgcaaa tgcgagaact acccaccatg gactcggcag tgtcaactg ggagtgttc 18120
 aagcgtatg cctgtcccg agaatttgg gaagaatag ctaacaacc tatccggata 18180
 accactgaga acatcactac ctatgtgacc aaattgaaag gcccgaaagc tgctgcctg 18240
 ttcgctaaga cccacaactt ggttccgctg caggagggtc ccatggacag attcacggtc 18300
 25 gacatgaaac gagatgtaa agtactcca gggacgaaac acacagagga aagacccaaa 18360
 gtccaggtaa tcaagcagc ggagccattg gcgaccgctt acctgtgcg catccacagg 18420
 gaattagtaa ggagactaaa tgctgtgta cgcctaacg tgcacacatt gttgatatg 18480
 tcggccgaag actttgacg gatcatgcc tctcactcc acccaggaga cccggttcta 18540
 gagacggaca ttgatcatt cgacaaaagc caggacgact cttggctct tacaggttta 18600
 30 atgatcctg aagatctagg ggtgatcag tacctgctg actgatcga ggcagcctt 18660
 ggggaaatat ccagctgta cctaccaact ggcacgcgt tcaagttcg agctatgatg 18720
 aaatcgggca tgtttctgac tttgttatt aacactgtt tgaacatcac catagcaagc 18780
 agggfactgg agcagagact cactgactcc gcctgtgcg ccttcatcg cgacgacaac 18840
 atcgttcacg gtagtctc cgacaagctg atggcggaga ggtgcgcgtc gtgggtcaac 18900
 35 atggaggta agatcattga cgctgcatg ggcgaaaaac cccatattt ttgtgggga 18960
 tcatagttt ttgacagct cacacagacc gcctgccgtg ttcagacc acttaagcgc 19020

ES 2 356 322 T3

ctgttcaagt tgggtaagcc gctaacagct gaagacaagc aggacgaaga caggcgacga 19080
gcactgagtg acgaggttag caagtgggtc cggacaggct tgggggccga actggaggtg 19140
gcactaacat ctaggatga ggtagagggc tgcaaaagta tcctcatagc catggccacc 19200
ttggcgaggg acattaagcc gtttaagaaa ttgagaggac ctgttataca cctctacggc 19260
5 ggtcctagat tggtaggta atacacagaa ttctgattat agcgactat tatatagcac 19320
catggatccc gtcgttttac aacgtgtga ctgggaaaac cctggcgta cccaacttaa 19380
tcgccttga gcacatcccc ctttcgccag ctggcgtaat agcgaagagg cccgcaccga 19440
tcgcccttc caacagtgc gcagcctgaa tggcgaatgg cgctttgcct ggtttccggc 19500
accagaagcg gtgccgaaa gctggctgga gtgcgatctt cctgaggccg atactgtcgt 19560
10 cgtcccctca aactggcaga tgcacggta cgtgcgccc atctacacca acgtaaccta 19620
tcccattac gtaacccgc cgtttgtcc cacggagaat ccgacgggtt gttactcgt 19680
cacatthaat gttgatgaaa gctggctaca ggaaggccag acgcaatta ttttgatgg 19740
cgtaactcg gctttcatc tgttggtcaa cgggcgctgg gtcggttac gccaggacag 19800
tcgttgccg tctgaattg acctgagcg atttttacgc gccggagaaa accgcctcgc 19860
15 ggtgatggtg ctgcttggga gtgacggcag ttatctgaa gatcaggata tgtggcggat 19920
gagcggcatt ttccgtgacg tctcgttct gcataaaccc actacacaaa tcagcgattt 19980
ccatgttgc actcgttta atgatgatt cagccgcgct gtactggagg ctgaagtca 20040
gatgtgcggc gagttcgtg actacctacg gtaaacagtt tctttatggc aggggaaac 20100
gcaggtcgc agcggcaccg cgccttcgg cggtaaaat atcgatgagc gtggtggtta 20160
20 tgccgatcg gtcacactac gtctgaacgt cgaaaaccg aaactgtgga gcgccgaaat 20220
cccgaatct tatcgtcgg tggttgaact gcacaccgc gacggcacgc tgattgaagc 20280
agaagcctgc gatgtcgtt tcccgagggt gcggattgaa aatggtctgc tgctgctgaa 20340
cggcaagccg ttgctgatt gaggcgttaa ccgtcacgag catcatctc tgcattgtca 20400
ggtcatggat gagcagacga tggtagcaga tatcctgctg atgaagcaga acaacttaa 20460
25 cgccgtcgc tgttcgatt atccgaacca tccgctgtg tacacgctg gcgaccgcta 20520
cggcctgtat tgggtgatg aagccaatat tgaaacccac ggcatggtgc caatgaatcg 20580
tctgaccgat gatccgcgct ggctaccgac gatgagcga cgcgtaacgc gaatggtgca 20640
gcgcatcgt aatcaccgca gtgtgatcat ctggtcgtg gggatgaat caggccacgg 20700
cgtaatcac gacgcgctg atcgctggat caaatctgc gatcctccc gcccggtgca 20760
30 gtatgaagc ggcggagccg acaccacgac caccgatatt attgcccga tgtacgcgcg 20820
cgtggatgaa gaccagcct tccggctgt gccgaaatg tccatcaaaa aatggcttc 20880
gctacctgga gagacgcgcc cgctgatct ttgcgaatac gccacgcga tgggtaacag 20940
tcttgccgt ttcgctaaat actggcaggc gttcgtcag tatccccgt tacaggcgg 21000
cttcgtcgg gactgggtg atcagtcgct gattaaatat gatgaaaacg gcaaccctg 21060
35 gtcggctac ggcggtgatt ttggcgtac gccgaacgat ccagcttct gtatgaacgg 21120
tctggtctt gccgaccgca cgcgcatcc agcgtgacg gaagcaaac accagcagca 21180

ES 2 356 322 T3

gttttccag ttccgttat ccgggcaaac catcgaagtg accagcgaat acctgttccg 21240
 tcatagcgat aacgagctcc tgcactggat ggtggcgctg gatggaagc cgctggcaag 21300
 cggggaagtg cctctggatg tgcctccaca aggtaaacag ttgattgaac tgcctgaact 21360
 accgcagccg gagagcgccg ggcaactctg gctcacagta cgcgtagtgc aaccgaacgc 21420
 5 gaccgcatgg tcagaagccg ggcacatcag cgctggcag cagtggcgtc tggcggaaaa 21480
 cctcagtgtg acgtccccg ccgctccca cgccatcccc catctgacca ccagcgaat 21540
 ggattttgc atcgagctgg gtaataagcg ttggcaattt aaccgccagt caggctttct 21600
 ttcacagatg tggattggcg ataaaaaaca actgctgacg ccgctgcgcg atcagttcac 21660
 ccgtgcaccg ctgataacg acattggcgt aagtgaagcg acccgcatg accctaacgc 21720
 10 ctgggtcgaa cgctggaagc cggcgggcca ttaccaggcc gaagcagcgt tgttgacgtg 21780
 cacggcagat acattgctg atcggtgtct gattacgacc gctcacgctg ggcagcatca 21840
 ggggaaaacc ttattatca gccggaaaac ctaccggatt gatgtagtg gtcaaatggc 21900
 gattaccgtt gatgtgaag tggcgagcga tacaccgcat ccggcgcgga ttggcctgaa 21960
 ctgccagctg gcgcaggtag cagagcgggt aaactggctc ggattagggc cgcaagaaaa 22020
 15 ctatcccgc cgccttactg ccgctgttt tgaccgctgg gatctgcat tctcagacat 22080
 gtataccccg tacgtctcc cgagcgaaaa cggctcgcg tgcgggacgc gcaattgaa 22140
 ttatggcca caccagtggc gcggcgactt ccagttcaac atcagccgct acagtcaaca 22200
 gcaactgatg gaaaccagcc atcgccatct gctgcacgcg gaagaaggca catggctgaa 22260
 tatcgacggt ttccatagtg ggattggtg cgacgactcc tggagcccgt cagtatcggc 22320
 20 ggaattccag ctgagcgcg gtcgctacca ttaccagttg gtctggtgta aaaaataata 22380
 ataaccgggc aggggggac ccgggtaatt aattgaatta catccctacg caaacgtttt 22440
 acggccgccc gtggcgcccg cgcggcgcg cccgtccttg gccgttcag gccactccgg 22500
 tggctcccgt cgtccccgac ttccaggccc agcagatgca gcaactcctc agcgcgtaa 22560
 atcgctgac aatgagacag aacgcaattg ctctgctag gcctccaaa ccaaagaaga 22620
 25 agaagacaac caaacaaaag ccgaaaacgc agccaagaa gatcaacgga aaaacgcagc 22680
 agcaaaagaa gaaagacaag caagccgaca agaagaagaa gaaacccgga aaaagagaaa 22740
 gaatgtgat gaagattgaa aatgactgta tctcgtatg cggctagcca cagtaacgta 22800
 gtgttccag acatgtcggg caccgacta tcatgggtg agaaaatctc ggggtgtctg 22860
 ggggcctcg caatcggcg taccctggg ctggtgtg tcaactgcat tgggtccgc 22920
 30 agataagtta gggtaggcaa tggcattgat atagcaagaa aattgaaaac agaaaaagtt 22980
 agggtaagca atggcatata accataactg tataactgt aacaaagcgc aacaagacct 23040
 gcgcaattgg ccccggtgct gcctcagcg aaactcggg caactcatat tgacacatta 23100
 attggcaata attggaagct tacataagct taattcgacg aataattgga tttttattt 23160
 atttgcaat tggttttaa tatttccaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa 23220
 35 aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaacta gatcctcgaa tcaagcttat 23280
 cgataccgct gactagatg gggcgggccc gccgcttca gcagacatga taagatacat 23340

tgatgagttt ggacaaacca caactagaat gcagtgaaaa aaatgcttta tttgtgaaat 23400
 ttgtgatgct attgctttat ttgtaacctat tataagctgc aataaacaag ttaacaacaa 23460
 caattgcatt cattttatgt ttcagggtca gggggagggtg tgggagggtt tttaaagcaa 23520
 gtaaaacctc tacaatgtg gtaaaatcga taaggatctc gacctcgagg gggggcctg 23580
 5 taccgggctc tgctgaggc tctggctgcc cagcaggctg aagctggggt tgttgccag 23640
 gggcactgt gttccatcg cagcggggcac ttgtcctcc caatcagatg gcctctgaag 23700
 gcaggcctgg ccagaagggt agtgctgctg aacgctatta tccactggc tgaggggtgt 23760
 ttccccgaa actgctgtgg tcacagctgc tgccgctgtg acctatcgag cattgtttaa 23820
 cgcagtgggc attctggca cactaggccc tctgagctgg tggggactca aggactgggt 23880
 10 gcccaggag ctgggacaga acccaggcag gggcacttct ggtggggtgg ccttggggct 23940
 ctgcatatgc tggcagacag agtcaagtct gccagggga gtctggcctg agtgtgagag 24000
 gatgggacac tgggggctgg aggtgaaaat tccttgccgc tccccagag ttggtgagat 24060
 cactcccatg ccctcgagc tctgtgctt ggtgagtggt atcattctg gactcagatt 24120
 gttctgaaga agcccagtc tgggtggcat caagtgctg ctatagggg ggcttgcctt 24180
 15 gatccggcta cacttgagg tgactgttc ttggacggct acatacagaa agagagaagt 24240
 ggggatgagt tccaaaggca tcctcgactt cggctgtggc caccggagg tagctcctgg 24300
 cccaacacgg acttctcacc tcccgccctt ggctctctac tgagctccc cctgctccc 24360
 aattcctgc cattcccctc atttctctgc cctcagcctg gactgcagtt cttctgggaa 24420
 gctgccccaa ctccctaggt ctgtgctcac caagagcaga tcacactgga ctgaaatgcc 24480
 20 agctgattg tctctcaag aaaattggaa gctcctggag gtcagggtcc atgtctgctt 24540
 ttacactcag tgctctgtat gcaggcctgg cactgcccac ccttgacag gtggtgcata 24600
 tttgtagaa ggaaggaagg ggccagggtg ggtgggctgg gctggtggcg ggagctagct 24660
 cagcctcta gattctctac ccgatggatg tgacctggga cagcaagtga gtgtggtgag 24720
 tgagtgcaga cgggtctttg ttccccctt gtctcatagc ctatagggc tctgagccca 24780
 25 gatctggggc tcagacaaca tttgtcaac tgaacggtaa tgggttctt ttctgaaggc 24840
 tgaaatctgg gagctgacat tctggactcc ctgagtctg aagagcctgg ggatggagag 24900
 acacggagca gaagatggaa ggtagagtcc cagggtccta agatggggaa tacatctcc 24960
 ctcaattgca tgagagtcca ctctagctga tatctactgt ggccaatct taccgtact 25020
 ttttgggt ggacactgag tcatgcagca gtcttatgt ttaccaagg tcaggtagg 25080
 30 gagacagtgc agtcagagca caagcccagt gtgtctgacc cacccaagaa tccatgctcg 25140
 tatctacaaa aatgatttt tctctgtaa tggctcctag gttctttat tatcatggca 25200
 tgtgtatgt ttcaactag gttacaatct ggcctataa ggtaacctc ctggaggcca 25260
 ccagcctcc tgaactgt ctgtctgct cctgcaactg gagtgtcct gatgtggcac 25320
 tccagcctgg acaagtggga cacagactcc gctgtatca ggcccaaaga tgtcttccat 25380
 35 aagaccagaa gagcaatggt gtagagggt catgggctac aataaagatg ctgacctcct 25440
 gtctgagggc aagcagcctc ttctggcctc cagacaaatg ctgagtgtc ccaagactac 25500

ES 2 356 322 T3

cctcggcctg gtccaatctc atcccactgg tgcgtaaggg ttgctgaact catgacttct 25560
 tggctagcct gcaacctcca cggagtgga actacatcag gcattttgct aactgctgta 25620
 tcctaggcca ataaatgtg atcacattta tagctgcat ggtagggtag ggaccctgc 25680
 tatctatctg tggaggctct gggagcccct gacacaaact ttctgaagca gagcctcccc 25740
 5 aaccctttt ccattcccta tacctgacag atggcccagg aaccattag aaatggaagg 25800
 tcaactgcagc agtatgtgaa tgtgcgtg ggagaagggc aggatcagag ccttgggggt 25860
 gtggcagccc ccaagtgatt ctaatccaga tcctagggtt gtttccctgt cccattgaaa 25920
 tagctgcttt aaggggcctg actcagggaa atcagtctct tgaattaagt ggtgattttg 25980
 gagtcattta gaccagcct tcaattggga tcctgctctt agagttgat gaattattta 26040
 10 actgatttc agatctcctc ttctcaatg ctttcagaag cacagtaact gcttactctg 26100
 aatgaattc tcaccctcact tccacatag cacccttgc ccacccttt gggaacactg 26160
 gccttaactg cttacctca aatggactca tctgttggga gatatatgca ttctgccgtt 26220
 caggggtcat tgccataaga cctgatctct gttcctctg ctaaacagaa gatgaaaaag 26280
 acaaattaga ttacagctac caattaataa ttagccttag gatcgcctgc tggggaccta 26340
 15 ggacttggct ttggtgcagc agaaagcatg aataaacaca ccagcataca ctgcatgca 26400
 tgccccacc tctcgagcaa aattccacag gtataataa agtaagattc tgcacctggg 26460
 ttaaaaacac aactgcaaca gcatagaatg gggcaggaga gacagaactt aatagcaaga 26520
 gcacacagaa aaaagttta ggcattttg atgtccatct gtcaggatg ggtcagcagt 26580
 gagatgCGGT cacaaaaga acaaatgtaa cattaggctg cattaataga agcagagtat 26640
 20 gtagaaggag ggaggtgaca gtctatgct aactctgcct tggccagact ataccacag 26700
 gagtctgggc atgccagtct caggagacc cagacagact ggctgcattc agaggatggt 26760
 aagtaatgag agtggggatt ggactcaaa ctaccagac aaagaatggc tgagcaagcc 26820
 aaggatgctg tggctggggc agagcagact gtggctatg tagtgggga tacctagcct 26880
 ctgcaggggt gcatagggga aaggacattg agaagaggac tgaggctgt tctggtggt 26940
 25 cctggcatga acggccagat gatcacatgg tcaggtgac acagtctca aactgggag 27000
 tagccaaaca ctactgcca acctcccgc cttctctga ctagttgag cataggcaat 27060
 tgggaggagc ttctgtctc catctgaaag ctggctgggt gggcaggggg aggagcgagc 27120
 caagttcaa gggcgagtt tcagcactca gtctgggatc ggctcaagga gaaagggga 27180
 agaacatagc caggagggaa taacatgaag gccccagac ccagaaaagg catgactgc 27240
 30 tctgagacc tcagccggtt ggtgtcaggt tgtgactcgg atccaggct gactcccagt 27300
 ccagtctt aagcctcacc ccacacagt aggggagccc ggccatctct gctcaactgc 27360
 tgccatctct ctcccctct caaccacaa ggcagctctg tctgggagca caagctcaa 27420
 gtccacttc tggctgtgt ccccccaag atgccagagg acttgcctct acaacacggg 27480
 ctgcccgtgc agtgcctgct ttccagcaa agggcttct ggaaccctc tctgactca 27540
 35 gtggggctgg tgggagtgg gcgggtagc gaccagtc ttggactgt gccagctct 27600
 caggcctggc agcagtctt ggcttgggt cctgccaagg cagagaggac aaacatag 27660

caccggaag actacaccag aagcgattcc accagactgg ggttgcttt tctatccgc 27720
 ccttagcctg cttcctgtcc tggccctgc ctccccctcc actggagctg ccgtgtgggc 27780
 agtgaggggc tgtttctcag ctgccctatg gagctgccct ctccctgcca aagcattggc 27840
 aaggcggcaa ggggtggggg tggggatggg ggggtggatc tgccttca agctctcatt 27900
 5 atactgagca cgtctcacc attattttat gtcatttagc aacaccccat gtggactg 27960
 aggagcatgg gggtcacatg accactgcc aaggccacac catccggatc tgcctgagat 28020
 ggtcaggggt ggagccatt tctgaaggca gtccttcgc tttggctct cttgtaccag 28080
 tctcaggaca tcagggcaga agatctacag tccccagctt actgatgta cagcagaggc 28140
 tcagagaggt taaatgactt gcccaagggt acacggctaa gaagtacagt atctcctaac 28200
 10 tgcagaccag gtgctctgc tgctctggg gacagattcc tgcgtggctg gctaggtcta 28260
 aacggtcctt aactcatcc ccaccggtg ctgcattagt tcatcaaat aacacagtg 28320
 tacagaggtg ggggttcagg ggcaggggca gatggaggct ggagagtgtg actaaggaaa 28380
 cagcagggga agtgccgtaa agtccgaagg gagggacgga aagagaaagc caagcccagg 28440
 ggcgtgccag acaaaaggaa aggccacgcc ggggcagggc aggcttcagc ggggtgctgg 28500
 15 gcgtctcat cccgggaagc acacattcca gaggacccg gagtctaag gaaaagctgg 28560
 ccagcctatc actatgaaa ctgccaaggc cacacagcgc tgctgacacc cagcctgggt 28620
 gccggtggcc agctctcag gatctcaag tctgggtgc caccagcaag cgacggtcct 28680
 ccatgggctc tcaccttac ggcagtgtcc agaggcaccg ccagtctct gctcctatgc 28740
 tggctctgct gtcctggca aaaggagcca gagcattctc tccaggctc cggaggaggc 28800
 20 tgcttcttt gttttcaga tggaggctcc catccttgt tctgaatcaa tgtgctcaa 28860
 agataagccc caagaaaaca gttgtgctt tttgactg acaattagaa tcgttgaaa 28920
 atggagaaaa caggaaatgg caaatggtt cagtaccag gaggaaccg tgcctgaaa 28980
 ttgctgcta gtgactgga cactgctt ctgctctt atgaaggaca gcctaggccg 29040
 tgtggcctt tataaaciaa gctatgaagg ggtcgtcaa tttttaggg ctgcaactgt 29100
 25 ggcactacgt cctgtgtgc caggtagcac tgacaagcag cactgagttc tatgcaagcc 29160
 caggtgtgct tctctatg tgaccccag agaactaagg ccagctctt cctctgtcac 29220
 acccctcca gccccactg tcagacaagg gaccacattc acagacagtc tcagccaaga 29280
 tggcaacctt ggaagtctg gggatgcctt tctagaagct cgcgcccta ggggccggcc 29340
 ttaattaaat caagctatc gataccgtc agacctcgag ggggggcatc actccgcct 29400
 30 aaaacctacg tcacccgcc cgttcccacg ccccgcgcca cgtcaciaac tccacccct 29460
 cattatcata ttgcttcaa tccaaaataa ggtatattat tgatgatgt t 29511
 <210> 10
 <211> 28191
 <212> DNA
 35 <213> Quimérico
 <220>

<221> 5' ITR
 <222> (1)..(438)
 <223> Primera secuencia terminal invertida repetida y señal de empaquetamiento
 5 <220>
 <221> Relleno
 <222> (439)..(10990)
 <223> Primera secuencia no codificante de relleno
 <220>
 10 <221> TERT
 <222> (10991)..(11285)
 <223> Promotor de la telomerasa (TERT)
 <220>
 <221> SFV
 15 <222> (11556)..(18665)
 <223> Región del replicón procedente del virus SFV
 <220>
 <221> mL-12
 <222> (18688)..(21021)
 20 <223> Secuencia correspondiente al gen de la interleucina-12 (IL12) de ratón
 <220>
 <221> PoliA
 <222> (21920)..(22179)
 25 <223> Secuencia de poliadenilación derivada del virus SV40
 <220>
 <221> Relleno
 <222> (22180)..(28030)
 <223> Segunda secuencia no codificante de relleno
 30 <220>
 <221> 3' ITR
 <222> (28031)..(28191)
 <223> Segunda secuencia terminal invertida repetida
 <400> 10
 35 aaacatcatc aataatatac cttattttgg attgaagcca atatgataat gagggggtgg 60
 agttgtgac gtggcgcggg gcgtgggaac ggggcggtg acgtagtagt gtggcggaag 120

tgtgatgttg caagtgtggc ggaacacatg taagcgacgg atgtggcaaa agtgacgttt 180
 ttggtgtgcg ccggtgtaca caggaagtga caatttcgc gcggttttag gcggatgttg 240
 tagtaaattt gggcgtacc gagtaagatt tggccatttt cgcgggaaaa ctgaataaga 300
 ggaagtgaaa tctgaataat tttgtgtac tcatagcgcg taatattgt ctagggccgc 360
 5 ggggactttg accgtttacg tggagactcg cccaggtgtt tttctcaggt gtttccgcg 420
 ttccgggtca aagttggcgt tttgatatca agcttatcga taccgtcaaa caagtcttta 480
 attcaagcaa gactttaaca agttaaagg agcttatggg taggaagtag tghtatgatg 540
 tatgggcata aagggtttta atgggatagt gaaaatgtct ataataatac ttaatggct 600
 gcccaatcac ctacaggatt gatgtaaaca tggaaaagg caaaaactg ggtcactaaa 660
 10 atagatgatt aatggagagg atgaggttga tagttaaag tagataagtg gtctattct 720
 caataaaaa gtgaacataa ggcgagtttc tacaagatg gacaggactc attcatgaaa 780
 cagcaaaaac tggacatttg ttctaactt tgaagatgata gaaaaattcc tattttaaag 840
 gtaaaacagt aactcacagg aaataccaac ccaacataaa atcagaaaca atagtctaaa 900
 gtaataaaaa tcaaactgtt gcacgatcaa attatgaatg aaattcacta ctaaaattca 960
 15 cactgatttt gtttcatcca cagtgtcaat gttgtgatgc attcaattg tgtgacacag 1020
 gcagactgtg gatcaaaaagt ggtttctggt gcgacttact ctctgagta tacctgcagt 1080
 cccctttctt aagtgtgta aaaaaaagg gggatttctt caattcgcca atactctagc 1140
 tctccatggt ctttctagga aacaagtgtt aaccacctt attgtcaaa cctagctcca 1200
 aaggactttt gactccccac aaaccgatgt agctcaagag agggatctg tcaccagtat 1260
 20 gtatagttaa aaaagtatcc caagtccaa cagcaattcc taaaaggagt ttattttaa 1320
 aaccacacac acctgtaaaa taagtatata tcctccaagg tgactagttt taaaaaaca 1380
 gtattggctt tgatgtaaag tactagttaa tatgttagaa aaatctact gtaaccaagt 1440
 gaaatgaaag caagtatgtt ttgcagagat tcaaagaaaa tataagaaaa cctactgttg 1500
 ccactaaaaa gaatcatata ttaaatac tcaacaata gctcttcagt ctgataaaat 1560
 25 ctacagtcac aggaatggat ctatcactat ttctattcag tgctttgatg taatccagca 1620
 ggtcagcaaa gaatttatag ccccccttga gcacacagag ggctacaatg tgatggcctc 1680
 ccatctcctt catcacatct cgagcaagac gttcagctct acagaaataa aatcaggaat 1740
 ttaatagaaa gttcataca ttaaacttta taacaacac ctcttagtca ttaaacttcc 1800
 acaccaacct gggcaatata gtgagacccc atgcctgcaa aaaaaaaaaa attagccagg 1860
 30 catggtagca tgtacctgta gtcccagcta cttgagaggt gaggtgggaa aatcacttta 1920
 gtgcaggatg ttgaggctgg agtgaactgt gattgtgcca ctgcactcca gcctggacaa 1980
 tagagcaaga cctgtctca aaaaaatgca taaaaattt tttttaaact tccacgat 2040
 cacatcttt gccctcatgt ttcaatagg taaaaattg atacctcaa aaaaaccaag 2100
 catacacta tcataattt ttttaatgc aaataaaaac aagataccat ttcacctat 2160
 35 cagactggca gtttctgatt aaatgaaatt ttctggataa tatacaatat taagagagac 2220
 tgtagaaact gggccagtg ctcatgcctg taatcccagc actttgggag gctgggtaac 2280

ES 2 356 322 T3

atggcgaacc ctgtttctac aaaataaaaa tattagctgg gagtgggtggc gcacacctat 2340
 agtcccagct actcaggagg ctgagggtga aggatcgctt gaaccagga ggttgagact 2400
 gcagtgaact gtgatcattc tctgctactg caccagcc tgggcaacag agacctgtc 2460
 tcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa gacaaattgt gaagagaaag gtacttcat ataacatcag 2520
 5 gagtataaaa tgattcaact tcttagagga aaattggca ataccaaaat attcaataaa 2580
 ctctttccc ttgaccaga aattccactt gaataaagct gaacaagtac caaacatgta 2640
 aaagaatgtt tcttctagta cagtcggtaa gaacaaaata gtgtctatca atagtggact 2700
 ggttaaatca gttatggtat ctccataaga cagaatgcta tgcaaccttt aaaatatatt 2760
 agatagctct agacacacta atattaaaag tgcctaataa catttaaac tatactcata 2820
 10 cgtaaaata taaatgtata tatgtacttt tgcatatagt atacatgat aggccagtgc 2880
 ttgagaagaa atgtgtacag aaggctgaaa ggagagaact ttagtcttct tgtttatggc 2940
 ctccatagtt agaataattt ataacacaaa tttttgata ttataattt aaaataaaaa 3000
 cacagaatag ccagacatac aatgcaagca ttcaatacca ggtaagggtt tcactgtaa 3060
 ttgacttaac agaaaatfff caagctagat gtgcataata ataaaaatct gacctgcct 3120
 15 tcatgtgatt cagccccagt ccattaccct gtttaggact gagaaatgca agactctggc 3180
 tagagttcct tcttccatct ccttcaatg ttfactttgt tctggtcctt acagagtccc 3240
 actataccac aactgatact aagtaattag taaggccctc ctctttatt ttaataaag 3300
 aagatttag aaagcatcag ttatttaata agttggccta gtttatgtc aaatagcaag 3360
 tactcagaac agctgctgat gttgaaatt aacacaagaa aaagtaaaaa acctcattt 3420
 20 aagatcttac ttactgtcc ataattagtc catgaggaat aacaccctt tccaaatcct 3480
 cagcataatg attaggtatg caaaataaat caaggtcata acctggttca tcatcactaa 3540
 tctgaaaaag aaatatagct gtttcaatga gagcattaca ggatacaaac atttgattgg 3600
 attaagatgt taaaaataa ccttagtcta tcagagaaat ttaggtgtaa gatgatatta 3660
 gtaactgtta actttgtagg tatgataatg aattatgtaa gaaaacaaca ggccgggagg 3720
 25 gttggtcac acgtgtaatc ccagcacttt gggaggctga ggcaggcaga ctgcctgagc 3780
 tcaggagttc gagaccagcc tgggcaacac ggtgaaatcc cgtctctact aaaaatacaa 3840
 aaaaattagc cgggtgtggt gacacatgcc ttagtccca gctactggg aggctgaggc 3900
 aggagaatca cttgaacctg ggaggtgaag gttgcagtga gccaagatgg caccactca 3960
 ctccagcctg gaaacagag caagactctg tctctgagct gagatggcac cacttactc 4020
 30 cagcctggga aacagagcaa gactctgtct caaaaaaaaaac aaaacacaca acaaaaaaaaa 4080
 caggctgggc cgggtggtc acgcctgtaa tcccagcact ttgggaggcc gaggcgggtg 4140
 gatcacctga ggtcaggagt tccagaccag cttgtcaac atggtgaaac ctccccccgc 4200
 cgtctctact aaaaatacaa aaattagcca ggctggtgg caggagcctg taatcccagc 4260
 tacttgggag gctgaggcag gagaatcgtt tgtaccaga aggcagaggt tgcactgagc 4320
 35 tgatgagca ccattgcact ccagcctggg ggacaagagc gagatttcgt ctttaaaaaa 4380
 caaaaacaaa acaaaaacc atgtaactat atgtctagt catcttagtc aagaatgtag 4440

aagtaaagtg ataagatatg gaatttcctt taggtcacia agagaaaaag aaaaatttta 4500
aagagctaag acaaacgcag caaaatcttt atatttaata atattctaaa catgggtgat 4560
gaacatacgg gtattcatta tactattctc tccacttttg agtatgtttg aaaatttagt 4620
aaaacaagt ttaacacact gtagtctaac aagataaaat atcacactga acaggaaaaa 4680
5 ctggcatggt gtgggtgctc aactgttaa tcccagtgtc ttgggaggct gagacaggag 4740
agttgcttga ggccaggagt tcaagaccga catggggaat gtagcaagac cccgtcccta 4800
caaaaaactt tgtaaaaatt tgccaggat ggtggtgcat acctgtagtc ccagctactc 4860
gggaggcgga ggcagaagga atcacttgag cccaggagtt tgaggctgca gtgagctacg 4920
atcataccac agcactccag cgtggacaac agagtaagac cctatctcaa aaacaaaaca 4980
10 aaacaaaaca aacaaaaaaa accacaagaa aaactgctgg ctgatgcagc ggctcatgcc 5040
tgtaatccca gtattttggg aggccagggt gggcgtatca cctgaggta ggagttagag 5100
accagcctgg ccaacatggt gaaacccat ctctactaaa aatacaaaat tagccaggca 5160
tgtggcagc gcctgtagtc ccagtactg ggaggctgaa gcaggaggat cacctgagcc 5220
cgggagggtg aggttgcagt gagccgagat cacaccactg cactccagcc tgggtgacac 5280
15 agcaataccc tacctcaaaa taaaaaagaa aaagaaaaga aaagttgctg tccccgtac 5340
cccaatccca aatccaaaca gcctctctca tctcacagta agggggaaaa atcacccaaa 5400
aaagctaagt gatctttga aaacccaac tcttagaagt ctaagattat tatagtaac 5460
tcatgaagt tcatcataaa agatactcta atattatta agtagaacca catattggtt 5520
gtcttggtat gtctagcccc tggcatacaa aatattaat aactgtata tggtaacctg 5580
20 gatgtgaaaa tgtactatga gtacagcttt ataatacta tatatgtacc tatatacaga 5640
aaaaataca acaaaatcat aaaagcactt atcttgaaa gaggagttac agcaatttta 5700
tttagtctt tattgctttg ctatatattc taaattttt tcaatgaata tatatcactt 5760
ttaaaaaat tcaatggtct ttctataaa ttactttgg cagcatgctt tttatatat 5820
acataataaa tgtatgggaa attttaaaag gatacattaa attaaagcaa aatatacaaa 5880
25 caaaaaatca gaatacaaaa agataaaaag attgggaagg gagggaggga gtaaggagga 5940
agggtgggtg ggtatagaga aatataccaa ataatggtaa gaagtgggtg cttgacactt 6000
tctacacttt ttttaataa aaaaaattt ttctctctc tttttttt ttagagacga 6060
agtctcgcta tgtgcccag gctggtcttg aactcctgg atcaagagat cctctgcct 6120
cagcctccca aggtgcttg attacagggt tgagccacca cgcctggta cttctacac 6180
30 ttaatatat atatttttc atttcaatg tcaattttat tagttaattt ataataccca 6240
ttcaccatta tattcaagt ctattgaag aaataaacca gaaagaatga aatacttag 6300
ctcacatgct attcaact aaattacct tcaaatcaca ttcaagaagc tgatgattta 6360
agctttggcg gttccaata aatattgct aaaccataat taaatctcaa tatatcagtt 6420
agtacctatt gagcatctcc tttacaacc taagcattgt attaggtgct taaatacaag 6480
35 cagctgact ttaatacat taaaaaatac atatttaaga cttaaactt tattatgga 6540
attcagttat atttgagggt ttccagtgt gagaaattg aggtttgtc tgtcttcag 6600

tccccaaagc tcagttctga gttctcagac tttggggaa cttcatgtat tgcaggttg 6660
 gcccgtaata cctgtgggac aactcagcc cctgtgcaca tggccaggag gctggtgca 6720
 aacatttca ggtaggtgga ccaggacatg cccctgtca tggccagggtg gaggcatagt 6780
 gctatacagc aggcagaagt caatattgat ttgttttaa agaaacatgt actacttca 6840
 5 taagcagaaa aaatttctat tctggggga aaagattatg ccagatcctc taggattaaa 6900
 tgctgatgca tctgctaaac cttcacatat cagaacatat ttactataga aagaatgaaa 6960
 atgggacatt tgtgtgtcac ctatgtgaac attccaaaaa tattttacaa caactaagta 7020
 tttataaat tttatgaact gaaatttagt tcaagttcta ggaaaataca aacctgcta 7080
 gatattataa aaatgataca atatataatc attcaggct catcagaata tatctgtat 7140
 10 cacttgacaa gaatgaaaat gcaccatttt gtagtgctt aaaatcagga agatccagag 7200
 tactaaaaat gacttctcc ttgaagctta ctcaccaact tcctcccagt tactactgc 7260
 ttctgccaca agcataaact aggaccagc cagaactccc ttgaatata cactgcaac 7320
 gattactgca tctatcaaaa tgggtcagtg cctggctaca ggttctgcag atcgactaag 7380
 aattgaaaa gtctgttta ttcaaagga agcccatgtg aattctgcc agagttcatc 7440
 15 ccagatatgc agtctaagaa tacagacaga tcagcagaga tgtattctaa aacaggaatt 7500
 ctggcaatat acaaaattga ttccaatca aaacagattt acataccata ctatgtcaa 7560
 gaagttgtt ttgtttatg catcctagat tttattttt tgattatgg ttactttaa 7620
 gcataaaaaa tttgcaata caactctcc caaaaggcat aaacaaaaat tcataaaact 7680
 tgcatcactt gagatactc aggtatgaat tcacaactt gttacaactt actatata 7740
 20 tgcacacata tatatatatt tgggtatatt ggggggggtc taatttaaga aatgcataat 7800
 tggctataga cagacagttg tcagaactg gcaatgggta cgtgcaggtt cattatacca 7860
 agtctactg tagttgtca aaatgtatca taatacaagg cggggcgagg tcgtcacgcc 7920
 tgtaatccca gcatttggg aggctaaggc aggaggattg ctgaggta ggagttgtg 7980
 accagcctgg gcaacagagc aagaccctgt ctccaaaaag aaaaaaata atttttaca 8040
 25 aaataaaaaac aaaatgtatc atcagacgaa attaaataag aggcaattca tttaaagac 8100
 aactttccc agctgacat ttaacaaaa gtctaagtc tctaattca tatttaatga 8160
 tcaaatatca aataactaatt tttttttt tttttttt gagacggagt ctgctctgt 8220
 cgcccaggct ggagtgacgt ggcgcgatcc tggctcactg caagctccgc ctcccgggtt 8280
 cagccattc tctgctca gctcccag tagctgggat tacagacatg cgccaccag 8340
 30 cccggctaatt tttgtattt tagtagagat ggggttctc catgttggtc aggctgtct 8400
 tgaatttccc acctcaggtg atctgctgc ctgacctca caaagcagta gctgggacta 8460
 caggcaccca ccaccacact tggtaattc tttgtattt ttttgtaaa gacgggattt 8520
 caccatgta gccaggatgg tctgatctc ctgatctcat gatccgccg cctcagcctc 8580
 ccaaagtgtc gggattacag gcgtgagcca cccgcccgg ccatcaata ctaattctta 8640
 35 aatgtaagg acccactatt cagaacctg atcctatca ctaaatgca aatatttatt 8700
 gaactactac tatgtcatg atactagaga gagttagata aattgatac agtaccctc 8760

acagaactta cagtgtaata gatggcatga catgtacatg agtaactgtg aacagtgtta 8820
 aattgctatt taaaaaaaaa gacggctggg cgctgtggct catgcctgta atcccagcac 8880
 ttggggaggc caaggcaagt tgatcgtcg aggtcaagag ttcgagacca gcctggccaa 8940
 cgtggtaaaa ccccgctctc actaaaaata caaaaaaaaa attagccagg catggtggca 9000
 5 caggcctgta atcccagcta ctagggaggc tgagacatgg agaactgctt gaatccagga 9060
 ggcagaggtt acagtgagcc gagatcatac cactacactc cagcctgagt gacagagcga 9120
 gactcctgtc taaaaaaaaa aaaaaaaaaa aagatacagg ttaagtgtta tggtagtga 9180
 agagagaact caaactctgt ctcagaagcc tcaactgcat gtggaccact gatatgaaat 9240
 aatataaata ggtataatc aataaatagg aactcagtt ttaatcatcc caaacaccaa 9300
 10 aacttctat caaacaggtc caataaactc aatctctata agagctagac agaaatctac 9360
 ttggtggcct ataatttat tagcccttac ttgtccatc tgatattaat taacccatc 9420
 taatatggt tagttaacaa tccagtggtc gctttgacag gaacagttgg agagagttgg 9480
 ggattgcaac atattcaatt atacaaaaat gcattcagca tctacctga ttaaggcagt 9540
 gtgcaacaga attgacagga gagtaaaaga atgattataa attacaacc ctaaagagc 9600
 15 tatagctggg cgtggtggct catgcctgta aatcccagca cttggggagg ctgaggcggg 9660
 tggatcacct gaggccagaa gttcaagacc agcctagcca acatggcgaa accctgtctc 9720
 tacaaaaaat acaaaaaatta gccgggtgtg gtggcacgtg cctgtagtcc cagttactg 9780
 ggaggccgag gcaggagaat cgcttgaacc taggaggtgg aggctgcagt gagccgagat 9840
 tgtgccactg cactccactt cagcctgggc gacaagagca agactccgtc aaaaaaaaa 9900
 20 aaaaaaaaaa aaagctaaa atctagtggg aaaggcatat atacatacaa ctaactgtat 9960
 agcataataa agctcataat ctgtaacaaa atctaattcg acaagcccag aaactgtga 10020
 ttaccaaaa acagttatat atacacaaaa agtaaacta gaacccaaag ttaccagca 10080
 ccaatgattc tctccctaag cagtatcaag tttaaagcag tgattacatt ctactgccta 10140
 gattgtaaac tgagtaaagg agaccagcac ctttctgcta ctgaactagc acagccgtgt 10200
 25 aaaccaacaa ggcaatggca gtgcccaact ttctgtatga atataagta catctgtttt 10260
 attattgtg acttggtgtt gcatgtggtt attatcaaca cttctgaaa gaacaactac 10320
 ctgctcaggc tgccataaca aaataccaca gactgagtga ctaacagaa acttattct 10380
 cacagtttg gaggctggga agtccaaaat taaggtaact gcaaggtagg ttcaatctc 10440
 aggcctctc ttggctga aggtcttcta actgtgtgct cacatgacct cttaacaa 10500
 30 gctctctggt gtctctttt tttttttt ctttttgag acagagtctc actctgtcac 10560
 ccaggctgga gtacagtggc acaactctgg ctcaactgca cctccaactc ccgggttcaa 10620
 gtgatttca tgcctcacc tcccgagtag cttggatgac aggagcccgc taccacacc 10680
 agctaatttt tgattttta gtgagatgg tgttcaacta cattggccag gctggtctca 10740
 aactcctgac ctcgatacc accacccttg gcctccaaa gtgctgggat tacaggtgtg 10800
 35 agccactgag cccgtcctgg tgtctttca tataagggca ctaatcaat cagacctggg 10860
 cccggcgcgc aattaacct cactaaaggg aacaaaagct ggagctccac cgcggtggcg 10920

ES 2 356 322 T3

gccgctctag aactagtga tcgggcccga gctctcgcga cggggctgca ggaattcgat 10980
cgctgctag ctgcgctgc ggggccaggc cgggctcca gtggattcgc gggcacagac 11040
gcccaggacc gcgcttcca cgtggcggag ggactgggga cccgggcacc cgtcctgccc 11100
cttcacctic cagctccgcc tctccgcgc ggacccgcc ccgtccgcac cctcccggg 11160
5 tccccggccc agccccctcc gggccctccc agccccctcc ctctcttcc gcggccccgc 11220
cctctctcg cggcgcgagt ttcaggcagc gctgctctct gctgcgcacg tgggaagccc 11280
tggcctggcg gatgtgtgac atacacgacg ccaaagatt ttgtccagc tctgccacc 11340
tccgctacgc gagagattaa ccaccacga tggccgcaa agtgcattgt gatattgagg 11400
ctgacagccc attcatcaag tctttgaga aggcatttcc gtcgttcgag gtggagtcac 11460
10 tgcaggtcac accaaatgac catgcaaag cagagcatt ttcgcacctg gctaccaa 11520
tgatcgagca ggagactgac aaagacacac tcatcttga tatcggcagt gcgcctcca 11580
ggagaatgat gtctacgac aaataccact gcgtatgcc tatgcgacg gcagaagacc 11640
ccgaaaggct cgtatgctac gaaagaaa tggcagcggc ctccgggaag gtgctggata 11700
gagagatgc aggaaaaatc accgacctgc agaccgtcat ggctacgcca gacgctgaat 11760
15 ctctacctt ttgctgcat acagacgta cgtgtctac ggcagccgaa gtggccgtat 11820
accaggacgt gtatgctgta catgaccaa catcgtgta ccatcaggcg atgaaagggt 11880
tcagaacggc gtattggatt gggttgaca ccacccgtt tatgtttgac gcgctagcag 11940
gcgctatcc aacctacgc acaactggg ccgacgagca ggtgttacag gccaggaaca 12000
taggactgtg tgcagcatcc ttgactgagg gaagactcgg caaactgtcc attctccga 12060
20 agaagcaatt gaaacctgc gacacagta tgttctcgtt aggatctaca ttgtacactg 12120
agagcagaaa gctactgagg agctggcact taccctcgtt attccacctg aaaggtaaac 12180
aatcctttac ctgtaggcgc gataccatcg tatcatgta aggttacgta gtttaaaaa 12240
tactatgtg ccccgctcg tacgtaaaa cggtaggta cgcctgacg tatcacgcg 12300
agggattcct agtgtgcaag accacagaca ctgtcaaagg agaaagagtc tcattccctg 12360
25 tatgcaccta cgtcccctca accatctgtg atcaaatgac tggcatacta gcgaccgacg 12420
tcacaccgga ggacgcacag aagtgttag tgggattgaa tcagaggata gttgtgaacg 12480
gaagaacaca gcgaaact aacacgatga agaactatct gctccgatt gtggccgtcg 12540
catttagcaa gtggcgagg gaatacaagg cagacctga tgatgaaaa cctctgggtg 12600
tccgagagag gtcacttact tgctgctgt tgtggcatt taaaacgagg aagatgcaca 12660
30 ccatgtacaa gaaaccagac acccagacaa tagtgaagg gcttcagag ttaactcgt 12720
tcgtcatccc gagcctatgg tctacaggcc tcgcaatccc agtcagatca cgcattaaga 12780
tgctttggc caagaagacc aagcgagagt taatacctgt tctcgacgcg tcgtcagcca 12840
gggatgctga acaagaggag aaggagaggt tggaggccga gctgactaga gaagccttac 12900
caccctcgt cccatcgcg ccggcggaga cgggagtcgt cgacgtcgac gttgaagaac 12960
35 tagagtatca cgcaggtgca ggggtcgtgg aaacacctg cagcgcgttg aaagtcaccg 13020
cacagccgaa cgacgtacta ctaggaaatt acgtagtct gtccccgag accgtgctca 13080

ES 2 356 322 T3

agagctccaa gttggccccc gtcaccctc tagcagagca ggtgaaaata ataacacata 13140
acgggagggc cggcggttac caggtcgacg gatatgacgg cagggctcta ctacatgtg 13200
gatcgccat tccggtccct gagttcaag ctttgagcga gagcgccact atggtgtaca 13260
acgaaagga gttcgtcaac aggaaactat accatattgc cgttcacgga ccgtcgctga 13320
5 acaccgacga ggagaactac gagaaagtca gagctgaaag aactgacgcc gagtacgtgt 13380
tcgacgtaga taaaaatgc tgcgtcaaga gagaggaagc gtcgggttg gtgttggtg 13440
gagagctaac caacccccg ttcatgaat tgcctacga agggctgaag atcaggccgt 13500
cggcacata taagactaca gtagtaggag tcttgggggt tccgggatca ggcaagtctg 13560
ctattattaa gagcctcgtg accaaacacg atctggtcac cagcggcaag aaggagaact 13620
10 gccaggaaat agttaacgac gtgaagaagc accgcgggaa ggggacaagt agggaaaaca 13680
gtgactcat cctgctaac ggggtcgtc gtgccgtgga catctatat gtggacgagg 13740
cttcgcttg ccattccgtt actctgttg ccctaattgc tctgttaaa cctcggagca 13800
aagtgtgtt atcgggagac ccaagcaat gcggattctt caatatgatg cagcttaagg 13860
tgaactcaa ccacaacatc tgcactgaag tatgtcataa aagtatatcc agacgttgca 13920
15 cgcgtccagt cacggccatc gtgtctactg tgcactacgg aggcaagatg cgcacgacca 13980
accctgcaa caaacccata atcatagaca ccacaggaca gaccaagccc aagccaggag 14040
acatcgtgtt aacatgcttc cgaggctggg caaagcagct gcagttggac taccgtggac 14100
acgaagcat gacagcagca gcatctcagg gcctcaccgg caaaggggta tacgccgtaa 14160
ggcagaaggt gaatgaaat ccctgtatg cccctgcgtc ggagcacgtg aatgtactgc 14220
20 tgacgcgac tgaggatag ctggtgtgga aaacgctggc cggcgatccc tggattaagg 14280
tcctataaa cattccacag gtaacttta cggccacatt ggaagaatgg caagaagaac 14340
acgacaaaat aatgaagtg attgaaggc cggctgcgcc tgtggacgag ttccagaaca 14400
aagcgaacgt gtgtgggagc aaaagcctgg tgcctgtcct ggacactgcc ggaatcagat 14460
tgacagcaga ggagtgagc accataatta cagcattta ggaggacaga gcttactctc 14520
25 cagtggtggc ctgfaatga atttgcacca agtactatgg agttgacctg gacagtggcc 14580
tgtttctgc cccgaagtg tccctgtatt acgagaaca cactgggat aacagacctg 14640
gtggaaggat gatggattc aatgccgca cagctgccag gctggaagct agacatacct 14700
tcctgaaggg gcagtggcat acgggcaagc aggcagttat cgcagaaaga aaaatccaac 14760
cgcttctgt gctggacaat gtaattccta tcaaccgag gctgccgcac gcctggtg 14820
30 ctgagtacaa gacggttaa ggcagtaggg ttgagtggct ggtcaataaa gtaagagggt 14880
accacgtct cctggtgagt gactacaacc tggcttggc tcgacgcagg gtcactgtgt 14940
tgtcaccgt gaatgtcaca ggcgccgata ggtgctacga cctaagtta ggactgccgg 15000
ctgacgccgg caggttcgac ttggtcttg tgaacattca cacggaattc agaatccacc 15060
actaccagca gtgtgtcag cagccatga agctgcagat gcttggggga gatgcgtac 15120
35 gactgctaaa acccggcggc atctgatga gagcttacgg atacccgat aaaatcagcg 15180
aagccgtgt ttctcctta agcagaaagt tctcgtctgc aagagtgtg cgccccgatt 15240

ES 2 356 322 T3

gtgtcaccag caatacagaa gtgttctgc tgttctcaa cttgacaac ggaaagagac 15300
 cctctacgct acaccagatg aataccaagc tgagtgccgt gtatgccgga gaagccatgc 15360
 acacggcccg gtgtgcacca tcctacagag ttaagagagc agacatagcc acgtgcacag 15420
 aagcggctgt ggtaacgca gctaacgcc gtggaactgt aggggatggc gtatgcaggg 15480
 5 ccgtagcgaa gaaatggccg tcagcctta agggagcagc aacaccagtg ggcacaatta 15540
 aaacagtcat gtgaggctgc taccocgta tccagctgt agcgcctaatt tctctgcca 15600
 cgactgaagc ggaaggggac cgcaattgg ccgctgtcta ccgggcagtg gccgccgaag 15660
 taaacagact gtactgagc agcgtagcca tcccgtctgt gtccacagga gtgttcagcg 15720
 gcggaagaga taggctgag caatccctca accatctatt cacagcaatg gacgccacgg 15780
 10 acgctgacgt gaccatctac tgcagagaca aaagtggga gaagaaaatc caggaagcca 15840
 ttgacatgag gacggctgtg gagttgtca atgatgacgt ggagctgacc acagacttgg 15900
 tgagagtga cccggacagc agcctggtg gtcgtaaggg ctacagtacc actgacgggt 15960
 cgctgtactc gtactttgaa ggtacgaaat tcaaccaggc tgctattgat atggcagaga 16020
 tactgacgtt gtggcccaga ctgcaagagg caaacgaaca gatatgccta tacgcgctgg 16080
 15 gcgaaacaat ggacaacatc agatccaaat gtccggtgaa cgattccgat tcatcaacac 16140
 ctcccaggac agtgcccctgc ctgtcccgt acgcaatgac agcagaacgg atcggcccgc 16200
 ttaggtcaca ccaagttaaa agcatggtgg ttgctcatc tttcccctc ccgaaatacc 16260
 atgtagatgg ggtgcagaag gtaaagtgcg agaaggttct cctgttcgac ccgacggtac 16320
 cttcagtgtg tagtccgag aagatgccc catctacgac ggaccactca gatcggctgt 16380
 20 tacgaggggt tgacttgac tggaccaccg actcgtctc cactgccagc gatacatgt 16440
 cgctaccag ttgcagtcg tgtgacatc actcgatcta cgagccaatg gctcccatag 16500
 tagtgacggc tgacgtacac cctgaacccg caggcatcgc ggacctggcg gcagatgtgc 16560
 accctgaacc cgcagaccat gtggacctc agaaccgat tctccaccg cgcccgaaga 16620
 gagctgata cttgctctc cgcgccggcg agcagaccgt gccggcgccg agaaagccga 16680
 25 cgctgcccc aaggactgcg tttaggaaca agctgcctt gacgttcgac gactttgacg 16740
 agcacgaggt cgatgcgtg gcctccggga ttactttcg agacttcgac gacgcctgc 16800
 gactaggccg cgccgggtgca tatatttct cctcgacac tggcagcggga cattacaac 16860
 aaaaatccgt taggcagcac aatctccagt gcgcacaact ggatgcggtc caggaggaga 16920
 aatgtacc gccaaaattg gatactgaga gggagaagct gttgctgctg aaaatgcaga 16980
 30 tgcacccatc ggaggcta aagagtcgat accagtctc caaagtggag aacatgaaag 17040
 ccacgggtgt ggacaggctc acatggggg ccagattgta cacgggagcg gacgtaggcc 17100
 gcataccaac ataccggtt cgttaccctc gcccggtgta ctcccctacc gtgatcgaag 17160
 gattctcaag ccccgatgta gcaatcgag cgtgcaacga atacctatcc agaaattacc 17220
 caacagtggc gtcgtaccag ataacagatg aatacagcgc atacttgac atggttgacg 17280
 35 ggtcggatag ttgcttgac agagcgacat tctcccggc gaagctccg tgctaccga 17340
 aacatcatgc gtaccaccag ccgactgtac gcagtgccgt cccgtcacc ttcagaaca 17400

ES 2 356 322 T3

cactacagaa cgtgctagcg gccgccacca agagaaactg caacgtcacg caaatgcbag 17460
 aactaccac catggactcg gcagtggtca acgtggagtg cttcaagcgc tatgcbtct 17520
 ccggagaata ttggaagaa tatgctaaac aacatatccg gataaccact gagaacatca 17580
 ctacatatgt gaccaaattg aaaggcccga aagctgctgc cttgttcgct aagaccaca 17640
 5 acttggtcc gctgcaggag gttccatgg acagattcac ggctgacatg aaacgagatg 17700
 tcaaagtac tccaggagc aaacacacag aggaagacc caaagtccag gtaattcaag 17760
 cagcggagcc attggcgacc gcttacctgt gcggcatcca cagggaatta gtaaggagac 17820
 taaatgctgt gttacgcct aacgtgcaca cattgttga tatgtcggcc gaagactttg 17880
 acgcbatcat cgcctctac ttccaccag gagaccgggt tctagagacg gacattgat 17940
 10 cattgacaa aagccaggac gactcctgg ctctacagg ttaattgat ctcgaagatc 18000
 taggggtgga tcagtacctg ctggactga tcgaggcagc cttggggaa atatccagct 18060
 gtcacctacc aactggcagc cgcttcaagt tcggagctat gatgaaatcg gcbatgttc 18120
 tgactttgt tattaacact gtttgaaca tcaccatagc aagcagggtc ctggagcaga 18180
 gactcactga ctccgcctgt gcggcctca tcggcgacga caacatcgtt cacggagtga 18240
 15 tctccgacaa gctgatggcg gagaggtgcg cgtcgtgggt caacatggag gtgaagatca 18300
 ttgacgtgt catggcgcaa aaaccccat attttggg gggattcata gttttgaca 18360
 gcgtcacaca gaccgcctgc cgtgttcag acccactaa gcgcctgttc aagttggta 18420
 agccgctaag acgtgaagac aagcaggcag aagacaggcg acgagcactg agtgacgag 18480
 ttagcaagtg gttccggaca ggctggggg ccgaactgga ggtggcacta acatctaggt 18540
 20 atgagtaga gggctgcaa agtatccta tagcbatggc cacctggcg agggacatta 18600
 aggcgttaa gaaattgaga ggacctgta tacacctta cggcgtcct agattgtgc 18660
 gtaatacac agaatttga ttgatctcg aggtcgacgg tatcgataag cttgggctgc 18720
 aggtcagtc actctagagg atcgtcccc accatgggtc aatcacgcta cctccttt 18780
 ttggccacc ttccctct aaaccacctc agtttgcca gggctattcc agtctctgga 18840
 25 cctgccaggt gtcttagcca gtcccgaac ctgctgaaga ccacagatga catggtgaag 18900
 acggccagag aaaaactgaa acattattcc tgcbatgctg aagacatcga tcatgaagac 18960
 atcacacggg accaaaccag cacattgaag acctgttac cactggaact acacaagaac 19020
 gagagttgc tgctactag agagactct tcacaacaa gagggagctg cctgccccca 19080
 cagaagacgt cttgatgat gacctgtgc cttgtagca tctatgagga cttgaagatg 19140
 30 taccagacag agttccaggc catcaacgca gcactcaga atcacaacca tcagcagatc 19200
 attctagaca agggcbatgt ggtggcctc gatgagctga tgcagtctct gaatcataat 19260
 ggcgagactc tgcgccagaa acctcctgtg ggagaagcag acccttacag agtgaaaatg 19320
 aagctctgca tctgctca cgcctcagc acccgcgtc tgaccatcaa cagggtgatg 19380
 ggctatctga gctccgctg agaattccgc ccctctccct cccccccc taacgttact 19440
 35 ggccgaagcc gcttgaata agccgggtg gcgtttgtct atatgttatt ttccaccata 19500
 ttccgtctt ttgcaatg tagggccgg aaacctggcc ctgtctctt gacgacatt 19560

cctaggggtc ttccctct cgccaaagga atgcaaggtc tgtgaaatgt cggaaggaa 19620
 gcagttcctc tggaagcttc tgaagacaa acaacgtctg tagcgaccct tgcaggcag 19680
 cggaaccccc cacctggcga caggtgcctc tgcggccaaa agccacgtgt ataagataca 19740
 cctgcaaagg cggcacaacc ccagtccac gttgtgagt ggatagttgt gaaagagtc 19800
 5 aatggctct cctcaagcgt attcaacaag gggctgaagg atgccagaa ggtacccat 19860
 tgtatgggat ctgatctggg gcctcgtgc acatgctta catgttita gtcgaggta 19920
 aaaaacgtct agggcccccg aaccacgggg acgtggttt ctttgaaaa acacgatgat 19980
 aatattgcca caacatggg tcctcagaag ctaacatct cctggttgc catcgtttg 20040
 ctggtgtct cactcatggc catgtgggag ctggagaaag acgtttatgt ttagagggtg 20100
 10 gactggactc ccgatgccc tggagaaaca gtgaacctca cctgtgacac gcctgaagaa 20160
 gatgacatca cctggacctc agaccagaga catggagtca taggctctgg aaagacctg 20220
 accatcactg tcaaagagtt ttagatgct ggccagtaca cctgccaaa aggaggcgag 20280
 actctgagcc actcacatct gctgtccac aagaaggaaa atggaattg gtccactgaa 20340
 attttaaaa attcaaaaa caagacttc ctgaagtgtg aagcaccaaa ttactccgga 20400
 15 cggttcacgt gctcatggct ggtgcaaaga aacatggact tgaagttcaa catcaagagc 20460
 agtagcagtt ccctgactc tcgggcagtg acatgtggaa tggcgtctct gtctgcagag 20520
 aaggtcacac tggaccaaag ggactatgag aagtattcag tctcctgcca ggaggatgc 20580
 acctgcccaa ctgccgagga gaccctgcc attgaactgg cgttggaaag acggcagcag 20640
 aataaatatg agaactacag caccagcttc ttcatcaggg acatcatcaa accagaccg 20700
 20 cccaagaact tgcagatgaa gccttgaag aactcacagg tggaggtcag ctgggagtac 20760
 cctgactcct ggagactcc ccattcctac ttctccctca agttcttgt tcgaatccag 20820
 cgcaagaaag aaaagatgaa ggagacagag gaggggtgta accagaaagg tgcgttctc 20880
 gtagagaaga catctaccga agtccaatgc aaaggcggga atgtctcgt gcaagctcag 20940
 gatcgtatt acaattctc atgcagcaag tgggcatgtg ttccctgag ggtccgatcc 21000
 25 tagaattcat tgatcacta ggatccggg taattaattg aattacatcc ctacgcaaac 21060
 gtttacggc cgccggtggc gcccgcgcc ggccggccgt ccttggccgt tgcaggccac 21120
 tccggtggct cccgtctcc ccgactcca ggcccagcag atgcagcaac tcatcagcgc 21180
 cgtaaatgcg ctgacaatga gacagaacgc aattgctct gctaggcctc ccaaaccaaa 21240
 gaagaagaag acaaccaaac caagccgaa aacgcagccc aagaagatca acgaaaaaac 21300
 30 gcagcagcaa aagaagaaag acaagcaagc cgacaagaag aagaagaaac ccgaaaaaag 21360
 agaaagaatg tgatgaaga tgaaaatga ctgtatctc gtatgaggct agccacagta 21420
 acgtagtgt tccagacatg tcgggcaccg cactatcatg ggtgcagaaa atctcgggtg 21480
 gtctgggggc cttcgaatc ggcgctatcc tggctcgtt tgggtcact tgcattggc 21540
 tccgcagata agttagggtg ggcaatggca ttgatatagc aagaaaattg aaaacagaaa 21600
 35 aagttagggt aagcaatggc atataacat aactgtataa cttgaacaa agcgcaacaa 21660
 gacctgcgca attggcccc tggtccgct cacggaaact cggggcaact catattgaca 21720

ES 2 356 322 T3

catlaattgg caataattgg aagcttacat aagcttaatt cgacgaataa ttggatTTTT 21780
 atttttttt gcaattgggt ttaatatatt ccaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 21840
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aactagatcc tcgaatcaag 21900
 cttatcgata ccgctgacta gagtcggggc ggccggccgc ttcgagcaga catgataaga 21960
 5 tacattgatg agtttgaca aaccacaact agaatgcagt gaaaaaaaaatg ctttattgt 22020
 gaaattgtg atgctattgc tttatttga accattataa gctgcaataa acaagttaac 22080
 aacaacaatt gcattcattt tatgttcag gttcaggggg aggtgtggga ggtttttaa 22140
 agcaagtaaa acctctacaa atgtggtaaa atcgataagg atctcgacct cgaggggggg 22200
 cccggtacc aatcgccct atagtgagtc gtattacgcg cgcccctgca gggggccctg 22260
 10 taccgggctc tgctgaggc tctggctgcc cagcaggctg aagctgggtg tgttgccag 22320
 gggcactgt gtcccatcg cagcgggac ttgtcctcc caatcagatg gccttgaag 22380
 gcaggcctgg ccagaagggt agtgctgctg aacgctatta tccactggc tgaggggtgt 22440
 tttcccgaa actgctggtg tcacagctgc tgccgctgtg acctatgcag cattgtgaa 22500
 cgcagtggc attctggca cactaggccg tctgagctgg tgggactca aggactgggt 22560
 15 gccaggagg ctgggacaga accaggcag gggcacttct ggtgggtgg ccttgggct 22620
 ctgcatatgc tggcagacag agtcaagtct gccagggga gtctggcctg agtgtgagag 22680
 gatgggacac tgggggctgg aggtgaaaat tcctgcccgc tccccagag ttggtgagat 22740
 cactcccatg ccctcgagc tctggtcct ggtgagtgg atcattcctg gactcagatt 22800
 gttctgaaga agcccagtc tgggtggcat caagtgctg ctagatggg ggcttcctt 22860
 20 gatccggcta cacttgagg tgactgttc ttggacggt acatacagaa agagagaagt 22920
 ggggatgagt tcaaaggca tcctcgactt cggctgtggc caccggagg tagctcctg 22980
 cccaacacgg acttctacc tcccgcctt ggctctctac tgagctccc cctgctccc 23040
 aattcctgc cattcccctc atttctgc cctcagcctg gactgcagt ctctgggaa 23100
 gctgccccaa ctccctaggt ctgtctcac caagagcaga tcacactgga ctgaaatgcc 23160
 25 agctgattg tcttcaag aaaattgaa gtcctggag gtcagggtcc atgtctgtt 23220
 ttactcag tgctgtat gcaggcctgg cactgcccac ctttgacag gtgtgcata 23280
 tttgtagaa ggaaggaagg ggccagggtg ggtgggctgg gctggtggcg ggagctagct 23340
 cagccttta gattctac ccgatgatg tgacctgga cagcaagtga gtgtgtgag 23400
 tgatgcaga cggtgcttg tccccctt gtctatagc ctatagggc tctgagccca 23460
 30 gatctggggc tcagacaaca tttgtcaac tgaacggtaa tgggttctt ttctgaaggc 23520
 tgaaatctg gagctgacat tctggactcc ctgagtctg aagagcctgg ggatggagag 23580
 acacggagca gaagatggaa ggtagagtc cagggtccta agatggggaa tacatctcc 23640
 ctcatgtca tgagagtcca ctctagctga tatctactgt ggccaatc taccgtact 23700
 ttttgggt ggacactgag tcatgcagca gtcttatgt ttaccaagg tcaggtagg 23760
 35 gagacagtgc agtcagagca caagccaggt gtgtctgacc caccaagaa tccatgctcg 23820
 tatctacaaa aatgatttt tctctgtaa tggctcctag gttctttat tatcatggca 23880

ES 2 356 322 T3

tgtgtatgtt ttcaactag gtfacaatct ggcctataa ggtaacctc ctggaggcca 23940
 ccagcctcc tgaactgt ctgtgctgc cctgcaactg gagtgcct gatgtggcac 24000
 tccagcctgg acaagtggga cacagactcc gctgtatca ggccaaaga tgtctccat 24060
 aagaccagaa gagcaatgt gtagaggtgt catgggctac aataaagatg ctgacctct 24120
 5 gctgagggc aagcagcctc ttctggcct cagacaaatg ctgagtgtc ccaagactac 24180
 cctggcctg gtccaatctc atcccactgg tgcgtaaggg ttgctgaact catgactct 24240
 tggctagcct gcaacctcca cggagtggga actacatcag gcattttgct aactgctgta 24300
 tcctaggcc aataatgttg atcacattta tagctgcat gtaggggtgg ggacctctc 24360
 tatctatctg tggaggctct gggagcccct gacacaaact ttctgaagca gagcctccc 24420
 10 aaccctttt ccattcccta tacctgacag atggcccagg aaccattag aaatggaagg 24480
 tctctgacg agtatgtgaa tgtgctgtg ggagaaggc aggatcagag cctgggggt 24540
 gtggcagccc ccaagtgtt ctaatccaga tcctaggggt gtttccctgt ccattgaaa 24600
 tagctgctt aagggcctg actcaggga atcagtctt tgaattaagt ggtgatttg 24660
 gactcattta gaccagcct tcaattggga tcctgctct agagttgat gaattatta 24720
 15 actgatttc agatctctc ttctcaatg ctttcagaag cacagtaact gcttactctg 24780
 aaatgaattc tcaccactc tcacatatg cacccttgc ccacccttt gggaactc 24840
 gccttaactg cttacttca aatggactc tctgtggga gatatatgca ttctgccgt 24900
 caggggtcat tgccataaga cctgatctc gttcctctg ctaaacagaa gatgaaaag 24960
 acaaattaga ttacagctac caattaataa ttagccttag gatcgctgcg tggggacct 25020
 20 ggacttggt ttgtgacg agaaagcatg aataaacaca ccagcataca ctgcatgca 25080
 tgccccacc tctgagcaa aattccacag gtataataa agtaagattc tgcacctgg 25140
 ttaaaaacac aactgcaaca gcatagaatg gggcaggaga gacagaact aatagcaaga 25200
 gcacacagaa aaaagtta ggcatttgg atgtccatct gctcaggatg ggtcagcagt 25260
 gagatgcgt caccaaaaga acaaatgta cattaggctg cattaataga agcagagtat 25320
 25 gtagaaggag ggaggtgaca gtcctatgt aactctgct tggccagact ataccacag 25380
 gagtctggc atgccagtct caggagacc cagacagact ggctgattc agaggatgt 25440
 aagtaatgag agtgggatt ggactcaa ctaccagac aaagaatggc tgagcaagcc 25500
 aaggatgctg tggctgggc agagcagact gtggctatg tagtgggga tacctagcct 25560
 ctgagggtc gcatagga aaggacattg agaaggac tgaggctgt tcctggtgt 25620
 30 cctggcatga acggccagat gatcacatgg tcaggtggac acagtctca acactggag 25680
 tagccaaaca cttactgca acctccgcc cttctctga ctagtgcag cataggcaat 25740
 tgggaggagc ttctgtct catctgaaag ctggctgggt gggcagggg aggagcgagc 25800
 caagttcaa ggccgagtt tcagactca gctgggatc ggctcaagga gcaaaggga 25860
 agaacatagc caggaggga taacatgaag gccccagac ccagaaaagg catgactgc 25920
 35 tctgagacc tcagccggt ggtgtcaggt tgtgactcg atccaggtct gactccagt 25980
 ccagtctg aagcctacc ccacacagt aggggagccc ggccatctc gctcaactgc 26040

tgccatctct ctcccctct caaccaccaa ggcagctctg tctgggagca caagctcaa 26100
 gtccacttct tggctgtgt ccccccaag atgccagagg acttgctct acaacacggg 26160
 ctgcccgtgc agtgctgtct ttccagcaa agggcttctg ggaaccctc tctgactca 26220
 gtggggctgg tgggagtggg gcggggtagc gaccagtgct tgggactgt gccagctct 26280
 5 caggcctggc agcagttcct ggccttgggt cctgccaagg cagagaggac aaacacatgg 26340
 caccgggaag actacaccag aagcgattcc accagactgg ggtttgcttt tctatccgc 26400
 ccttagcctg ctctctgtcc tggctcctgc ctcccctcc actggagctg ccgtgtgggc 26460
 agtgaggggc tgtttctcag ctgccatg gagctgccct ctccctgcca aagcattggc 26520
 aaggcgcaaa ggggtggggg tgggatggg ggggtggatc tgcttctca agctctcatt 26580
 10 atactgagca cgtctcacc attatttat gtcatctagc aacaccccat gtggactg 26640
 aggagcatgg ggttcacatg accactgcc aagccacac catccgatc tgcctgagat 26700
 ggtcaggggt ggcagccatt tctgaaggca gtccttcgc ttggctctt ctgtaccag 26760
 tctcaggaca tcagggcaga agatctacag tcccagctt actgatgtga cagcagaggc 26820
 tcagagaggt taaatgactt gcccaagggt acacggctaa gaagtacagt atctcctaac 26880
 15 tgcagaccag gtgctctgc tgctctggg gacagattcc tgcgtggctg gctaggtcta 26940
 aacggtcctt aactccatcc ccaccgggtg ctgcattagt ttcatcaaat aacacagttg 27000
 tacagaggta ggggttcagg ggcaggggca gatggaggct ggagagtgtg actaaggaaa 27060
 cagcagggga agtgcggtaa agtcccagg gagggacgga aagagaaagc caagcccagg 27120
 ggcgtgccag acaaaaggaa aggccacgcc ggggcagggc aggctcagc ggggtgctgg 27180
 20 gcgtctcat cccgggaagc acacattcca gaggaccccg gacttaatg gaaaagctgg 27240
 ccagcctatc actatgaaa ctgccaaggc cacacagcgc tgctgacacc cagcctgggt 27300
 gccgtggcc agctctcagc gatctcaag tctggggctg caccagcaag cgacggctct 27360
 ccatgggctc ttcacctac ggcagtgtcc agaggcaccg ccagtctct gctcctatgc 27420
 tggctctgt gtcctggca aaaggagcca gagcattctc tccaggctc cagaggaggc 27480
 25 tgcttcttt gttttgcaga tggaggctcc catcctttgt tctgaatcaa tgtgctcaa 27540
 agataagccc caagaaaaca gttgtgctt tttgactg acaattagaa tcgttgga 27600
 atggagaaaa caggaaatgg caaatggtt cagtaccag gaggaacccg tgcctgaaag 27660
 ttgctgcta gtgactggga cactcgttt ctgctctt atgaaggaca gcctaggccg 27720
 tgtggccttt tataaaciaa gctatgaagg ggtcgtcaa tttctaggg ctgcaactgt 27780
 30 ggcactacgt cctgtgtgc caggtagcac tgacaagcag cactgagttc tatgcaagcc 27840
 cagggtgtct tctctatgg tgaccccg agaactaagg cccagctct cctctgtcac 27900
 accctccca gccccactg tcagacaagg gaccacattc acagacagtc tcagccaaga 27960
 tggcaacctt ggaagtctg gggatgcctt tctagaagct cgcgccccta gggccggcc 28020
 ttaattaaat caagctatc gataccgtc agacctcag ggggggcatc actccgcct 28080
 35 aaaactacg tcacccgcc cgttcccacg ccccgccca cgtcacaac tcacccct 28140
 cattatcata ttggctcaa tccaaaataa ggtatattat tgatgatgt t 28191

<210> 11
 <211> 5844
 <212> DNA
 <213> Plásmido
 5 <220>
 <221> MCS
 <222> (1)..(25)
 <223> Sitio múltiple de clonaje
 <220>
 10 <221> AFP enhancer
 <222> (26)..(820)
 <223> Potenciador AFP
 <220>
 <221> AFP pro
 15 <222> (828)..(1054)
 <223> Promotor AFP
 <400> 11
 ggtaccgagc tcttacgcgt gctagaattc gcctgtcata cagctaataa tgaccataa 60
 gacaattaga tttaaattag ttttgaatct ttctaatacc aaagtcagt ttactgttcc 120
 20 atgttgcttc tgagtggctt cacagactta tgaaaaagta aacggaatca gaattacatc 180
 aatgcaaaag cattgctgtg aactctgtac ttaggactaa actttgagca ataacacaca 240
 tagattgagg attgtttgct gttagcatac aaactctggt tcaaagctcc tctttattgc 300
 ttgtcttga aaatttctg ttctcatgg ttctcttt cactgctatc tattttctc 360
 aaccactcac atggctacaa taactgtctg caagcttatg attcccaat atctatctct 420
 25 agcctcaatc ttgtccaga agataaaaag tagtattcaa atgcacatca acgtctccac 480
 ttggagggct taaagacgtt tcaacataca aaccggggag tttgcctgg aatgttctc 540
 aaaatgtgtc ctgtagcaca tagggctctc ttgtccta aatctaatt acttttagcc 600
 cagtgtcat cccacctatg gggagatgag agtgaaaagg gagcctgatt aataattaca 660
 ctaagtcaat aggcatagag ccaggactgt ttgggtaaac tggtcacttt atctaaact 720
 30 aaatataatc aaaactgaac atgtacttag ttactaagtc ttgacttta tctcattcat 780
 accactcagc ttatccagg ccacttatt gacagtctag ctagccccta gattttctgc 840
 cccaaagagc tctgtgtcct tgaacataaa atacaaataa ccgctatgct gtttaattatt 900
 ggcaaatgtc ccatfctca cctaaggaaa taccataaag taacagatat accaacaataa 960
 ggttactagt taacaggcat tgctgaaaa gagtataaaa gaatttcagc atgattttcc 1020
 35 atattgtgct tccaccactg ccaataacag gatcgggctc gagatctgcg atctaagtaa 1080
 gcttggcatt ccggtactgt tggtaaagcc accatggaag acgccaataa cataaagaaa 1140

ES 2 356 322 T3

ggccccggcg cattctatcc gctggaagat ggaaccgctg gagagcaact gcataaggct 1200
 atgaagagat acgcccctggt tcttgaaca attgcttta cagatgcaca tatcgagggt 1260
 gacatcactt acgctgagta ctcgaaatg tccgttcggt tggcagaagc tatgaaacga 1320
 tatgggctga atacaaatca cagaatcgtc gtatgcagtg aaaactctct tcaattcttt 1380
 5 atgccggtgt tgggcgctt atttatcgga gttgcagttg cccccgcaa cgacatttat 1440
 aatgaacgtg aattgctcaa cagtatgggc atttcgagc ctaccgtggt gttcgtttcc 1500
 aaaaaggggt tgcaaaaaat ttgaacgtg caaaaaaagc tcccaatcat ccaaaaaatt 1560
 attatcatgg attctaaaac ggattaccag ggatttcagt cgatgtacac gttcgtcaca 1620
 tctcatctac ctcccgttt taatgaatac gattttgtgc cagagtcctt cgatagggac 1680
 10 aagacaattg cactgatcat gaactcctct ggatctactg gtctgcctaa aggtgtcgtc 1740
 ctgcctcata gaactgcctg cgtgagattc tcgcatgcca gagatcctat tttggcaat 1800
 caaatcattc cggatactgc gatttaagt gttgttccat tccatcacgg ttttgaatg 1860
 ttactacac tcggatatt gatatgtgga ttctgagtcg tctaatgta tagattttaa 1920
 gaagagctgt ttctgaggag ccttcaggat tacaagattc aaagtgcgct gctggtgcca 1980
 15 accctattct cttctctgc caaaagcact ctgattgaca aatacgattt atctaattta 2040
 cacgaaatg cttctggtgg cgctcccctc tctaaggaag tcggggaagc ggttgccaag 2100
 aggttccatc tgccaggat caggcaagga tatgggctca ctgagactac atcagctatt 2160
 ctgattacac cggaggggga tgataaacgg ggccggtcgt gtaaagttgt tccattttt 2220
 gaagcgaagg ttgtgatct ggataccggg aaaacgctgg gcgttaatca aagaggcga 2280
 20 ctgtgtgta gaggtcctat gattatgctc ggttatgta acaatccgga agcgaccaac 2340
 gccttgattg acaaggatgg atggctacat tctggagaca tagcttactg ggacgaagac 2400
 gaacactct tcatcgttga ccgctgaag tctctgatta agtaciaaagg ctatcagggtg 2460
 gctcccgtg aattggaatc catctgtct caacaccca acatcttga cgcagggtgc 2520
 gcaggcttc ccgacgatga cgcgggtgaa cttcccgcg ccgttgtgt tttggagcac 2580
 25 ggaaagacga tgacggaaaa agagatcgtg gattacgtc cagtaagt aacaaccgcg 2640
 aaaaagttgc gcggaggagt tgtttgtg gacgaagtac cgaagggtct taccgaaaa 2700
 ctgacgcaa gaaaaatcag agagatcctc ataaaggcca agaagggcgg aaagatcgcc 2760
 gtgtaattct agagtcgggg cggccggccg cttcgagcag acatgataag atacattgat 2820
 gagttggac aaaccacaac tagaatcag tgaaaaaat gctttattg tgaattgt 2880
 30 gatgctattg cttattgt aaccattata agctgcaata aacaagtaa caacaacaat 2940
 tgcattcatt ttatgttca ggttcagggg gaggtgtggg aggttttta aagcaagtaa 3000
 aaccttaca aatgtggtaa aatcgataag gatccgtcga ccgatgccct tgagagcctt 3060
 caaccagtc agctcctcc ggtggcgcg gggcatgact atcgtcggc cacttatgac 3120
 tgtctctt atcatgcaac tcgtaggaca ggtgccgga gcgctctcc gcttctcgc 3180
 35 tcaactgact gctgcgctg gtcgtcggc tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaagg 3240
 cggaatacag gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaa 3300

ES 2 356 322 T3

gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgctgtgct ggcgttttc cataggctcc 3360
 gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagta gaggtggcga aaccgacag 3420
 gactataaag ataccaggcg ttccccctg gaagctcct cgtgcgctct cctgttccga 3480
 ccctgccgt taccggatac ctgtccgct ttccccctc gggaagcgtg gcgcttttc 3540
 5 aatgctcag ctgtaggtat ctcagttcgg ttaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg 3600
 tgcaagaacc ccccgttcag cccgaccgt ggccttacc cggtaactat cgtcttgagt 3660
 ccaaccggg aagacacgac ttatgccac tggcagcagc cactggtaac aggattagca 3720
 gagcgaggta ttagggcgt gctacagagt tctgaagtg gtggcctaac tacggctaca 3780
 ctagaaggac agtatttgg atctgcgctc tgctgaagcc agttacctc ggaaaaagag 3840
 10 ttgtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cgggtgttt ttgtttgca 3900
 agcagcagat tacgcgcaga aaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc tttctacgg 3960
 ggtctgacgc tcagtgaac gaaaactcac gtaagggat ttggtcatg agattatcaa 4020
 aaaggatct cacttagatc ctttaaat aaaaatgaag ttttaataca atctaaagta 4080
 tatatgagta aactgtgtc gacagttacc aatgctaat cagtgaggca cctatctcag 4140
 15 cgatctgtc attcgttca tccatagttg cctgactccc cgtcgtgtg ataactacga 4200
 tacgggaggg ctaccatct ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac ccacgctcac 4260
 cggctccaga ttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc agaagtgtc 4320
 ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattgtg ccgggaagct agagtaagta 4380
 gttcggcagt taatagttg cgcaacgtg ttgccattgc tacaggcatc gtggtgtcac 4440
 20 gctcgtcgt ttgtatggct tcattcagct ccggttcca acgatcaagg cgagttacat 4500
 gatccccat gttgtgcaaa aaagcgggta gctcctcgg tcctccgatc gttgtcagaa 4560
 gtaagttggc cgcagtgta tcaactatg ttatggcagc actgcataat tcttactg 4620
 tcatgccatc cgtaagatgc tttctgtga ctggtgagta ctcaaccaag tcattctgag 4680
 aatagtgat gcggcgaccg agttgctct gcccgcgctc aatacgggat aataccgctc 4740
 25 cacatagcag aacttataaa gtgctcatca ttgaaaacg ttctcgggg cgaaaactct 4800
 caaggatct accgctgtg agatccagtt cgatgtaacc cactcgtgca cccaactgat 4860
 cttcagcatc tttacttc accagcgtt ctgggtgagc aaaaacagga aggcaaatg 4920
 ccgcaaaaaa gggaataagg gcgacacgga aatgttgaat actcatactc ttccttttc 4980
 aatattattg aagcattat caggttatt gtctcatgag cgatacata ttgaaatgta 5040
 30 tttagaaaaa taaacaata ggggttccg gcacatttc ccgaaaagt ccacctgacg 5100
 cgccctgtg cggcgcatta agcgcggcgg gtgtggtgtg tacgcgcagc gtgaccgcta 5160
 cacttgccag cgccctagcg cccgctcct tcgctttct cccttcttt ctcgccacgt 5220
 tcgcccgtt tccccgtaa gctctaaatc gggggctccc tttagggttc cgatttagtg 5280
 ctttacggca cctcgacccc aaaaaactg attaggtgta tggttcacgt agtgggcat 5340
 35 cgccctgata gacggtttt cgcccttga cgtggagtc cacgttctt aatagtgac 5400
 tctgttcca aactggaaca aactcaacc ctatctcgt ctattcttt gattataag 5460

ggattttgcc gatttcggcc tattggtaa aaaatgagct gatttaacaa aaatttaacg 5520
 cgaatttaa caaaatatta acgtttaciaa ttcccattc gccattcagg ctgcgcaact 5580
 gttgggaagg gcgatcggg cgggctctt cgctattacg ccagccaag ctacatgat 5640
 aagtaagtaa tattaagga cgggaggtac ttggagcggc cgcaataaaa tatcttatt 5700
 5 ttattacat ctgtgtgtg gttttgtg tgaatcgata gtactaacat acgctctcca 5760
 tcaaaacaaa acgaaacaaa acaaactagc aaaataggct gtccccagtg caagtcagg 5820
 tgccagaaca tttctctatc gata 5844
 <210> 12
 <211> 2334
 10 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 12
 tcgaggtcga cggatcgtat aagcttgggc tgcaggtcga tcgactctag aggatcgtac 60
 cccaccatgg gtcaatcacg ctacctctc ttttggcca ccctgacct cctaaaccac 120
 15 ctcaatttgg ccagggtcat tccagtctt ggacctgcca ggtgtcttag ccagtccga 180
 aacctgctga agaccacaga tgacatggtg aagacggcca gagaaaaact gaaacattat 240
 tcctgactg ctgaagacat cgatcatgaa gacatcacac gggaccaaac cagcacattg 300
 aagacctgtt taccactgga actacacaag aacgagagtt gcctggctac tagagagact 360
 tctccacaa caagagggag ctgcctgcc cccacagaaga cgtctttgat gatgacctg 420
 20 tgcttggtg gcactatga ggactgaag atgtaccaga cagagtcca ggccatcaac 480
 gcagcacttc agaatacaca ccatcagcag atcattctag acaagggcat gctggtggcc 540
 atcgatgagc tgatgcagtc tctgaatcat aatggcgaga ctctgcgcca gaaacctct 600
 gtgggagaag cagacctta cagagtgaag atgaagctct gcacacctc tcacgcctc 660
 agcaccgctg tcgtgacct caacaggggtg atgggctatc tgagctccgc ctgagaattc 720
 25 cgccccctc cctcccccc ccctaactgt actggccgaa gccgcttga ataaggccg 780
 tgtgcgttg tctatatgt atttccacc atattgccgt ctttggcaa tgtgaggcc 840
 cggaaacctg gccctgtct ctgacgagc attcctagg gtcttcccc tctgcacaa 900
 ggaatgcaag gtctgtgaa tgcgtgaag gaagcagtc ctctggaag tcttgaaga 960
 caaacaactg ctgtagcag ccttgcagg cagcggaaacc cccacctgg cgacaggtg 1020
 30 ctctgcggcc aaaagccag tgtataagat acacctgcaa aggcggcaca acccagtg 1080
 cacgttga gttggatagt tgtggaaga gtcaaatggc tctctcaag cgtattcaac 1140
 aaggggctga aggatgcca gaaggtacc cattgtatg gatctgatct ggggctcgg 1200
 tgcacatgct ttacatgtg ttagtcgagg ttaaaaaacg ttaggcccc ccgaaccag 1260
 gggacgtggt tttcttga aaaacacgat gataatatgg ccacaacct gggctctcag 1320
 35 aagctaacca tctcctggt tgccatcgtt ttgctggtg ctccactcat ggccatggt 1380
 gagctggaga aagacgttta tttgttagag gtgactgga ctccgatg ccttgagaa 1440

ES 2 356 322 T3

acagtgaacc tcacctgtga cacgcctgaa gaagatgaca tcacctggac ctacagaccag 1500
 agacatggag tcataggctc tggaaagacc ctgacatca ctgtcaaaga gtttctagat 1560
 gctggccagt acacctgcca caaaggaggc gagactctga gccactcaca tctgctgctc 1620
 cacaagaagg aaaatggaat ttgtccact gaaatttaa aaaattcaa aaacaagact 1680
 5 ttctgaagt gtgaagcacc aaattactcc ggacgggtca cgtgctcatg gctggtgcaa 1740
 agaaacatgg acttgaagt caacatcaag agcagtagca gttcccctga ctctcgggca 1800
 gtgacatgtg gaatggcgtc tctgtctgca gagaaggta cactggacca aagggactat 1860
 gagaagtatt cagtgtcctg ccaggaggat gtcacctgcc caactgccga ggagaccctg 1920
 cccattgaac tggcgttga agcacggcag cagaataaat atgagaacta cagcaccagc 1980
 10 ttctcatca gggacatcat caaaccagac ccgccaaga acttcagat gaagccttg 2040
 aagaactcac aggtggaggt cagctgggag taccctgact cctggagcac tccccattcc 2100
 tacttctccc tcaagttct tttcgaatc cagcgcaaga aagaaaagat gaaggagaca 2160
 gaggaggggt gtaaccagaa aggtgcgtc ctgtagaga agacatctac cgaagtcaa 2220
 tgcaaaggcg ggaatgtctg cgtgcaagct caggatcgtt attacaattc ctcatgcagc 2280
 15 aagtgggat gtgtccctg cagggtccga tctagaatt cattgatcca ctag 2334
 <210> 13
 <211> 2336
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 13
 ctgcagacca tgggtccagc ggcagcctc ctcttggg ctaccctgtt cctcctggac 60
 cacctcagtt tggccagaaa cctccccgtg gccactccag acccaggaat gttccatgc 120
 cttcaccact cccaaaacct gctgagggcc gtcagcaaca tgctccagaa ggccagacaa 180
 actctagaat ttacccttg cacttctgaa gagattgatc atgaagatat cacaaaagat 240
 25 aaaaccagca cagtggaggc ctgtttacca ttggagtaa ccaagaatga gagttgccta 300
 aattccagag agacctttt cataactaat gggagttgcc tggcctccag aaagacctct 360
 tttatgatgg ccctgtgcct tagtagtatt tatgaagact tgaagatgta ccagggtggag 420
 ttcaagacca tgaatgcaaa gcttctgatg gatcctaaga ggcagatctt tctagatcaa 480
 aacatgctgg cagttattga tgagctgatg caggccctga attcaacag tgagactgtg 540
 30 ccacaaaaat cctcccttga agaaccggat ttttataaaa ctaaaatcaa gctctgcata 600
 cttctcatg ctttcagaat tggggcagtg actattgata gagtgacgag ctatctgaat 660
 gcttctaac tgcagaaggg cgaattccag cacactggcg gccgttacta ggggctgcag 720
 gaattccgcc cccccctc cctccccccc cctaacgtt actggccgaa gccgcttga 780
 ataaggccgg tgtgcgttg tctatatgtt atttccacc atattgccgt cttttgcaa 840
 35 tgtgagggcc cgaaacctg gccctgtct cttgacgagc attctaggg gtctttccc 900
 tctcgccaaa ggaatgcaag gtctgttga tgcgtgaag gaagcagttc ctctggaagc 960

ttctgaaga caaacaacgt ctgtagcgac cctttgcagg cagcggaaacc cccacactgg 1020
 cgacaggtgc ctctcgccccc aaaagccacg tgtataagat acacctgcaa agcggcacia 1080
 ccccagtgcc acgtttgtag ttggatagtt gtgaaagag tcaaatggct ctctcaagc 1140
 gtattcaaca aggggctgaa ggatgccag aaggtacccc attgtatggg atctgatctg 1200
 5 gggcctcggg gcacatgctt tacatgtgt tagtcgaggt taaaaaacg tctaggcccc 1260
 ccgaaccacg gggacgtggt ttcctttga aaaacacgat gataatatgg ccacaacct 1320
 gggcaccag cagttgttca tctctgggt tccctgggt tttctggcat ctcccctgt 1380
 ggccatattg gaactgaaga aagatgttta tgcctagaa ttgattggt atccggatgc 1440
 ccctggagaa atggtggcc tcacctgta caccctgaa gaagatgta tcacctggac 1500
 10 ctggaccag agcagtgagg tcttaggctc tggcaaac ctgacctcc aagtaaaga 1560
 gtttgagat gctggccagt acacctgca caaaggaggc gaggttctaa gccattcgct 1620
 cctgctgctt cacaaaaagg aagatggaat ttgtccact gatatttaa aggaccagaa 1680
 agaaccmeta aataagacct ttctaagat cgaggccaag aattattctg gacgtttcac 1740
 ctgctggtgg ctgacgacia tcagtactga ttgacattc agtgtcaaaa gcagcagagg 1800
 15 ctctctgac cccaagggg tgacgtcgg agctgctaca ctctctgag agagagtcag 1860
 aggggacaac aaggagtatg agtactcagt ggagtgccag gaggacagt cctgcccagc 1920
 tgctgaggag agtctgcccc ttgaggtcat ggtggatgcc gttcacaagc tcaagtatga 1980
 aaactacacc agcagctctt tcacagga catcatmeta cctgaccac ccaagaactt 2040
 gcagctgaag ccattaaaga attctcgca ggtggaggtc agctgggagt accctgacac 2100
 20 ctggagtact ccacattct acttctcct gacattctgc gttcaggtcc agggcaagag 2160
 caagagagaa aagaagata gactctcac ggacaagacc tcagccacgg tcatctgccg 2220
 caaaaatgcc agcattagcg tgcgggcccc ggaccgtac tatagctcat ctggagcga 2280
 atgggatct gtgcctgca gttagatc aagcttatcg ataccgtca cctcga 2336
 <210> 14
 25 <211> 3057
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli
 <400> 14
 atggatccc tctgttaca acgtcgtgac tgggaaacc ctggcgttac ccaactaat 60
 30 cgccttgag cacatcccc tttcgccagc tggcgtata gcgaagaggc ccgaccgat 120
 cgccttccc aacagttgag cagcctgaa ggcaatggc gcttgctg gttccggca 180
 ccagaagcgg tgccgaaag ctggctggag tgcgatctc ctgaggccga tactgtctc 240
 gtcccctcaa actggcagat gcacggttac gatgcgcca tctacacaa cgtaacctat 300
 cccattacgg tcaatccgcc gttgttccc acggagaatc cgacgggtg ttactgctc 360
 35 acattaatg ttgatgaaag ctggctacag gaaggccaga cgcaattat tttgatggc 420
 gttactcgg cgtttcatct gtgtgcaac gggcgtggg tcggttacgg ccaggacagt 480

cgttgccgt ctgaattga cctgagcga ttttacgcg ccggagaaaa ccgcctcgcg 540
 gtgatgggc tgcgttgag tgacggcagt tatctggaag atcaggatat gtggcggatg 600
 agcggcattt tccgtgacgt ctggtgctg cataaacca ctacacaaat cagcgatttc 660
 catgttgcca ctgccttaa tgatgatttc agccgcgctg tactggaggc tgaagttag 720
 5 atgtgcggcg agttgcgtga ctacctacgg gtaacagttt cttatggca gggtgaaacg 780
 caggtcgcca gcggcaccgc gccttcggc ggtgaaatta tcgatgagcg tgggtggtat 840
 gccgatcgcg tcacctacg tctgaacgc gaaaaccga aactgtggag cgccgaaatc 900
 ccgaatctct atcgtgcggt ggtgaaactg cacaccgccc acggcacgct gattgaagca 960
 gaagcctcgc atgtcggttt ccgagaggcg cggattgaaa atggtctgct gctgctgaac 1020
 10 ggcaagccgt tgctgattcg aggcgttaac cgtcacgagc atcatcctct gcatggtcag 1080
 gtcattgatg agcagacgat ggtgcaggat atcctgctga tgaagcagaa caacttaac 1140
 gccgtgcgct gttcgatta tccgaacat ccgctgtgtt acacgctgtg cgaccgctac 1200
 ggctgtatg tgggtgatga agccaatatt gaaaccacg gcatggtgcc aatgaatcgt 1260
 ctgaccgatg atccgcgctg gctaccggcg atgagcgaac gcgtaacgcg aatggtgcag 1320
 15 cgcgatcgtg atcaccgag tgatgatc tggtcgtg ggaatgaatc aggccacggc 1380
 gctaatcacg acgcgctg taagctggatc aaatctgctg atcctcccg cccggtgcag 1440
 tatgaaggcg gcggagccga caccacggcc accgatatta ttgcccgat gtacgcgccc 1500
 gtggatgaag accagccctt cccggctgtg ccgaaatgt ccatcaaaaa atggcttctg 1560
 ctacctggag agacgcgccc gctgatcctt tgcaaatag cccacgcgat gggtaacagt 1620
 20 ctggcggtt tcgctaata ctggcaggcg ttcctcagt atccccgtt acagggcggc 1680
 ttctctggg actgggtgga tcagtcgctg attaaatag atgaaaacgg caaccctggg 1740
 tcggcttacg gcggtgattt tggcgatac ccgaacgatc gccagttctg tatgaacggt 1800
 ctggtcttg ccgaccgcac gccgatcca gcgctgacgg aagcaaaaca ccagcagcag 1860
 ttttccagt tccgtttat cgggcaaacc atcgaagtga ccagcgaata cctgttccgt 1920
 25 catagcgata acgagctcct gcaactgatg gtggcgtg atggttaagcc gctggcaagc 1980
 ggtgaagtgc ctctggatg ctctccaca ggtaaacagt tgattgaact gcctgaacta 2040
 ccgagcccg agacgcgccc gcaactctg ctacagtagc gcgtagtga accgaacgcg 2100
 accgatggt cagaagcccg gcaatcagc gcctggcagc agtggcgtct ggcggaaaac 2160
 ctacgtgta cgtccccg cgctccac gccatcccgc atctgaccac cagcgaatg 2220
 30 gattttgca tcgagctggg taataagcgt tggcaattta accgccagtc aggtttctt 2280
 tcacagatg ggattggcga taaaaaaca ctgctgacgc cgctgcgca tcagttcacc 2340
 cgtgcaccgc tggataacga cattggcgtg agtgaagcga cccgattga ccctaaccgc 2400
 tgggtcgaac gctggaaggc ggcgggcat taccaggccc aagcagcgtt gttgcagtgc 2460
 acggcagata cacttgctg tgccgtgctg attacgaccg ctacgcgctg gcagcatcag 2520
 35 gggaaaacct tatttatcag ccgaaaacc taccggattg atggtagtgg tcaaatgagc 2580
 attaccgttg atgtgaagt ggcgagcgt acaccgatc ccgcccggat tggcctgaac 2640

ES 2 356 322 T3

tgccagctgg cgcaggtagc agagcgggta aactggctcg gattagggcc gcaagaaaac 2700
tatcccgacc gccttactgc cgcctgttt gaccgctggg atctgccatt gtcagacatg 2760
tataccccgt acgtctccc gagcgaaaac ggtctgcgct gcgggacgcg cgaattgaat 2820
tatggcccac accagtggcg cggcgacttc cagttcaaca tcagccgcta cagtcaacag 2880
5 caactgatgg aaaccagcca tcgccatctg ctgcacgcg aagaaggcac atggctgaat 2940
atcgacggft tccatattgg gattggtggc gacgactcct ggagcccgtc agtatcggcg 3000
gaattccagc tgagcggcgg tcgctacat taccagtgg tctggtgtca aaaataa 3057
<210> 15
<211> 336
10 <212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 15
ctgcgctgc ggggccaggc cgggctcca gtggattgc gggcacagac gccaggacc 60
gcgcttcca cgtggcggag ggactgggga cccgggcacc cgtcctgcc cttcacctc 120
15 cagctccgcc tctccgcgc ggaccccgcc cgtcccgc cctcccggg tccccggccc 180
agccccctcc gggccctccc agccccctcc cttccttcc gcggccccgc cctctcctc 240
cggcgcgagt ttcaggcagc gctgcgtcct gctgcgcacg tgggaagccc tggccgatgg 300
gctcgacgca cgtgggcgca cgtgggcgca cgtggg 336

REIVINDICACIONES

1. Un vector híbrido adenoviral de expresión génica que comprende al menos los siguientes elementos, orientados en dirección 5' a 3':
- 5 i. una primera cadena de origen adenoviral que comprende una primera secuencia terminal invertida repetida (ITR) y una secuencia señal para el empaquetamiento del adenovirus;
 - ii. una primera secuencia no codificante de relleno;
 - iii. una secuencia correspondiente a un promotor específico de tejido;
 - 10 iv. una cadena de ADNc derivada de un alfavirus, cuya secuencia es parcialmente complementaria de un ARN alfaviral, que comprende al menos una secuencia codificante de al menos un gen exógeno de interés, en donde dicha cadena de ADNc comprende:
 - a) una secuencia 5' necesaria para la replicación del alfavirus,
 - b) una secuencia que codifica las proteínas no estructurales requeridas para la replicación del ARN alfaviral,
 - c) al menos un promotor subgenómico del alfavirus, y
 - d) una secuencia 3' necesaria para la replicación del alfavirus;
 - 15 v. una secuencia de poliadenilación; y
 - vi. una segunda secuencia terminal invertida repetida (ITR) adenoviral.
2. Un vector híbrido adenoviral de expresión génica según la reivindicación 1, que comprende además un elemento vii que es una segunda secuencia no codificante de relleno, entre el elemento v y el elemento vi.
3. Un vector híbrido adenoviral de expresión génica según la reivindicación 1, en donde el elemento ii es una secuencia no codificante de relleno humana.
4. Un vector híbrido adenoviral de expresión génica según la reivindicación 1 ó 3, en donde el elemento ii es la región intrón de la fosforribosiltransferasa de hipoxantina genómica humana (HPRT).
5. Un vector híbrido adenoviral de expresión génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el elemento i tiene la SEQ ID NO: 1.
- 25 6. Un vector híbrido adenoviral de expresión génica según la reivindicación 1, en donde el elemento iii es un promotor específico de tumores.
7. Un vector híbrido adenoviral de expresión génica según la reivindicación 6, en donde el elemento iii es un promotor específico de tumores seleccionado entre AFP, telomerasa TERT, PAP, E2F y HIF.
- 30 8. Un vector híbrido adenoviral de expresión génica según la reivindicación 1, en donde el elemento iii es un promotor específico de tumores que tiene una secuencia seleccionada entre SEQ ID NO: 7, correspondiente a AFP p+e, y SEQ ID NO: 15, correspondiente a telomerasa TERT.
9. Un vector híbrido adenoviral de expresión génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el elemento iv comprende una secuencia derivada del virus Semliki Forest (SFV).
- 35 10. Un vector híbrido adenoviral de expresión génica según la reivindicación 1, en donde las secuencias a) a c) del elemento iv en su conjunto tienen una secuencia seleccionada entre SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.
11. Un vector híbrido adenoviral de expresión génica según la reivindicación 1 ó 10, caracterizado porque el elemento iv d) tiene la secuencia SEQ ID NO: 5..
- 40 12. Un vector híbrido adenoviral de expresión génica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el gen exógeno de interés está seleccionado entre uno o más genes terapéuticos, uno o más genes reporteros, o combinaciones de ellos.
13. Un vector híbrido adenoviral de expresión génica según la reivindicación 12, en donde el gen exógeno de interés es el gen terapéutico interleucina de mamífero IL-12.
14. Un vector híbrido adenoviral de expresión génica según la reivindicación 12, en donde el gen exógeno de interés es el gen terapéutico interleucina humana hIL-12.
- 45 15. Un vector híbrido adenoviral de expresión génica según la reivindicación 12, en donde el gen exógeno de

interés es un gen terapéutico seleccionado entre los genes factor estimulante de colonias (GMCSF), interferón-alfa y timidin-kinasa del virus de herpes simple (HSV-TK).

16. Un vector híbrido adenoviral de expresión génica según la reivindicación 10, en donde el elemento iv comprende en serie uno o varios subconjuntos de (promotor subgenómico + gen exógeno de interés).

5 17. Un vector híbrido adenoviral de expresión génica según la reivindicación 12, en donde el gen exógeno de interés es un gen reportero seleccionado entre LacZ, Luciferasa, timidin kinasa del virus de herpes simple HSV-TK y GFP.

10 18. Un vector híbrido adenoviral de expresión génica según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 17, en donde el elemento iv forma un replicón funcionalmente controlado por el promotor iii, y en donde el promotor subgenómico alfaviral comprendido en iv.c) controla funcionalmente la expresión del gen exógeno de interés.

19. Un vector híbrido adenoviral de expresión génica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el elemento v es una secuencia de poliadenilación de SV40.

20. Un vector híbrido adenoviral de expresión génica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el elemento v tiene la secuencia SEQ ID NO: 6.

15 21. Un vector adenoviral de expresión génica según la reivindicación 2, en donde la segunda secuencia no codificante de relleno es C346.

22. Un vector adenoviral de expresión génica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el elemento vi tiene la secuencia SEQ ID NO: 2.

20 23. Un vector híbrido adenoviral de expresión génica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende:

i. una primera cadena de origen adenoviral que comprende una primera secuencia terminal invertida repetida (ITR) y una secuencia señal para el empaquetamiento del adenovirus;

ii. una primera secuencia no codificante de relleno, que es la región intron de la fosforribosiltransferasa de hipoxantina genómica humana (HPRT);

25 iii. una secuencia correspondiente a un promotor específico de tejido, que es el promotor AFP,

iv. una cadena de ADNc derivada de un alfavirus, cuya secuencia es parcialmente complementaria a un ARN alfaviral derivado del virus SFV, que comprende una secuencia que codifica un gen exógeno de interés que es hIL-12, en donde dicha cadena de ADNc comprende:

a) una secuencia 5' necesaria para la replicación del alfavirus,

30 b) una secuencia que codifica las proteínas no estructurales requeridas para la replicación del ARN alfaviral,

c) al menos un promotor subgenómico del alfavirus, y

d) una secuencia 3' necesaria para la replicación del alfavirus;

v. una secuencia de poliadenilación de SV40,

vi. una segunda secuencia terminal invertida repetida (ITR) adenoviral y

35 vii. una segunda secuencia no codificante de relleno, que es C346 genómico humano, colocada entre el elemento v y el elemento vi.

24. Un vector híbrido adenoviral de expresión génica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende:

40 i. una primera cadena de origen adenoviral que comprende una primera secuencia terminal invertida repetida (ITR) y una secuencia señal para el empaquetamiento del adenovirus;

ii. una primera secuencia no codificante de relleno, que es la región intrón de la fosforribosiltransferasa de hipoxantina genómica humana (HPRT);

iii. una secuencia que corresponde a un promotor específico de tejido, que es el promotor AFP,

45 iv. una cadena de ADNc derivada de un alfavirus, cuya secuencia es parcialmente complementaria de un ARN alfaviral derivado del virus SFV, que comprende una secuencia que codifica un gen exógeno de interés, seleccionado entre mL-12 y LacZ, en donde dicha cadena de ADNc comprende:

- a) una secuencia 5' necesaria para la replicación del alfavirus,
- b) una secuencia que codifica las proteínas no estructurales requeridas para la replicación del ARN alfaviral,
- c) al menos un promotor subgenómico del alfavirus, y
- d) una secuencia 3' necesaria para la replicación del alfavirus;

5

v. una secuencia de poliadenilación de SV40,

vi. una segunda secuencia terminal invertida repetida (ITR) adenoviral, y

vii. una segunda secuencia no codificante de relleno, que es C346 genómico humano, colocada entre el elemento v y el elemento vi.

10

25. Un vector híbrido adenoviral de expresión génica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho vector tiene una longitud comprendida entre 27 y 38 kilobases.

26. Un vector híbrido adenoviral de expresión génica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho vector tiene la secuencia SEQ ID NO: 8.

27. Un vector híbrido adenoviral de expresión génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, en donde dicho vector tiene la secuencia SEQ ID NO: 9.

15

28. Un vector híbrido adenoviral de expresión génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, en donde dicho vector tiene la secuencia SEQ ID NO: 10.

29. Uso de un vector híbrido adenoviral según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28 anteriores en un procedimiento in vitro para transferir material genético a una célula, en donde dicha célula no es una célula de una línea germinal humana.

20

30. Uso según la reivindicación 29, en donde dicha célula es una célula tumoral.

31. Uso según la reivindicación 30, en donde dicha célula es una célula tumoral que expresa AFP.

32. Uso de un vector híbrido adenoviral definido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de tumores .

25

33. Un vector híbrido adenoviral definido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28 para su uso en el tratamiento de tumores.

34. Uso de un vector híbrido adenoviral definido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28 para la preparación de un medicamento para inducir una respuesta inmune contra un antígeno extraño.

35. Un vector híbrido adenoviral definido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28, para su uso en la inducción de una respuesta inmune frente a antígenos extraños.

30

36. Una composición farmacéutica, que comprende al menos un vector híbrido adenoviral definido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28.

37. Una composición farmacéutica, que comprende al menos un vector híbrido adenoviral definido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28, en donde el gen exógeno de interés es hIL-12.

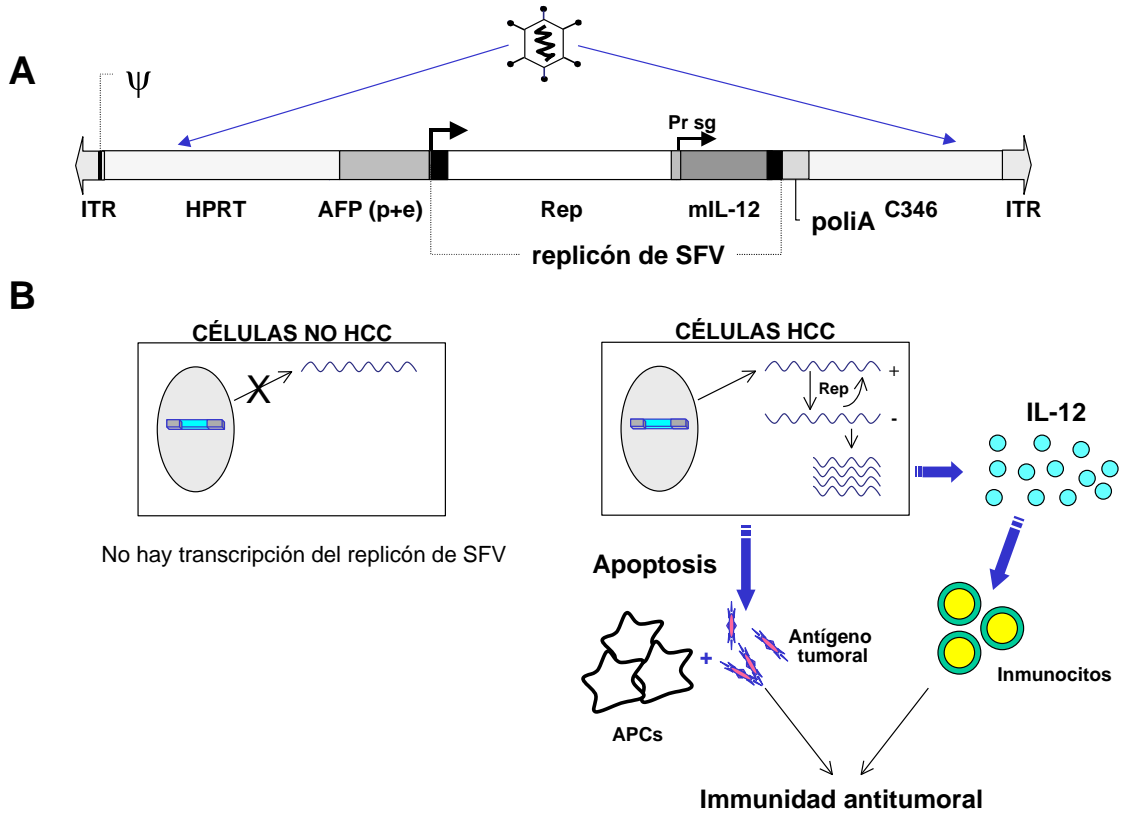


Figura 1

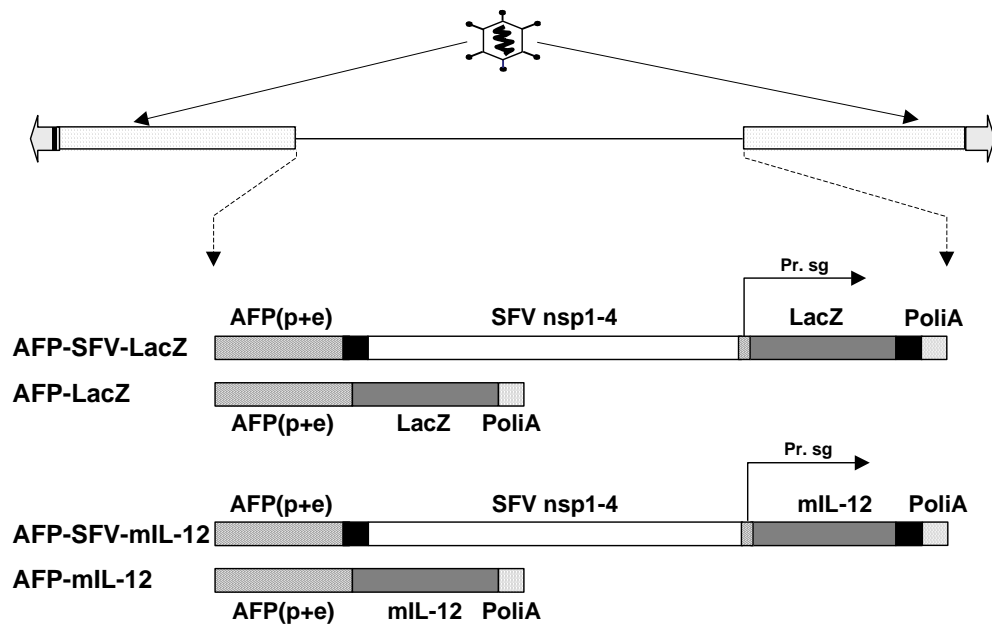


Figura 2

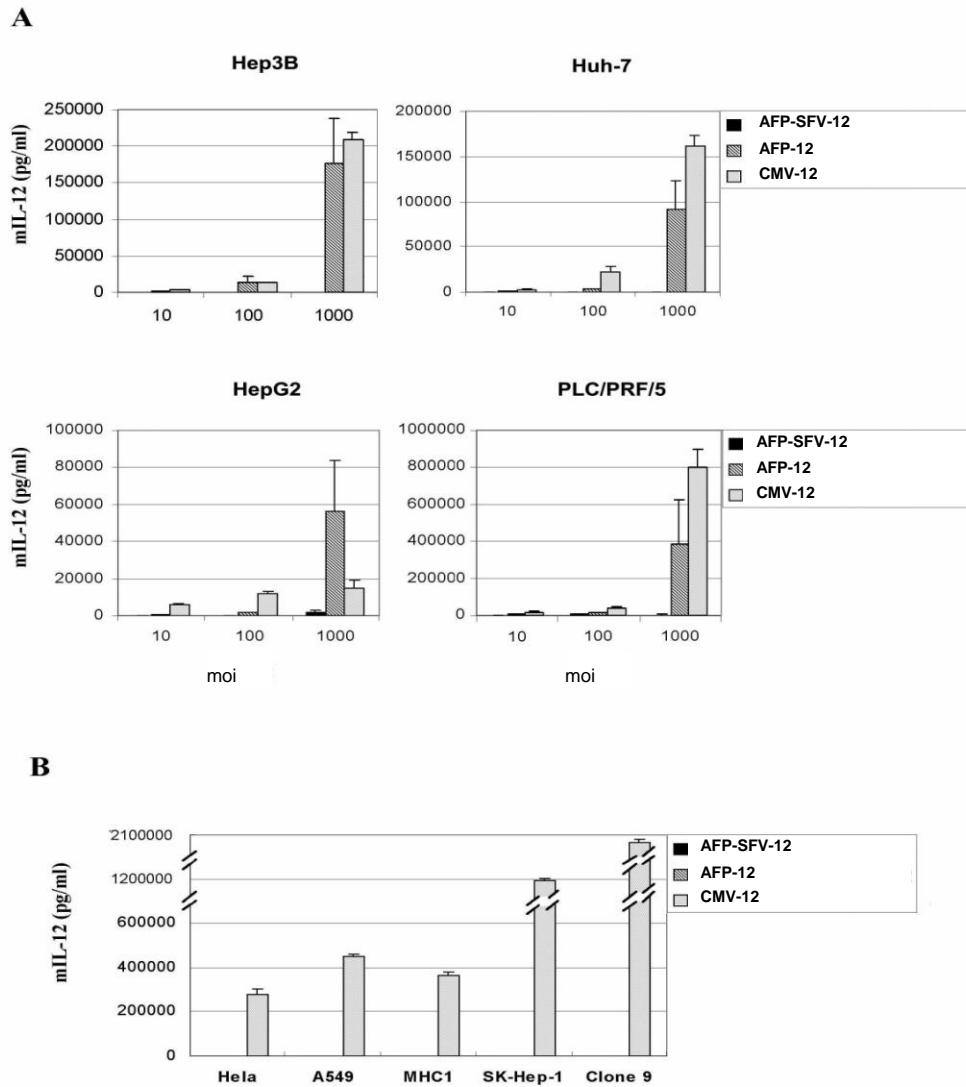


Figura 3

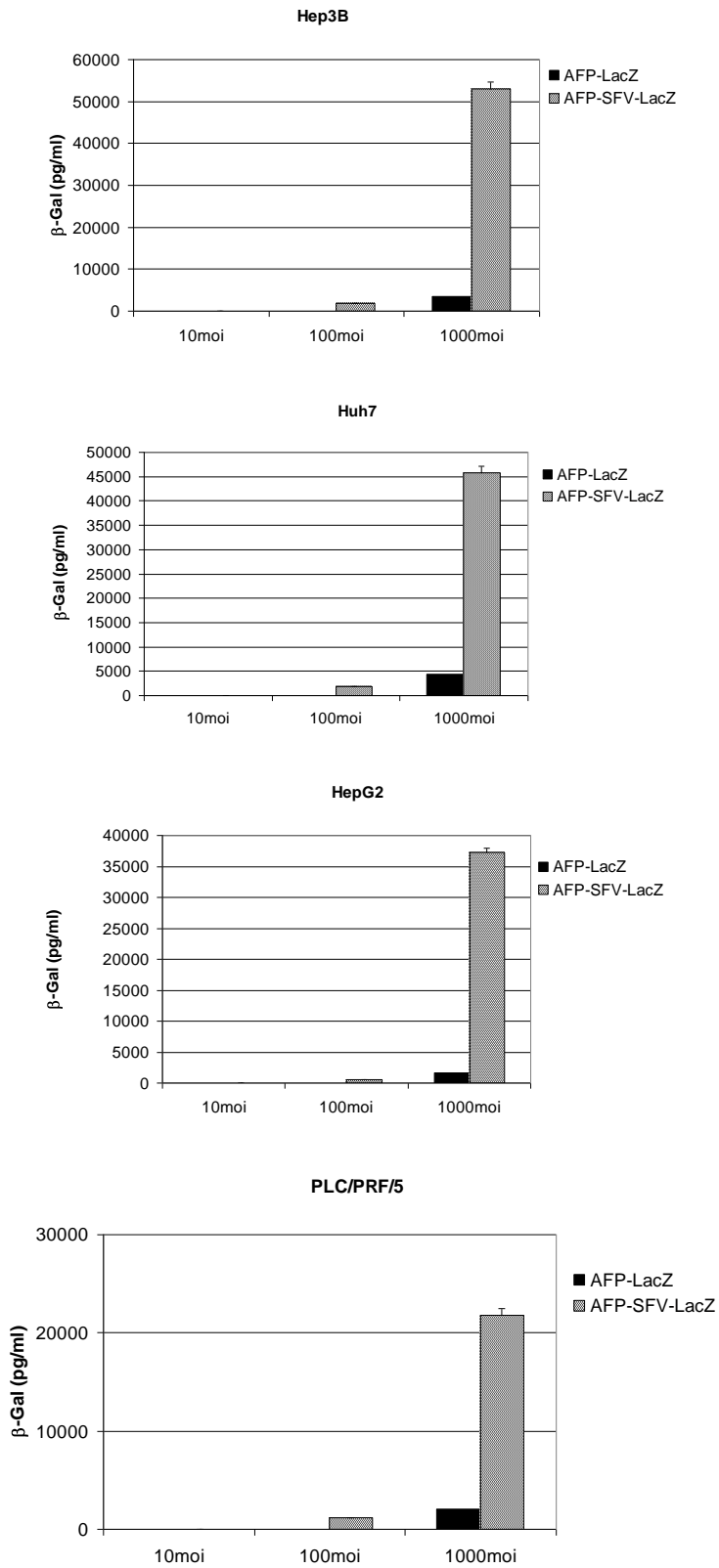


Figura 4

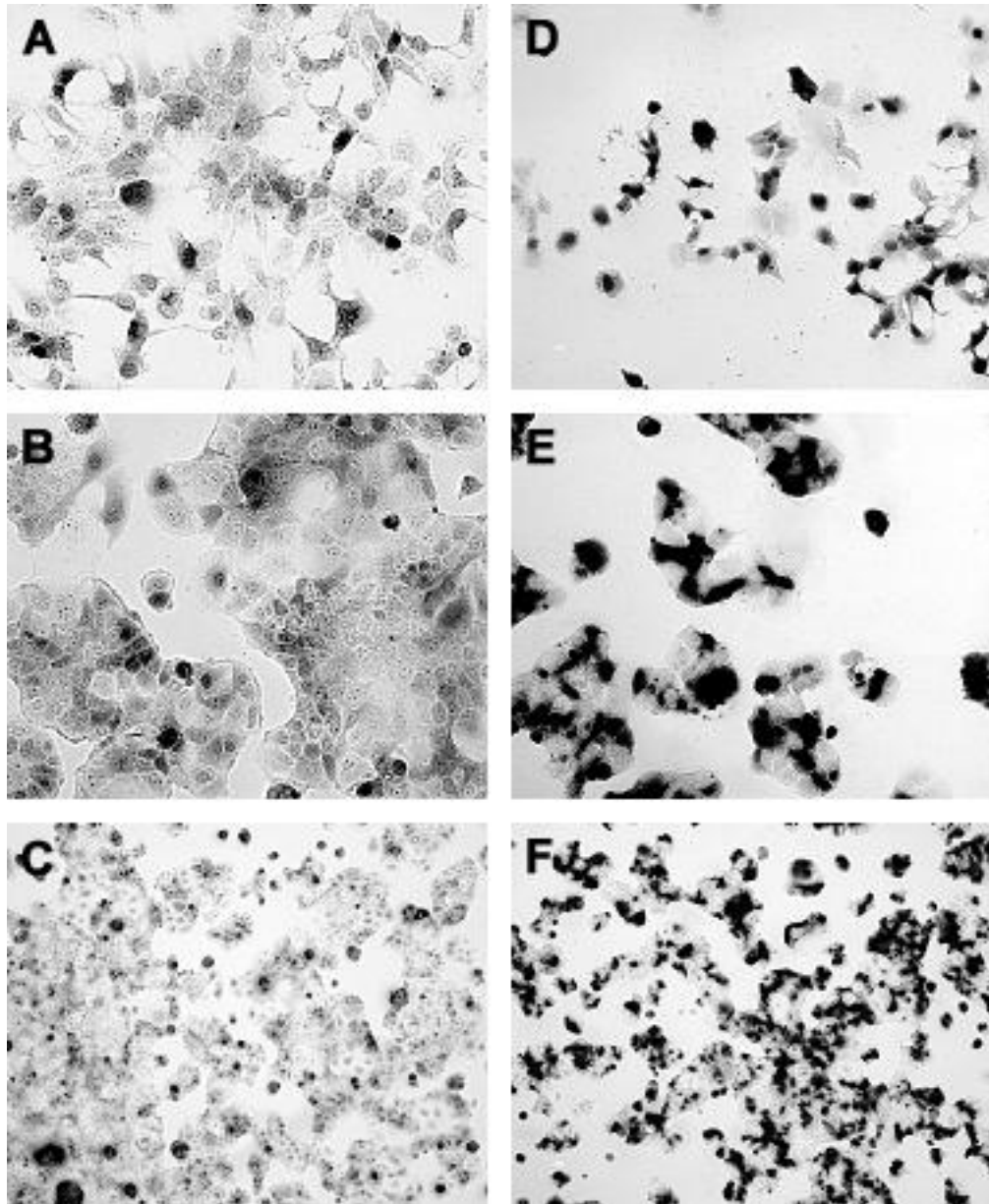


Figura 5

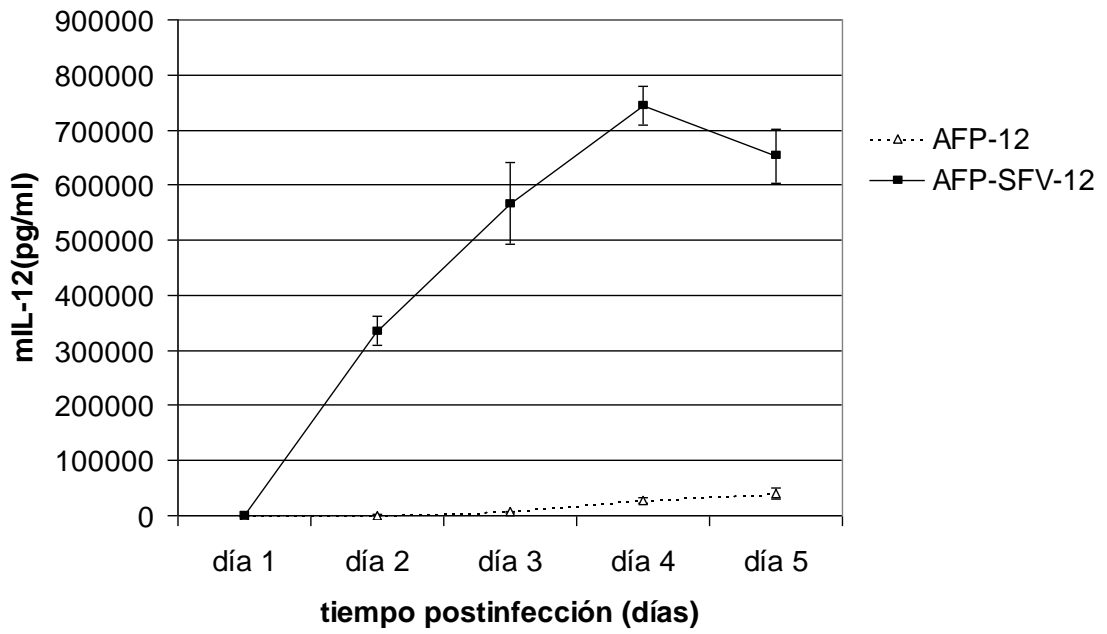


Figura 6A

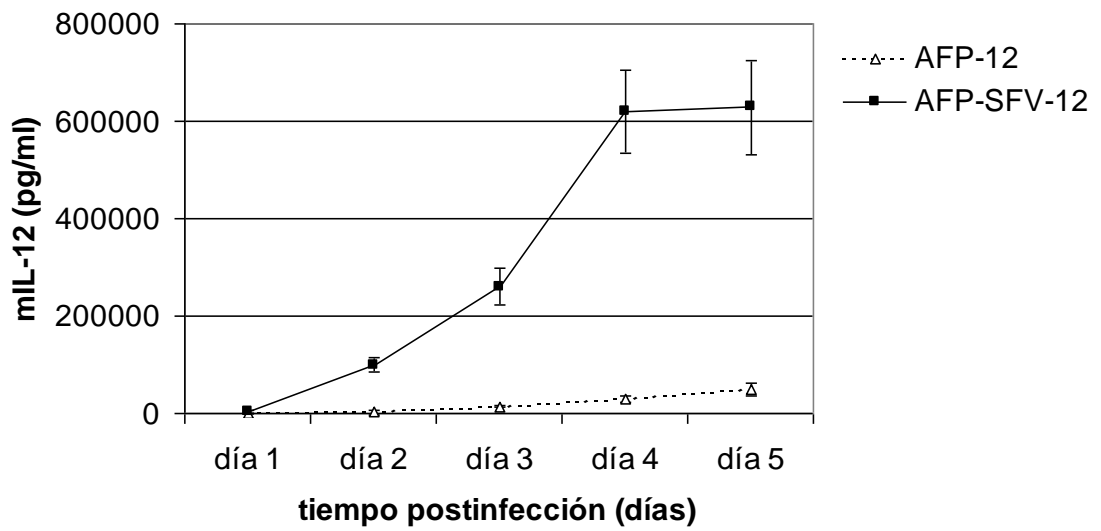


Figura 6B

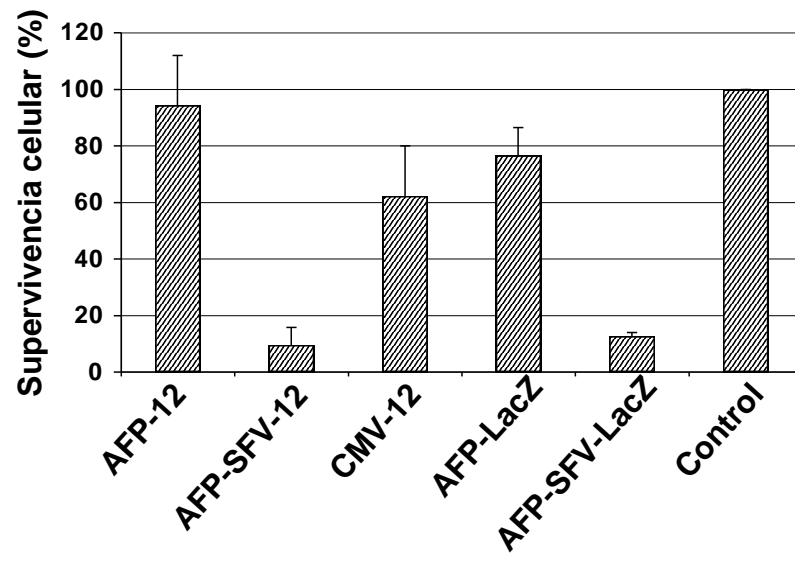


Figura 7A

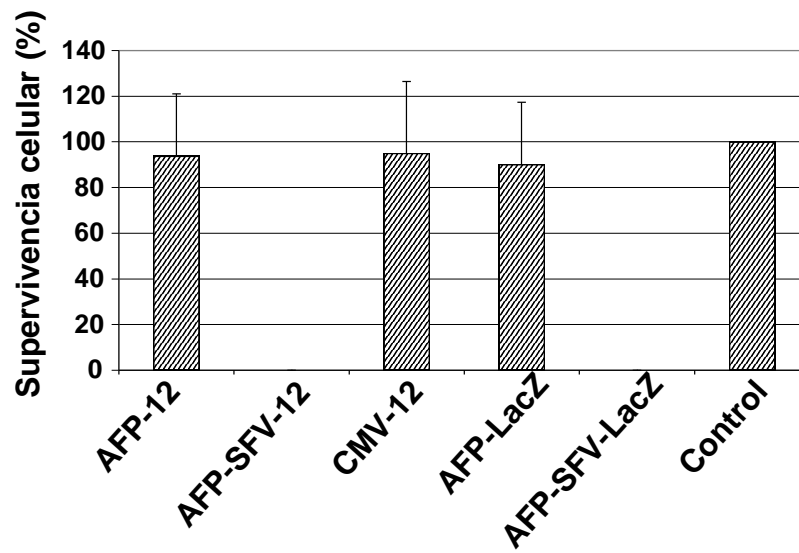


Figura 7B

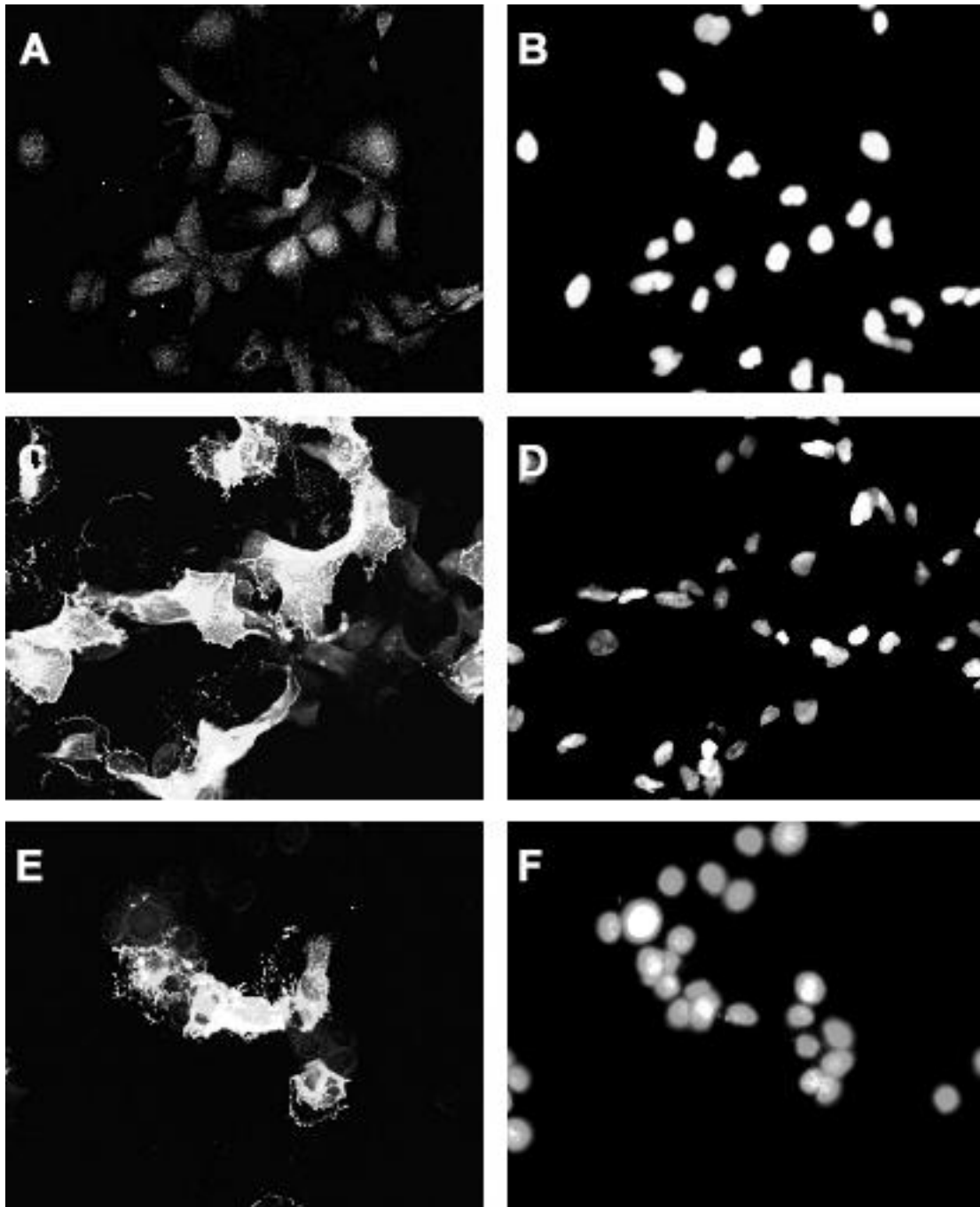


Figura 8

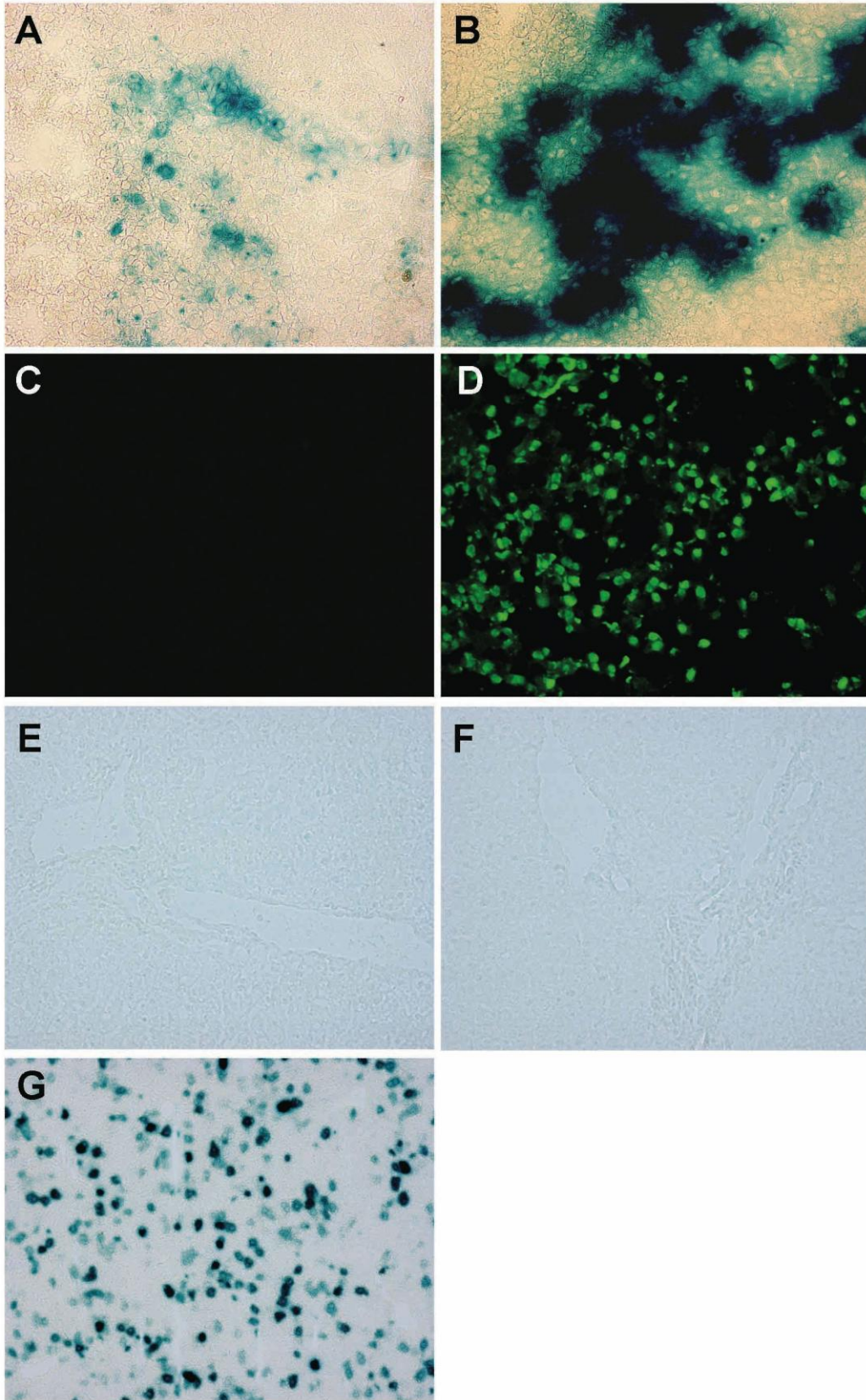


Figura 9

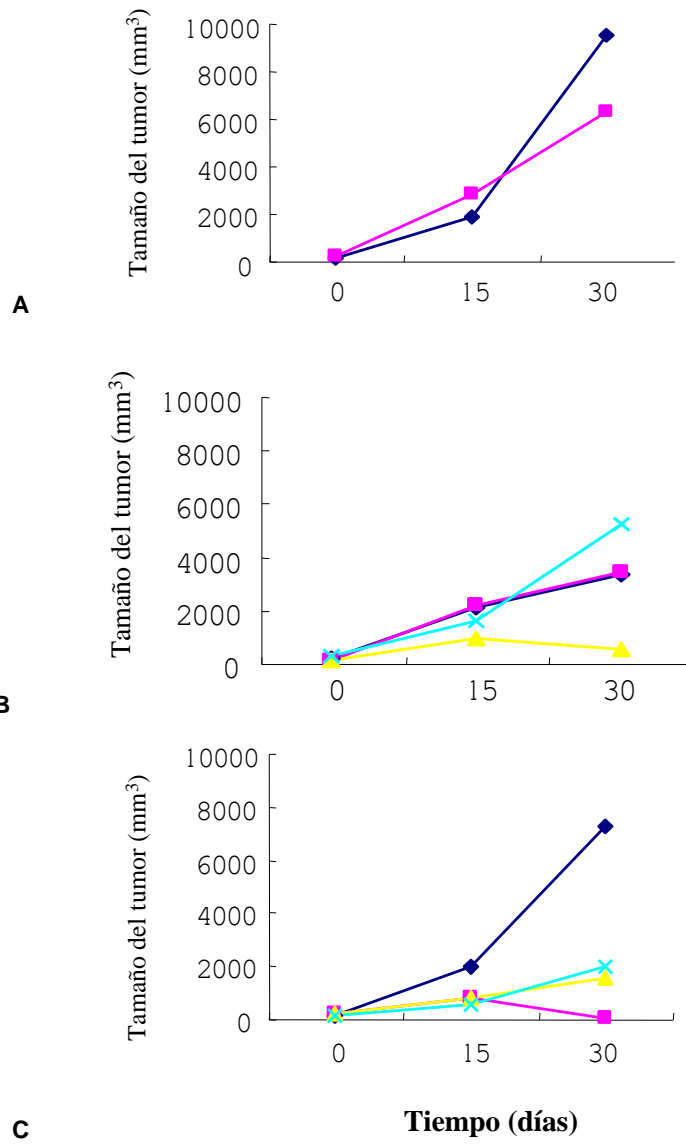
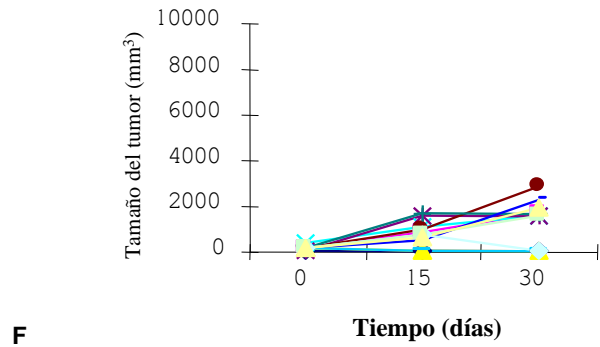
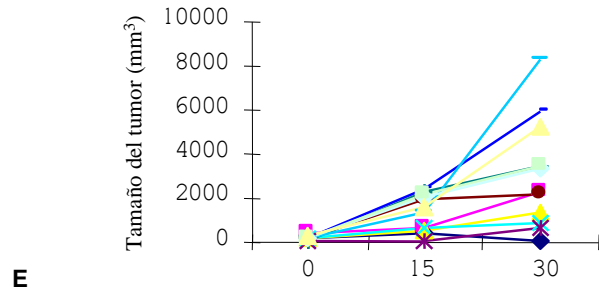
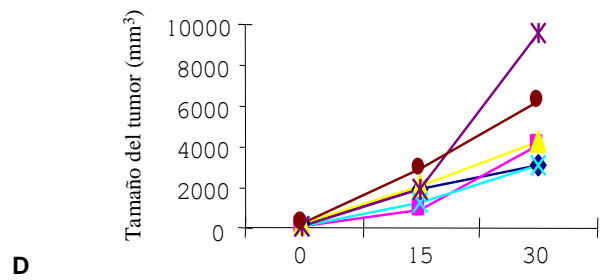


Figura 10: 10^{11}



F

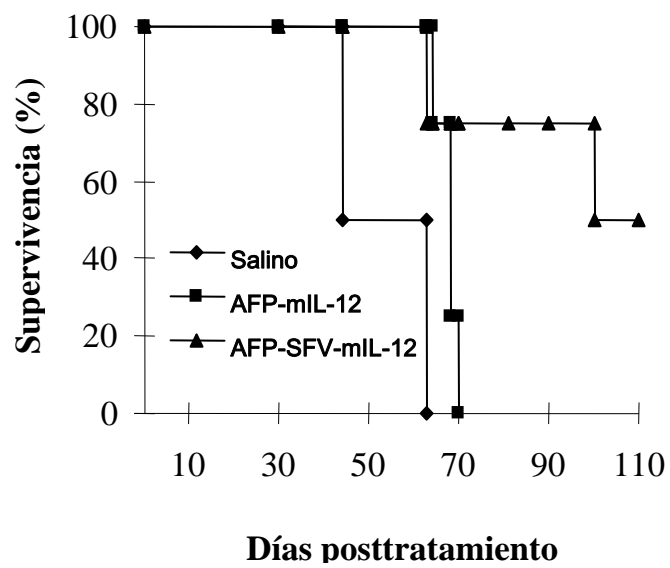


Figura 10: 2×10^{11}

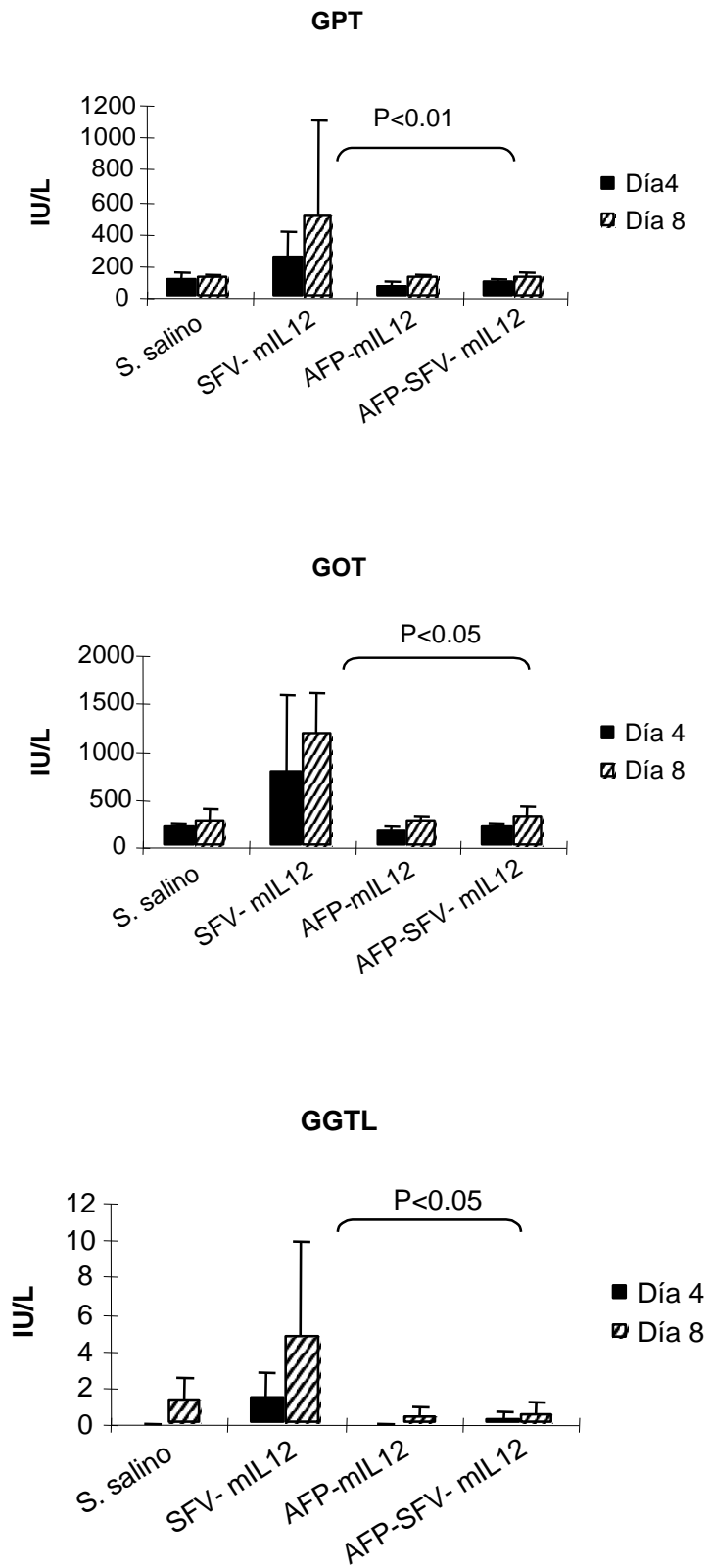


Figura 11A

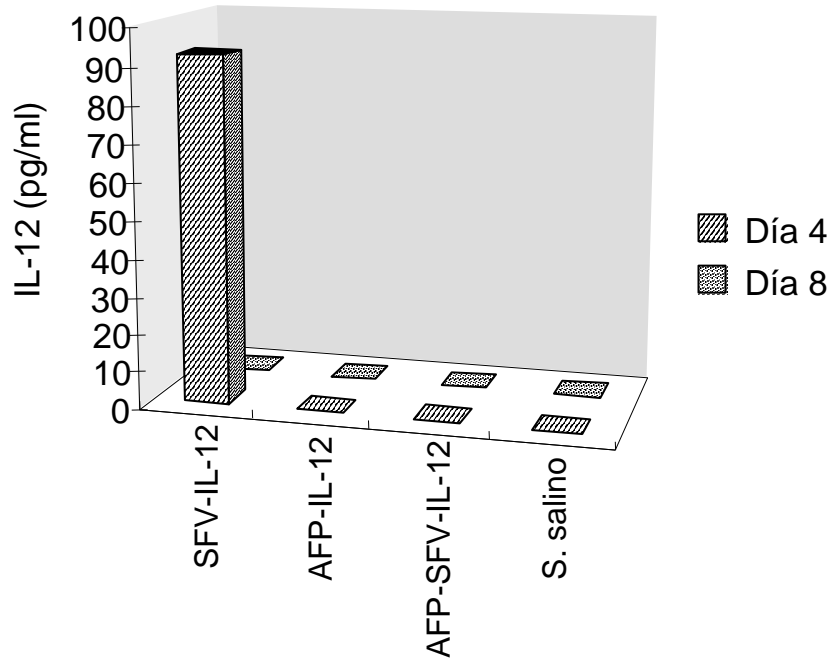


Figura 11B

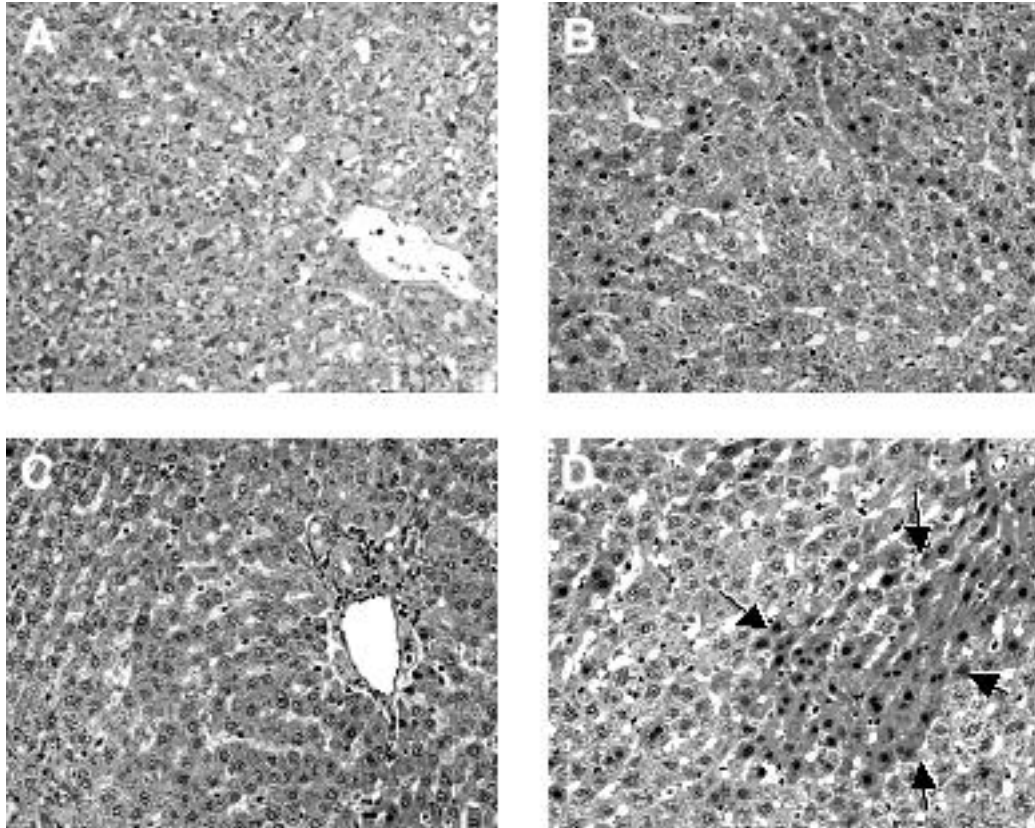
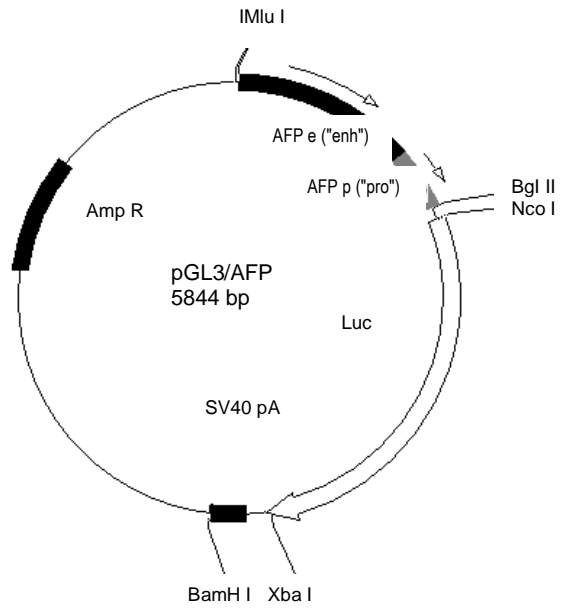
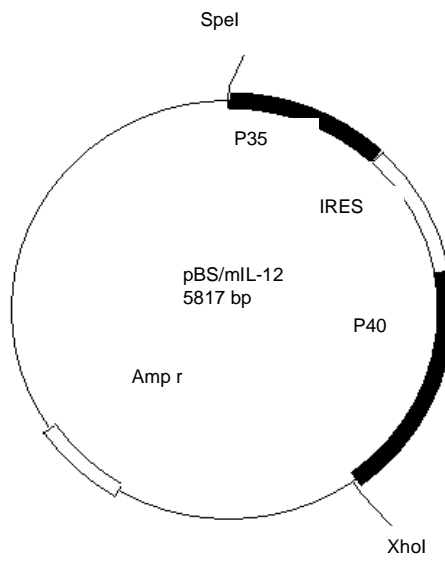


Figura 12



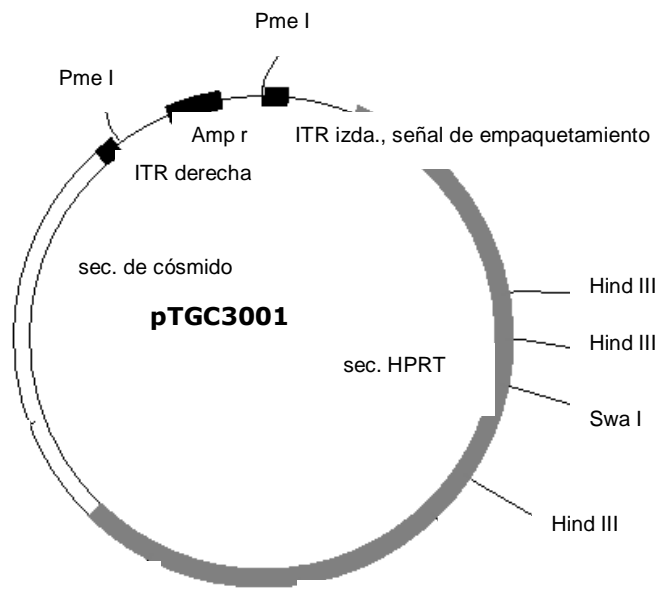
pGL3/AFP

Figura 13A



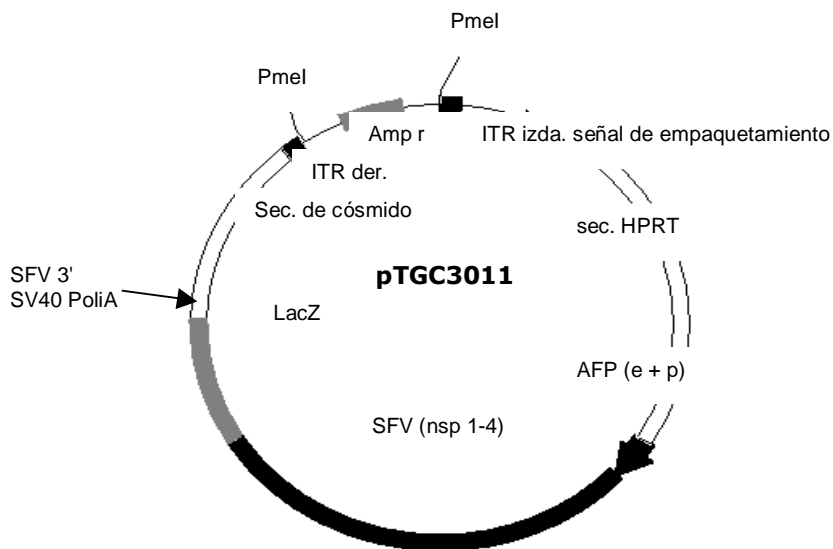
pBS/mIL-12

Figura 13B



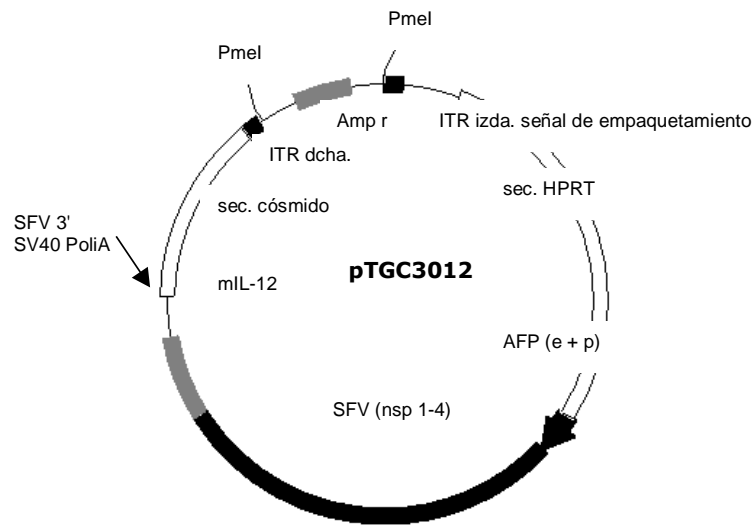
pTGC3001

Figura 14A



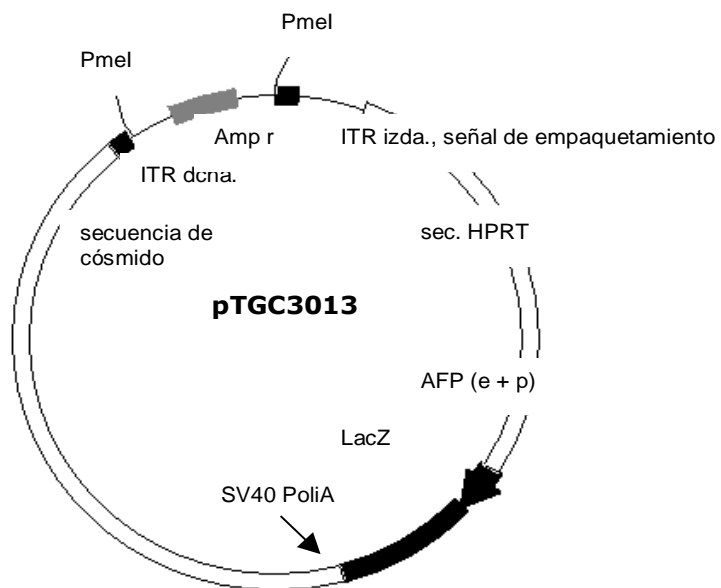
pTGC3011

Figura 14B



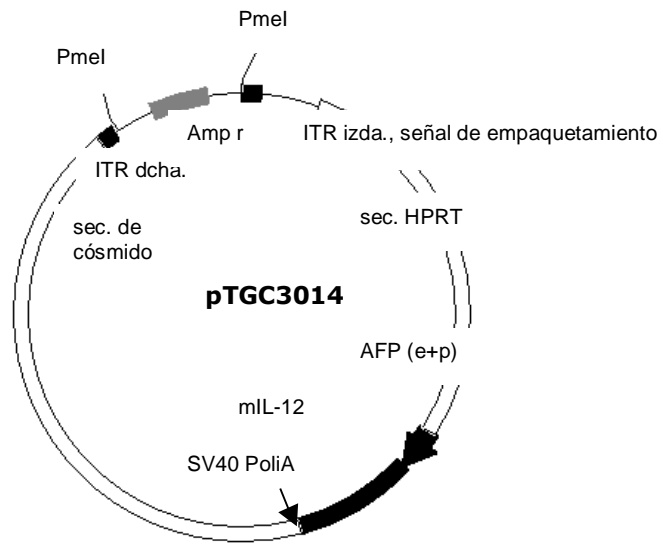
pTGC3012

Figura 15A



pTGC3013

Figura 15B



pTGC3014

Figura 16