

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 372 823**

51 Int. Cl.:
C12N 15/86 (2006.01)
C12N 15/34 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07106036 .2**
96 Fecha de presentación: **16.05.2000**
97 Número de publicación de la solicitud: **1818408**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.08.2007**

54 Título: **ADENOVIRUS RECOMBINANTE DEL SEROTIPO AD11.**

30 Prioridad:
17.05.1999 EP 99201545

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.01.2012

73 Titular/es:
CRUCCELL HOLLAND B.V.
ARCHIMEDES WEG 4
2333 CN LEIDEN, NL

72 Inventor/es:
Vogels, Ronald;
Havenga, Menzo Jans Emko y
Bout, Abraham

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 372 823 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

Adenovirus recombinante del serotipo Ad11

5 La presente invención se refiere al campo de la terapia génica, en particular a la terapia génica que implica elementos derivados de virus, más concretamente elementos de adenovirus. Los adenovirus han sido propuestos como vehículos adecuados para liberar genes al anfitrión.

10 Existen numerosos rasgos de los adenovirus que los hacen particularmente útiles para el desarrollo de vectores de transferencia génica para la terapia génica en humanos:

15 El genoma de adenovirus está bien caracterizado. Consta de una molécula de ADN de doble hebra lineal de aproximadamente 36.000 pares de bases. El ADN de adenovirus contiene Repeticiones Terminales Invertidas (ITR) idénticas de aproximadamente 90-140 pares de bases con una longitud exacta que depende del serotipo. Los orígenes de replicación virales están en las ITR exactamente en los extremos del genoma;

20 La biología de los adenovirus está caracterizada en detalle; el adenovirus no está asociado con una patología humana grave en individuos inmunocompetentes;

El virus es extremadamente eficaz al introducir su ADN en la célula anfitriona; el virus puede infectar una amplia gama de células y tiene una amplia gama de anfitriones;

25 El virus puede ser producido a elevados títulos de virus en grandes cantidades;

30 El virus se puede volver de replicación defectuosa mediante la delección de la región temprana 1 (E1) del genoma viral (Brody et al., 1994). La mayoría de los vectores adenovirales utilizados en la actualidad en la terapia génica tienen una delección en la región E1, en la que se puede introducir la información genética deseada.

35 Basándose en estas características, los métodos preferidos para la transferencia génica in vivo en células diana humanas, hacen uso de vectores adenovirales como vehículos de liberación de genes.

40 No obstante, todavía existen desventajas asociadas con el uso terapéutico de vectores adenovirales en humanos. Una desventaja principal es la existencia de una inmunidad pre-existente muy difundida entre la población contra los adenovirus. La exposición a adenovirus de tipo salvaje es muy común en humanos, como ya se ha documentado ampliamente [revisado en Wadell, 1984]. Esta exposición ha dado como resultado respuestas inmunitarias contra la mayor parte de los tipos de adenovirus, no sólo contra los adenovirus a los cuales han sido expuestos los individuos realmente, si no también contra los adenovirus que tienen epítomos similares (neutralizantes). Este fenómeno de los anticuerpos pre-existentes en humanos, combinado con una fuerte respuesta inmunitaria humoral y celular secundaria contra el virus, puede afectar seriamente a la transferencia génica utilizando vectores adenovirales recombinantes.

45 Hasta la fecha, se han propuesto seis subgrupos diferentes de adenovirus humanos que en total abarcan 51 serotipos de adenovirus distintos (véase el la Tabla 1). Un serotipo se define basándose en su carácter distintivo determinado por neutralización cuantitativa con antisueros animales (caballo, conejo). Si la neutralización muestra cierto grado de reacción cruzada entre dos virus, se supone el carácter distintivo del serotipo si A) las hemaglutininas no están relacionadas, como muestra la carencia de reacción cruzada en la inhibición de hemaglutinación, o B) existen diferencias biofísicas/bioquímicas sustanciales en el ADN (Francki et al., 1991). Los nueve serotipos identificados finalmente (42-51) fueron aislados por primera vez de pacientes infectados con VIH (Hierholzer et al. 1988; Schnurr et al., 1993). Por razones no bien comprendidas, la mayoría de los pacientes inmunocomprometidos desprendían adenovirus raramente o jamás aislados de individuos inmunocompetentes (Hierholzer et al., 1988, 1992; Khoo et al., 1995, De Jong et al., 1998).

50 La inmensa mayoría de los individuos habían sido expuestos previamente a adenovirus, especialmente los serotipos de adenovirus 5 y el tipo 2 (Ad5 y Ad2) bien investigados o a serotipos inmunológicamente relacionados. Importantemente, estos dos serotipos también son los más ampliamente estudiados para su uso en terapia génica en humanos.

55 El adenovirus recombinante según la invención también puede comprender elementos de otros (adeno)virus, con tal que se remplace un elemento que pudiera conducir a la inmunidad contra semejante vehículo de reparto génico por un elemento de adenovirus 35 o un homólogo funcional del mismo, que tenga reducida semejante desventaja y preferiblemente que evite semejante desventaja. En la presente invención un vehículo de reparto génico es cualquier vehículo que sea capaz de liberar un ácido nucleico de interés en una célula anfitriona. Este debe, según la invención comprender un elemento de adenovirus 35 o un equivalente funcional de semejante elemento, que debe tener un efecto beneficioso en lo referente a la respuesta inmunitaria contra semejante vehículo. Básicamente todos los demás elementos que constituyen el vehículo pueden ser cualquiera de los elementos conocidos en la técnica o desarrollados en la técnica, con tal que juntos sean capaces liberar dicho ácido nucleico de interés. En principio el experto en la técnica puede utilizar y/o producir cualquiera de los productos adenovirales o sistemas de producción que puedan o hayan sido aplicados en el campo de los adenovirus. Típicamente los productos de la invención pueden ser elaborados en células de empaquetamiento utilizables v.g. para adenovirus 5, típicamente los vectores basados en adenovirus 35 pueden ser producidos y/o utilizados de la misma manera que los de los otros adenovirus

v.g. adenovirus 2 y/o 5. Una buena visión de conjunto de las posibilidades de los vectores mínimos, los sistemas de empaquetamiento, la amplificación intracelular, los sistemas basados en vectores y plásmidos puede ser encontrada en las solicitudes copendientes de los autores de la presente solicitud (PCT/NL99/00235 y PCT/NL96/00244). Los sistemas de liberación no virales también pueden ser proporcionados con elementos según la invención como lo pueden los sistemas de liberación virales. Ambas clases de sistemas son bien conocidas en la técnica en muchas estructuras diferentes y por lo tanto no necesitan ninguna explicación adicional aquí. Una revisión de los muchos sistemas diferentes y de sus propiedades se puede encontrar en Robbins y Ghivizzani (1998) y en Prince (1998).

Los vehículos de liberación génica contienen típicamente un ácido nucleico de interés. Un ácido nucleico de interés puede ser un gen o una porción funcional de un gen (donde un gen es cualquier ácido nucleico que puede ser expresado) o un precursor de un gen o un gen transcrito en cualquier nivel de ácido nucleico (ADN y/o ARN; de hebra doble o sencilla). Los genes de interés son bien conocidos en la técnica e incluyen típicamente aquellos que codifican proteínas terapéuticas tales como TPA, EPO, citocinas, anticuerpos o derivados de los mismos, etc. Una visión de conjunto de las proteínas terapéuticas que se van a aplicar en terapia génica se enumera más abajo.

Factores inmunoestimuladores como los antígenos específicos de tumores, las citocinas, etc.;

Ejemplos no limitantes de factores anti-angiogénicos endostatina, angiostatina, ATF-BPTI CDT-6, mutantes VEGF negativos dominantes, etc.;

Ejemplos no limitantes de factores angiogénicos VEGF, Factores de crecimiento de fibroblastos, Oxido nítrico sintetasas, Péptidos natriuréticos de tipo C, etc.;

Proteínas inhibidoras de la inflamación como CD40 soluble, FasL, IL-12, IL-10, IL-4, IL-13 y anticuerpos de cadena sencilla excretados para CD4, CD5, CD7, CD52, IL-2, IL-1, IL-6, TNF, etc. o anticuerpos de cadena sencilla excretados al receptor de las células T en células T auto-reactivas. También se pueden utilizar mutantes negativos de PML dominantes para inhibir la respuesta inmunitaria.

Además, se pueden utilizar antagonistas de las citocinas promotoras de la inflamación, por ejemplo la IL-1RA (antagonista de receptor) y los receptores solubles como sIL-1RI, sIL-1RII, sTNFR1 y sTNFR2. Asimismo se pueden utilizar genes inhibidores del crecimiento y/o la respuesta inmunitaria tales como ceNOS, Bc13, cactus e $I\kappa\beta$, β o γ y las proteínas que inducen la apoptosis como la proteína VP3 del virus de la anemia de pollo. Además, se pueden utilizar genes suicidas como HSV-TK, citosina desaminasa, nitrorreductasa y linamerasa.

Un ácido nucleico de interés también puede ser un ácido nucleico que puede hibridar con una secuencia de ácido nucleico presente en la célula anfitriona inhibiendo de ese modo la expresión o transcripción o traducción de dicho ácido nucleico. También puede bloquear por medio de la co-supresión. En resumen un ácido nucleico de interés es cualquier ácido nucleico que se puede desear para proporcionar a una célula con el fin de inducir una respuesta por esa célula, cuya respuesta puede ser la producción de una proteína, la inhibición de semejante producción, la apoptosis, la necrosis, la proliferación, la diferenciación etc. La presente invención es la primera en describir el adenovirus 35 o un homólogo funcional del mismo para uso terapéutico, para esto la invención también proporciona un adenovirus de serotipo 35 o un homólogo funcional del mismo o un virus quimérico derivado de él, o un vehículo de liberación génica basado en dicho virus, su homólogo o su quimera para su uso como fármaco. El propio serotipo de la presente invención, el adenovirus de tipo 35, es conocido en la técnica. Es un adenovirus del grupo B poco común que fue aislado de pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida y otras alteraciones de inmunodeficiencia (Flomenberg et al., 1987; De Jong et al., 1983). Se ha demostrado que el Ad 35 difiere del subgrupo C caracterizado más completamente (incluyendo Ad2 y Ad5) con respecto a las propiedades patogénicas (Basler et al., 1996). Se ha sugerido que esta diferencia puede tener correlación con las diferencias en la región E3 del genoma de Ad35 (Basler et al., 1996). El ADN de Ad35 ha sido parcialmente clonado y mapeado (Kang et al., 1989a y b; Valderrama-Leon et al., 1985).

Los serotipos de adenovirus de tipo B tales como 34 y 35 tienen una región E3 diferente a los otros serotipos. Típicamente esta región está implicada en la supresión de la respuesta inmunitaria a los productos adenovirales. Por lo tanto esta invención proporciona un vehículo de liberación génica según la invención por medio del cual dichos elementos implicados en la evitación o disminución de la respuesta inmunitaria comprenden los productos de expresión de E3 de adenovirus 35 o los genes que los codifican o equivalentes funcionales de cualquiera o de ambos.

Otra porción de los adenovirus implicada en la respuesta inmunitaria es la cápsida, en particular las proteínas pentona y/o hexona. Por lo tanto la invención también proporciona un vehículo de liberación génica según la invención por medio del cual los elementos comprenden al menos una proteína de la cápsida de adenovirus 35 o una porción funcional de la misma, tal como las proteínas de la fibra, la pentona y/o la hexona o un gen que codifica al menos una de ellas. No es necesario que una proteína completa relevante para la respuesta inmunitaria tenga su origen en el adenovirus 35 (o un homólogo funcional del mismo). Es perfectamente posible insertar una porción de una proteína de la fibra, pentona o hexona de adenovirus en otra fibra, pentona o hexona. De ese modo se obtienen proteínas quiméricas.

Asimismo es posible tener una pentona de cierto adenovirus, una hexona de otro y una fibra o una región E3 de otro adenovirus más. Según la invención al menos una de las proteínas o genes que las codifican debe comprender un

elemento de adenovirus 35 o un homólogo funcional del mismo, con lo que dicho elemento tiene un efecto sobre la respuesta inmunitaria del anfitrión. Así la invención proporciona una liberación génica según la invención, que es una quimera de adenovirus 35 con otro adenovirus como mínimo. De este modo también se puede modificar el virus resultante en otros aspectos en lugar de sólo la respuesta inmunitaria. Se puede intensificar su eficacia de infección con los elementos responsables de la misma; se puede intensificar su replicación en una célula de empaquetamiento, o se puede cambiar su tropismo.

De este modo la invención proporciona p. ej. un vehículo de liberación génica según la invención que tiene un tropismo diferente al del adenovirus 35. Por supuesto el tropismo debe ser alterado preferiblemente de manera que el vehículo de liberación génica sea liberado preferentemente en un subgrupo de células del anfitrión, es decir las células diana. Los cambios en el tropismo y los otros cambios que también pueden ser aplicados en la presente invención de vehículos de liberación adenovirales o de otros genes se describen en las solicitudes co-pendientes de los autores de la presente solicitud (núms. 98204482.8, 99200624.7 y 98202297.2). Por supuesto la presente solicitud también proporciona todos y cada uno de los bloques necesarios y/o útiles para obtener los vehículos de liberación génica y/o las quimeras, etc. de la presente invención. Esto incluye las células de empaquetamiento tales como PER.C6 (número de consigna en la ECACC 96022940) o células basadas en ellas, pero adaptadas para Ad35 o un homólogo funcional del mismo; también se incluyen cualquiera de los ácidos nucleicos que codifican las porciones funcionales del adenovirus 35 o un homólogo funcional del mismo, tales como los constructos coadyuvantes, y los constructos de empaquetamiento, así como los vectores que comprenden los genes de interés y p. ej. una ITR, etc.

Típicamente la solicitud de los autores de la presente solicitud (PCT/NL96/00244) describe los elementos necesarios y útiles para lograr los vehículos de liberación génica de la invención. Así la invención también proporciona un ácido nucleico que codifica al menos una porción funcional de un vehículo de liberación génica según la invención, o un virus, homólogo o quimera del mismo según la invención. Según la invención, tales elementos, que codifican funciones que terminarán en el vehículo de liberación génica resultante deben comprender o ser codificados por un ácido nucleico que codifique al menos uno de los elementos del adenovirus de serotipo 35 o un equivalente funcional del mismo, responsable de evitar o disminuir la actividad neutralizadora contra los elementos adenovirales del anfitrión en el cual se ha liberado el gen. Típicamente el gen de interés estará presente en el mismo ácido nucleico lo que significa que semejante ácido nucleico tiene semejante gen o que tiene un sitio para introducir allí un gen de interés.

Típicamente semejante ácido nucleico también comprende al menos una ITR y si es un ácido nucleico que va a ser empaquetado también una señal de empaquetamiento. Sin embargo, como se ha mencionado antes todos los elementos necesarios y útiles y/o las unidades estructurales para la presente invención pueden ser encontrados en la solicitud de los autores de la presente solicitud (PCT/NL96/00244). Un grupo de mejoras adicionales en el campo de la producción de vehículos de liberación génica adenovirales es el sistema plasmídico de los autores de la presente solicitud descrito en PCT/NL99/00235 mencionada antes en la presente memoria. Este sistema funciona en una realización como una recombinación homóloga de un plásmido adaptador y un plásmido más largo, comprendiendo juntos todos los elementos del ácido nucleico que va a ser incorporado al vehículo de liberación génica. Estos métodos también pueden ser aplicados a los vehículos de liberación génica inventados en el momento presente y a sus elementos estructurales. De este modo la invención también proporciona un ácido nucleico según la invención que comprende adicionalmente una región de nucleótidos diseñada o utilizable para la recombinación homóloga, preferiblemente como parte de al menos un grupo de dos ácidos nucleicos que comprende un ácido nucleico según la invención, por medio del cual dicho grupo de ácidos nucleicos es susceptible de un evento de recombinación homóloga individual entre sí, que conduce a un ácido nucleico que codifica un vehículo de liberación génica funcional. Se proporcionan tanto las células de empaquetamiento vacías (en las cuales todavía se tiene que introducir o producir el vector que va a ser empaquetado para elaborar un vehículo de liberación génica según la invención) como las células que comprenden un vector según la invención que va a ser empaquetado. De este modo la invención también abarca una célula que comprende un ácido nucleico según la invención o un grupo de ácidos nucleicos según la invención, preferiblemente una célula que complementa los elementos necesarios para la replicación adenoviral que están ausentes del ácido nucleico que va a ser empaquetado, o de un grupo de ácidos nucleicos según la invención. En la presente invención se ha descubierto que los vectores de adenovirus 35 con E1 suprimida, no son susceptibles de replicación en células que proporcionan las proteínas del adenovirus 5 en *trans*. La invención proporciona por lo tanto adicionalmente una célula capaz de proporcionar las proteínas E1 del adenovirus 35 en *trans*. Semejante célula es típicamente una célula humana derivada de la retina o el riñón. Se ha demostrado que las células embrionarias tales como los amniocitos, son particularmente adecuadas para la generación de una línea celular que complementa E1. Por lo tanto en la presente invención se prefieren tales células. La complementación específica del serotipo por las proteínas E1 puede ser debida a una o más proteínas codificadas por la región E1. Por lo tanto es esencial que al menos la proteína de serotipo específico sea proporcionada en *trans* en la línea celular complementadora. Las proteínas E1 no específicas del serotipo esenciales para la complementación eficaz de un adenovirus con E1 suprimida pueden derivar de otros serotipos de adenovirus. Preferiblemente, se proporciona al menos una proteína E1 de la región E1B de adenovirus 35 en *trans* para complementar los vectores basados en adenovirus 35 con E1 suprimida. En una realización el ácido nucleico que codifica una o más proteínas E1 específicas del serotipo es introducido en la célula PER.C6 o una célula que se origina a partir de una célula PER.C6 (número de consigna en la ECACC 96022940), o una célula de

empaquetamiento similar que complementa con los elementos de Ad 35 o un homólogo funcional del mismo. Como ya se ha referido la invención también abarca un método para producir un vehículo de liberación génica según la invención, que comprende expresar un ácido nucleico según la invención en una célula según la invención y cosechar el vehículo de liberación génica resultante. Lo anterior hace referencia a la carga de la célula de empaquetamiento vacía con los ácidos nucleicos relevantes. El formato de la célula cargada también es por supuesto parte de la presente invención, que proporciona un método para producir un vehículo de liberación génica según la invención, que comprende cultivar una célula de empaquetamiento cargada (célula productora) según la invención en un medio de cultivo adecuado y cosechar el vehículo de liberación génica resultante.

Los vehículos de liberación génica resultantes obtenibles mediante cualquiera de los métodos según la invención también son por supuesto parte de la presente invención, también concretamente un vehículo de liberación génica según la invención, que deriva de una quimera de un adenovirus y un virus integrante.

Es bien sabido que los vehículos de liberación génica adenovirales no se integran normalmente en el genoma anfitrión. Para la expresión a largo plazo de los genes en una célula anfitriona se prefiere por lo tanto preparar quimeras que tengan esa capacidad. Tales quimeras han sido descritas en la solicitud de los autores de la presente invención co-pendiente PCT/NL98/00731. Un ejemplo muy bueno de semejante quimera de adenovirus y un virus integrante donde dicho virus integrante es un virus adenoasociado. Como se ha discutido aquí antes otras quimeras útiles, que también pueden ser combinadas con las anteriores son las quimeras (sea ésta en proteínas completas intercambiables o partes de las mismas o ambas) que tienen un tropismo alterado. Un ejemplo muy bueno de la misma es una quimera de Ad 35 y Ad 16, posiblemente con elementos por ejemplo de Ad 2 o Ad 5, donde la porción determinante del tropismo de Ad 16 o un equivalente funcional del mismo se utiliza para dirigir el vehículo de liberación génica a sinoviocitos y/o células de la musculatura lisa (véase el las solicitudes co-pendientes de los autores de la presente invención núms. 98204482.8 y 99200624.7). Las células dendríticas (DC) y las células del tallo hematopoyético (HSC) no son fácilmente transducidas con vehículos génicos derivados de Ad2 y Ad5. La presente invención proporciona vehículos de liberación génica que poseen una capacidad de transducción de células DC y HSC incrementada. Tales vehículos de liberación génica comprenden al menos la porción determinante del tropismo del tejido de un adenovirus Ad35. La invención proporciona por lo tanto adicionalmente el uso de una porción determinante del tropismo del tejido de una cápsida del adenovirus 35 para transducir células dendríticas y/o células del tallo hematopoyético. Otros adenovirus de tipo B también son adecuados. Una porción determinante del tropismo del tejido comprende al menos la protuberancia y/o el eje de una proteína de la fibra. Por supuesto para una persona experta en la técnica es muy posible determinar las secuencias de aminoácidos responsables el tropismo del tejido en la proteína de la fibra. Semejante conocimiento puede ser utilizado para idear proteínas quiméricas que comprenden tales secuencias de aminoácidos. Tales proteínas quiméricas son por lo tanto parte de la invención. Las células DC son células presentadoras de antígenos muy eficaces. Introduciendo el vehículo de liberación génica en tales células el sistema inmunitario del anfitrión puede ser disparado hacia antígenos específicos. Tales antígenos pueden estar codificados por ácidos nucleicos liberados en las DC o por las proteínas del propio vehículo de liberación génica. La presente invención también proporciona por lo tanto un vehículo de liberación génica con la capacidad de eludir el sistema inmunitario del anfitrión como vacuna. El vector es capaz de eludir el sistema inmunitario lo suficiente para encontrar eficazmente células diana y al mismo tiempo es capaz de liberar antígenos específicos para las células presentadoras de antígenos permitiendo de ese modo la inducción y/o la estimulación de respuestas inmunitarias eficaces hacia el antígeno o los antígenos específicos. Para modular adicionalmente la respuesta inmunitaria, el vehículo de liberación génica puede comprender proteínas y/o ácidos nucleicos que codifican tales proteínas capaces de modular una respuesta inmunitaria. Se encuentran ejemplos no limitantes de tales proteínas entre las interleucinas, las moléculas de adherencia, las proteínas co-estimuladoras, los interferones etc. La invención proporciona por lo tanto adicionalmente una vacuna que comprende un vehículo de liberación génica de la invención. La invención proporciona adicionalmente un vector de adenovirus con la capacidad de transducir eficazmente DC y/o HSC, comprendiendo el vehículo al menos una porción determinante del tropismo de tejido del adenovirus de serotipo 35. La invención proporciona adicionalmente el uso de semejantes vehículos de liberación para la transducción de células HSC y/o DC. Se encontraron tropismos de tejido similares entre otros adenovirus de serotipo B, concretamente en el serotipo 11 y que también son parte de la invención. Por supuesto también es posible proporcionar otros vehículos de liberación génica con la porción determinante del tropismo de tejido proporcionando de ese modo a tales vehículos de liberación una capacidad de transducción de DC y/o HSC. Tales vehículos de liberación génica también son por lo tanto parte de la invención.

Los vehículos de liberación génica según la invención pueden ser utilizados para liberar genes o ácidos nucleicos de interés en las células del anfitrión. Este será típicamente un uso farmacéutico. Semejante utilización está incluida en la presente invención. Las composiciones adecuadas para semejante uso también son parte de la presente invención. La cantidad de vehículo de liberación génica que se necesita que esté presente por dosis o por infección (m.o.i.) dependerá de la afección que se vaya a tratar, de la ruta de administración (típicamente parenteral) del sujeto y de la eficacia de la infección, etc. Los estudios para descubrir la dosis son bien conocidos en la técnica y se pueden utilizar típicamente aquellos ya realizados con otros vehículos de liberación génica (adenovirales) como pautas para encontrar las dosis adecuadas de los vehículos de liberación génica según la invención. Típicamente es aquí donde se pueden encontrar excipientes adecuados, medios de administración adecuados, medios adecuados de prevención de la infección con el vehículo cuando no se desea, etc. Así la invención también proporciona una formulación farmacéutica que comprende un vehículo de liberación génica según la invención y un excipiente

adecuado, así como una formulación farmacéutica que comprende un adenovirus o una quimera del mismo, o un homólogo funcional del mismo según la invención y un excipiente adecuado.

Breve descripción de los dibujos

- 5 Figura 1: Diagrama de barras que muestra el porcentaje de muestras de suero positivas para la neutralización de cada adenovirus wt humano sometido a ensayo (véase el ejemplo 1 para la descripción del análisis de neutralización).
- 10 Figura 2: Gráfico que muestra la ausencia de correlación entre la razón VP/DICC50 y el porcentaje de neutralización.
- Figura 3: Representación esquemática de un mapa de restricción parcial de Ad35 (tomado de Kang et al., 1989) y los clones generados para elaborar virus basados en Ad35 recombinantes.
- 15 Figura 4: Diagrama de barras que presenta el porcentaje de muestras de suero que muestran actividad neutralizadora para una selección de serotipos de adenovirus. Los sueros derivaban de voluntarios sanos de Bélgica y Reino Unido.
- 20 Figura 5: Diagrama de barras que presenta el porcentaje de muestras de suero que muestran actividad neutralizadora para los serotipos de adenovirus 5, 11, 26, 34, 35, 48 y 49. Los sueros derivaban de cinco localizaciones diferentes de Europa y Estados Unidos.
- Figura 6: Secuencia de adenovirus humano de tipo 35. Como se explica en el texto la secuencia de nucleótidos de los extremos terminales del virus no se resuelven definitivamente.
- 25 Figura 7: Mapa de pAdApt
- Figura 8: Mapa de pIPspAdApt
- Figura 9: Mapa de pIPspAdApt1
- 30 Figura 10: Mapa de pIPspAdApt3
- Figura 11: Mapa de pAdApt35IP3
- 35 Figura 12: Mapa de pAdApt35IP1
- Figura 13: Representación esquemática de las etapas experimentadas para construir pWE.Ad35.pIX-rITR
- Figura 14: Mapa de pWE.Ad35.pIX-rITR
- 40 Figura 15: Mapa de pRSV.Ad35-E1
- Figura 16: Mapa de PGKneopA
- 45 Figura 17: Mapa de pRSVpNeo
- Figura 18: Mapa de pRSVhvbNeo
- Figura 19: Análisis de citometría de flujo sobre la expresión de proteína fluorescente Verde (GFP) en células TF-1 humanas. Las células TF-1 no transducidas fueron utilizadas para ajustar un nivel de fondo del 1%. Se muestra la expresión de GFP en células transducidas con Ad5, Ad5.Fib16, Ad5.Fib17, Ad5.Fib40-L, Ad5.Fib35, y Ad5.Fib51.
- 50
- Figura 20: Transducción de estroma de tipo fibroblástico humano primario. Las células fueron analizadas 48 horas después de una exposición de dos horas a los diferentes virus con fibra quiméricos. Se muestra el porcentaje de células que se ha encontrado que son positivas para el transgen: proteína fluorescente verde (GFP) utilizando un citómetro de flujo. Las células estromáticas no transducidas fueron utilizadas para ajustar un fondo al 1%. Se muestran los resultados de diferentes experimentos (n=3) ± la desviación típica.
- 55
- Figura 21: Transducción de estroma de tipo fibroblástico humano primario, células CD34⁺ y células CD34⁺Lin⁻. Las células fueron analizadas 5 días después de una exposición de dos horas a los diferentes virus con fibra quiméricos. Se muestra el porcentaje de células que se ha encontrado que son positivas para el transgen: proteína fluorescente verde (GFP) utilizando un citómetro de flujo. Las células no transducidas fueron utilizadas para ajustar un fondo al 1%. Asimismo se muestra el número de eventos GFP positivos dividido por el número total de eventos analizados (entre paréntesis).
- 60
- 65

- Figura 22: A) Análisis citométrico de flujo de células GFP positivas tras la transducción de células CD34⁺ con Ad5.Fib51. Todas las células reunidas en R2-R7 son positivas para CD34 pero difieren en la expresión de los marcadores de diferenciación tempranos CD33, CD38, y CD71 (Lin). Las células en R2 son negativas para CD33, CD38, CD71 mientras las células en R7 son positivas para estos marcadores. Para demostrar la especificidad de Ad5.Fib51 se determinó el porcentaje de células GFP positivas en R2-R7 que se demostró que disminuía a partir del 91% (R2) al 15% (R7). B) Idéntico experimento como se muestra en A (el eje de las X es R2 a R7) pero para los otros virus quiméricos de la fibra Ad que muestran que Ad5.Fib35, y Ad5.Fib16 se comportan de un modo similar a Ad5.Fib51.
- Figura 23: Alineamiento de las proteínas de la fibra quiméricas de Ad5fib16, Ad5fib35 y Ad5fib51 con la secuencia de fibra de Ad5.
- Figura 24: Toxicidad de la exposición de Adenovirus a células de médula ósea humana primitiva y células del Tallo. Los cultivos celulares fueron sometidos a recuento inmediatamente antes y 5 días después de la transducción con adenovirus. Se muestra el porcentaje de células de médula ósea humana primitivas (CD34⁺) y HSC (CD34⁺Lin⁻) recuperadas en comparación con el día 0.
- Figura 25: Transducción de DC inmaduras a una dosis de virus de 100 o 1.000 partículas de virus por célula. El virus sometido a ensayo es Ad5 y vectores basados en Ad5 que portan la fibra de serotipo 12 (Ad5.Fib12), 16 (Ad5.Fib16), 28 (Ad5.Fib28), 32 (Ad5.Fib32), la fibra larga de 40 (Ad5.Fib40-L), 49 (Ad5.Fib49), 51 (Ad5.Fib51). La expresión del transgen de la luciferasa es expresada como unidades de luz relativa por microgramo de proteína.
- Figura 26: Análisis citométrico de flujo de la expresión de LacZ sobre DC inmaduras y maduras transducidas con 10.000 partículas de virus por célula de Ad5 o los vectores con fibra quiméricos Ad5.Fib16, Ad5.Fib40-L, o Ad5.Fib51. Los porcentajes de las células que puntuaban como positivas se muestran en la esquina superior izquierda de cada histograma.
- Figura 27: Expresión del transgen de la luciferasa en DC inmaduras humanas medida 48 horas después de la transducción con 1.000 o 5.000 partículas de virus por célula. Los virus sometidos a ensayo fueron virus quiméricos con fibra que portaban la fibra de los miembros del subgrupo B (serotipos 11, 16, 35, y 51).
- Figura 28: Expresión de la proteína fluorescente verde en DC humanas inmaduras después de la transducción con 1.000 partículas de virus por célula de Ad5, Ad5.Fib16, y Ad5.Fib35. Las células no transducidas fueron utilizadas para ajustar un nivel de fondo de aproximadamente el 1% (-).
- Figura 29: Transducción de DC de ratón y chimpancé. La expresión del transgen de la luciferasa medida en DC de ratón 48 horas después de la transducción se expresa como unidades de luz relativa por microgramo de proteína. Las DC de chimpancé fueron medidas 48 horas después de la transducción utilizando un citómetro de flujo. La expresión de GFP demuestra la escasa transducción de Ad (35) en contraste con Ad5.Fib35 (66%).
- Figura 30: Crecimiento dependiente de la temperatura de PER.C6. Se cultivaron células PER.C6 en Medio de Eagle Modificado de Dulbecco con un suplemento de Suero Bovino Fetal al 10% (FBS, Gibco BRL) y MgCl₂ 10 mM en una atmósfera de CO₂ al 10% a 32°C, 37°C o 39°C. El día 0, se sembraron un total de 1 x 10⁶ células PER.C6 por matraz para el cultivo de tejidos de 25 cm² (Nunc) y las células fueron cultivadas a 32°C, 37°C o 39°C. El día 1-8, se contaron las células. La tasa de crecimiento y la densidad celular final del cultivo de PER.C6 a 39°C era comparable al de 37°C. La tasa de crecimiento y la densidad final del cultivo de PER.C6 a 32°C estaban ligeramente reducidas en comparación con las de 37°C o las de 39°C. Las células PER.C6 fueron sembradas a una densidad de 1 x 10⁶ células por matraz para el cultivo de tejidos de 25 cm² y cultivadas a 32, 37, o 39°C. En los momentos puntuales indicados, las células fueron sometidas a recuento en un contador celular Burkert. PER.C6 crece bien tanto a 32, como a 37 y 39°C.
- Figura 31: Niveles de DBP en células PER.C6 transfectadas con pcDNA3, pcDNA3wtE2A o pcDNA3ts125E2A. Se fraccionaron cantidades iguales de extracto de células completas mediante SDS-PAGE sobre geles al 10%. Las proteínas fueron transferidas a membranas Immobilon-P y la proteína DBP fue visualizada utilizando el monoclonal αDBP B6 en un sistema de detección ECL. Todas las líneas celulares derivadas de la transfección con pcDNA3ts125E2A expresan la proteína DBP codificada por E2A de 72 kDa (panel izquierdo, calles 4-14; panel central, calles 1-13; panel derecho, calles 1-12). En contraste, la única línea celular derivada de la transfección con pcDNAwtE2A no expresaba la proteína DBP (panel izquierdo, calle 2). No se detectaba DBP en el extracto de una línea celular derivada de la transfección con pcDNA3 (panel izquierdo, calle 1), que sirve como control negativo. El extracto de células PER.C6 transfectadas transitoriamente con pcDNA3ts125 (panel izquierdo, calle 3) servía como control positivo para el procedimiento de transferencia Western. Estos datos confirman que la expresión constitutiva de wtE2A es tóxica para las células y que utilizando el mutante ts125 de E2A se puede evitar esta toxicidad.
- Figura 32: Crecimiento en suspensión de PER.C6ts125E2A C5-9.
- La línea que expresa tsE2A PER.C6tsE2A.c5-9 fue cultivada en suspensión en Ex-cell[®] sin suero. En los momentos

puntuales indicados, las células fueron contadas en un contador celular Burkert. Se indican los resultados de 8 cultivos independientes. PER.C6tsE2A crece bien en suspensión en medio Ex-cell[®] sin suero.

Figura 33: Curva de crecimiento PER.C6 y PER.C6tsE2A

Se cultivaron células PER.C6 o PER.C6ts125E2A (c8-4) a 37°C o 39°C, respectivamente. El día 0, se sembraron un total de 1×10^6 células por matraz para el cultivo de tejidos de 25 cm². En los momentos puntuales indicados, se contaron las células. El crecimiento de las células PER.C6 a 37°C es comparable con el crecimiento de PER.C6ts125E2A c8-4 a 39°C. Esto muestra que la sobreexpresión constitutiva de ts125E2A no tiene un efecto adverso sobre el crecimiento de las células a la temperatura no permisiva de 39°C.

Figura 34: Estabilidad de PER.C6ts125E2A. Para varios pases, se cultivó la línea celular PER.C6ts125E2A clon 8-4 a 39°C en medio sin G418. Se fraccionaron cantidades iguales de extracto de células completas mediante SDS-PAGE sobre geles al 10%. Las proteínas fueron transferidas a membranas Immobilon-P y se visualizó la proteína DBP utilizando el monoclonal α DBP B6 en un sistema de detección ECL. La expresión de la proteína DBP codificada por ts125E2A es estable durante al menos 16 pases, lo que equivale a aproximadamente 40 duplicaciones celulares. No se observaron descensos en los niveles de DBP durante este período de cultivo, indicando que la expresión de ts125E2A es estable, incluso en ausencia de presión de selección con G418.

Figura 35: Actividad tTA en células PER.C6/tTA (A) y PER.C6/E2A/tTA (B) resistentes a higromicina. Se hicieron crecer 16 colonias de células PER.C6/tTA resistentes a higromicina independientes y 23 colonias de células PER.C6/E2A/tTA resistentes a higromicina independientes en pocillos de 10 cm³ hasta la subconfluencia y se transfectaron con 2 μ g de pUHC 13-3 (un plásmido que contiene el gen informador de la luciferasa bajo el control del promotor 7xtetO). La mitad de los cultivos se mantuvo en medio que contenía doxiciclina para inhibir la actividad de tTA. Las células fueron cosechadas a las 48 horas de la transfección y se midió la actividad luciferasa. La actividad luciferasa se indica en unidades de luz relativa (RLU) por μ g de proteína.

Descripción Detallada

Como se ha descrito antes, los serotipos de adenovirus más ampliamente estudiados no son idealmente adecuados para liberar material genético adicional en las células anfitrionas. Esto se debe parcialmente a la inmunidad pre-existente entre la población contra estos serotipos. Esta presencia de anticuerpos pre-existentes en humanos, combinada con una fuerte respuesta humoral y celular secundaria contra el virus afectará a la terapia génica adenoviral. La presente invención proporciona el uso de al menos los elementos de un serotipo y los homólogos funcionales del mismo de adenovirus que son muy adecuados como vectores de terapia génica. La presente invención también describe un escrutinio de alto rendimiento automatizado de todos los serotipos de adenovirus conocidos frente a sueros de muchos individuos. Sorprendentemente, no se encontró capacidad neutralizadora en ninguno de los sueros que se evaluaron frente a un serotipo concreto, el adenovirus 35 (Ad 35). Esto hace extremadamente útil el serotipo de la presente invención como sistema vector para la terapia génica en el hombre. Semejante sistema vector es capaz de transferir eficazmente material genético a una célula humana sin el problema inherente de la inmunidad pre-existente.

Típicamente, se produce un virus utilizando un vector adenoviral (típicamente un plásmido, un cósmido o un vector de baculovirus). Tales vectores también son por supuesto parte de la presente invención. La invención también proporciona vectores derivados de adenovirus que se han vuelto de replicación defectuosa mediante delección o inactivación de la región E1. Por supuesto, también se puede insertar un gen de interés por ejemplo en el sitio de la E1 del adenovirus original del cual deriva el vector. En todos los aspectos de la invención los adenovirus pueden contener delecciones en la región E1 e inserciones de genes heterólogos conectados o no al promotor. Además, los adenovirus pueden contener delecciones en las regiones E2, E3 o E4 e inserciones de genes heterólogos conectados a un promotor. En estos casos, se requieren las líneas celulares complementadoras de E2 y/o E4 para generar adenovirus recombinantes.

Se puede elegir la utilización del propio serotipo Ad35 para la preparación de los adenovirus recombinantes que van a ser utilizados en terapia génica. Alternativamente, se puede elegir la utilización de elementos derivados del serotipo de la presente invención en tales adenovirus recombinantes. Se puede desarrollar por ejemplo un adenovirus quimérico que combine las propiedades deseables de diferentes serotipos. Algunos serotipos tienen una gama de anfitrión algo limitada, pero tienen la ventaja de ser menos inmunogénicos, algunos lo contrario. Algunos tienen el problema de ser de virulencia limitada, pero tienen una amplia gama de anfitrión y/o una inmunogenicidad reducida. Tales adenovirus quiméricos son conocidos en la técnica, y se pretende que estén dentro del alcance de la presente invención. Así en una realización la invención proporciona un adenovirus quimérico que comprende al menos una porción del genoma del adenovirus del presente serotipo, que le proporciona la ausencia de inmunidad pre-existente, y al menos una porción del genoma de adenovirus de otro serotipo de adenovirus dando como resultado un adenovirus quimérico. De esta manera el adenovirus quimérico producido es tal que combina la ausencia de inmunidad pre-existente del serotipo de la presente invención, con otras características de otro serotipo. Tales características pueden ser la estabilidad frente a la temperatura, el ensamblaje, el anclaje, la infección re-

dirigida, el rendimiento de producción, la infección re-dirigida o mejorada, la estabilidad del ADN en la célula diana, etc.

5 Generalmente se necesitará una célula de empaquetamiento con el fin de producir una cantidad suficiente de adenovirus. Para la producción de adenovirus recombinantes para la terapia génica, se encuentran disponibles numerosas líneas celulares. Entre estas se incluyen pero no están limitadas a las líneas celulares conocidas PER.C6 (número de consigna en la ECACC 96022940), 911, 293, y E1 A549.

10 Un importante rasgo de la presente invención es el método para producir el adenovirus. Típicamente, no se desea que un lote de adenovirus para aplicaciones clínicas contenga adenovirus de replicación competente. En general por lo tanto, se desea omitir numerosos genes (al menos uno) del genoma adenoviral en el genoma adenoviral y facilitar estos genes al genoma de la célula a la cual se dirige el vector para producir adenovirus quiméricos. Semejante célula es denominada normalmente célula de empaquetamiento. Por tanto la invención también proporciona una
15 célula de empaquetamiento para producir un adenovirus (un vehículo de liberación génica) según la invención, que comprende en trans todos los elementos necesarios para la producción de adenovirus no presentes en el vector adenoviral según la invención. Típicamente el vector y la célula de empaquetamiento deben ser adaptados entre sí ya que tienen todos los elementos necesarios, pero no tienen elementos solapantes que conduzcan a un virus de replicación competente mediante recombinación.

20 De este modo, la invención también proporciona un estuche de porciones que comprende una célula de empaquetamiento según la invención y un vector recombinante según la invención por medio del cual no hay esencialmente secuencia solapante que conduzca a la recombinación dando como resultado la producción de adenovirus de replicación competente entre dicha célula y dicho vector.

25 De este modo, la presente invención proporciona los métodos para producir adenovirus, que tras la aplicación escapará de la inmunidad humoral pre-existente, que comprende proporcionar un vector con elementos derivados de un serotipo de adenovirus contra el cual no existe virtualmente inmunidad natural y transfectar dicho vector en una célula de empaquetamiento según la invención y permitir la producción de partículas virales.

30 En un aspecto esta invención describe el uso del serotipo de adenovirus de la presente invención para superar la actividad neutralizadora del anfitrión existente por naturaleza o inducida hacia los adenovirus administrados in vivo para aplicaciones terapéuticas. La necesidad de un nuevo serotipo está acentuada por las observaciones de que 1) la liberación sistémica repetida del adenovirus de serotipo 5 recombinante es infructuosa debido a la formación de elevados títulos de anticuerpos neutralizadores contra el adenovirus de serotipo 5 recombinante (Schulick y col,
35 1997), y 2) la inmunidad pre-existente o humoral está muy difundida en la población.

En otro aspecto la invención proporciona el uso de vehículos de liberación génica de la invención o el uso del serotipo 35 de adenovirus para vacunación. Semejante uso evita al menos en parte las respuestas inmunitarias no deseadas del anfitrión. Ejemplos no limitantes de las respuestas inmunitarias no deseadas están evocando una
40 respuesta inmunitaria contra el vehículo de liberación génica o el serotipo 35 de adenovirus y/o reforzando una respuesta inmunitaria contra el vehículo de liberación génica o el serotipo 35 de adenovirus.

En otro aspecto de la invención, se hace uso alternativo de los vectores Ad que corresponden a diferentes subgrupos. Por lo tanto, este aspecto de la invención evita la incapacidad de repetir la administración de un adenovirus para fines de terapia génica.
45

Ejemplos

Ejemplo 1

50 Análisis de elevado rendimiento para la detección de la actividad neutralizadora en suero humano

Para permitir el escrutinio de una gran cantidad de suero humano en cuanto a la presencia de anticuerpos neutralizadores contra todos los serotipos de adenovirus, se desarrolló un análisis de 96 pocillos automatizado.

55 Suero humano

Se seleccionó un panel de 100 individuos. Los voluntarios (50% hombres, 50% mujeres) eran individuos sanos entre 20 y 60 años de edad sin restricción de raza. Todos los voluntarios firmaron un informe de consentimiento. Se excluyeron las personas implicadas profesionalmente en la investigación de adenovirus.
60

Se recogieron aproximadamente 60 ml de sangre en tubos secos. En las dos horas posteriores a la toma de muestras, la sangre fue centrifugada a 2.500 rpm durante 10 minutos. Se transfirieron aproximadamente 30 ml de suero a tubos de polipropileno y se almacenaron congelados a -20°C hasta su uso adicional.

65 El suero se descongeló y se inactivó con calor a 56°C durante 10 minutos y después se formaron alícuotas para

ES 2 372 823 T3

evitar ciclos repetidos de congelación/descongelación. Parte se utilizó para realizar cinco etapas de diluciones 1:2 en medio (DMEM, Gibco, BRL) en una cantidad suficiente para llenar aproximadamente 70 placas de 96 pocillos. Las alícuotas de sueros no diluidos y diluidos fueron pipeteadas en placas de pocillos profundos (formato de 96 pocillos) y utilizando un PlateMate programado dispensadas en alícuotas de 100 μ l en placas de 96 pocillos. De este modo las placas fueron cargadas con ocho sueros diferentes por duplicado (100 μ l/pocillo) conforme al siguiente esquema:

S1/2	S1/4	S1/8	S1/16	S1/32	S5/2	S5/4	S5/8	S5/16	S5/32	-	-
S1/2	S1/4	S1/8	S1/16	S1/32	S5/2	S5/4	S5/8	S5/16	S5/32	-	-
S2/2	S2/4	S2/8	S2/16	S2/32	S6/2	S6/4	S6/8	S6/16	S6/32	-	-
S2/2	S2/4	S2/8	S2/16	S2/32	S6/2	S6/4	S6/8	S6/16	S6/32	-	-
S3/2	S3/4	S3/8	S3/16	S3/32	S7/2	S7/4	S7/8	S7/16	S7/32	-	-
S3/2	S3/4	S3/8	S3/16	S3/32	S7/2	S7/4	S7/8	S7/16	S7/32	-	-
S4/2	S4/4	S3/8	S3/16	S3/32	S8/2	S8/4	S8/8	S8/16	S8/32	-	-
S4/2	S4/4	S3/8	S3/16	S3/32	S8/2	S8/4	S8/8	S8/16	S8/32	-	-

Donde S1/2 a S8/2 en las columnas 1 y 6 representan 1x sueros diluidos y Sx/4, Sx/8, Sx/16 y Sx/32 las diluciones seriadas 1:2. Las últimas placas también contenían cuatro pocillos cargados con 100 μ l de suero de ternera fetal como control negativo. Las placas se mantuvieron a -20°C hasta su uso adicional.

Preparación de soluciones de partida de adenovirus humano

Se inocularon prototipos de todos los adenovirus humanos conocidos en matraces T25 sembrados con células PER.C6 (número de consigna en la ECACC 96022940) (Fallaux et al., 1998) y se cosecharon tras un ECP completo. Tras congelar/descongelar se utilizaron 1-2 ml de productos lisados brutos para inocular en un matraz T80 células PER.C6 (número de consigna en la ECACC 96022940) y el virus fue cosechado a un ECP completo. El marco temporal entre la inoculación y la aparición de ECP así como la cantidad de virus necesaria para re-infectar un nuevo cultivo, diferían entre los serotipos. Las soluciones de partida de adenovirus fueron preparadas mediante congelación/descongelación y se utilizaron para inocular 3-4 matraces de tres capas T175 cm² con células PER.C6 (número de consigna en la ECACC 96022940). Tras la aparición del ECP, las células se cosecharon tapando el matraz, se sedimentaron y el virus se aisló y se purificó mediante un gradiente en CsCl de dos etapas como sigue. Los sedimentos celulares fueron disueltos en 50 ml de tampón NaPO₄ 10 mM (pH 7,2) y congelados a -20°C. Después de descongelar a 37°C, se añadieron 5,6 ml de desoxicolato de sodio (5% p/p). La solución se mezcló suavemente y se incubó durante 5-10 minutos a 37°C para lisar completamente las células. Después de homogeneizar la solución, se añadieron 1.875 μ l de MgCl₂ 1M. Tras la adición de 375 μ l de ADNasa (10 mg/ml) la solución se incubó durante 30 minutos a 37°C. Los restos celulares se separaron por centrifugación a 1.880xg durante 30 minutos a la temperatura ambiente sin interrupción. El sobrenadante se purificó con posterioridad de las proteínas mediante extracción con freón (3x). El sobrenadante aclarado se cargó en un gradiente por bloques de cloruro de cesio tamponado con Tris/HCl 1 M (intervalo: 1,2/1,4 gr/ml) y se centrifugó a 21.000 rpm durante 2,5 horas a 10°C. La banda de virus se aísla después de lo cual se realiza una segunda purificación utilizando un gradiente continuo tamponado con Tris/HCl 1M de 1,33 gr/ml de cloruro de cesio. El virus fue centrifugado después durante 17 horas a 55.000 rpm a 10°C. La banda de virus se aísla y se añade sacarosa (50% p/v) a una concentración final del 1%. El exceso de cloruro de cesio se separa mediante diálisis (tres veces 1 hora a la temperatura ambiente) en portas para diálisis (Slide-a-lizer, corte 10.000 kDa, Pierce, USA) frente a 1,5 litros de PBS con un suplemento de CaCl₂ (0,9 mM), MgCl₂ (0,5 mM) y una concentración creciente de sacarosa (1, 2, 5%). Después de la diálisis, el virus es separado del "slide-a-lizer" después de lo cual se toman alícuotas en porciones de 25 y 100 μ l tras lo cual el virus es almacenado a -85°C.

Para determinar el número de partículas de virus por mililitro, se hacen pasar 50 μ l del lote de virus por una cromatografía líquida de alta presión (HPLC) como describen Shabram et al. (1997). Los virus se hicieron eluir utilizando un gradiente de NaCl que oscilaba de 0 a 600 mM. Como se representa en la Tabla I, la concentración de NaCl a la cual eluían los virus difería significativamente entre los serotipos.

La mayor parte de los adenovirus humanos replicaban bien en las células PER.C6 (número de consigna en la ECACC 96022940) con pequeñas excepciones. Los adenovirus de tipo 8 y 40 se hicieron crecer en células 911-E4 (He et al., 1998). Las soluciones de partida purificadas contenían entre 5x10¹⁰ y 5x10¹² partículas de virus/ml (VP/ml; ver la tabla I).

Titulación de soluciones de partida de adenovirus humanos purificados

Los adenovirus fueron titulados en células PER.C6 (número de consigna en la ECACC 96022940) para determinar la cantidad de virus necesaria para obtener un ECP completo en cinco días, la duración del análisis de neutralización. A este fin, se dispensaron 100 μ l de medio en cada pocillo de las placas de 96 pocillos. Se añadieron 25 μ l de soluciones de partida de adenovirus prediluidas 10⁴, 10⁵, 10⁶ o 10⁷ veces a la columna 2 de una placa de 96 pocillos y se mezclaron pipeteando arriba y abajo 10 veces. Después se llevaron 25 μ l de la columna 2 a la columna 3 y de

nuevo se mezclaron. Esto se repitió hasta la columna 11 después de lo cual se descartaron 25 μ l de la columna 11. De este modo se obtuvieron diluciones seriadas en etapas de 5 partiendo de una solución de partida prediluida. Después se añadieron 3×10^4 células PER.C6 (número de consigna en la ECACC 96022940) en un volumen de 100 μ l y las placas se incubaron a 37°C, CO₂ al 5% durante cinco o seis días. Se controló microscópicamente el ECP. Se utilizó el método de Reed y Muensch para calcular la dosis inhibitora del cultivo celular del 50% (DICC50).

Análogamente se crearon placas idénticas que fueron analizadas utilizando el análisis MTT (Promega). En este análisis se cuantifican células vivas mediante tinción colorimétrica. A este fin, se añadieron 20 μ l de MTT (7,5 mg/ml en PBS) a los pocillos y se incubaron a 37°C, CO₂ al 5% durante dos horas. El sobrenadante fue separado y se añadieron a los pocillos 100 μ l de una solución 20:1 de isopropanol/triton-X100. Las placas se pusieron en un aparato oscilatorio de 96 pocillos durante 3-5 minutos para solubilizar la tinción precipitada. Se midió la absorbancia a 540 nm y a 690 nm (fondo). Mediante este análisis se pueden distinguir los pocillos con ECP en marcha o con ECP completo.

Análisis de neutralización

Se descongelaron placas de 96 pocillos con muestras de suero humano diluido a 37°C, CO₂ al 5%. Se prepararon soluciones de partida de adenovirus diluidas a 200 DICC50 por 50 μ l y se añadieron alícuotas de 50 μ l a las columnas 1-11 de las placas con suero. Las placas fueron incubadas durante 1 hora a 37°C, CO₂ al 5%. Después se dispensaron 50 μ l de células PER.C6 (número de consigna en la ECACC 96022940) a 6×10^5 /ml en todos los pocillos y se incubaron durante 1 día a 37°C, CO₂ al 5%. El sobrenadante se separó utilizando puntas de pipeta nuevas para cada fila y se añadieron 200 μ l de medio de nueva aportación a todos los pocillos para evitar los efectos tóxicos del suero. Las placas fueron incubadas durante otros 4 días a 37°C, CO₂ al 5%. Además, se establecieron placas de control paralelas por duplicado con sueros de control positivos diluidos generados en conejos y específicos para cada serotipo que se iba a someter a ensayo en las filas A y B y con suero de control negativo (FCS) en las filas C y D. Asimismo, en cada una de las filas E-H se realizó una titulación como se ha descrito antes con etapas de dilución 1:5 partiendo de una DICC50 de 200 de cada virus que va a ser sometido a ensayo. El día 5 una de las placas de control fue analizada microscópicamente y con el análisis MTT. Se calculó el título experimental a partir de la placa de titulación de control observada microscópicamente. Si se encontraba que el ECP era completo, es decir la primera dilución en el experimento de titulación de control analizada mediante MTT muestra una clara muerte celular, todas las placas de análisis eran tratadas. Si no, se dejaba continuar el análisis durante uno o más días hasta que el ECP completo era evidente después de lo cual se trataban todas las placas. En la mayoría de los casos, el análisis se terminó el día 5. Para Ad1, 5, 33, 39, 42 y 43 el análisis se dejó durante seis días y para Ad2 durante ocho días.

Se considera que una muestra de suero no es neutralizadora cuando a la concentración de suero más elevada se observa una protección máxima del 40% en comparación con los controles sin suero.

Los resultados del análisis de los adenovirus prototipo 44 frente al suero de 100 voluntarios sanos se muestran en la figura 1. Como se esperaba el porcentaje de las muestras de suero que contenían anticuerpos neutralizadores para Ad2 y Ad5 era muy elevado. Esto también se verificaba para la mayor parte de los adenovirus de numeración inferior. Sorprendentemente, ninguna de las muestras de suero contenía anticuerpos neutralizadores para el adenovirus de serotipo 35. Asimismo, el número de individuos con títulos de anticuerpo neutralizadores para los serotipos 26, 34 y 48 era muy bajo.

Por lo tanto, los adenovirus con E1 suprimido basados en Ad35 o uno de los otros serotipos mencionados antes tienen una importante ventaja en comparación con los vectores recombinantes basados en Ad5 respecto al aclaramiento de los virus por los anticuerpos neutralizadores.

Asimismo, los vectores basados en Ad5 que tienen (partes de) las proteínas de la cápsida implicadas en la respuesta inmunogénica del anfitrión remplazadas por las correspondientes (partes de) proteínas de la cápsida de Ad35 o uno de los otros serotipos serán menos, o incluso no serán, neutralizados por la inmensa mayoría de los sueros humanos.

Como se puede observar en la tabla I la razón VP/DICC50 calculada a partir de las partículas del virus por ml y la DICC50 obtenida para cada virus en los experimentos era muy variable y oscilaba entre 0,4 y 5 log. Esto estaba causado probablemente por las diferentes eficacias de infección de las células PER.C6 (número de consigna en la ECACC 96022940) y por las diferencias en la eficacia de replicación de los virus. Además, las diferencias en las calidades de los lotes pueden jugar un papel. Una elevada proporción VP/DICC50 representa que se había puesto más virus en los pocillos para obtener el ECP en 5 días. Como consecuencia el resultado del estudio de neutralización podría estar influido puesto que más partículas de virus (inactivas) podían proteger los anticuerpos. Para verificar si este fenómeno había tenido lugar, se trazó la proporción VP/DICC50 frente al porcentaje de las muestras de suero que se había encontrado que eran positivas en el análisis (Figura 2). El gráfico muestra claramente que no hay correlación negativa entre la cantidad de virus del análisis y la neutralización en suero.

Ejemplo 2Generación de vectores plasmídicos de Ad5 para la producción de virus recombinantes y la fácil manipulación de genes adenovirales

5 *PBr/Ad.Bam-rITR* (consigna ECACC P97082122)

10 Con el fin de facilitar la clonación de extremos romos de las secuencias ITR, se trató ADN de adenovirus de tipo 5 humano de tipo salvaje (Ad5) con la enzima de Klenow en presencia de dNTP en exceso. Tras la inactivación de la enzima de Klenow y la purificación mediante extracción con fenol/cloroformo seguida de precipitación con etanol, el ADN fue digerido con BamHI. Esta preparación de ADN fue utilizada sin purificación adicional en una reacción de ligación con el ADN del vector derivado de pBr322 preparado como sigue: se digirió el ADN de pBr322 con EcoRV y BamHI, se desfosforiló mediante tratamiento con la enzima TSAP (Life Technologies) y se purificó en gel de LMP-agarosa (SeaPlaque GTG). Tras la transformación en *E. Coli* DH5 α competente (Life Technologies) y el análisis de las colonias resistentes a ampicilina, se seleccionó un clon que mostraba un patrón de digestión como se esperaba para un inserto que se extendía desde el sitio BamHI de Ad5 a la ITR derecha.

15 El análisis de la secuencia de la frontera de clonación de la ITR derecha revelaba que la mayor parte de los restos G 3' de la ITR se habían perdido, se encontró que el resto de la ITR era correcto. Dicho resto G perdido es complementado por la otra ITR durante la replicación.

20 *PBr/Ad.Sal-rITR* (consigna ECACC P97082119)

PBr/Ad.Bam-rITR fue digerido con BamHI y Sall. El fragmento vector que incluía el inserto de adenovirus fue aislado en agarosa LMP (SeaPlaque GTG) y ligado a un fragmento Sall-BamHI de 4,8 kb obtenido a partir de ADN de Ad5 wt y purificado con el estuche de Genclean II (Bio 101, Inc.). Se seleccionó un clon y se determinó la integridad de las secuencias de Ad5 mediante análisis con enzimas de restricción. El clon *pBr/Ad.Sal-rITR* contiene secuencias adeno de tipo 5 desde el sitio Sall en el pb 16746 hasta e incluyendo la rITR (perdiendo el principal resto G 3').

PBr/Ad.Cla-Bam (consigna ECACC P97082117)

30 Se digirió ADN adeno de tipo 5 wt con ClaI y BamHI, y se aisló el fragmento de 20,6 kb del gel mediante electro-elución. Se digirió pBr322 con las mismas enzimas y se purificó a partir del gel de agarosa mediante Genclean. Ambos fragmentos fueron ligados y transformados en DH5 α competente. El clon resultante *pBr/Ad.Cla-Bam* fue analizado mediante digestión con enzimas de restricción y se demostró que contenía un inserto con secuencias de adenovirus desde el pb 919 al 21566.

PBr/Ad.AfIII-Bam (consigna ECACC P97082114)

35 El clon *pBr/Ad.Cla-Bam* fue linealizado con EcoRI (en pBr322 y digerido parcialmente con AfIII. Tras la inactivación con calor de AfIII durante 20' a 65°C los extremos del fragmento fueron rellenados con la enzima de Klenow. Después el ADN fue ligado a un oligoconector de doble hebra de extremos romos que contenía un sitio PacI (5'-AAT TGT CTT AAT TAA CCG CTT AA-3'). Este conector fue elaborado recociendo los siguientes dos oligonucleótidos: 5'-AAT TGT CTT AAT TAA CCG C-3' Y 5'-AAT TGC GGT TAA TTA AGA C-3', seguido de formación de extremos con la enzima de Klenow. Tras la precipitación del ADN ligado para cambiar el tampón, las ligaciones fueron digeridas con un exceso de enzima PacI para separar los concatámeros del oligo. El fragmento parcial de 22016 pb que contenía las secuencias de Ad5 desde el pb 3534 hasta el 21566 y las secuencias vectoras, fue aislado en agarosa LMP (SeaPlaque GTG), religado y transformado con DH5 α competente. Se seleccionó un clon que se había encontrado que contenía el sitio PacI y que había conservado el fragmento adeno grande y se secuenció en el extremo 5' para verificar la inserción correcta del conector PacI en el sitio AfIII (perdido).

45 *PBr/Ad.Bam-rITRpac#2* (consigna ECACC P97082120) y
PBr/Ad.Bam-rITRpac#8 (consigna ECACC P97082121)

50 Para permitir la inserción de un sitio PacI cerca de la ITR de Ad5 en el clon *pBr/Ad.Bam.rITR* se separaron aproximadamente 190 nucleótidos entre el sitio ClaI del esqueleto de pBr322 y el inicio de las secuencias ITR. Esto se realizó como sigue: *pBr/Ad.Bam-rITR* fue digerido con ClaI y tratado con la nucleasa Bal31 durante diferentes intervalos de tiempo (2', 5', 10' y 15'). Se siguió el grado de separación de nucleótidos para separar las reacciones del ADN de pBr322 (también digerido en el sitio ClaI), utilizando tampones y condiciones idénticos. La enzima Bal31 fue inactivada por incubación a 75°C durante 10', el ADN fue precipitado y resuspendido en un volumen más pequeño de tampón TE. Para asegurar los extremos romos, los ADN se trataron adicionalmente con ADN polimerasa de T4 en presencia de dNTP en exceso. Tras la digestión del ADN de pBr322 (control) con Sall, se observó una degradación satisfactoria (~150 pb) en la muestra tratada durante 10' o 15'. Las muestras de *pBr/Ad.Bam-rITR* tratadas 10' o 15' fueron ligadas después a los conectores PacI de extremos romos descritos antes (Ver *pBr/Ad.AfIII-Bam*). Las ligaciones fueron purificadas por precipitación, digeridas con PacI en exceso y separadas de los conectores en gel de agarosa LMP. Tras la religación, los ADN fueron transformados en DH5 α competentes y se analizaron las colonias. Se seleccionaron diez clones que mostraban una delección de aproximadamente la longitud deseada y estos fueron analizados adicionalmente mediante secuenciación T-track

(estuche secuenciador de T7, Pharmacia Biotech). Se encontraron dos clones con el conector Pacl insertado inmediatamente aguas abajo de la rITR. Tras la digestión con Pacl, el clon Núm. 2 tiene 28 pb y el clon Núm. 8 tiene 27 pb anclados a la ITR.

5 *PWE/Ad.AfIII-rITR (consigna ECACC P97082116)*

Se utilizó el vector cosmídico pWE15 (Clontech) para clonar insertos de Ad5 más grandes. Primero, se insertó un conector que contenía un sitio Pacl único en los sitios EcoRI de pWE15 creando pWE.pac. En este punto, se utilizó el oligo Pacl de doble hebra descrito para pBr/Ad.AfIII-BamHI pero ahora con sus extremos EcoRI sobresalientes. Después se aislaron los siguientes fragmentos mediante electroelución en gel de agarosa: pWE.pac digerido con Pacl, pBr/AfIII-Bam digerido con Pacl y BamHI y pBr/Ad.Bam-rITR#2 digerido con BamHI y Pacl. Estos fragmentos fueron ligados entre sí y empaquetados utilizando extractos de empaquetamiento del fago λ (Stratagene) según el protocolo del fabricante. Tras la infección en bacterias anfitrionas, se desarrollaron colonias sobre las placas y se analizaron en cuanto a la presencia del inserto completo. PWE/Ad.AfIII-rITR contiene todas las secuencias de adenovirus de tipo 5 desde el pb 3534 (sitio AfIII) hasta la ITR derecha inclusive (perdiendo el resto G 3' principal).

15 *PBr/Ad.IITR-Sal(9.4) (consigna ECACC P97082115)*

Se trató ADN adeno 5 wt tratado con enzima de Klenow en presencia de dNTP en exceso y con posterioridad se digirió con Sall. Dos de los fragmentos resultantes, denominados ITR izquierda-Sal (9.4) y Sal(16.7)-ITR derecha, respectivamente, fueron aislados en agarosa LMP (SeaPlaque GTG). Se digirió ADN de pBr322 con EcoRV y Sall y se trató con fosfatasa (Life Technologies). El fragmento vector fue aislado utilizando el método GeneClean (BIO 101, Inc.) y ligado a los fragmentos Sall de Ad5. Sólo la ligación con el fragmento de 9,4 kb producía colonias con un inserto. Tras el análisis y la secuenciación de la frontera de clonación se seleccionó un clon que contenía la secuencia ITR en toda su longitud y se prolongó hasta el sitio Sall en el pb 9462.

25 *PBr/Ad.IITR-Sal(16.7) (consigna ECACC P97082118)*

PBr/Ad.IITR-Sal(9.4) es digerido con Sall y desfosforilado (TSAP, Life Technologies). Para prolongar este clon hasta el tercer sitio Sall de Ad5, se linealizó pBr/Ad.Cla-Bam con BamHI y se digirió parcialmente con Sall. Se aisló un fragmento Sall de 7,3 kb que contenía secuencias de adenovirus desde 9462-16746 en gel de agarosa LMP y se ligó al fragmento vector pBr/Ad.IITR-Sal(9.4) digerido con Sall.

35 *PWE/Ad.AfIII-EcoRI*

PWE.pac fue digerido con ClaI y los extremos 5' sobresalientes fueron rellenados utilizando la enzima de Klenow. El ADN fue digerido después con Pacl y aislado en gel de agarosa. PWE/AfIII-rITR fue digerido con EcoRI y tras el tratamiento con la enzima de Klenow fue digerido con Pacl. El fragmento grande de 24 kb que contenía las secuencias adenovirales fue aislado en gel de agarosa y ligado al vector pWE.pac de extremos romos y digerido con ClaI utilizando el kit Ligation Express[®] de Clontech. Tras la transformación de células Ultracompetent XL10-Gold de Stratagene, se identificó que los clones contenían el inserto esperado. PWE/AfIII-EcoRI contiene secuencias de Ad5 de los pb 3534-27336.

45 *Generación de pWE/Ad.AfIII-rITRsp*

La ITR 3' del vector pWE/Ad.AfIII-rITR no incluye el nucleótido G terminal. Además, el sitio Pacl está localizado a casi 30 pb de la ITR derecha. Ambas características pueden disminuir la eficacia de la generación de virus debido al inicio ineficaz de la replicación en la ITR 3'. Obsérvese que durante la generación del virus la ITR izquierda del plásmido adaptador está intacta y permite la replicación del ADN del virus tras la recombinación homóloga.

Para mejorar la eficacia del inicio de la replicación en la ITR 3', se modificó pWE/Ad.AfIII-rITR como sigue: primero se digirió el constructo pBR/Ad.Bam-rITRpac#2 con Pacl y después se digirió parcialmente con AvrII y se aisló el fragmento que contenía el vector de 17,8 kb y se desfosforiló utilizando la enzima SAP (Boehringer Mannheim). Este fragmento carece de las adenossecuencias desde el nucleótido 35464 a la ITR 3'. Utilizando ADN de pWE/Ad.AfIII-rITR como molde y los cebadores ITR-EPH:

55 5'-CGG AAT TCT TAA TTA AGT TAA CAT CAT CAA TAA TAT ACC-3'

y

Ad101: 5'-TGA TTC ACA TCG GTC AGT GC-3'

60 Se generó un fragmento mediante PCR de 630 pb que correspondía a las secuencias 3' de Ad5. Este fragmento de la PCR fue clonado con posterioridad en el vector pCR2.1 (Invitrogen) y se aislaron los clones que contenían el fragmento de la PCR y se secuenciaron para verificar la correcta amplificación del ADN. El clon de la PCR fue digerido después con Pacl y AvrII y el inserto adeno de 0,5 kb fue ligado al fragmento pBr/Ad.Bam-rITRpacNúm.2 digerido con Pacl/AvrII parcial generando pBr/Ad.Bam-rITRsp. A continuación se utilizó este constructo para generar

un clon cosmidico (como se ha descrito antes) que tiene un inserto correspondiente a las secuencias de adenovirus 3534 a 35938. Este clon fue denominado pWE/AfIII-rITRsp.

Generación de pWE/Ad.AfIII-rITRΔE2A:

5 La delección de las secuencias codificadoras de E2A de pWE/Ad.AfIII-rITR (consigna ECACC P97082116) ha sido completada como sigue. Las secuencias adenovirales que flanquean la región codificadora de E2A a la izquierda y a la derecha fueron amplificadas a partir del plásmido pBr/Ad.Sal.rITR (consigna ECACC P97982119) en una reacción de PCR con el sistema Expand PCR (Boehringer) según el protocolo del fabricante. Se utilizaron los siguiente
10 cebadores: Secuencias limítrofes por la derecha (correspondientes a los nucleótidos 24033 a 25180 de Ad5): ΔE2A.SnaBI:5'-GGC GTA CGT AGC CCT GTC GAA AG-3' y ΔE2a.DBP-inicio:5'-CCA ATG CAT TCG AAG TAC TTC CTT CTC CTA TAG GC-3'

15 El fragmento de ADN amplificado fue digerido con SnaBI y NsiI (el sitio NsiI es generado en el cebador ΔE2A.DBP -inicio, subrayado). Secuencias limítrofes por la izquierda (correspondientes a los nucleótidos 21557 a 22442 de Ad5): ΔE2A.DBP-terminación:5'-CCA ATG CAT ACG GCG CAG ACG G-3' y ΔE2a.BamHI: 5'-GAG GTG GAT CCC ATG GAC GAG-3'.

20 El ADN amplificado fue digerido con BamHI y NsiI (el sitio NsiI es generado en el cebador ΔE2A.DBP -terminación, subrayado).

Con posterioridad, los fragmentos de ADN digeridos fueron ligados en pBr/Ad.Sal-rITR digerido con SnaBI/BamHI. La secuenciación confirmaba la reposición exacta de la región codificadora de DBP con un único sitio NsiI en el plásmido pBr/Ad.Sal-rITRΔE2A. Se puede utilizar el único sitio NsiI para introducir un casete de expresión para un gen que va a ser transducido mediante el vector recombinante.
25

30 La delección de las secuencias codificadoras de E2A se realizó de manera que los sitios aceptores del empalme del gen que codifica L4 de 100 K en la posición 24048 en la hebra superior se dejaron intactos. Además, las señales de poliadenilación de los ARN de E2A y los ARN de L3 originales de la izquierda de las secuencias codificadoras se dejaron intactas. Esto asegura la expresión apropiada de los genes de L3 y del gen que codifica la proteína L4 de 100 K durante el ciclo vital del adenovirus.

35 A continuación, se generó el plásmido pWE/Ad.AfIII-rITRΔE2A. El plásmido pBR/Ad.Sal-rITRΔE2A fue digerido con BamHI y SpeI. El fragmento de 3,9 Kb en el que la región codificadora de E2A fue remplazada por el único sitio NsiI fue aislado. El pWE/Ad.AfIII-rITR fue digerido con BamHI y SpeI. El fragmento de ADN de 35 Kb, del cual se separaba el fragmento BamHI/SpeI que contenía la secuencia codificadora de E2A, fue aislado. Los fragmentos fueron ligados y empaquetados utilizando extractos de empaquetamiento del fago λ según el protocolo del fabricante (Stratagene), rindiendo el plásmido pWE/Ad.AfIII-rITRΔE2A.

40 Este clon cosmidico puede ser utilizado para generar vectores adenovirales que tienen E2A suprimida mediante cotransfección de ADN digerido con PacI junto con plásmidos adaptadores digeridos sobre células de empaquetamiento que expresan el producto génico de E2A funcional.

Construcción de plásmidos adaptadores

45 La ausencia de solapamiento de secuencia entre el adenovirus recombinante y las secuencias de E1 en la línea celular de empaquetamiento es esencial para la generación libre de RCA segura y la propagación de nuevos virus recombinantes. El plásmido adaptador pMLPI.TK (descrito en PCT/NL96/00244) es un ejemplo de un plásmido adaptador diseñado para su uso según la invención en combinación con las líneas celulares de empaquetamiento de la invención. Este plásmido fue utilizado como sustancia de partida para elaborar un nuevo vector en el cual las moléculas de ácido nucleico que comprenden un promotor específico y las secuencias de genes pueden ser fácilmente intercambiadas.
50

55 Primero, se generó un fragmento de PCR a partir de ADN molde de pZipΔMo+PyF101(N') (descrito en PCT/NL96/00195) con los siguientes cebadores: LTR-1: 5'-CTG TAC GTA CCA GTG CAC TGG CCT AGG CAT GGA AAA ATA CAT AAC TG-3' Y LTR-2: 5'-GCG GAT CCT TCG AAC CAT GGT AAG CTT GGT ACC GCT AGC GTT AAC CGG GCG ACT CAG TCA ATC G-3'. Se utilizó ADN polimerasa de Pwo (Boehringer Mannheim) según el protocolo del fabricante con los siguientes ciclos de temperatura: una vez 5' a 95°C; 3' a 55°C; y 1' a 72°C, y 30 ciclos de 1' a 95°C, 1' a 60°C, 1' a 72°C, seguido de una vez 10' a 72°C. El producto de la PCR fue digerido después con BamHI y ligado en el vector pMLP10 (Levrero et al., 1991) digerido con PvuII y BamHI, generando de ese modo el vector pLTR10. Este vector contiene secuencias adenovirales desde el pb 1 al pb 454 seguido de un promotor que constaba de una parte de la LTR Mo-MuLV cuyas secuencias intensificadoras de tipo salvaje estaban remplazadas por el intensificador de un virus de polioma mutante (PyF101). El fragmento promotor fue denominado L420. A continuación, se insertó la región codificadora del gen HSA murino. Se digirió pLTR10 con BstBI seguido de tratamiento de Klenow y digestión con NcoI. El gen HSA fue obtenido mediante amplificación por PCR en pUC18-HSA (Kay et al., 1990) utilizando los siguientes cebadores: HSA1, 5'-GCG CCA CCA TGG GCA GAG CGA TGG
65

TGG C-3' y HSA2, 5'-GTT AGA TCT AAG CTT GTC GAC ATC GAT CTA CTA ACA GTA GAG ATG TAG AA-3'. El fragmento amplificado de 269 pb fue subclonado en un vector lanzadera utilizando los sitios NcoI y BglII. La secuenciación confirmó la incorporación de la secuencia codificadora correcta del gen HSA, pero con una inserción de TAG extra directamente después del codón de terminación TAG. La región codificadora del gen HSA, incluyendo la duplicación de TAG fue escindida en forma de un fragmento NcoI(cohesivo)-Sall(romo) y clonada en el fragmento NcoI(cohesivo)/BstBI(romo) de 3,5 kb de pLTR10, dando como resultado pLTR-HSA10.

Finalmente, se digirió pLTR-HSA10 con EcoRI y BamHI después de lo cual se insertó el fragmento que contenía la ITR izquierda, la señal de empaquetamiento, el promotor L420 y el gen HSA en el vector pMLP1.TK digerido con las mismas enzimas y reemplazando de ese modo el promotor y las secuencias génicas. Esto daba como resultado el nuevo plásmido pAd/L420-HSA adaptador que contiene los sitios de reconocimiento convenientes para diversas enzimas de restricción próximos al promotor y las secuencias génicas. SnaBI y AvrII pueden ser combinados con HpaI, NheI, KpnI, HindIII para intercambiar las secuencias promotoras, mientras los últimos sitios pueden ser combinados con los sitios ClaI o BamHI 3' de la región HSA para reemplazar los genes de este constructo. Otro plásmido adaptador que fue diseñado para permitir el fácil intercambio de moléculas de ácido nucleico fue elaborado reemplazando las secuencias promotoras, génicas y poli A en pAd/L420-HSA por el promotor de CMV, un sitio de clonación múltiple, un intrón y una señal poli A. Para este fin, se digirió pAd/L420-HSA con AvrII y BglII seguido de tratamiento con Klenow para obtener extremos romos. El fragmento de 5,1 kb con el vector pBr322 y las secuencias adenovirales fue aislado y ligado a un fragmento de 1570 pb romo de pCDNA1/amp (Invitrogen) obtenido mediante digestión con HhaI y AvrII seguido de tratamiento con ADN polimerasa de T4. Este plásmido adaptador fue denominado pAd5/CLIP. Para permitir la separación de secuencias vectoras de la ITR izquierda en pAd/Clip, éste plásmido fue parcialmente digerido con EcoRI y el fragmento lineal fue aislado. Se recoció un oligo de la secuencia 5' TTA AGT CGA C-3' consigo mismo dando como resultado un conector con un sitio Sall y EcoRI sobresaliente. El conector fue ligado al vector pAd5/Clip parcialmente digerido y se seleccionaron los clones que tenían el conector insertado en el sitio EcoRI 23 pb aguas arriba de la ITR de adenovirus izquierda en pAd/Clip dando como resultado pAd5/Clipsal. Del mismo modo, se ha cambiado el sitio EcoRI de pAd5/Clip por un sitio PacI mediante inserción de un conector de secuencia 5'-AAT TGT CTT AAT TAA CCG CAA TT-3'. El vector pAd5/Clip fue digerido parcialmente con EcoRI, desfosforilado y ligado al conector PacI con EcoRI sobresaliente. La mezcla de ligación fue digerida con PacI para separar los concatámeros, aislada en gel de agarosa y religada. El vector resultante fue denominado pAd5/Clippac. Estos cambios permiten más flexibilidad para liberar la ITR izquierda de la secuencia vectora plasmídica.

El vector pAd5/L420-HSA también fue modificado para crear un sitio Sall o PacI aguas arriba de la ITR izquierda. A este fin pAd5/L420-HSA fue digerido con EcoRI y ligado al conector PacI descrito antes en la presente invención. La mezcla de ligación fue digerida con PacI y religada tras el aislamiento del ADN lineal en gel de agarosa para separar los conectores concatamerizados. Esto daba como resultado un plásmido adaptador pAd5/L420-HSApac. Este constructo fue utilizado para generar pAd5/L420-HSAsal como sigue: pAd5/L420-HSApac fue digerido con Scal y BsrGI y el fragmento vector fue ligado al fragmento de 0,3 kb aislado tras la digestión de pAd5/Clipsal con las mismas enzimas.

Generación de plásmidos adaptadores pAdMire y pAdApt

Para crear un plásmido adaptador que contenga solamente una secuencia poliligadora y no secuencias promotoras o poli A, se digirió pAd5/L420-HSApac con AvrII y BglII. El fragmento vector fue ligado a un oligonucleótido conector digerido con las mismas enzimas de restricción. El conector fue elaborado recociendo oligos de la siguiente secuencia: PLL-1: 5'-GCC ATC CCT AGG AAG CTT GGT ACC GGT GAA TTC GCT AGC GTT AAC GGA TCC TCT AGA CGA GAT CTG G-3' y PLL-2: 5'-CCA GAT CTC GTC TAG AGG ATC CGT TAA CGC TAG CGA ATT CAC CGG TAC CAA GCT TCC TAG GGA TGG C-3'.

Los conectores recocidos fueron digeridos con AvrII y BglII y separados de los extremos pequeños mediante purificación en columna (estuche de separación de nucleótidos Qiaquick) según las recomendaciones de los fabricantes. El conector fue ligado después al fragmento pAd5/L420-HSApac digerido con AvrII/BglII. Se seleccionó un clon, denominado AdMire, que tenía el conector incorporado y fue secuenciado para verificar la integridad del inserto.

El plásmido adaptador AdMire permite la fácil inserción de casetes de expresión completas.

Se construyó un plásmido adaptador que contenía el promotor de CMV humano que media elevados niveles de expresión en células humanas como sigue: pAd5/L420-HSApac fue digerido con AvrII y los extremos salientes 5' fueron rellenados utilizando la enzima de Klenow. Una segunda digestión con HindIII dio como resultado la separación de las secuencias promotoras de L420. El fragmento vector fue aislado y ligado a un fragmento de PCR que contenía la secuencia promotora de CMV. Este fragmento de la PCR fue obtenido tras la amplificación de las secuencias de CMV de pCMVLacl (Stratagene) con los siguientes cebadores: CMVplus: 5'-GAT CGG TAC CAC TGC AGT GGT CAA TAT TGG CCA TTA GCC-3' y CMVminA: 5'-GAT CAA GCT TCC AAT GCA CCG TTC CCG GC-3'. El fragmento de la PCR fue digerido primero con PstI (subrayado en CMVplus) después de lo cual los extremos salientes 3' fueron separados mediante tratamiento con ADN polimerasa de T4. Después el ADN fue

digerido con HindIII (subrayado en CMVminA) y ligado en el fragmento pAd5/L420-HSApac descrito en la presente memoria digerido con AvrII y HindIII. El plásmido resultante fue denominado pAd5/CMV-HSApac. Este plásmido fue digerido después con HindIII y BamHI y el fragmento vector fue aislado y ligado a la secuencia poliligadora obtenida tras la digestión de AdMire con HindIII y BglII. El plásmido resultante fue denominado pAdApt. El plásmido adaptador pAdApt contiene los nucleótidos 735 a +95 del promotor de CMV humano (Boshart et al., 1985). Una segunda versión de este plásmido adaptador que contiene un sitio Sall en lugar del sitio PacI aguas arriba de la ITR izquierda fue elaborada insertando el fragmento Scal-BsrGI de 0,7 kb de pAd5/Clipsal en pAdApt digerido con Scal y digerido parcialmente con BsrGI. Este clon fue denominado pAdApt.sal.

10 *Generación de adenovirus recombinantes basados en Ad5*

Se pueden generar adenovirus recombinantes libres de RCA muy eficazmente utilizando los plásmidos adaptadores descritos en la presente memoria y los constructos pWe/Ad.AfIII-rITR o pWe/Ad.AfIII-rITRsp. Generalmente, el plásmido adaptador que contiene el transgen deseado en la casete de expresión deseada es digerido con enzimas adecuadas para liberar el inserto de secuencias vectoras en el extremo 3' y/o 5'. Los plásmidos de complementación adenovirales pWE/Ad.AfIII-rITR o pWE/Ad.AfIII-rITRsp son digeridos con PacI para liberar las secuencias adeno de los plásmidos vectores. Como ejemplo no limitante se describe la generación de AdApt-LacZ. Se generó el plásmido adaptador pAdApt-LacZ como sigue. El gen LacZ de E. Coli fue amplificado a partir del plásmido pMLP.nlsLacZ (EP 95-202.213) mediante PCR con los cebadores 5'-GGG GTG GCC AGG GTA CCT CTA GGC TTT TGC AA-3' y 5'-GGG GGG ATC CAT AAA CAA GTT CAG AAT CC-3'. La reacción de PCR fue realizada con Ex Taq (Takara) según el protocolo de los proveedores en el siguiente programa de amplificación: 5 minutos a 94°C, 1 ciclo; 45 segundos a 94°C y 30 segundos a 60°C y 2 minutos a 72°C, 5 ciclos; 45 segundos a 94°C y 30 segundos a 65°C y 2 minutos a 72°C, 25 ciclos; 10 minutos a 72; 45 segundos a 94°C y 30 segundos a 60°C y 2 minutos a 72°C, 5 ciclos, ciclo I. El producto de la PCR fue digerido con posterioridad con KpnI y BamHI y el fragmento de ADN digerido fue ligado en pcDNA3 (Invitrogen) digerido con KpnI/BamHI, dando lugar a pcDNA3.nlsLacZ. El constructo pcDNA3.nlsLacZ fue digerido después con KpnI y BamHI y el fragmento LacZ de 3 kb fue aislado en gel utilizando el estuche GeneClean Spin (Bio 101, Inc.).

pAdApt también fue digerido con KpnI y BamHI y el fragmento vector lineal fue aislado en gel como antes. Ambos fragmentos aislados fueron ligados y se seleccionó un clon que contenía el inserto LacZ. El constructo pAdApt-LacZ fue digerido con Sall, purificado mediante el estuche GeneClean Spin y con posterioridad digerido con PacI. pWE/Ad.AfIII-rITRsp fue digerido con PacI. Ambas mezclas de digestión fueron tratadas durante 30' a 65°C para inactivar las enzimas. Las muestras fueron colocadas en gel para estimar la concentración. Se sembraron $2,5 \times 10^6$ células PER.C6 en matraces T25 en DMEM con FCS al 10% y MgCl 10 mM. Al día siguiente se transfectaron cuatro microgramos de cada plásmido a las células PER.C6 (consigna ECACC 96022940) utilizando el reaccionante de transfección Lipofectamine (Life Technologies Inc.) según las instrucciones del fabricante. Al día siguiente el medio fue reemplazado por medio de cultivo de nueva aportación y las células fueron cultivadas adicionalmente a 37°C, CO₂ al 10%. De nuevo un día más tarde fueron tratadas con tripsina, sembradas en matraces T80 y cultivadas a 37°C, CO₂ al 10%. Se obtuvo un ECP completo 6 días después de la siembra en los matraces T80. Las células fueron cosechadas en el medio y sometidas a un ciclo de congelación/descongelación. El producto lisado bruto obtenido de este modo fue utilizado para purificar en placa la mezcla de virus. Se escogieron diez placas, se desplegaron en una placa de 24 pocillos y se sometieron a ensayo en cuanto a la expresión de LacZ tras la infección de las células A549. Los virus de las diez placas expresaban LacZ.

45 **Ejemplo 3**

Generación de adenovirus recombinantes quiméricos

50 *Generación de adenovirus basados en Ad5 quiméricos de hexonas*

Los anticuerpos neutralizadores en suero humano están dirigidos principalmente a la proteína hexona y en un grado menor a la proteína pentona. Las proteínas hexona de los diferentes serotipos muestran regiones muy variables presentes en bucles que se pronostica que están expuestas en la parte externa del virus (Athappilly et al., 1994; J. Mol. Biol. 242, 430-455). Para estas regiones altamente variables han sido mapeados la mayoría de los epítomos de tipo específico (Toogood et al., 1989; J. Gen Virol. 70, 3203-3214). Así el reemplazo de (parte de) las secuencias de la hexona por las correspondientes secuencias de un serotipo diferente es una estrategia eficaz para evitar los anticuerpos neutralizadores (pre-existent) de Ad5. Las secuencias que codifican la hexona del adenovirus de serotipo 5 están localizadas entre los nucleótidos 18841 y 21697.

60 Para posibilitar el fácil intercambio de las secuencias que codifican la hexona de los serotipos de adenovirus alternativos en el esqueleto de Ad5, primero se generó un vector lanzadera.

Este subclon, codificado pBr/Ad.Eco-PmeI, fue generado digiriendo primero el plásmido pBr322 con EcoRI y EcoRV e insertando el fragmento PmeI-EcoRI de 14 kb de pWE/Ad.AfIII-Eco. En este vector lanzadera se realizó una delección de un fragmento SanDI de 1430 pb mediante digestión con SanDI y religación para dar pBr/Ad.Eco-PmeI

65

ΔSanDI. El fragmento separado contiene los únicos sitios SpeI y MunI. De pBr/Ad.Eco-PmeIΔSanDI se suprimió el ADN de Ad5 que codificaba la hexona. A este fin, se amplificaron mediante PCR las secuencias que flanqueaban la hexona y se conectaron entre sí generando de ese modo sitios de restricción únicos que remplazaban la región codificadora de la hexona. Para estas reacciones de PCR se requerían cuatro oligonucleótidos diferentes: Δhex1 - Δhex4.

Δhex1: 5'-CCT GGT GCT GCC AAC AGC-3'
 Δhex2: 5'-CCG GAT CCA CTA GTG GAA AGC GGG CGC GCG-3'
 Δhex3: 5'-CCG GAT CCA ATT GAG AAG CAA GCA ACA TCA ACA
 AC-3'
 Δhex4: 5'-GAG AAG GGC ATG GAG GCT G-3'

El ADN amplificado producto de ± 1100 pb obtenido con los oligonucleótidos Δhex1 y Δhex2 fue digerido con BamHI y FseI. El ADN amplificado producto de ± 1600 pb obtenido con los oligonucleótidos Δhex3 y Δhex4 fue digerido con BamHI y SbfI. Estos fragmentos de PCR digeridos fueron purificados con posterioridad en gel de agarosa y en una reacción de ligación en tres partes utilizando la enzima ligasa de T4 conectada a pBr/Ad.Eco-PmeI Δ SanDI digerida con FseI y SbfI. El constructo resultante estaba codificado por pBr/Ad.Eco-PmeIΔHexon. Este constructo fue secuenciado en parte para confirmar la correcta secuencia de nucleótidos y la presencia de los sitios de restricción únicos MunI y SpeI.

PBr/Ad.Eco-PmeIΔHexon sirve como vector lanzadera para introducir secuencias de hexona heterólogas amplificadas a partir de ADN de virus de diferentes serotipos utilizando cebadores que introducen los sitios de restricción únicos MunI y SpeI en los extremos 5' y 3' de las secuencias de hexona respectivamente. Para generar vectores basados en Ad5 que contengan secuencias de hexona de los serotipos para los cuales los individuos sanos no tienen títulos de NAB, o los tienen muy bajos, se amplificaron las secuencias de hexona de Ad35, Ad34, Ad26 y Ad48 utilizando los siguientes cebadores: Hex-up2: 5'-GAC TAG TCA AGA TGG CYA CCC CHT CGA TGA TG-3' y Hex-do2: 5'-GCT GGC CAA TTG TTA TGT KGT KGC GTT RCC GGC-3'. Estos cebadores fueron diseñados utilizando las secuencias de las regiones codificadoras de hexona publicadas (por ejemplo las secuencias de hexona de Ad2, Ad3, Ad4, Ad5, Ad7, Ad16, Ad40 y Ad41 pueden ser obtenidas en GenBank). Los nucleótidos degenerados fueron incorporados en las posiciones que muestran variación entre los serotipos.

Los productos de la PCR fueron digeridos con SpeI y MunI y clonados en el constructo pBr/Ad.Eco-PmeIΔHexon digerido con las mismas enzimas.

Las secuencias de hexona modificadas fueron introducidas con posterioridad en el constructo pWE/Ad.AfIII-rITR mediante intercambio del fragmento AsclI generando pWE/Ad.AfIII-rITRHexXX donde XX representa el serotipo utilizado para amplificar las secuencias de las hexonas.

Los constructos pWE/Ad.AfIII-rITRHexXX son utilizados después para elaborar virus de la misma manera que se ha descrito antes en la presente memoria para los virus recombinantes de Ad5.

Generación de virus recombinantes basados en Ad5 quiméricos de pentonas

El gen de la pentona del adenovirus de tipo 5 está localizado entre las secuencias 14156 y 15869. La base pentona es la proteína de la cápsida de adenovirus que media la internalización del virus en la célula diana. Se ha demostrado que al menos ciertos serotipos (tipo C y B) logran esto mediante la interacción de una secuencia RGD de la pentona con las integrinas de la superficie celular. Sin embargo, los adenovirus de tipo F no tienen una secuencia RGD y para la mayoría de los virus del grupo A y D no se conoce la secuencia de la pentona. Por lo tanto, la pentona puede estar implicada en la especificidad de la célula diana. Además, como proteína de la cápsida, la proteína pentona está implicada en la inmunogenicidad del adenovirus (Gahery-Segard et al., 1998). Por lo tanto, la reposición de las secuencias de pentona de Ad5 con las secuencias de pentona de serotipos para los cuales no existen o son bajos los títulos de NAB existentes además de la reposición de las secuencias de hexona evitará el aclaramiento del vector adenoviral más eficazmente que la reposición de la hexona sola. La reposición de las secuencias de la pentona también puede afectar a la especificidad de infección.

Para poder introducir secuencias de pentona heterólogas en Ad5 los autores de la presente invención hicieron uso del sistema basado en plásmidos descrito antes. Primero se elaboró un vector lanzadera para las secuencias de pentona mediante inserción del fragmento NheI-EcoRV del constructo pWE/Ad.AfIII-EcoRI en pBr322 digerido con las mismas enzimas. El vector resultante fue denominado pBr/XN. De este plásmido se suprimieron las secuencias de pentona de Ad5 y se remplazaron por sitios de restricción únicos que se utilizaron después para introducir nuevas secuencias de pentona de otros serotipos. A este fin, se amplificaron las secuencias limítrofes izquierdas de la pentona en pBr/XN mediante PCR utilizando los siguientes cebadores: DP5-F: 5'-CTG TTG CTG CTG CTA ATA GC-3' y DP5-R: 5'-CGC GGA TCC TGT ACA ACT AAG GGG AAT ACA AG-3'

DP5-R tiene un sitio BamHI (subrayado) para la ligación a la secuencia limítrofe derecha y también introduce un sitio BsrGI único (negrita) en el extremo 5' de la primera región de la pentona de Ad5.

La secuencia limítrofe derecha fue amplificada utilizando: DP3-F: 5'-CGC GGA TCC CTT AAG GCA AGC ATG TCC ATC CTT-3' y DP3-3R: 5'-AAA ACA CGT TTT ACG CGT CGA CCT TTC-3'

- 5 DP3-F tiene un sitio BamHI (subrayado) para la ligación a la secuencia limítrofe izquierda y también introduce un sitio AflII único (negrita) en el extremo 3' de la primera región de la pentona de Ad5.

Los dos fragmentos resultantes de la PCR fueron digeridos con BamHI y ligados entre sí. Después esta mezcla de ligación fue digerida con AvrII y BglII. PBr/XN también fue digerido con AvrII y BglII y el fragmento vector fue ligado a los fragmentos de PCR ligados digeridos. El clon resultante fue denominado pBr/Ad. Las secuencias codificadoras de la pentona de Ad35, Ad34, Ad26 y Ad48 fueron amplificadas mediante PCR de manera que los extremos 5' y 3' contuvieran los sitios BsrGI y AflII respectivamente. A este fin, se utilizaron los siguientes cebadores:

Para Ad34 y Ad35:

15 P3-for: 5'-GCT CGA TGT ACA ATG AGG AGA CGA GCC GTG CTA-3'
P3-rev: 5'-GCT CGA CTT AAG TTA GAA AGT GCG GCT TGA AAG-3'

Para Ad26 y Ad48:

20 P17F: 5'-GCT CGA TGT ACA ATG AGG CGT GCG GTG GTG TCT
TC-3'
P17R: 5'-GCT CGA CTT AAG TTA GAA GGT GCG ACT GGA AAG C-3'

25 Los productos de la PCR amplificados fueron digeridos con BfrI y BsrGI y clonados en pBr/Ad.Δpenton digerido con las mismas enzimas. La introducción de estas secuencias de pentona heterólogas en pBr/Ad generó constructos denominados pBr/Ad.pentonXX donde XX representa el número del serotipo correspondiente al serotipo utilizado para amplificar las secuencias de pentona insertadas. Con posterioridad las nuevas secuencias de pentona fueron introducidas en el vector pWE/Ad.AflII-rITR que tenía una hexona modificada. Por ejemplo las secuencias de pentona de Ad35 fueron introducidas en el constructo pWE/Ad.AflII-rITRHex35 mediante intercambio del fragmento FseI común. Asimismo se realizaron otras combinaciones de secuencias de pentona y hexona. Los virus con secuencias de hexona y pentona modificadas fueron elaborados como se ha descrito antes utilizando la cotransfección con un plásmido adaptador en células PER.C6 (número de consigna en la ECACC 96022940). Además, las secuencias de pentona fueron introducidas en el constructo pWE/Ad.AflII-rITR. Los últimos constructos contienen sólo una pentona modificada y los virus generados a partir de estos constructos serán utilizados para estudiar la contribución de las secuencias de pentona a la neutralización de adenovirus y también para el análisis de los posibles cambios en la eficacia y la especificidad de la infección.

40 *Generación de virus basados en Ad5 quiméricos de la fibra*

La infección por adenovirus está mediada por dos proteínas de la cápsida fibra y pentona. La unión del virus a las células se logra mediante la interacción de la proteína fibra saliente con un receptor de la superficie celular. La internalización tiene lugar en ese caso tras la interacción de la proteína pentona con las integrinas de la superficie celular. Se ha demostrado que al menos algunos adenovirus del subgrupo C y B utilizan un receptor diferente para la unión a la célula y por lo tanto tienen eficacias de infección diferentes en los diferentes tipos de células. Así es posible cambiar el espectro de infección de los adenovirus cambiando la fibra de la cápsida. La secuencia codificadora de la fibra de Ad5 está localizada entre los nucleótidos 31042 y 32787. Para separar el ADN de Ad5 que codifica la fibra los autores de la presente invención comenzaron en el constructo pBr/Ad.Bam-rITR. Primero se eliminó un sitio NdeI de este constructo. Para este propósito, el ADN del plásmido pBr322 fue digerido con NdeI después de lo cual los extremos salientes fueron rellenados utilizando enzima de Klenow. Este plásmido pBr322 fue religado después, digerido con NdeI y transformado en E. Coli DH5α. El plásmido pBr/ΔNdeI fue digerido con Scal y Sall y el fragmento vector de 3198 pb resultante fue ligado al fragmento Scal-Sall de 15349 pb derivado de pBr/Ad.BamrITR, dando como resultado el plásmido pBr/Ad.Bam-rITRΔNdeI que contenía por tanto un único sitio NdeI. A continuación se realizó una PCR con los oligonucleótidos NY-up: 5'-CGA CAT ATG TAG ATG CAT TAG TTT GTG TTA TGT TTC AAC GTG-3' y NY-down: 5'-GGA GAC CAC TGC CAT GTT-3'.

60 Durante la amplificación, se introdujeron ambos sitios de restricción NdeI (negrita) y NsiI (subrayado) para facilitar la clonación de los ADN de la fibra amplificados. La amplificación consistía en 25 ciclos de 45 segundos cada uno a 94°C, 1 minuto a 60°C, y 45 segundos a 72°C. La reacción de PCR contenía 25 pmoles de oligonucleótidos NY-up y NY-down, dNTP 2 mM, tampón para PCR con MgCl₂ 1,5 mM, y 1 unidad de la polimerasa estable al calor Elongase (Gibco, Países Bajos). Una décima parte del producto de la PCR se hizo circular sobre gel de agarosa lo que demostró que el fragmento de ADN esperado de ± 2200 pb estaba amplificado. Este fragmento de la PCR fue purificado con posterioridad utilizando el sistema del estuche GeneClean (Bio101 Inc.). Después, tanto el constructo pBr/Ad.Bam-rITRΔNdeI como el producto de la PCR fueron digeridos con las enzimas de restricción NdeI y SbfI. El fragmento de la PCR fue clonado con posterioridad utilizando la enzima ligasa de T4 en pBr/Ad.Bam-rITRΔNdeI digerido con NdeI y SbfI, generando pBr/Ad.BamRΔFib.

Este plásmido permite la inserción de cualquier secuencia de la fibra amplificada mediante PCR a través de los sitios NdeI y NsiI únicos que están insertados en lugar de la secuencia de la fibra eliminada. Los virus pueden ser generados mediante la recombinación homóloga doble en células de empaquetamiento descrita en la patente de los Estados Unidos Núm. 5994128 de Bout et al. utilizando un plásmido adaptador, constructo pBr/Ad.AfIII-EcoRI digerido con PaeI y EcoRI y un constructo pBr/Ad.BamRΔFib en el cual se han insertado las secuencias de la fibra heterólogas. Para aumentar la eficacia de la generación de virus, se modificó el constructo pBr/Ad.BamRΔFib para generar un sitio PaeI que flanqueaba la ITR derecha. A este fin, se digirió pBr/Ad.BamRΔFib con AvrII y el fragmento de adenovirus de 5 kb fue aislado e introducido en el vector pBr/Ad.Bam-rITR.pac#8 descrito antes reemplazando el correspondiente fragmento AvrII. El constructo resultante fue denominado pBr/Ad.BamRΔfib.pac. Una vez que se ha introducido una secuencia de la fibra heteróloga en pBr/Ad.BamRΔfib.pac, el clon de adenovirus con la fibra modificada a mano derecha es introducido en un gran clon cosmídico como se ha descrito antes en la presente memoria para pWE/Ad.AfIII-rITR. Semejante clon cosmídico grande permite la generación de adenovirus sólo mediante una recombinación homóloga. Los virus basados en Ad5 con fibras modificadas han sido elaborados y descritos (núms. 98204482.8 y 99200624.7). Además, las secuencias de hexona y pentona de los serotipos de esta invención se combinan con las secuencias de la fibra deseadas para generar virus que infectan las célula diana de elección muy eficazmente. Por ejemplo, las células de la musculatura lisa, las células endoteliales o los sinoviocitos (todos de origen humano) son muy bien infectados con virus basados en Ad5 con una fibra de los virus del subgrupo B especialmente Ad16.

Los ejemplos descritos antes en los cuales las secuencias específicas pueden ser suprimidas del esqueleto de Ad5 en los plásmidos y reemplazadas por las correspondientes secuencias de otros serotipos muestran claramente la flexibilidad del sistema. Es evidente que mediante los métodos descritos en la presente memoria se puede elaborar cualquier combinación de genes de la cápsida de diferentes serotipos. Así, se diseñan adenovirus basados en Ad5 quimérico recombinante con las secuencias de hexona y pentona deseadas haciendo menos sensible a la neutralización al virus y con secuencias de fibra deseadas que permiten una infección eficaz en tejidos diana específicos.

Ejemplo 4

Construcción de un sistema basado en plásmidos para generar virus recombinantes de Ad35

Se han publicado previamente mapas de restricción parciales de Ad35 (Valderrama-Leon et al., 1985; Kang et al., 1989; Li et al. 1991). Un ejemplo de un sistema basado en plásmidos funcionales para generar adenovirus recombinantes basados en Ad35 consta de los siguientes elementos:

1. Un plásmido adaptador que comprende una ITR izquierda y secuencias de empaquetamiento derivadas de Ad35 y al menos un sitio de restricción para la inserción de una casete de expresión heteróloga y que carece de las secuencias de E1. Además, el plásmido adaptador contiene secuencias 3' de Ad35 de E1B que codifican la región que incluye el promotor pIX y secuencias codificadoras suficientes para mediar la recombinación homóloga del plásmido adaptador con un segundo nucleótido.
2. Un segundo nucleótido que comprende secuencias homólogas para el plásmido adaptador y secuencias de Ad35 necesarias para la replicación y el empaquetamiento del virus recombinante, esto es, genes tempranos, intermedios y tardíos que no están presentes en la célula de empaquetamiento.
3. Una célula de empaquetamiento que proporciona al menos proteínas E1 funcionales capaces de complementar la función E1 de Ad35.

El ADN de Ad35 fue aislado de un lote de virus purificado como sigue. A 100 µl de solución de partida de virus (Ad35: 3,26x10¹² VP/ml) se añadieron 10 µl 10x tampón ADNasa (Tris-HCl 130 mM pH 7,5; CaCl₂ 1,2 M; MgCl₂ 50 mM). Tras la adición de 10 µl de ADNasa I de 10 mg/ml (Roche Diagnostics) la mezcla fue incubada durante 1 hora a 37°C. Tras la adición de 2,5 µl de EDTA 0,5 M, 3,2 µl de SDS al 20% y 1,5 µl de ProteinaseK (Roche Diagnostics; 20 mg/ml) las muestras fueron incubadas a 50°C durante 1 hora. A continuación, se aisló el ADN viral utilizando el GeneClean Spin Kit (Bio101 Inc.) según las instrucciones de los fabricantes. El ADN se hizo eluir de la columna de centrifugación con 25 µl de agua MilliQ estéril. En lo siguiente se utilizarán unos tamaños de fragmentos de ADN y una numeración de fragmentos según Kang et al. (1989). El ADN de Ad35 fue digerido con EcoRI y los tres fragmentos (aproximadamente 22,3 (A), 7,3 (B) y 6 kb (C)) fueron aislados del gel utilizando el estuche GeneClean (Bio 101, Inc.). pBr322 fue digerido con EcoRI o con EcoRI y EcoRV y los fragmentos digeridos fueron aislados del gel y desfosforilados con la enzima Tsap (Gibco BRL). A continuación, se ligó el fragmento C de Ad35 de 6 kb con el fragmento pBr322xEcoRI y el fragmento de Ad35 que contenía la ITR (EcoRI-B) fue ligado al fragmento pBr322xEcoRI/EcoRV. Las ligaciones fueron incubadas a 16°C durante la noche y transformadas en bacterias DH5α competentes (Life Techn.) Se analizaron minipreps de colonias obtenidas en cuanto a la correcta inserción de los fragmentos de Ad35 mediante análisis de restricción. Se encontró que los fragmentos de Ad35 tanto de 6 kb como de 7,3 kb estaban correctamente insertados en pBR322. El fragmento de 6 kb fue aislado en ambas orientaciones pBr/Ad35-Eco6.0⁺ como pBr/Ad35-Eco6.0⁻ con lo que + representa la orientación 5' a 3' relativa para pBr322. El clon

con el inserto de Ad35 B de 7,3 kb, denominado pBr/Ad35-Eco7.3 fue secuenciado parcialmente para verificar la correcta ligación de la ITR 3'. Se encontró que la ITR tenía al menos la secuencia 5'-CATCATCAAT...-3' en la hebra inferior. Después se amplió pBr/Ad35-Eco7.3 en el extremo 5' mediante inserción del fragmento Ad35 de 6 kb. A este fin, pBr/Ad35-Eco7.3 fue digerido con EcoRI y desfosforilado. El fragmento fue aislado del gel y ligado al fragmento EcoRI de Ad35 de 6 kb. Tras la transformación los clones fueron sometidos a ensayo en cuanto a la correcta orientación del inserto y se seleccionó un clon, denominado pBr/Ad35-Eco13.3.

Este clon es ampliado después con el fragmento Sall D de ~5,4 kb obtenido tras la digestión de Ad35 wt con Sall. A este fin, se elimina el sitio Sall del esqueleto de pBr322 mediante digestión parcial de pBr/Ad35-Eco13.3 con Sall, relleno de los extremos cohesivos mediante tratamiento de Klenow y religación. Se selecciona un clon que contiene un único sitio Sall en el inserto adenoviral. Este clon, denominado pBr Δ sall/Ad35-Eco13.3 es linealizado después con AatII que está presente en el esqueleto de pBr322 y ligado con el conector Sall con los extremos complementarios AatII. El ADN es digerido después con Sall en exceso y el fragmento lineal es aislado y ligado al fragmento Sall-D de 5,4 kb de Ad35. Se selecciona un clon que contiene el fragmento Sall insertado en la orientación correcta en pBr/Ad35-Eco13.3. El clon resultante, pBr/Ad35.Sal2-rITR contiene los ~17 kb 3' de Ad35 incluyendo la ITR derecha. Para permitir la liberación de la ITR derecha de las secuencias vectoras en el momento de generación del virus, se introduce mediante PCR un sitio NotI que flanquea la ITR.

El fragmento EcoRI-A de Ad35 de 22,3 kb también fue clonado en pBr322xEcoRI/EcoRV. Se seleccionó un clon, denominado pBr/Ad35-EcoA3', que tenía aparentemente una delección de aproximadamente 7 kb del extremo 5'. Contenia el sitio Sall a 9,4 kb del ADN wt de Ad35 y a aproximadamente 1,5 kb de las secuencias aguas arriba. Utilizando este sitio Sall y el único sitio NdeI del esqueleto de pBr322 se amplía este clon en el extremo 5' mediante inserción de un fragmento 5' de Ad35 de aproximadamente 5 kb desde el primer Sall de Ad35 de tal manera que se crea un sitio de restricción NotI en el extremo 5' de Ad35 mediante inserción de un conector. Este clon, denominado pBr/Ad35.pIX-EcoA no contiene las secuencias del extremo izquierdo (ITR, secuencias de empaquetamiento y E1) y en el extremo 3' tiene aproximadamente un solapamiento de 3,5 kb con el clon pBr/Ad35.Sal2rITR.

Para crear un plásmido adaptador, se digirió pAd35 con Sall y el fragmento B del extremo izquierdo de ~9,4 kb fue aislado. pBr322 fue digerido con EcoRV y Sall, aislado en gel y desfosforilado con la enzima Tsap. Ambos fragmentos son ligados y los clones con la inserción correcta y la secuencia correcta de la ITR izquierda son seleccionados. Para permitir la liberación de la ITR izquierda de las secuencias vectoras en el momento de la generación del virus, se introduce mediante PCR un sitio NotI que flanquea la ITR izquierda. A partir de este clon se suprimen las secuencias E1 y se remplazan por una secuencia poliligadora utilizando la PCR. La secuencia poliligadora se utiliza para introducir una casete de expresión para un gen de elección.

Los clones de Ad35 recombinantes son generados mediante transfección de las células PER.C6 con el plásmido adaptador, pBr/Ad35.pIX-EcoA y pBr/Ad35.Sal2-rITR como se muestra en la figura 3. La recombinación homóloga da lugar a virus recombinantes.

Ejemplo 5

La prevalencia de la actividad neutralizadora (NA) para Ad35 es baja en sueros humanos de diferentes localizaciones geográficas

En el ejemplo 1 se describió el análisis de la actividad neutralizadora (NA) en sueros humanos de una localización en Bélgica. Sorprendentemente, de un panel de 44 serotipos de adenovirus sometidos a ensayo, un serotipo, Ad35, no era neutralizado en ninguno de los 100 sueros analizados. Además, se encontró que unos pocos serotipos, Ad26, Ad34 y Ad48 eran neutralizados en un 8%, o menos, de los sueros sometidos a ensayo. Este análisis fue ampliado adicionalmente a otros serotipos de adenovirus no sometidos a ensayo previamente y, utilizando una selección de serotipos del primer escrutinio, también se amplió a sueros de diferentes localizaciones geográficas.

A este fin, los adenovirus fueron propagados, purificados y sometidos a ensayo en cuanto a la neutralización en el análisis de inhibición del ECP como se describe en el ejemplo 1. Utilizando los sueros del mismo lote que en el ejemplo 1, se sometieron a ensayo para la neutralización los serotipos de adenovirus 7B, 11, 14, 18 y 44/1876. Se encontró que estos virus eran neutralizados respectivamente en el 59, 13, 30, 98 y 54% de los sueros. Así, de esta serie Ad11 es neutralizado con una frecuencia relativamente baja.

Puesto que se sabe que la frecuencia de aislamiento de los serotipos de adenovirus de tejido humano así como la prevalencia de AN para los serotipos de adenovirus puede diferir en las diferentes localizaciones geográficas, los autores de la presente invención sometieron a ensayo una selección de los serotipos de adenovirus contra sueros de diferentes lugares. Se obtuvieron sueros humanos de dos lugares adicionales en Europa (Bristol, Reino Unido y Leiken, Países Bajos) y de dos lugares en los Estados Unidos (Stanford, CA y Great Neck, NY). Los adenovirus que se encontró que eran neutralizados en el 20% o menos de los sueros del primer escrutinio, así como Ad2, Ad5, Ad27, Ad30, Ad38, Ad43, fueron sometidos a ensayo en cuanto a la neutralización en sueros del Reino Unido. Los resultados de estos experimentos se presentan en la Figura 4. Los adenovirus de serotipos 2 y 5 fueron neutralizados de nuevo en un elevado porcentaje de sueros humanos. Además, algunos de los serotipos que eran

neutralizados en un bajo porcentaje de sueros en el primer escrutinio son neutralizados en un porcentaje mayor de los sueros del Reino Unido, v.g. Ad26 (7% vs. 30%), Ad28 (13% vs. 50%), Ad34 (5% vs. 27%) y Ad48 (8% vs. 32%). La actividad neutralizadora frente a Ad11 y Ad49 que se encontraban en un porcentaje relativamente bajo de sueros en el primer escrutinio, se encuentran en un porcentaje incluso menor de sueros en este segundo escrutinio (13% vs. 5% y 20% vs. 11%, respectivamente). Se encontró ahora que el serotipo de Ad35 que no era neutralizado en ninguno de los sueros en el primer escrutinio, era neutralizado en un bajo porcentaje (8%) de sueros del Reino Unido. La prevalencia de AN en sueros humanos del Reino Unido es la más baja para los serotipos Ad11 y Ad35.

Para un análisis adicional, se obtuvieron sueros de dos localizaciones en los Estados Unidos (Stanford, CA y Great Neck, NY) y de Países Bajos (Leiden). La Figura 5 presenta una visión de conjunto de los datos obtenidos con estos sueros y los datos previos. No todos los virus fueron sometidos a ensayo en todos los sueros, excepto para Ad5, Ad11 y Ad35. La conclusión global de este escrutinio comprensivo de sueros humanos es que la prevalencia de actividad neutralizadora para Ad35 es la más baja de todos los serotipos en todos los países del oeste: como media el 7% de los sueros humanos contienen actividad neutralizadora (5 localizaciones diferentes).

Otro grupo B de adenovirus, Ad11 también es neutralizado en un bajo porcentaje de sueros humanos (media 11% en sueros de 5 localizaciones diferentes). El adenovirus de tipo 5 es neutralizado en un 56% de los sueros humanos obtenidos de 5 localizaciones diferentes. Aunque no sometido a ensayo en todos los sueros, el serotipo 49 del grupo D también es neutralizado con una frecuencia relativamente baja en muestras de Europa y de una localización de los Estados Unidos (media 14%).

En los experimentos de neutralización descritos antes se evalúa que un suero no es neutralizador cuando en el pocillo con la concentración de suero más elevada la protección máxima de ECP es del 40% en comparación con los controles sin suero. La protección se calcula como sigue:

$$\% \text{ protección} = \frac{\text{DO pocillo correspondiente} - \text{DO control virus}}{\text{DO control no infectado} - \text{DO control virus}} \times 100$$

Como se ha descrito en el ejemplo 1, el suero es cultivado en placa en cinco diluciones diferentes que oscilan entre diluciones por 4 y por 64. Por lo tanto, es posible distinguir entre títulos bajos (es decir neutralización solo en las concentraciones de suero más elevadas) y títulos elevados de AN (es decir también neutralización en pocillos con la concentración de suero más baja). De los sueros humanos utilizados en el escrutinio de los autores de la presente invención que se encontró que contenían actividad neutralizadora para Ad5, resultó que el 70% tenía títulos elevados mientras de los sueros que contenían AN para Ad35, sólo el 15% tenían títulos elevados. De los sueros que eran positivos en cuanto a AN para Ad11 sólo el 8% tenían títulos elevados.

Para Ad49 este era del 5%. Por lo tanto, no sólo la frecuencia de AN para Ad35, Ad11 y Ad49 es mucho más baja en comparación con Ad5, si no que de los sueros que contienen AN para estos virus, la inmensa mayoría tiene títulos bajos. Los vectores adenovirales basados en Ad35 tienen por lo tanto una clara ventaja sobre los vectores basados en Ad5 cuando se utilizan como vehículos de terapia génica o vectores de vacunación *in vivo* o en cualquier aplicación en la que la eficacia de infección sea impedida por la actividad neutralizadora.

En los siguientes ejemplos se describe la construcción de un sistema vector para la generación de vectores basados en Ad35 libres de RCA, seguros.

Ejemplo 6

Secuencia de adenovirus humano de tipo 35

Los virus Ad35 fueron propagados en células PER.C6 y el ADN fue aislado como se describe en el ejemplo 4. La secuencia total fue generada por Qiagen Sequence Services (Qiagen GmbH, Alemania). El ADN viral total fue sometido a cizalla mediante sonicación y los extremos del ADN se volvieron romos mediante ADN polimerasa de T4. Los fragmentos romos sometidos a cizalla fueron fraccionados por tamaños sobre geles de agarosa y se obtuvieron porciones de gel correspondientes a fragmentos de ADN de 1,8 a 2,2 kb. El ADN fue purificado a partir de las porciones de gel mediante el protocolo de extracción de gel de QIAquick y subclonado en un banco fragmentado al azar "shotgun" de vectores de clonación del plásmido pUC19. Se utilizó una disposición de los clones en placas de 96 pocillos cubriendo el ADN diana 8 (+/- 2) veces para generar la secuencia total. La secuenciación se realizó en termocicladores Perkin-Elmer 9700 utilizando la química de BigDyeTerminator y la ADN polimerasa de AmpliTaq FS seguido de purificación de las reacciones de secuenciación utilizando la tecnología QIAGEN DyeEx 96. Los productos de la reacción de secuenciación fueron sometidos después a separación automatizada y detección de fragmentos en secuenciadores de 96 calles ABI 377 XL. Los resultados de la secuencia inicial fueron utilizados para generar una secuencia contigua y los espacios fueron rellenados mediante lecturas de paseo con cebador sobre el ADN diana o mediante secuenciación directa de los productos de la PCR. Los extremos de los virus resultaron estar ausentes en el banco fragmentado al azar, muy probablemente debido a las dificultades de clonación resultantes de los aminoácidos de pTP que permanecen unidos a las secuencias ITR tras la digestión con proteinasa K del ADN

viral.

Las rondas de secuencias adicionales sobre el ADN viral resolvían la mayor parte de la secuencia de esas regiones, sin embargo era difícil obtener una secuencia clara de los nucleótidos más terminales. En el extremo 5' la porción de la secuencia obtenida era 5'-CCA ATA ATA TAC CT...-3' mientras en el extremo 3' la porción de la secuencia obtenida era 5'...AGG TAT ATT ATT GAT GAT GGG-3'. La mayoría de los adenovirus humanos tienen una secuencia terminal 5'-CAT CAT CAA TAA TAT ACC-3'. Además, un clon que representaba el extremo 3' del ADN de Ad35 obtenido tras clonar el fragmento EcoRI de Ad35 de 7 kb en pBr322 (véase el ejemplo 4) también resultó tener la secuencia CATCATCAATAAT... típica. Por lo tanto, Ad35 puede tener la secuencia del extremo típica y las diferencias obtenidas al secuenciar directamente el ADN viral se deben a artefactos correlacionados con rondas de secuenciación "run-off" y la presencia de aminoácidos residuales de pTP.

La secuencia total de Ad35 con secuencias terminales corregidas se da en la Figura 6. Basándose en la homología de la secuencia con Ad5 (Genbank Núm.M72360) y Ad7 (secuencia parcial Genbank Núm.X0300) y en la localización de los marcos de lectura abiertos, la organización del virus es idéntica a la organización general de la mayoría de los adenovirus humanos, especialmente los virus del subgrupo B. La longitud total del genoma es de 34794 pares de bases.

Ejemplo 7

Construcción de un sistema vector basado en plásmidos para generar virus basados en Ad35 recombinantes.

Un sistema vector basado en plásmidos funcional para generar vectores adenovirales recombinantes comprende los siguientes componentes:

1. Un plásmido adaptador que comprende una ITR izquierda y secuencias de empaquetamiento derivadas de Ad35 y al menos un sitio de restricción para la inserción de una casete de expresión heteróloga y carente de secuencias E1. Además, el plásmido adaptador contiene las secuencias 3' de Ad35 de la región codificadora de E1B incluyendo el promotor pIX y secuencias codificadoras suficientes para mediar la recombinación homóloga del plásmido adaptador con una segunda molécula de ácido nucleico.

2. Una segunda molécula de ácido nucleico, que comprende secuencias homólogas al plásmido adaptador, y secuencias de Ad35 necesarias para la replicación y el empaquetamiento del virus recombinante, esto es, genes tempranos, intermedios y tardíos que no están presentes en la célula de empaquetamiento.

3. Una célula de empaquetamiento que proporciona al menos proteínas E1 funcionales capaces de complementar la función E1 de Ad35.

Otros métodos para la generación de adenovirus recombinantes en células de empaquetamiento complementadoras son conocidos en la técnica y pueden ser aplicados a los virus Ad35 sin apartarse de la invención. Como ejemplo, se describe con detalle más abajo la construcción de un sistema basado en plásmidos, como se ha esbozado antes.

1) Construcción de plásmidos adaptadores de Ad35

A este fin, el plásmido adaptador pAdApt (Figura 7; descrito en el ejemplo 2) fue modificado primero para obtener plásmidos adaptadores que contienen poliligadores ampliados y que tienen los sitios de restricción únicos convenientes flanqueando la ITR izquierda y la secuencia de adenovirus en el extremo 3' para permitir la liberación del inserto de adenovirus de las secuencias del vector plasmídico. La construcción de estos plásmidos se describe más abajo con detalle: El plásmido adaptador pAdApt (Ejemplo 2) fue digerido con Sall y tratado con Shrimp Alkaline Phosphatase para reducir la re-ligación. Un conector, compuesto por los siguientes dos oligos fosforilados y recocidos:

ExSalPacF 5' - TCG ATG GCA AAC AGC TAT TAT GGG TAT TAT GGG TTC GAA TTA ATT AA- 3';
y ExSalPacR 5' - TCG ATT AAT TAA TTC GAA CCC ATA ATA CCC ATA ATA GCT GTT TGC CA- 3';
fue ligado directamente en el constructo digerido, reemplazando de ese modo el sitio de restricción Sall por Pi-PsPI, Swal y Pacl.

Este constructo fue denominado conector pADAPT+ExSalPac. Además, parte de la ITR izquierda de pAdApt fue amplificada mediante PCR utilizando los siguientes cebadores: PCLIPMSF: 5' -CCC CAA TTG GTC GAC CAT CAT CAA TAA TAT ACC TTA TTT TGG -3' y pCLIPBSRGI: 5' - GCG AAA ATT GTC ACT TCC TGT G - 3'. El fragmento amplificado fue digerido con MnlI y BsrGI y clonado en pAd5/Clip (véase el Ejemplo 2), que estaba parcialmente digerido con EcoRI y tras la purificación digerido con BsrGI, re-insertando de ese modo la ITR izquierda y la señal de empaquetamiento. Tras el análisis con la enzima de restricción, el constructo fue digerido con Scal y SgrAI y el fragmento de 800 pb fue aislado del gel y ligado en el conector pADAPT+ExSalPac digerido con Scal/SgrAI. El constructo resultante, denominado pIPspSalAdapt, fue digerido con Sall, desfosforilado, y ligado al conector de doble hebra ExSalPacF/ExSalPacR fosforilado mencionado antes. Un clon en el que el sitio Pacl era el más cercano

a la ITR fue identificado mediante análisis de restricción y las secuencias fueron confirmadas mediante análisis de la secuencia. Este constructo pAdApt novedoso, denominado pIPspAdapt (Figura 8) alberga por tanto dos conectores ExSalPac que contienen las secuencias de reconocimiento para Pacl, PI-PspI y BstBI, que rodean la porción adenoviral del constructo adaptador adenoviral, y que puede ser utilizado para linealizar el ADN plasmídico antes de la co-transfección con fragmentos coadyuvantes adenovirales.

Con el fin de incrementar adicionalmente las permutaciones de clonación transgénica se construyeron numerosas variantes de poliligadores basadas en pIPspAdapt. Para este fin se digirió primero pIPspAdapt con EcoRI y se desfosforiló. Un conector compuesto por los dos oligos fosforilados y recocidos siguientes: Ecoconector+: 5' - AAT TCG GCG CGC CGT CGA CGA TAT CGA TAG CGG CCG C - 3' y Ecoconector-: 5' - AAT TGC GGC CGC TAT CGA TAT CGT CGA CGG CGC GCC G - 3' fue ligado en este constructo, creando de este modo sitios de restricción para Ascl, Sall, EcoRV, ClaI y NotI. Se obtuvieron ambas orientaciones de este conector y se confirmaron las secuencias mediante análisis de restricción y análisis de la secuencia. El plásmido que contenía el poliligador en el orden 5' HindIII, KpnI, AgeI, EcoRI, Ascl, Sall, EcoRV, ClaI, NotI, NheI, HpaI, BamHI y XbaI fue denominado pIPspAdapt1 (Figura 9) mientras el plásmido que contenía el poliligador en el orden HindIII, KpnI, AgeI, NotI, ClaI, EcoRV, Sall, Ascl, EcoRI, NheI, HpaI, BamHI y XbaI fue denominado pIPspAdapt2.

Para facilitar la clonación de los otros constructos efector o antisentido, se diseñó un conector compuesto por los dos oligonucleótidos siguientes, para invertir el poliligador del pIPspAdapt: HindXba+ 5'-AGC TCT AGA GGA TCC GTT AAC GCT AGC GAA TTC ACC GGT ACC AAG CTT A-3'; HindXba-5'-CTA GTA AGC TTG GTA CCG GTG AAT TCG CTA GCG TTA ACG GAT CCT CTA G-3'. Este conector fue ligado en pIPspAdapt digerido con HindIII/XbaI y el constructo correcto fue aislado. La confirmación se realizó mediante análisis con enzimas de restricción y secuenciación. Este nuevo constructo, pIPspAdaptA, fue digerido con EcoRI y el Ecoconector mencionado antes fue ligado en este constructo. Se obtuvieron ambas orientaciones de este conector, dando como resultado pIPspAdapt3 (Figura 10), que contiene el poliligador en el orden XbaI, BamHI, HpaI, NheI, EcoRI, Ascl, Sall, EcoRV, ClaI, NotI, AgeI, KpnI y HindIII. Todas las secuencias fueron confirmadas mediante análisis con enzimas de restricción y secuenciación.

Después se construyeron plásmidos adaptadores basados en Ad35 como sigue:

La ITR izquierda y la secuencia de empaquetamiento correspondiente a los nucleótidos 1 a 464 de las secuencias de Ad35 wt (Figura 6) fueron amplificadas mediante PCR sobre ADN de wtAd35 utilizando los siguientes cebadores: Cebador 35F1: 5'-CGG AAT TCT TAA TTA ATC GAC ATC ATC AAT AAT ATA CCT TAT AG-3' Cebador 35R2: 5'-GGT GGT CCT AGG CTG ACA CCT ACG TAA AAA CAG-3' La amplificación introduce un sitio Pacl en el extremo 5' y un sitio AvrII en el sitio 3' de la secuencia.

Para la amplificación se utilizó la enzima ADN polimerasa Platinum Pfx (LTI) según las instrucciones del fabricante pero con los cebadores a 0,6 µM con DMSO añadido a una concentración final del 3%. El programa de amplificación fue el siguiente: 2 minutos a 94°C, (30 segundos a 94°C, 30 segundos a 56°C, 1 minuto a 68°C) durante 30 ciclos, seguido de 10 minutos a 68°C.

El producto de la PCR fue purificado utilizando un estuche de purificación pvr (LTI) según las instrucciones de fabricante y digerido con Pacl y AvrII. El fragmento digerido fue purificado después en gel utilizando el estuche geneClean (Bio 101, Inc.). El plásmido adaptador basado en Ad5 pIPspAdapt-3 (Figura 10) fue digerido con AvrII y después parcialmente con Pacl y el fragmento de 5762 pb fue aislado en una porción de gel de agarosa LMP y ligado con el fragmento de PCR mencionado antes digerido con las mismas enzimas y transformado en células DH10B electrocompetentes (LTI). El clon resultante se denomina pIPspAdapt3-Ad35ITR.

Paralelamente, se amplificó una segunda porción de ADN de Ad35 utilizando los siguientes cebadores:

35F3: 5'-TGG TGG AGA TCT GGT GAG TAT TGG GAA AAC-3' y 35R4: 5'-CGG AAT TCT TAA TTA AGG GAA ATG CAA ATC TGT GAG G-3'. Las secuencias de este fragmento corresponden a los nucl. 3401 a 4669 de wtAd35 (Figura 6) y contiene 1,3 kb de secuencias que comienzan directamente 3' desde la secuencia codificadora de E1B 55k. La amplificación y purificación se realizaron como se ha descrito antes para el fragmento que contiene la ITR izquierda y la secuencia de empaquetamiento. El fragmento de PCR fue digerido después con Pacl y subclonado en el vector pNEB193 (New England Biolabs) digerido con SmaI y Pacl. La integridad de la secuencia del clon resultante fue verificada mediante análisis de la secuencia.

Después pNEB/Ad35pF3R4 fue digerido con BglII y Pacl y el inserto de Ad35 fue aislado del gel utilizando el estuche QIAExII (Qiagen). pIPspAdapt3-Ad35ITR fue digerido con BglII y después parcialmente con Pacl. El fragmento de 3624 pb (conteniendo secuencias del vector, la ITR de Ad35 y las secuencias de empaquetamiento así como el promotor de CMV, la región de clonación múltiple y la señal poliA), también fue aislado utilizando el estuche QIAExII (Qiagen). Ambos fragmentos fueron ligados y transformados en células DH10B (LTI). El clon resultante, pAdApt35IP3 (Figura 11), tiene la casete de expresión de pIPspAdapt3 pero contiene la ITR izquierda de Ad35 y las secuencias de empaquetamiento y un segundo fragmento correspondiente a los nucl. 3401 a 4669 de Ad35. Una segunda versión del plásmido adaptador de Ad35 que tenía el sitio de clonación múltiple en la orientación contraria se elaboró como sigue:

PIPspAdapt1 (Figura 9) fue digerido con NdeI y BglII y la banda de 0,7 kpb que contiene parte del promotor de CMV, MCS y poliA de SV40 fue aislada e insertada en los sitios correspondientes de pAdApt35IP3 generando pAdApt35IP1 (Figura 12).

Los plásmidos adaptadores pAdApt35.LacZ y pAdApt35.Luc fueron generados después insertando los transgenes de pcDNA.LacZ (digerido con KpnI y BamHI) y pAdApt.Luc (digerido con HindIII y BamHI) en los sitios correspondientes en pAdApt35IP1. La generación de pcDNA.LacZ y pAdApt.Luc se describe en la Solicitud de Patente Internacional WO99/55132.

2) Construcción del cósmido pWE.Ad35.pXI-rITR

La Figura 13 presenta las diversas etapas acometidas para construir el clon cosmídico que contiene las secuencias de Ad35 de los pb 3401 a 34794 (extremo de la ITR derecha) que se describen con detalle más abajo.

Se generó un primer fragmento de PCR (pIX-NdeI) utilizando el siguiente grupo de cebadores: 35F5: 5'-CGG AAT TCG CGG GCG CCG CGG TGA GTA TTG GGA AAA C-3' y 35R6: 5'-CGC CAG ATC GTC TAC AGA ACA G-3'. Se utilizó la ADN polimerasa Pwo (Roche) según las instrucciones del fabricante, sin embargo, con una concentración final de 0,6 μ M de ambos cebadores y utilizando 50 ng de ADN de Ad35 wt como molde. La amplificación se realizó como sigue: 2 minutos a 94°C, 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 65°C y 1 minuto 45 segundos a 72°C, seguido de 8 minutos a 68°C. Para permitir la clonación en el vector de clonación TA PCR2.1, se realizó una última incubación con 1 unidad de polimerasa superTaq (HT Biotechnology LTD) durante 10 minutos a 72°C.

El fragmento amplificado de 3370 pb contiene las secuencias de Ad35 desde el pb 3401 al 6772 con un sitio NotI añadido en el extremo 5'. Los fragmentos fueron purificados utilizando el estuche de purificación por PCR (LTI).

Se generó un segundo fragmento de PCR (NdeI-rITR) utilizando los siguientes cebadores: 35F7: 5'-GAA TGC TGG CTT CAG TTG TAA TC-3' y 35R8: 5'-CGG AAT TCG CGG CCG CAT TTA AAT CAT CAT CAA TAA TAT ACC-3'. La amplificación se realizó con ADN polimerasa pfx (LTI) según las instrucciones del fabricante pero con 0,6 μ M de ambos cebadores y DMSO al 3% utilizando 10 ng de ADN de wtAd35 como molde. El programa era el siguiente: 3 minutos a 94°C y 5 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 40°C, 2 minutos 45 segundos a 68°C seguido de 25 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C, 2 minutos 45 segundos a 68°C. Para permitir la clonación en el vector de clonación TA PCR2.1, se realizó una última incubación con 1 unidad de polimerasa superTaq durante 10 minutos a 72°C. El fragmento amplificado de 1,6 kb que oscilaba del nucl. 33178 al extremo de la ITR derecha de Ad35, fue purificado utilizando el estuche de purificación por PCR (LTI).

Ambos fragmentos de PCR purificados fueron ligados en el vector PCR2.1 del estuche de clonación TA (Invitrogen) y transformados en células competentes STBL-2 (LTI). Los clones que contenían el inserto esperado fueron secuenciados para confirmar la amplificación correcta. A continuación, ambos fragmentos fueron separados por corte del vector mediante digestión con NotI y NdeI y purificados en gel utilizando el estuche GeneClean (Bio 101, Inc.). El vector cosmídico pWE15 (Clontech) fue digerido con NotI, desfosforilado y también purificado en gel. Estos tres fragmentos fueron ligados y transformados en células competentes STBL2 (LTI). Uno de los clones correctos que contenía ambos fragmentos de la PCR fue digerido después con NdeI y el fragmento lineal fue purificado en gel utilizando el estuche GeneClean. El ADN de Ad35 wt fue digerido con NdeI y el fragmento de 26,6 kb fue purificado en gel LMP utilizando Agarase Enzym (Roche) según las instrucciones del fabricante. Estos fragmentos fueron ligados entre sí y empaquetados utilizando los extractos de empaquetamiento del fago λ (Stratagene) según el protocolo del fabricante. Tras la infección en células STBL-2, las colonias se hicieron crecer sobre placas y se analizaron en cuanto a la presencia del inserto completo. Se seleccionó un clon con el fragmento grande insertado en la orientación correcta y que tenía los patrones de restricción correctos tras las digestiones independientes con tres enzimas (NcoI, PvuII y ScaI). Este clon se denomina pW.Ad35.pIX-rITR. Contiene las secuencias de Ad35 desde el pb 3401 al extremo y está flanqueado por sitios NotI (Figura 14).

3) Generación de virus recombinantes basados en Ad35 sobre PER.C6

El virus Ad35 de tipo salvaje se puede hacer crecer sobre células de empaquetamiento PER.C6 a títulos muy elevados. No obstante, no se sabe si la región E1 de Ad5 que está presente en PER.C6 es capaz de complementar los virus recombinantes de Ad35 con E1 suprimida. Para someter a ensayo esto, las células PER.C6 fueron cotransfectadas con el plásmido adaptador pAdApt35.LacZ descrito antes y el fragmento del esqueleto grande pWE.Ad35.pIX-rITR. Primero, pAdApt35.LacZ fue digerido con PacI y pWE.Ad35.pIX-rITR fue digerido con NotI. Sin purificación adicional se mezclaron 4 μ gr de cada constructo con DMEM (LTI) y se transfectaron en células PER.C6, sembrados a una densidad de 5×10^6 células en un matraz T25 el día antes, utilizando Lipofectamine (LTI) según las instrucciones del fabricante. Como control positivo, se cotransfectaron 6 μ gr de ADN de pWE.Ad35.pIX-rITR digerido con PacI con un fragmento NheI de 6,7 kb aislado de ADN de Ad35 wt que contenía el extremo izquierdo del genoma viral incluyendo la región E1.

Al día siguiente se renovó el medio (DMEM con FBS al 10% y MgCl₂ 10 mM) y las células fueron incubadas

adicionalmente. A los 2 días de la transfección, las células fueron tratadas con tripsina y transferidas a matraces T80. El matraz de control positivo mostraba ECP a los cinco días de la transfección, mostrando que el constructo pWE.Ad35.pIX-rITR es funcional al menos en presencia de proteínas E1 de Ad35. La transfección con el plásmido adaptador LacZ de Ad35 y pWE.Ad35.pIX-rITR no daba lugar a ECP. Estas células fueron cosechadas en el medio el día 10 y congeladas/descongeladas una vez para liberar el virus de las células. Se añadieron 4 ml del material cosechado a un matraz T80 con las células PER.C6 (a una confluencia del 80%) y se incubaron durante otros cinco días. Esta cosecha/reinfección se repitió dos veces pero no hubo evidencia de virus asociado con ECP. A partir de este experimento parece que las proteínas E1 de Ad5 no son, o no son lo bastante, capaces de complementar los virus recombinantes de Ad35, sin embargo, puede ser que el solapamiento de la secuencia del plásmido adaptador y el plásmido esqueleto pWE.Ad35.pIX-rITR no sea lo bastante grande para recombinar eficazmente y dar origen a un genoma de virus recombinante. La transfección de control positiva se realizó con un fragmento del extremo izquierdo de 6,7 kb y por lo tanto el solapamiento de la secuencia era de aproximadamente 3,5 kb. El plásmido adaptador y el fragmento pWE.Ad35.pIX-rITR tienen un solapamiento de la secuencia de 1,3 kb. Para verificar si el solapamiento de la secuencia de 1,3 kb es demasiado pequeño para una recombinación homóloga eficaz, se realizó una cotransfección con pWE.Ad35.pIX-rITR digerido con PaeI y un fragmento de PCR de ADN wt de Ad35 generado con 35F1 y 35R4 mencionados antes utilizando los mismos procedimientos descritos antes en la presente memoria. El fragmento de PCR contiene por tanto las secuencias del extremo izquierdo hasta el pb 4669 y por lo tanto tiene las mismas secuencias solapantes con pWE.Ad35.pIX-rITR que el plásmido adaptador pAdApt35.LacZ pero tiene secuencias E1 de Ad35. Tras la purificación en columna de la PCR, el ADN fue digerido con Sall para separar posibles secuencias molde intactas. Una transfección con el producto de la PCR digerido solo servía como control negativo. Cuatro días después de la transfección, se produjo el ECP en las células transfectadas con el producto de la PCR y el fragmento pIX-rITR de Ad35, y no en el control negativo.

Este resultado muestra que la secuencia solapante de 1,3 kb es suficiente para generar virus en presencia de proteínas E1 de Ad35.

A partir de estos experimentos los autores de la presente invención concluyen que la presencia de al menos una de las proteínas E1 de Ad35 es necesaria para generar vectores basados en Ad35 recombinantes a partir de ADN plasmídico en líneas celulares complementadoras de Ad5.

Ejemplo 8

1) Construcción de plásmidos de expresión Ad35.E1

Puesto que las proteínas E1 de Ad5 en PER.C6 no son capaces de complementar los virus recombinantes de Ad35 eficazmente, las proteínas E1 de Ad35 han de ser expresadas en células complementadoras de Ad5 (v.g. PER.C6). Por otra parte, se tiene que crear una nueva línea celular de empaquetamiento que exprese las proteínas E1 de Ad35, partiendo o bien de células humanas primarias diploides o bien de líneas celulares establecidas que no expresen las proteínas E1 de adenovirus. Para estudiar la primera posibilidad, se clonó la región E1 de Ad35 en plásmidos de expresión como se describe más abajo.

Primero, se amplificó la región E1 de Ad35 desde el pb 468 al pb 3400 a partir de ADN de wtAd35 utilizando el siguiente grupo de cebadores: 35F11: 5'-GGG GTA CCG AAT TCT CGC TAG GGT ATT TAT ACC-3' y 35F10: 5'-GCT CTA GAC CTG CAG GTT AGT CAG TTT CTT CTC CAC TG-3'. Esta PCR introduce un sitio KpnI y EcoRI en el extremo 5' y un sitio SbfI y XbaI en el extremo 3'.

La amplificación en 5 ng de ADN molde se realizó con ADN polimerasa Pwo (Roche) utilizando las instrucciones del fabricante, no obstante, con ambos cebadores a una concentración final de 0,6 μ M. El programa era el siguiente: 2 minutos a 94°C, 5 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 56°C y 2 minutos a 72°C, seguido de 25 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C y 2 minutos a 72°C, seguido de 10 minutos a 72°C. El producto de la PCR fue purificado mediante un estuche de purificación de PCR (LTI) y digerido con KpnI y XbaI. El fragmento de la PCR digerido fue ligado después al vector de expresión pRSVhvbvNeo (véase el más abajo), también digerido con KpnI y XbaI. Las ligaciones fueron transformadas en células STBL-2 competentes (LTI) según las instrucciones del fabricante y las colonias fueron analizadas en cuanto a la correcta inserción de las secuencias E1 de Ad35 en el polilizador entre el promotor de RSV y poliA de HBV.

El clon resultante fue denominado pRSV.Ad35-E1 (Figura 15). Las secuencias de Ad35 en pRSV.Ad35-E1 fueron verificadas mediante análisis de la secuencia.

Se generó pRSVhvbvNeo como sigue: pRc-RSV (Invitrogen) fue digerido con PvuII, desfosforilado con la enzima TSAP (LTI) y el fragmento vector de 3 kb fue aislado en agarosa de bajo punto de fusión (LMP). El plásmido pPGKNeoA (Figura 16) descrito en WO96/35798, fue digerido con SspI completamente para linealizar el plásmido y facilitar la digestión parcial con PvuII. Tras la digestión parcial con PvuII, los fragmentos resultantes fueron separados en un gel de agarosa LMP y el fragmento PvuII de 2245 pb, que contenía el promotor de PGK, el gen de resistencia a la neomicina y poliA de HBV, fue aislado. Ambos fragmentos aislados fueron ligados para dar el vector de expresión pRSV-pNeo que ahora tiene la casete de expresión SV40prom-neo-SV40poliA original remplazada por

una casete PGKprom-neo-HBVpoliA (Figura 17). Este plásmido fue modificado adicionalmente para remplazar BGHpA por HBVpA como sigue: se linealizó pRSVpNeo con Scal y se digirió adicionalmente con XbaI. El fragmento de 1145 pb, que contenía parte del gen Amp y las secuencias promotoras de RSV y una secuencia poliligadora, fue aislado en gel utilizando el estuche GeneClean (Bio Inc. 101). A continuación pRSVpNeo fue linealizado con Scal y adicionalmente digerido con EcoRI parcialmente y el fragmento de 3704 pb que contenía la casete PGKneo y las secuencias del vector fueron aislados en gel como antes. Un tercer fragmento, que contenía la secuencia poliA de HBV flanqueada por XbaI y EcoRI en el extremo 5' y 3' respectivamente, fue generado después mediante amplificación mediante PCR en pRSVpNeo utilizando el siguiente grupo de cebadores: HBV-F: 5'-GGC TCT AGA GAT CCT TCG CGG GAC GTC-3' y HBV-R: 5'-GGC GAA TTC ACT GCC TTC CAC CAA GC-3'. La amplificación se realizó con la enzima Elongase (LTI) según las instrucciones del fabricante con las siguientes condiciones: 30 segundos a 94°C, después 5 ciclos de 45 segundos a 94°C, 1 minuto a 42°C y 1 minuto a 68°C, seguido de 30 ciclos de 45 segundos a 94°C, 1 minuto a 65°C y 1 minuto a 68°C, seguido de 10 minutos a 68°C. El fragmento de la PCR de 625 pb fue purificado después utilizando el estuche de purificación de PCR Qiaquick, digerido con EcoRI y XbaI y purificado en gel utilizando el estuche GeneClean. Los tres fragmentos aislados fueron ligados y transformados en células DH5 α competentes (LTI) para dar el constructo pRSVhbvNeo (Figura 18). En este constructo las regiones reguladoras de la transcripción de la casete de expresión de RSV y el marcador de selección para neomicina se modifican para reducir el solapamiento con los vectores adenovirales que a menudo contienen secuencias reguladoras de la transcripción de CMV y SV40.

2) Generación de virus recombinantes de Ad35 en células PER.C6 cotransfectadas con un constructo de expresión de Ad35-E1

Se sembraron células PER.C6 a una densidad de 5×10^6 células en un matraz T25 y al día siguiente se transfectaron con una mezcla de ADN que contenía:

- 1 μ g pAdApt35.LacZ digerido con PacI
- 5 μ g pRSV.Ad35E1 no digerido
- 2 μ g pWE.Ad35.pIX-rITR digerido con NotI

La transfección se realizó utilizando Lipofectamine según las instrucciones del fabricante. Cinco horas después de la adición de la mezcla de transfección a las células, el medio se separó y se reemplazó por medio de nueva aportación. Al cabo de dos días las células fueron transferidas a matraces T80 y cultivadas adicionalmente. Una semana después de la transfección se añadió 1 ml del medio a células A549 y al día siguiente las células se tiñeron para la expresión de LacZ. Las células de color azul eran claramente visibles dos horas después de la tinción indicando que se habían producido virus que expresaban LacZ recombinantes. Las células fueron cultivadas adicionalmente pero no se observó una clara aparición de ECP. Sin embargo, al cabo de 12 días aparecían grupos de células en la monocapa y 18 días después de la transfección las células se desprendieron. Las células y el medio se cosecharon después, se congelaron-descongelaron una vez y se utilizó 1 ml del producto lisado bruto para infectar células PER.C6 en una placa de 6 pocillos. Dos días después de la infección las células fueron teñidas para la actividad LacZ. Al cabo de dos horas se habían teñido de azul el 15% de las células. Para someter a ensayo la presencia de virus wt y/o de replicación competente, se infectaron células A549 con estos virus y se cultivaron adicionalmente. No se encontraron signos de ECP indicando la ausencia de virus de replicación competente. Estos experimentos muestran que los virus AdApt35.LacZ recombinantes se habían construido en células PER.C6 cotransfectadas con un constructo de expresión Ad35.E1.

3) Los virus recombinantes de Ad35 escapan de la neutralización en suero humano que contiene actividad neutralizadora de virus Ad35

Después se utilizaron los virus AdApt35.LacZ para investigar la infección en presencia de suero que contiene actividad neutralizadora de virus Ad5. El virus LacZ basado en Ad5 purificado servía como control positivo para la AN. A este fin, se sembraron células PER.C6 en una placa de 24 pocillos a una densidad de 2×10^5 células/pocillo. Al día siguiente se diluyó una muestra de suero humano con una elevada actividad neutralizadora de Ad5 en medio de cultivo en cinco etapas de diluciones a la quinta. Después se mezclaron 0,5 ml de suero diluido con 4×10^6 partículas virales de virus AdApt5.LacZ en 0,5 ml de medio y al cabo de 30 minutos de incubación a 37°C, se añadieron 0,5 ml de la mezcla a las células PER.C6 por duplicado. Para los virus AdApt35.LacZ, se mezclaron 0,5 ml de muestras de suero diluido con 0,5 ml del producto lisado bruto conteniendo virus AdApt35.LacZ y tras la incubación se añadieron 0,5 ml de esta mezcla a células PER.C6 por duplicado. Las muestras de virus incubadas en medio sin suero fueron utilizadas como control positivo para la infección. Al cabo de dos horas de infección a 37°C, se añadió medio para alcanzar un volumen final de 1 ml y las células se incubaron adicionalmente. Dos días después de la infección las células fueron teñidas para la actividad LacZ. Los resultados se muestran en la Tabla II. A partir de estos resultados está claro que mientras los virus AdApt5.LacZ eran eficazmente neutralizados, los virus AdApt35.LacZ se mantenían infecciosos con independencia de la presencia de suero humano. Esto demuestra que los virus basados en Ad35 recombinantes escapan a la neutralización en sueros humanos que contienen AN de virus basados en Ad5.

Ejemplo 9Un vector quimérico Ad5/fibra 35 con especificidad del tipo de célula para las células del tallo CD34⁺Lin⁻ hematopoyéticas

En el ejemplo 3 los autores de la presente invención han descrito la generación de un banco de adenovirus basados en Ad5 que albergan la proteína de la fibra de otros serotipos. Como ejemplo no limitante para el uso de este banco los autores de la presente invención describen aquí la identificación de adenovirus con la fibra modificada que muestran una infección mejorada de las células del tallo hematopoyético.

Las células aisladas de médula ósea, sangre del cordón umbilical, o sangre periférica humanas que portan el fenotipo citométrico de flujo de ser positivas para el antígeno CD34 y negativas para los marcadores de diferenciación temprana CD33, CD38 y CD71 (lin⁻) son referidas comúnmente como células del tallo hematopoyético (HSC). La modificación genética de estas células es de gran interés puesto que todos los linajes hematopoyéticos están derivados de estas células y por lo tanto la HSC es una célula diana para el tratamiento de muchas alteraciones hematopoyéticas humanas adquiridas o congénitas. Entre los ejemplos de las enfermedades que son corregibles por modificación genética de HSC se incluyen, pero no están limitados a, enfermedad de Hurlers, enfermedad de Hunters, enfermedad de Sanfilippos, enfermedad de Morquios, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Farbers, enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad de Krabe, Leucodistrofia Metacromática, enfermedad de las células I, síndrome de inmunodeficiencia grave, deficiencia de Jak-3, deficiencia de Fucosidosis, talasemia, y porfiria eritropoyética. Además de estas alteraciones hematopoyéticas también las estrategias para prevenir o tratar el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y los cánceres hematopoyéticos están basadas en la modificación genética de HSC o de células derivadas de HSC tales como los linfocitos CD4 positivos en el caso del SIDA. Los ejemplos enumerados en la presente memoria pretenden de este modo introducir ADN en la HSC con el fin de complementar a nivel genético una deficiencia de un gen o una proteína. En el caso de las estrategias para el SIDA o el cáncer, el ADN que se va a introducir en las HSC puede ser de genes anti-virales o de genes suicidas.

Además de los ejemplos enumerados en la presente memoria, existen otras numerosas áreas en las cuales la transducción eficaz de HSC utilizando vectores adenovirales puede jugar un importante papel. Por ejemplo en el caso de las aplicaciones para tejidos. En esta área es importante dirigir la diferenciación de HSC a linajes específicos. Algunos ejemplos, no limitantes, son la formación de hueso, la formación de cartilago, la formación de piel *ex vivo*, así como la generación de precursores de las células T o precursores de las células endoteliales. La generación de hueso, cartilago o piel en biorreactores puede ser utilizada para el trasplante tras fracturas óseas o lesiones de la médula espinal o lesiones por quemaduras graves. Naturalmente, las células transducidas también pueden ser re-infundidas directamente en el paciente. La formación de un gran número de precursores de células endoteliales a partir de HSC tiene interés puesto que las células endoteliales pueden regresar, tras la re-infusión, a sitios de lesión cardiovascular tales como la isquemia. Del mismo modo, la formación de un gran número de células T a partir de HSC tiene interés puesto que estos precursores de las células T pueden ser cebados, *ex vivo*, para erradicar ciertas dianas en el cuerpo humano tras la reinfusión de las células T cebadas. Las dianas preferidas en el cuerpo humano pueden ser tumores o células infectadas con virus.

A partir de los ejemplos descritos en la presente memoria, se puede concluir que la liberación génica eficaz para HSC tiene un gran interés para el campo de la terapia génica. Por lo tanto, la alteración de la gama de células anfitrionas de Ad5 para que sea capaz de dirigirse a HSC *in vitro* así como *in vivo* es el principal interés de la invención. Para identificar un adenovirus quimérico con unas características preferidas de infección de HSC humanas, los autores de la presente invención generaron un banco de virus basados en Ad5 que portaban la molécula de la fibra de serotipos adenovirales alternativos (serotipos 8, 9, 13, 16, 17, 32, 35, 45, 40-L, 51). La generación de este banco con la fibra modificada se describe en el ejemplo 3. Se tomó Ad5 como referencia. Se sometió a ensayo un pequeño panel de este banco en TF-1 humano (leucemia eritroide, ATCC CRL-2003) mientras todos los virus quiméricos generados fueron sometidos a ensayo en células estromáticas primarias humanas y HSC humanas. Las células TF-1 humanas fueron mantenidas rutinariamente en DMEM con un suplemento de FCS al 10% y 50 ng/ml de IL-3 (Sandoz, Basel, Suiza). El estroma de tipo fibroblástico primario humano, aislado aspirando médula ósea, se mantiene rutinariamente en DMEM/FCS al 10%. El estroma fue sembrado a una concentración de 1×10^5 células por pocillo de placas de 24 pocillos. Veinticuatro horas después de la siembra las células fueron expuestas durante 2 horas a 1000 partículas de virus por célula de Ad5, Ad5.Fib16, Ad5.Fib17, Ad5.Fib35, Ad5.Fib40-L, o Ad5.Fib51 portando todos GFP como marcador. Al cabo de 2 horas las células fueron lavadas con PBS y sembradas de nuevo en medio sin la adición de virus. Las células TF-1 fueron sembradas a una concentración de 2×10^5 células por pocillo de placas de 24 pocillos y también fueron expuestas durante 2 horas a 1000 partículas de virus de los diferentes adenovirus quiméricos. El virus fue eliminado lavando las células después de 2 horas de exposición. Ambos tipos de células fueron cosechados 48 horas después de la exposición al virus y analizados en cuanto a la expresión de GFP utilizando un citómetro de flujo. Los resultados en las células TF-1, mostrados en la figura 19, demuestran que los adenovirus quiméricos que portan una fibra de los serotipos 16, 35, o 51 (todos derivados del subgrupo B de adenovirus) tienen unas características de infección preferidas en comparación con Ad5 (subgrupo C), Ad5.Fib17 (subgrupo D), o Ad5.Fib40-L (subgrupo F). Se sometió a ensayo estroma primario humano puesto que estas células son utilizadas comúnmente como células "alimentadoras" para permitir la proliferación y el mantenimiento de HSC en condiciones de cultivo *ex vivo*. En contraste con la

transducción de las células TF-1, ninguno de los adenovirus de fibra quimérica era capaz de transducir eficazmente estroma primario humano (Figura 20). Se observó una infección razonable de estroma primario de tipo fibroblástico humano sólo con Ad5 a pesar de la observación de que ninguna de las moléculas receptoras conocidas son expresadas en estas células (véase el la tabla III). La ausencia de infección de estroma humano utilizando los virus quiméricos es ventajosa puesto que en un entorno de cultivo simultáneo, el adenovirus quimérico no será absorbido principalmente por las células "alimentadoras" estromáticas.

Para someter a ensayo la capacidad de transducción de los virus de fibra quimérica, se utilizó una reserva de sangre de cordón umbilical (3 individuos) para el aislamiento de células del tallo. Las células CD34⁺ fueron aisladas de una preparación de células mononucleares utilizando el sistema de separación de laboratorio MACS (Miltenyi Biotec) utilizando el protocolo proporcionado por el fabricante. De las células CD34⁺, 2 x 10⁵ se sembraron en un volumen de 150 µl de DMEM (sin suero; Gibco, Gaithersburg, MD) y se añadieron 10 µl de adenovirus quimérico (para dar una proporción final de partículas de virus/célula de 1000). Los adenovirus quiméricos sometidos a ensayo eran Ad5, Ad5.Fib16, Ad5.Fib35, Ad5.Fib17, Ad5.Fb51 conteniendo todos GFP como marcador. Las células fueron incubadas durante 2 horas en una atmósfera humidificada de CO₂ al 10% a 37°C. Después de eso, las células fueron lavadas una vez con 500 µl de DMEM y resuspendidas en 500 µl de medio StemPro-34 SF (Life Technologies, Grand Island, NY).

Las células fueron cultivadas después durante 5 días en placas de 24 pocillos (Greiner, Frickenhausen, Alemania) en estroma de médula ósea humana pre-establecido (ref 1) irradiado (20 Gy), en una atmósfera humidificada de CO₂ al 10% a 37°C. Al cabo de 5 días, se recogió la población celular completa mediante tripsinización con 100 µl de Tripsina-EDTA al 0,25% (Gibco). El número de células antes y después de 5 días de cultivo fue determinado utilizando un hematocitómetro. Se calculó el número de células CD34⁺ y CD34⁺CD33,38,71⁻ en cada muestra a partir del número total de células recuperadas y la frecuencia de las células CD34⁺CD33,38,71⁻ en la población total como se determina mediante análisis FACS. La eficacia de transducción fue determinada mediante análisis FACS mientras se controlaba en las distintas subpoblaciones la frecuencia de células que expresaban GFP así como la intensidad de GFP por célula individual. Los resultados de este experimento, mostrados en la figura 21, demuestran que el Ad5 o el adenovirus quimérico Ad5.Fib17 no infecta las células CD34⁺Lin⁻ como quedaba demostrado por la ausencia de expresión de GFP. En contraste, con los virus quiméricos que portaban la molécula de fibra de los serotipos 16, 51, o 35 se obtenían elevados porcentajes de células GFP positivas en esta población de células. Se demuestra la especificidad para CD34⁺Lin⁻ puesto que se observa una escasa expresión de GFP en las células CD34⁺ que también expresan CD33, CD38 y CD71. El subfraccionamiento de las células CD34⁺Lin⁻ (Figura 22) mostraba que el porcentaje de células positivas para GFP disminuía utilizando Ad5.Fib16, Ad5.Fib35, o Ad5.Fib51 cuando las células se volvían más y más positivas para los marcadores de diferenciación temprana CD33 (mieloide), CD71 (eritroide), y CD38 (marcador de diferenciación temprana común). Estos resultados demuestran por tanto la especificidad de los adenovirus quiméricos Ad5.Fib16, Ad5.Fib35, y Ad5.Fib51 para HSC.

En la figura 23 se muestra el alineamiento de la fibra de Ad5 con las proteínas de la fibra del grupo B quiméricas derivadas de Ad16, 35 y 51. Determinando el número de células recuperadas tras el procedimiento de transducción se puede determinar la toxicidad de los adenovirus. La recuperación de la cantidad de células CD34⁺ así como la cantidad de CD34⁺Lin⁻ (Figura 24) demuestra que una exposición de 2 horas a 1000 partículas de adenovirus no tenía efecto sobre el número de células recuperadas.

Ejemplo 10

Un vector quimérico Ad5/fibra 35 con especificidad del tipo de célula para las células Dendríticas

Las células dendríticas son células presentadoras de antígenos (APC), especializadas en iniciar una respuesta inmunitaria primaria y capaces de reforzar el tipo de memoria de la respuesta inmunitaria. Dependiendo de su estado de desarrollo, las DC despliegan diferentes funciones: las DC inmaduras son muy eficaces en la captación y el procesamiento de antígenos para la presentación por las moléculas de clase I y clase II del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC), mientras las DC maduras, que son menos eficaces en la captura y el procesamiento de antígenos, funcionan mucho mejor al estimular las células T CD4⁺ y CD8⁺ sin activación previa "naïve" y de memoria, debido a la elevada expresión de las moléculas del MHC y las moléculas co-estimuladoras de su superficie celular. Las DC inmaduras maduran *in vivo* tras la captación de antígenos, viajan a las áreas de las células T del los órganos linfoides, y ceban la activación de las células T.

Puesto que las DC son las células responsables del desencadenamiento de una respuesta inmunitaria ha habido un interés desde hace mucho tiempo en cargar las DC con proteínas inmunoestimuladoras, péptidos o genes que codifiquen estas proteínas para disparar el sistema inmunitario. Las aplicaciones de esta estrategia se encuentran en el campo del tratamiento del cáncer así como en el campo de la vacunación. Hasta aquí, las estrategias anticancerosas han estado enfocadas principalmente a una carga *ex vivo* de las DC con antígenos (proteínas o péptidos). Estos estudios han revelado que este procedimiento daba como resultado la inducción de la actividad de las células T citotóxicas. Los antígenos utilizados para cargar las células son identificados generalmente por ser específicos de los tumores. Algunos ejemplos, no limitantes, de tales antígenos son GP100, MAGE, o Mart-1 para el melanoma.

Además del tratamiento del cáncer se están evitando en la actualidad otras muchas enfermedades humanas potenciales a través de la vacunación. En la estrategia de vacunación, se presenta al sistema inmunitario un patógeno "invalidado" por medio de la acción de las células presentadoras de antígenos, es decir las DC inmaduras. Entre los ejemplos bien conocidos de prevención de enfermedades por medio de estrategias de vacunación se incluyen la Hepatitis A, B, C, la influenza, la rabia, la fiebre amarilla, el sarampión. Además de estos programas de vacunación bien conocidos, se están desarrollando programas de investigación para el tratamiento de la malaria, el ébola, la ceguera de los ríos, el VIH y otras muchas enfermedades. Muchos de los patógenos mencionados antes son considerados peligrosos para la generación de una vacuna de patógenos "invalidados". Esta última se llama así por el aislamiento y la caracterización de proteínas de cada patógeno que son capaces de armar una respuesta inmunitaria madura que produce una protección completa tras la sensibilización con el patógeno de tipo salvaje.

Para que esta estrategia de cargar las DC con proteínas o péptidos inmunoestimuladores se vuelva factible terapéuticamente se deben satisfacer al menos dos criterios distintos. 1) el aislamiento de un gran número de DC que puedan ser aisladas, manipuladas, y re-infundidas en un paciente, haciendo autólogo el procedimiento. Hasta la fecha, es posible obtener tales grandes cantidades de DC inmaduras a partir de monocitos de sangre periférica cultivados de cualquier donador dado. 2) un vector que pueda transducir las DC eficazmente de manera que se pueda liberar el ADN que codifica la proteína inmunoestimuladora. Lo último es extremadamente importante puesto que ha quedado claro que el tiempo requerido para que las DC viajen a los órganos linfoides es tal que la mayoría de las proteínas o péptidos ya se han liberado de las DC produciendo un cebado inmunitario incompleto. Debido a que las DC son células diferenciadas terminalmente y por tanto no están en división, se están considerando los vectores adenovirales recombinantes para liberar el ADN que codifica los antígenos para las DC. Idealmente este adenovirus debe tener una elevada afinidad por las células dendríticas pero además no debe ser reconocido por los anticuerpos neutralizadores del anfitrión de manera que se pueda completar la transducción *in vivo* de las DC. Esto último podría omitir la necesidad de manipulaciones *ex vivo* de las DC pero daría como resultado un procedimiento médico idéntico a los programas de vacunación que están teniendo lugar en la actualidad, es decir predominantemente inyección intramuscular o subcutánea. De este modo, las DC transducidas por los vectores adenovirales que codifican una proteína inmunogénica pueden ser ajustados idealmente para que sirvan como coadyuvantes naturales para la inmunoterapia y la vacunación.

A partir de los ejemplos descritos antes, se puede concluir que la liberación génica eficaz en las DC tiene un gran interés para el campo de la terapia génica. Por lo tanto, la alteración de la gama de célula anfitriona del adenovirus de serotipo 5 para que sea capaz de dirigirse a las DC *in vitro* así como *in vivo* tiene un interés fundamental para la invención. Para identificar un adenovirus quimérico con las características de infección preferidas para las DC humanas, los autores de la presente invención generaron un banco de virus basados en Ad5 que portaban una molécula de fibra de serotipos alternativos (serotipos 8, 9, 13, 16, 17, 32, 35, 45, 40-L, 51). Se tomó Ad5 como referencia.

Los autores de la presente invención evaluaron la susceptibilidad de los monocitos humanos derivados de DC inmaduras y maduras a los adenovirus quiméricos recombinantes que expresan diferentes fibras.

Se aislaron PBMC humanos de donadores sanos por medio de centrifugación por densidad en Ficoll-Hypaque. Los monocitos fueron aislados de PBMC mediante enriquecimiento en células CD14⁺ utilizando la tinción con anticuerpo monoclonal anti-CD14 humano marcado con FITC (Becton Dickinson), y columnas de separación de microcuentas FITC y MACS (Miltenyi Biotec.)

Este procedimiento produce normalmente una población de células que son CD14⁺ < 90% como se analizaba mediante FACS. Las células fueron colocadas en cultivo utilizando medio RPMI-1640 (Gibco) conteniendo Suero Bovino Fetal ("FBS") al 10% (Gibco), 200 ng/ml de GM-CSF rhu (R&D/ITK diagnostics), 100 ng/ml de IL-4 rhu (R&D/ITK diagnostics) y cultivadas durante 7 días alimentando los cultivos con medio de nueva aportación conteniendo citocinas en días alternos. Las DC inmaduras resultantes de este procedimiento al cabo de 7 días expresan un fenotipo CD83⁻, CD14^{bajo} o CD14⁻, HLA-CR⁺, como se demostraba mediante análisis FACS. Las DC inmaduras maduran cultivando las células en medio que contenía 100 ng/ml de TNF- α durante 3 días, después de lo cual expresaban CD83 en su superficie celular.

En un experimento piloto se sembraron 5.10⁵ DC inmaduras en pocillos de placas de 24 pocillos y se expusieron durante 24 horas a 100 y 1000 partículas de virus por célula de cada virus de fibra recombinante. El virus sometido a ensayo era Ad5, y los virus de fibra quimérica basados en Ad5: Ad5.Fib12, Ad5.Fib16, Ad5.Fib28, Ad5.Fib32, Ad5.Fib40-L (fibra larga del serotipo 40), Ad5.Fib49, y Ad5.Fib51 (donde Fibxx representa el serotipo del cual deriva la fibra). Estos virus derivan del subgrupo C, A, B, D, D, F, D, y B respectivamente. Al cabo de 24 horas las células fueron lisadas (Triton X-100/PBS al 1%) y la actividad luciferasa fue determinada utilizando el protocolo suministrado por el fabricante (Promega, Madison, WI, USA). Los resultados de este experimento, mostrados en la figura 25, demuestran que Ad5 infecta escasamente las DC inmaduras como quedaba demostrado por el bajo nivel de expresión transgénica. En contraste, Ad5.Fib16 y Ad5.Fib51 (ambos virus de fibra quimérica del grupo B) y también Ad5.Fib40-L (Subgrupo F) muestran una infección eficaz de las DC inmaduras basándose en la expresión transgénica de la luciferasa.

En un segundo experimento, se infectaron $5 \cdot 10^5$ DC inmaduras y maduras con 10.000 partículas de virus por célula de Ad5, Ad5.Fib16, Ad5.Fib40-L, y Ad5.Fib51 portando todas el gen LacZ como marcador. La expresión de LacZ fue controlada mediante análisis de citometría de flujo utilizando un sistema de estuches CM-FDG y las instrucciones suministradas por el fabricante (Molecular Probes, Leiden, Países Bajos). Los resultados de este experimento, mostrados en la figura 26, se corresponden con el experimento anterior ya que Ad5.Fib16 y Ad5.Fib51 son superiores a Ad5 transduciendo las DC humanas maduras e inmaduras. Asimismo, este experimento muestra que Ad5.Fib40-L no es tan bueno como Ad5.Fib16 y Ad5.Fib51 pero es mejor que Ad5.

Basándose en estos resultados los autores de la presente invención sometieron a ensayo otros adenovirus quiméricos que contenían fibras de virus del grupo B, por ejemplo, Ad5.Fib11 y Ad5.Fib35 en cuanto a su capacidad para infectar las DC. Los autores de la presente invención se concentraron en las DC inmaduras puesto que estas son las células que transforman un producto transgénico expresado en péptidos presentables de la clase I y II del MHC. Las DC inmaduras fueron sembradas a una densidad celular de $5 \cdot 10^5$ células/pocillo en placas de 24 pocillos (Costar) e infectadas con 1000 y 5000 partículas de virus por célula después de lo cual las células fueron cultivadas durante 48 horas en condiciones para DC inmaduras antes de las mediciones de la lisis celular y la actividad Luciferasa. El resultado de este experimento, mostrado en la figura 27, demuestra que los adenovirus quiméricos basados en Ad5 que contienen fibras de virus del grupo B infectan eficazmente las DC inmaduras. En un cuarto experimento los autores de la presente invención infectaron de nuevo DC inmaduras de una manera idéntica a la descrita en los primeros experimentos pero esta vez se utilizaron Ad5, Ad5.Fib16, y Ad5.Fib35 que portaban GFP como gen marcador. Los resultados de la expresión de GFP medida con el citómetro de flujo 48 horas después de la exposición del virus se muestran en la figura 28 y se corresponden con los datos obtenidos hasta ahora.

Así, los resultados hasta aquí coinciden en que los vectores basados en Ad5 que portan una fibra de un adenovirus alternativo derivado del subgrupo B predominantemente la fibra de 35, 51, 16, y 11 son superiores a Ad5 transduciendo las DC humanas.

Los adenovirus descritos aquí también son muy adecuados en la vacunación de animales. Para ilustrar esto, los autores de la presente invención sometieron a ensayo DC derivadas de ratón y chimpancé para identificar si estos virus pueden ser utilizados en estos modelos animales. Esto último en particular ya que el receptor de adenovirus humano derivado del subgrupo B es desconocido hasta la fecha y por lo tanto no se sabe si esta proteína está conservada entre especies. Para ambas especies se sembraron DC inmaduras a una densidad de 10^5 células por pocillo de placas de 24 pocillos. Las células fueron expuestas con posterioridad durante 48 horas a 1000 partículas de virus por célula de Ad5, Ad5.Fib16, y Ad5.Fib51 en el caso de DC de ratón y Ad5, Ad5.Fib35 en el caso de DC de chimpancé (véase la figura 29). El experimento con ratón se realizó con virus que portaban luciferasa como marcador y mostraban una actividad luciferasa incrementada aproximadamente 10-50 veces en comparación con Ad5. Las DC de chimpancé fueron infectadas con los virus GFP y fueron analizadas utilizando un citómetro de flujo. Estos resultados, también mostrados en la figura 29, demuestran que Ad5 (3%) transduce las DC de chimpancé muy escasamente en comparación con Ad5.Fib35 (66,5%).

Ejemplo 11

Construcción de un sistema vector basado en plásmidos para generar virus recombinantes basados en Ad11

Los resultados de los experimentos de neutralización descritos en el Ejemplo 5 muestran que Ad11, como Ad35, tampoco era neutralizado en la inmensa mayoría de las muestras de suero humano.

Por lo tanto, se prefieren los adenovirus recombinantes basados en Ad11 con respecto a los vectores basados normalmente en vectores Ad2 y Ad5 como vectores para tratamiento con terapia genética y vacunación. Tanto Ad35 como Ad11 son virus del grupo B y se clasifican como virus pertenecientes a la agrupación 2 de homología del ADN (Wadell, 1984). Por lo tanto, los genomas de Ad35 y Ad11 son muy similares. Para generar un sistema basado en plásmidos para la producción de virus recombinantes basados en Ad11 el plásmido adaptador pAdApt35IP1 generado en el Ejemplo 7 es modificado como sigue. El constructo pAdApt35IP1 es digerido con AvrII y después parcialmente con PacI. La mezcla de digestión es separada en gel y el fragmento de 4,4 kb que contiene la casete de expresión y el esqueleto del vector es aislado utilizando el estuche de GeneClean (BIO 101, Inc.). Después, se realiza una amplificación mediante PCR en ADN de wtAd11 utilizando los cebadores 35F1 y 35R2 (véase el Ejemplo 7) utilizando ADN polimerasa Pwo según las instrucciones del fabricante. El fragmento de PCR obtenido de 0,5 kb es purificado utilizando el estuche de purificación de PCR (LTI) y ligado al fragmento separado antes de pAdApt35IP1. Esto da el constructo pAdApt11-35IP1 en el cual el fragmento 5' del adenovirus es intercambiado por la correspondiente secuencia de Ad11. A continuación, pAdApt11-35IP1 es digerido con BgIII y parcialmente con PacI. Los fragmentos obtenidos son separados en gel y el fragmento de 3,6 kb que contiene las secuencias vectoras, el fragmento 5' de adenovirus y la casete de expresión es purificado en gel como antes. A continuación, se genera un fragmento de PCR utilizando los cebadores 35F3 y 35R4 (véase el Ejemplo 7) en ADN de wtAd11.

La amplificación se realiza como antes y el fragmento de 1,3 kb obtenido se purifica y digiere con BgIII y PacI. Los fragmentos aislados son ligados después para dar el constructo pAdApt11IP1. Este plásmido adaptador contiene

ahora las secuencias de Ad11 en lugar de las secuencias de Ad35. La correcta amplificación de las secuencias de Ad11 amplificadas mediante PCR es verificada mediante comparación de la secuencia de este clon con la correspondiente secuencia del ADN de Ad11. El último es obtenido mediante secuenciación directa del ADN de Ad11 utilizando los cebadores de PCR indicados. El clon cosmídico grande que contiene el esqueleto de Ad11 es generado como sigue: Primero, se amplifica un fragmento de PCR sobre el ADN de Ad11 utilizando los cebadores 35F5 y 35R6 con ADN polimerasa Pwo como se describe en el Ejemplo 7 para el ADN de Ad35. El fragmento de la PCR es purificado después utilizando el estuche de purificación de PCR (LTI) y digerido con NotI y NdeI. El fragmento de 3,1 kb resultante es aislado en gel utilizando el estuche GeneClean BIO 101, Inc.). Después se genera un segundo fragmento de PCR en ADN de Ad11 utilizando los cebadores 35F7 y 35R8 (véase el Ejemplo 7) con ADN polimerasa Pwo según las instrucciones del fabricante y se purifica utilizando el estuche de purificación de PCR (LTI). Este fragmento amplificado también es digerido con NdeI y NotI y el fragmento de 1,6 kb resultante es purificado en gel como antes.

Los dos fragmentos de PCR digeridos son ligados después con el vector cosmídico pWE15, previamente digerido con NotI y desfosforilado utilizando la enzima Tsap (LTI) según las instrucciones del fabricante. Se selecciona un clon que tiene insertada una copia de ambos fragmentos. Los clones correctos se seleccionan mediante digestión analítica con NotI que da un fragmento de 4,7 kb. Se obtiene confirmación mediante una reacción PCR utilizando los cebadores 35F5 y 35R8 que da un fragmento del mismo tamaño. Después el clon correcto es linealizado con NdeI y aislado en gel. A continuación, se digiere ADN de wtAd11 con NdeI y el fragmento grande de 27 kb se aísla en gel de agarosa de bajo punto de fusión utilizando la enzima agarasa (Roche) según las instrucciones del fabricante. Ambos fragmentos son ligados después y empaquetados utilizando extractos de empaquetamiento del fago λ (Stratagene) según el protocolo del fabricante. Tras la infección en células STBL-2 (LTI) las colonias se hacen crecer sobre placas y se analizan en cuanto a la presencia del inserto completo. La funcionalidad de los clones seleccionados es sometida a ensayo después mediante cotransfección en células PER.C6. A este fin, el ADN es digerido con NotI y 6 μ g son co-transfectados con 2 μ g de un fragmento de PCR generado en ADN de Ad11 con los cebadores 35F1 y 35R4 (véase el ejemplo 7). Los clones correctos producen ECP en la semana siguiente a la transfección. El clon correcto es denominado pWE.Ad11.pIX-rITR.

Utilizando el procedimiento descrito antes, se genera un sistema a base de plásmidos que consta de un plásmido adaptador adecuado para la inserción de genes foráneos y un fragmento coadyuvante grande que contiene el esqueleto viral. Los virus basados en Ad11 recombinante se elaboran utilizando los métodos descritos aquí para los virus recombinantes basados en Ad35.

Ejemplo 12

Neutralización de adenovirus en muestras derivadas de pacientes

En los experimentos de neutralización descritos en los Ejemplo 1 y 5, todas las muestras derivaron de voluntarios sanos. Puesto que una de las aplicaciones de los vectores no neutralizados se encuentra en el campo de la terapia génica, es interesante investigar si Ad35 también es neutralizado con una baja frecuencia y con títulos bajos en grupos de pacientes que son candidatos para el tratamiento con terapia génica.

- Pacientes con enfermedades cardiovasculares

Se obtuvieron 26 muestras de suero y fluido pericárdico (PF) emparejadas de pacientes con insuficiencia cardíaca. Estas fueron sometidas a ensayo frente a Ad5 y Ad35 utilizando el análisis de neutralización descrito en el Ejemplo 1. Los resultados confirmaron los datos previos con muestras de voluntarios sanos. El 70% de las muestras de suero contenía AN para Ad5 y el 4% para Ad35. En las muestras de fluido pericárdico los títulos eran inferiores dando como resultado un total del 40% con AN para Ad5 y ninguno para Ad35. Había una buena correlación entre AN y PF en suero es decir no había muestras PF positivas sin AN en la muestra de suero emparejada. Estos resultados muestran que se prefieren los vectores no neutralizados basados en Ad35 sobre los vectores de Ad5 para el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares. Como se verifica para todas las formas de vectores no neutralizados en esta aplicación, el vector puede estar basado en el genoma del serotipo no neutralizado o puede estar basado en Ad5 (u otro serotipo) aunque muestre al menos las principales proteínas de la cápsida (hexónicas, pentónicas y opcionalmente fibra) del serotipo no neutralizado.

- Pacientes de Artritis Reumatoide

El determinante molecular subyacente de la artritis todavía no es conocido pero se sabe que tanto la disfunción de las células T como la producción desequilibrada de factor de crecimiento en las articulaciones ocasionan inflamación e hiperplasia del tejido sinovial. Los sinoviocitos comienzan a proliferar e invadir el cartilago y el hueso lo que conduce a la destrucción de estos tejidos. El tratamiento actual comienza (cuando es en la fase temprana) con la administración de fármacos anti-inflamatorios (anti-TNF, II1-RA, IL-10) y/o fármacos convencionales (v.g. MTX, sulfasalazina). En la RA en fase tardía se realiza la sinovectomía que se basa en la cirugía, radiación, o intervención química. Una alternativa u opción adicional es el tratamiento por medio de terapia génica en la que un vector adenoviral es liberado directamente en las articulaciones de los pacientes y expresa un fármaco anti-inflamatorio o

un gen suicida. Los estudios previos realizados en monos rhesus que padecían artritis inducida por colágeno han demostrado que los vectores basados en Ad5 que portan un gen marcador pueden transducir los sinoviocitos. No se sabe si en la situación humana la liberación adenoviral está impedida por la presencia de AN. Para investigar la presencia de AN en fluido sinovial (SF) de pacientes con RA, se obtuvieron muestras de SF de un panel de 53 pacientes seleccionados al azar que padecían artritis reumatoide (RA).

Estos fueron sometidos a ensayo frente a numerosos adenovirus wt utilizando el análisis de neutralización descrito en el Ejemplo 1. Los resultados de este escrutinio se presentan en la Tabla III. Se encontró que el adenovirus de tipo 5 era neutralizado en el 72% de las muestras de SF. La mayor parte de estas muestras contienen títulos elevados de AN como también la dilución más elevada de la muestra de SF que se había sometido a ensayo (64x) neutralizaba los virus Ad5. Esto significa que la liberación del vector adenoviral en los sinoviocitos de las articulaciones de los pacientes con RA será muy ineficaz. Por otra parte, puesto que los títulos en SF son tan elevados es dudoso que el lavado de las articulaciones antes de la inyección del vector elimine suficiente AN. De los otros serotipos que se sometieron a ensayo se demostró que Ad35 era neutralizado sólo en el 4% de las muestras. Por lo tanto, estos datos confirman los resultados obtenidos en las muestras de suero de pacientes sanos y muestran que para el tratamiento de la artritis reumatoide los vectores basados en Ad35 o los vectores quiméricos que despliegan al menos alguna de las proteínas de la cápsida de Ad24 son los vectores preferidos.

Ejemplo 13

Modificaciones en el esqueleto de virus basados en Ad35

1) Generación de pBr/Ad35.Pac-rITR y pBr/Ad35.PRn

En el Ejemplo 4 se describe la generación del subclon de Ad35 pBr/Ad35.Eco13.3. Este clon contiene secuencias de Ad35 desde el pb 21943 al extremo de la ITR derecha clonadas en los sitios EcoRI y EcoRV de pBr322. Para ampliar estas secuencias al sitio PacI localizado en el pb 18137 de Ad35, pBr/Ad35.Eco13.3 (véase el Ejemplo 4) fue digerido con AatII y SnaBI y el fragmento que contenía el vector grande fue aislado en gel utilizando el estuche de extracción en gel QIAEX II (Qiagen). El ADN de Ad35 wt fue digerido con PacI y SnaBI y el fragmento de 4,6 kb fue aislado como antes. Este fragmento fue ligado después a un conector de doble hebra (dh) que contiene un saliente PacI y AatII. Este conector fue obtenido tras recocer los siguientes oligonucleótidos:

A-P1: 5'-CTG GTG GTT AAT-3' y A-P2: 5'-TAA CCA CCA GAC GT-3'

La mezcla de ligación que contenía el ligador de doble hebra y el fragmento PacI-SnaBI de Ad35 fue separado del conector no ligado en un gel LMP. La banda de 4,6 kb fue separada mediante corte del gel, fundida a 65°C, y después ligada al fragmento vector pBr/Ad35.Eco13.3 purificado digerido con AatII y SnaBI. Las ligaciones fueron transformadas en células DH10B electrocompetentes (Life Technologies Inc.). El clon resultante, pBr/Ad35.Pac-rITR, contenía secuencias de Ad35 desde el sitio PacI en el pb 18137 hasta la ITR derecha.

A continuación, se introdujo el único sitio de restricción en el extremo 3' de la ITR derecha para poder liberar la ITR de las secuencias del vector. A este fin, se utilizó un fragmento de PCR que cubre las secuencias de Ad35 desde el sitio NdeI en el pb 33165 a la ITR derecha que tenía los sitios de restricción SwaI, NotI y EcoRI anclados a la rITR. El fragmento de la PCR fue generado utilizando los cebadores 35F7 y 35R8 (descritos en el Ejemplo 7). Tras la purificación, el fragmento de la PCR fue clonado en el vector de clonación AT (Invitrogen) y secuenciado para verificar la amplificación correcta. El clon amplificado correcto se digirió después con EcoRI, sus extremos se hicieron romos con la enzima de Klenow y con posterioridad se digirió con NdeI y se aisló el fragmento de la PCR. Paralelamente, el NdeI del vector pBr de pBr/Ad35.Pac-rITR fue separado como sigue: se separó un vector pBr322 del cual se había separado el sitio NdeI por digestión con NdeI, tratamiento de Klenow y religación, se digirió con AatII y NheI. El fragmento vector fue aislado en gel LMP y ligado al fragmento AatII-NheI de Ad35 de 16,7 kb de pBr/Ad35.Pac-rITR que también se había aislado en gel LMP. Esto generó pBr/Ad35.Pac-rITR.ΔNdeI. A continuación pBr/Ad35.Pac-rITR.ΔNdeI fue digerido con NheI, los extremos fueron rellenados utilizando la enzima de Klenow y el ADN fue digerido después con NdeI. El fragmento grande que contenía el vector y las secuencias de Ad35 fue aislado. La ligación de este fragmento vector y el fragmento de la PCR dio como resultado pBr/Ad35.PRn. En este clon las secuencias específicas que codifican la fibra, E2A, E3, E4 o la hexona pueden ser manipuladas. Además, las secuencias promotoras que dirigen por ejemplo las proteínas E4 o E2 pueden ser mutadas o suprimidas e intercambiadas por promotores heterólogos.

2) Generación de virus basados en Ad35 con proteínas de la fibra de diferentes serotipos.

Los adenovirus infectan las células humanas con diferentes eficacias. La infección se completa mediante un procedimiento de dos etapas que implica tanto las proteínas de la fibra que median la unión del virus a los receptores específicos de las células, como las proteínas pentónicas que median la internalización mediante la interacción por ejemplo de la secuencia RGD con las integrinas presentes en la superficie celular. Para los virus del subgrupo B, del cual Ad35 es miembro, no se conoce el receptor celular para la proteína de la fibra. Existen diferencias sorprendentes en la eficacia de infección de las células humanas de los virus del subgrupo B en

comparación con los virus del subgrupo C como Ad5 (véase WO 00/03029 y EP 99200624.7). Incluso dentro de un subgrupo las eficacias de infección de ciertas células humanas pueden diferir entre los diversos serotipos. Por ejemplo, la fibra de Ad16, cuando está presente en un virus recombinante basado en Ad5 infecta principalmente las células endoteliales, las células de la musculatura lisa y los sinoviocitos de origen humano y de mono rhesus mejor que los virus quiméricos de Ad5 que portan la fibra de Ad35 o Ad51. De este modo, para obtener elevadas eficacias de infección de virus basados en Ad35, puede ser necesario cambiar la proteína de la fibra por una proteína de la fibra de un serotipo diferente. La tecnología para semejantes quimeras de fibras se describe para los virus basados en Ad5 en el Ejemplo 3, y se ejemplifica más abajo para los virus Ad35.

Primero, la mayor parte de las secuencias de la fibra son suprimidas del esqueleto de Ad35 en el constructo pBr/Ad35.PRn como sigue: Las secuencias limítrofes izquierdas y parte de la proteína de la fibra de Ad35 que oscilan entre el pb 30225 aguas arriba del único sitio MluI hasta el pb 30872 (números según la secuencia de Ad35 wt descrita en la Figura 6) en la cola de la fibra son amplificadas utilizando los cebadores DF35-1: 5'-CAC TCA CCA CCT CCA ATT CC-3' y DF35-2: 5'-CGG GAT CCC GTA CGG GTA GAC AGG GTT GAA GG-3'

Esta amplificación mediante PCR introduce un único sitio BsiWI en la cola del gen de la fibra.

Las secuencias limítrofes derechas que oscilan desde el extremo de la proteína de la fibra en el pb 31798 hasta el pb 33199 (numeración según la secuencia de Ad35 wt, Figura 6), 3' con respecto al único sitio NdeI es amplificada utilizando los cebadores DF35-3: 5'-CGG GAT CCG CTA GCT GAA ATA AAG TTT AAG TGT TTT TAT TTA AAA TCA C-3' y DF35-4: 5'-CCA GTT GCA TTG CTT GGT TGG-3'. Esta PCR introduce un único sitio NheI en el lugar de las secuencias de la fibra. La amplificación mediante PCR se realiza con ADN polimerasa Pwo (Roche) según las instrucciones del fabricante. Tras la amplificación los productos de la PCR son purificados utilizando un estuche de purificación y los fragmentos son digeridos con BamHI y ligados entre sí. Los fragmentos ligados de 2 kb son purificados en gel y clonados en el vector PCR Script Amp (Stratagene). La amplificación correcta es verificada mediante secuenciación. El fragmento de PCR es escindido en forma de un fragmento MluI/NdeI y clonado en pBr/Ad35.PRn digerido con las mismas enzimas. Esto genera pBr/Ad35.PRfib, un vector lanzadera adecuado para introducir secuencias de la fibra de serotipos alternativos. Esta estrategia es análoga a la estrategia de modificación de la fibra para los virus basados en Ad5 descrita en la Solicitud de Patente Internacional WO00/03029. Los cebadores que se enumeran en la Tabla I de esa solicitud fueron utilizados para amplificar las secuencias de la fibra de diversos subgrupos de adenovirus. Para la amplificación de fibras que están clonadas en pBr/Ad35.PR se pueden utilizar las mismas secuencias cebadoras (degeneradas), no obstante, el sitio NdeI de los cebadores directos (oligonucleótidos de la cola A a E) debe ser cambiado por un sitio BsiWI y el sitio Nsil del oligo inverso (oligonucleótido de la protuberancia 1 a 8) debe ser cambiado por un sitio NheI. De este modo se amplifican 16 secuencias utilizando los siguientes cebadores degenerados: 5'-CCK GTS TAC CCG TAC GAA GAT GAA AGC-3' y 5'-CCG GCT AGC TCA GTC ATC TTC TCT GAT ATA-3'. Las secuencias amplificadas son digeridas después con BsiWI y NheI y clonadas en pBr/Ad35.PRfib digerido con las mismas enzimas para generar pBr/Ad35.PRfib16. El último constructo es digerido después con PacI y Swal y el inserto es aislado en gel. El fragmento de Ad35 PacI/Swal con la fibra modificada es clonado después en los sitios correspondientes de pWE/Ad35.pIX-riTR para dar pWE/Ad35.pIX-riTR.fib16. Este esqueleto cosmidico puede ser utilizado después con un plásmido adaptador basado en Ad35 para generar virus recombinantes de Ad35 que presentan la fibra de Ad16. Se pueden amplificar otras secuencias de la fibra con los cebadores (degenerados) mencionados antes. Si una de las secuencias de la fibra resulta tener un sitio BsiWI o NheI interno, el fragmento de la PCR tiene que ser digerido parcialmente con esa enzima.

3) Generación de virus basados en Ad35 con expresión de E4, independiente de E1, inducible.

El promotor E4 de adenovirus es activado por la expresión de las proteínas E1. No se sabe ahora si las proteínas E1 de Ad5 son capaces de mediar la activación del promotor E4 de Ad35. Por lo tanto, para permitir la producción de virus recombinantes de Ad35 en células PER.C6, puede ser ventajoso independizar la expresión de E4 de la de E1. Esto se puede lograr reemplazando el promotor E4 de Ad35 por secuencias promotoras heterólogas como, pero no limitadas a, el promotor 7xTetO.

Se ha demostrado que los vectores basados en Ad5 con E1 suprimida recombinantes tienen una expresión residual de genes virales del esqueleto vector en las células diana, a pesar de la ausencia de expresión de E1. La expresión génica viral aumenta la toxicidad y puede desencadenar la respuesta inmunitaria del anfitrión a la célula infectada. Para la mayor parte de las aplicaciones de los vectores adenovirales en el campo de la terapia génica y la vacunación se desea reducir o disminuir la expresión de los genes virales del esqueleto. Un modo de lograr esto es suprimir todas las secuencias del esqueleto viral, o tantas como sea posible. Suprimiendo los genes E2A, E2B o E4 y/o las funciones de los genes tardíos, se deben complementar estas funciones durante la producción. Esta complementación puede ser por medio de un virus coadyuvante o por medio de la adición estable de estas funciones, con o sin una regulación de la transcripción inducible, a la célula productora.

Los métodos para lograr esto han sido descritos para Ad5 y son conocidos en la técnica. Un método específico es la reposición del promotor E4 con secuencias promotoras que no son activas en las células diana. Las proteínas E4 juegan un papel por ejemplo en la replicación de los adenovirus por medio de la activación del promotor E2 y en la

expresión del gen tardío por medio de la regulación del empalme y la exportación nuclear de los transcritos génicos tardíos. Además, al menos algunas de las proteínas E4 son tóxicas para las células. Por lo tanto, la reducción o la eliminación de la expresión de E4 en las células diana mejorarán adicionalmente los vectores basados en Ad35. Un modo de lograr esto es remplazar el promotor E4 por un promotor heterólogo que sea inactivo en las células diana. Un ejemplo de sistema promotor/activador heterólogo que es inactivo en las células diana es el sistema TetO inducible por tetraciclina (Gossen y Bujard, 1992). Se pueden utilizar otros sistemas promotor/activador procarióticos o sintéticos. En este ejemplo, el promotor E4 del esqueleto del vector viral es remplazado por un fragmento de ADN que contiene 7 repeticiones del elemento sensible a la tetraciclina del operón tet (7xTetO). Un potente transactivador de este promotor es una proteína de fusión que contiene el dominio de unión al ADN del represor tet y el dominio de activación de VP16 (proteínas transactivadora de Tet, Tta). La expresión fuerte de E4, independiente de la expresión de E1, puede ser lograda en células PER.C6 que expresan Tta. Las células PER.C6 que expresan Tta han sido generadas y descritas (véase el Ejemplo 15). Los virus con E1 suprimida derivados de Ad5 con E4 bajo el control de 7xTetO pueden ser generados y propagados en estas células. Tras la infección en células de origen humano o animal (que no expresan el transactivador Tta), se encontró que la expresión de E4 disminuía enormemente en comparación con los virus que tienen E1 suprimida con el promotor E4 normal.

Más abajo se describe la construcción de pWE/Ad35.pIX-rITR.TetO-E4, un vector coadyuvante cosmiótico para producir virus con la reposición del promotor E4.

Primero, se generó un fragmento mediante amplificación PCR en ADN de pBr/Ad35.PRn utilizando los siguientes cebadores: 355ITR: 5'-GAT CCG GAG CTC ACA ACG TCA TTT TCC CAC G-3' y 353ITR: 5'- CGG AAT TCG CGG CCG CAT TTA AAT C-3'. Este fragmento contiene secuencias entre el pb 34656 (numeración según wtAd35) y el sitio NotI 3' de la ITR derecha de pBr/Ad35.PRn e introduce un sitio SstI 5' de la secuencia ITR derecha.

Se generó un segundo fragmento de PCR en ADN de pBr/Ad35.PRn utilizando los cebadores: 35DE4: 5'-CCC AAG CTT GCT TGT GTA TAT ATA TTG TGG-3' y 35f7: Véase el Ejemplo 7.

Esta PCR amplifica las secuencias de Ad35 entre el pb 33098 y 34500 (numeración según wtAd35) e introduce un sitio HindIII curso arriba de la caja Tata de E4. Con estas dos reacciones de PCR se amplificaron las secuencias limítrofes derecha e izquierda del promotor E4. Para la amplificación, se utilizó ADN polimerasa Pwo según las instrucciones del fabricante. Se aisló un tercer fragmento que contenía el promotor 7xTetO del constructo pAAO-E-TATA-7xTetO mediante digestión con SstI y HindIII. La generación de pAAO-E-TATA-7xTetO se describe más abajo. Después el primer fragmento de la PCR (355/353) fue digerido con SstI y NotI y ligado al fragmento 7xTetO. La mezcla de ligación fue digerida después con HindIII y NotI y el fragmento de 0,5 kb aislado en gel. El segundo fragmento de la PCR (35DE4/35F7) fue digerido con NdeI y HindIII y purificado en gel. Estos dos fragmentos son ligados después en pBr/Ad35.PRn digerido con NdeI y NotI para dar pBr/Ad35.PR.TetOE4. La modificación del promotor E4 es transferida después al clon cosmiótico coadyuvante de Ad35 intercambiando el fragmento PacI/SwaI del último por uno de pBr/Ad35.PR.TetOE4 para dar pWE/Ad35.pIX-rITR.TetOE4. pAAO-E-TATA.7xTetO fue generado como sigue. Se sintetizaron dos oligonucleótidos: TATAplus: 5'-AGC TTT CTT ATA AAT TTT CAG TGT TAG ACT AGT AAA TTG CTT AAG-3' y TATAmin: 5'-AGC TCT TAA GCA ATT TAC TAG TCT AAC ACT GAA AAT TTA TAA GAA-3' (Las secuencias subrayadas forman una caja TATA modificada).

Los oligonucleótidos fueron recocidos para producir un fragmento de ADN de doble hebra con salientes 5' que son compatibles con ADN digerido con HindIII. El producto de la reacción de recocido fue ligado en el Vector pGL3-Intensificador (Promega) digerido con HindIII para producir pAAO-E-TATA. El clon que tenía el sitio HindIII en el extremo 5' del inserto restaurado fue seleccionado para su clonación adicional.

A continuación, la secuencia del operador tet heptamerizada fue amplificada a partir del plásmido pUHC-13-3 (Gossen y Bujard, 1992) en una reacción de PCR utilizando el sistema de PCR Expand (Roche) según el protocolo del fabricante. Se utilizaron los siguientes cebadores: Tet3: 5'-CCG GAG CTC CAT GGC CTA ACT CGA GTT TAC CAC TCC C-3' y Tet5: 5'-CCC AAG CTT AGC TCG ACT TTC ACT TTT CTC-3'

El fragmento amplificado fue digerido con SstI y HindIII (estos sitios están presentes en tet3 y tet5 respectivamente) y clonado en pAAO-E-TATA digerido con SstI/HindIII dando lugar a pAAO-E-TATA-7xtetO.

Para someter a ensayo la funcionalidad del clon cosmiótico pWE/Ad35.pIX-rITR.TetOE4 generado, el ADN fue digerido con NotI. El extremo izquierdo del ADN de wtAd35 fue amplificado después utilizando los cebadores 35F1 y 35R4 (véase el Ejemplo 7). Tras la amplificación, la mezcla de PCR fue purificada y digerida con SalI para separar el ADN viral intacto. Después 4 gr tanto de pWE/Ad35.pIX-rITR.TetOE4 digerido como del fragmento de PCR fueron cotransfectados en células PER.C6-tTA que habían sido sembradas en matraces T25 el día anterior. Las células transfectadas fueron transferidas a matraces T80 al cabo de dos días y dos días más tarde se obtuvo ECP, mostrando que el esqueleto cosmiótico es funcional.

Ejemplo 14Generación de líneas celulares capaces de complementar los virus Ad35 con E1 suprimida5 *Generación de pIG135 y pIG270*

El constructo pIG.E1A.E1B contiene las secuencias de la región E1 de Ad35 correspondientes a los nucleótidos 459 a 3510 de la secuencia de Ad5 wt (número de acceso Genbank M72360) conectado operativamente al promotor de la fosfoglicerato quinasa humana (PGK) y a las secuencias poliA del Virus de la Hepatitis B. La generación de este constructo se describe en WO97/00326. Las secuencias E1 de Ad5 fueron reemplazadas por las correspondientes secuencias de Ad35 como sigue. PRSV.Ad35-E1 (descrito en el ejemplo 8) fue digerido con EcoRI y Sse8387I y el fragmento de 3 kb correspondiente a las secuencias E1 de Ad35 fue aislado en gel. El constructo pIG.E1A.E1B fue digerido con Sse8387I completamente y parcialmente con EcoRI. El fragmento de 4,2 kb correspondiente a las secuencias vectoras sin la región E1 de Ad5 pero conservando el promotor PGK fue separado de otros fragmentos en gel de agarosa LMP y la banda correcta fue escindida del gel. Ambos fragmentos obtenidos fueron ligados dando como resultado pIG.Ad35-E1.

Este vector fue modificado adicionalmente en el esqueleto del vector pUC119. A este fin, el vector fue digerido con BsaAI y BstXI y el fragmento grande fue aislado del gel. Se preparó un oligo de doble hebra recociendo los dos oligos siguientes: BB1: 5'-GTG CCT AGG CCA CGG GG-3' y BB2: 5'-GTG GCC TAG GCA C-3'.

La ligación del oligo y el fragmento del vector dio como resultado el constructo pIG135. La inserción correcta del oligo restaura los sitios BsaAI y BstXI e introduce un sitio AvrII único. A continuación, los autores de la presente invención introdujeron un sitio único en el extremo 3' de la casete de expresión Ad35-E1 en pIG135. A este fin, el constructo fue digerido con SapI y los extremos 3' sobresalientes se volvieron romos mediante tratamiento con ADN polimerasa de T4. El plásmido lineal tratado de este modo fue digerido adicionalmente con BsrGI y el vector grande que contenía el fragmento fue aislado en gel. Para restaurar el extremo 3' de la secuencia poliA de HBV y para introducir un sitio único, se generó un fragmento de PCR utilizando los siguientes cebadores: 270F: 5'-CAC CTC TGC CTA ATC ATC TC -3' y 270r: 5'-GCT CTA GAA ATT CCA CTG CCT TCC ACC -3'. La PCR se realizó en el ADN de pIG.Ad35.E1 utilizando la polimerasa Pwo (Roche) según las instrucciones del fabricante. El producto de la PCR obtenido fue digerido con BsrGI y desfosforilado utilizando la enzima Tsap (LTI), la última para prevenir la dimerización del inserto en el sitio BsrGI. El fragmento de la PCR y el fragmento vector fueron ligados para producir el constructo pIG270.

35 *Las secuencias E1 de Ad35 son capaces de transformar células primarias de rata*

Se sacrificaron ratas WAG/RIJ recién nacidas con 1 semana de gestación y se aislaron los riñones. Tras la cuidadosa eliminación de la cápsula, los riñones fueron disgregados en una sola suspensión celular mediante múltiples rondas de incubación en tripsina/EDTA (LTI) a 37°C y recolección de las células flotantes en PBS frío conteniendo FBS al 1%. Cuando la mayor parte del riñón se hubo tratado con tripsina todas las células fueron resuspendidas en DMEM con un suplemento de FBS al 10% y filtradas a través de cuajo de queso estéril. Las células de Riñón de Cría de Rata (BRK) obtenidas de un riñón fueron cultivadas en 5 placas (Greiner, 6 cm). Cuando se alcanzaba una confluencia del 70-80%, las células fueron transfectadas con 1 o 5 µg de ADN/placa utilizando el estuche de precipitación con CaPO₄ (LTI) según las instrucciones del fabricante. Los siguientes constructos fueron utilizados en transfecciones separadas: pIG.E1A.E1B (que expresaba la región Ad5-E1), pRSV.Ad35-E1, pIG.Ad35-E1 y pIG270 (expresando el último la E1 de Ad35). Las células fueron incubadas a 37°C, CO₂ al 5% hasta que aparecieron focos de células transformadas. La Tabla IV muestra el número de focos que resultan de diversos experimentos de transfección utilizando ADN circular o lineal. Como se esperaba, la región E1 de Ad5 transformaba eficazmente las células BRK. También aparecían focos en la capa de células transfectadas con E1 de Ad35 aunque con menor eficacia. Los focos transformados con Ad35 aparecían en un momento puntual más tardío: ~2 semanas después de la transfección en comparación con los 7-10 días para E1 de Ad5. Estos experimentos muestran claramente que los genes E1 del virus del grupo B Ad35 son capaces de transformar células primarias de roedor.

Esto demuestra la funcionalidad de los constructos de expresión de E1 de Ad35 y confirma descubrimientos anteriores de la capacidad de transformación de los virus del grupo B Ad3 y Ad7 (Dijkema, 1979). Para someter a ensayo si las células de los focos estaban realmente transformadas se escogieron unos pocos focos y se ampliaron. De los 7 focos elegidos, resultó que al menos 5 crecían en forma de líneas celulares establecidas.

60 *Generación de nuevas células de empaquetamiento derivadas de amniocitos humanos primarios*

Se centrifugó fluido amniótico obtenido tras la amniocentesis y las células fueron resuspendidas en medio AmnioMax (LTI) y cultivadas en matraces para el cultivo de tejidos a 37°C y CO₂ al 10%. Cuando las células estaban creciendo bien (aproximadamente una división celular/24 horas), el medio fue reemplazado por una mezcla 1:1 de medio completo AmnioMax y medio MDEM con bajo contenido de glucosa (LTI) con un suplemento de Glutamax I (concentración final 4 mM, LTI) y glucosa (concentración final 4,5 gr/litro, LTI) y FBS al 10% (LTI). Para la transfección, se cultivaron en placa ~5x10⁵ células en placas para el cultivo de tejidos de 10 cm. El día después, las

células fueron transfectadas con 20 μ gr de pIG270 circular/placa utilizando el estuche de transfección CaPO₄ (LTI) según las instrucciones del fabricante y las células fueron incubadas durante la noche con el producto precipitado de ADN. Al día siguiente, las células fueron lavadas 4 veces con PBS para separar el producto precipitado e incubadas adicionalmente durante más de tres semanas hasta que aparecieron focos de células transformadas.

Una vez a la semana el medio fue remplazado por medio de nueva aportación. Se utilizaron otros agentes de transfección similares, pero no limitados a, Lipofectamine (LTI) o PEI (Polietilenimina, elevado peso molecular, sin agua, Aldrich). De estos tres agentes PEI alcanzaba la mejor eficacia de transfección en amniocitos humanos primarios: ~1% células azules 48 horas después de la transfección de pAdApt35.LacZ.

Los focos son aislados como sigue. Se separa el medio y se reemplaza por PBS después de lo cual los focos son aislados raspando suavemente las células utilizando una pipeta Gilson de 50-200 μ l con una punta de filtro desechable. Las células contenidas en ~10 μ l de PBS se llevaron a una placa de 96 pocillos conteniendo 15 μ l de tripsina/EDTA (LTI) y se obtuvo una única suspensión celular pipeteando arriba y abajo y con una corta incubación a la temperatura ambiente. Tras la adición de 200 μ l de la mezcla 1:1 de medio completo Amniomax y DMEM con suplementos y FBS al 10% descrita antes, las células fueron incubadas adicionalmente. Los clones que continuaban creciendo fueron ampliados y analizados en cuanto a su capacidad para complementar el crecimiento de los vectores adenovirales con E1 suprimida de diferentes subgrupos, específicamente los derivados de virus del grupo B específicamente de Ad35 y Ad11.

Generación de nuevas líneas celulares de empaquetamiento de retinoblastos embrionicos humanos

Se aislaron células de retina humana y se cultivaron en medio DMEM con un suplemento de FBS al 10% (LTI). El día antes de la transfección, se cultivan en placa ~5x10⁵ células en placas de 6 cm y se cultivan durante la noche a 37°C y CO₂ al 10%. La transfección se realiza utilizando el estuche de precipitación con CaPO₄ (LTI) según las instrucciones del fabricante. Cada placa es transfectada con 8-10 μ g de ADN de pIG270, ya sea en forma de un plásmido circular o en forma de un fragmento purificado. Para obtener el fragmento purificado pIG270 fue digerido con AvrII y XbaI y el fragmento de 4 kb correspondiente a la casete de expresión de E1 de Ad35 fue aislado en gel mediante tratamiento con agarosa (Roche). Al día siguiente, el producto precipitado es lavado cuidadosamente por medio de cuatro lavados con PBS estéril. Después se añade medio de nueva aportación y las células transfectadas son cultivadas adicionalmente hasta que aparecen focos de células transformadas. Cuando son bastante grandes (>100 células) los focos son seleccionados y llevados a 96 pocillos como se ha descrito antes. Los clones de células HER transformadas que continúan creciendo, son ampliados y sometidos a ensayo en cuanto a su capacidad para complementar el crecimiento de vectores adenovirales con E1 suprimida de diferentes subgrupos específicamente los derivados de los virus del grupo B específicamente de Ad35 y Ad11.

Nuevas líneas celulares de empaquetamiento derivadas de PER.C6

Como se describe en el ejemplo 8, es posible generar y hacer crecer virus con E1 suprimida de Ad35 sobre células PER.C6 con la cotransfección de un constructo de expresión de E1 de Ad35, p. ej. pRSV.Ad35.E1. Sin embargo, la producción a gran escala de adenovirus recombinantes utilizando este método es engorrosa debido a que para cada etapa de amplificación se necesita una etapa de transfección del constructo E1 de Ad35. Además, este método aumenta el riesgo de recombinación no homóloga entre el genoma del plásmido y del virus con elevadas posibilidades de generación de virus recombinantes que incorporan secuencias de E1 dando como resultado virus de replicación competente. Para evitar esto, la expresión de proteínas E1 de Ad35 en PER.C6 tiene que estar mediada por copias integradas del plásmido de expresión en el genoma. Puesto que las células PER.C6 ya están transformadas y expresan las proteínas E1 de Ad35, la adición de expresión de E1 de Ad35 extra puede ser tóxica para las células, no obstante, no es imposible transfectar establemente células transformadas con proteínas E1 puesto que han sido generadas células A549 que expresan E1 de Ad5.

En un intento de generar adenovirus recombinantes derivados del virus del subgrupo B Ad7, Abrahamsen et al. (1997) no fueron capaces de generar virus con E1 suprimida sobre células 293 sin contaminación de Ad7 wt. Se demostró que los virus que fueron escogidos tras la purificación en placa sobre células 293 ORF6 (Brough et al., 1996) tenían incorporadas secuencias E1B de Ad7 mediante recombinación no homóloga. De este modo, se demostró que era posible la propagación eficaz de virus recombinantes de Ad7 solamente en presencia de expresión de E1B de Ad7 y de la expresión de ORF6 de E4 de Ad5. Se sabe que las proteínas E1B interaccionan con las proteínas celulares así como virales (Bridge et al., 1993; White, 1995). Posiblemente, el complejo formado entre la proteína E1B de 55 K y ORF6 de E4 que es necesario para incrementar la exportación de ARNm de proteínas virales y para inhibir la exportación de la mayor parte de los ARNm celulares, es crítica y en cierto modo específica del serotipo. Los experimentos anteriores sugieren que las proteínas E1A de Ad5 son capaces de complementar una delección de E1A de Ad7 y de que la expresión de E1B de Ad7 en células de empaquetamiento de adenovirus como tal no sea suficiente para generar una línea celular complementadora estable. Para someter a ensayo si una o ambas proteínas E1B de Ad35 es o son el factor limitante en la eficaz propagación del vector de Ad35 sobre las células PER.C6, los autores de la presente invención han generado un plásmido adaptador de Ad35 que contiene el promotor de E1B y las secuencias de E1B pero carece del promotor y la región codificadora para

E1A. A este fin, el extremo izquierdo del ADN de Ad35 wt fue amplificado utilizando los cebadores 35F1 y 35R4 (ambos descritos en el Ejemplo 7) con ADN polimerasa Pwo (Roche) según las instrucciones del fabricante. El producto de la PCR de 4,6 kb fue purificado utilizando el estuche de purificación de PCR (LTI) y digerido con las enzimas SnaBI y ApaI. El fragmento de 4,2 kb resultante fue purificado después en gel utilizando el estuche QIAExII (Qiagen). A continuación, pAdApt35Ip1 (Ejemplo 7) fue digerido con SnaBI y ApaI y el fragmento que contenía el vector de 2,6 kb fue aislado en gel utilizando el estuche GeneClean (BIO 101, Inc.). Ambos fragmentos aislados fueron ligados para dar pBr/Ad35.leftITR-pIX. La amplificación correcta durante la PCR fue verificada mediante un ensayo de funcionalidad como sigue: El ADN fue digerido con BstBI para liberar el inserto de Ad35 de las secuencias vectoras y 4 µg de este ADN fueron cotransfectados con 4 µg de pWE/Ad35.pIX-rITR digerido con NotI (Ejemplo 7) en células PER.C6.

Las células transfectadas se pasaron a matraces T80 el día 2 y de nuevo dos días después se había formado ECP mostrando que el nuevo constructo pBr/Ad35.leftITR-pIX contiene secuencias E1 funcionales. El constructo pBr/Ad35.leftITR-pIX fue modificado después como sigue. El ADN fue digerido con SnaBI y HindIII y el saliente HindIII 5' fue rellenado utilizando la enzima de Klenow. La religación del ADN digerido y la transformación en células competentes (LTI) produjeron el constructo pBr/Ad35.leftITR-pIXΔE1A. Este último constructo contiene el extremo izquierdo de 4,6 kb de Ad35 excepto para las secuencias de E1A entre el pb 450 y 1341 (numeración según wtAd35, Figura 6) y por tanto carece del promotor E1A y de la mayoría de las secuencias codificadoras de E1A. Después pBr/Ad35.leftITR-pIXΔE1A fue digerido con BstBI y 2 µgr de este constructo fueron cotransfectados con 6 µgr de pWE/Ad35.pIX-rITR (Ejemplo 7) digerido con NotI en células PER.C6. Una semana después de la transfección se había formado una un ECP completo en los matraces transfectados.

Este experimento muestra que las proteínas E1A de Ad35 son complementadas funcionalmente por la expresión de e1A de Ad5 en células PER.C6 y que al menos una de las proteínas E1B de Ad35 no puede ser complementada por la expresión de E1 de Ad5 en PER.C6. Adicionalmente muestra que es posible elaborar una línea celular complementadora para los virus con E1 suprimida de Ad35 expresando las proteínas E1B de Ad35 en PER.C6. La expresión estable de las secuencias E1B de Ad35 a partir de copias integradas en el genoma de las células PER.C6 puede ser dirigida por el promotor E1B y terminada mediante una señal de poli-adenilación heteróloga como, pero no limitada a, HBVpA. La señal pA heteróloga es necesaria para evitar el solapamiento entre el inserto E1B y el vector recombinante, puesto que la terminación de E1B natural está localizada en la unidad de transcripción pIX que tiene que estar presente en el vector adenoviral. Alternativamente, las secuencias de E1B pueden ser dirigidas por un promotor heterólogo como, pero no limitado a, el promotor PGK humano o por un promotor inducible como, pero no limitado a, el promotor 7xtetO (Gossen y Bujard, 1992). También en estos casos la terminación de la transcripción está mediada por una secuencia pA heteróloga, p. ej. la pA de HBV. Las secuencias E1B de Ad35 comprenden al menos una de las regiones codificadoras de las proteínas E1B de 21K y E1B de 55K localizadas entre los nucleótidos 1611 y 3400 de la secuencia de Ad35 wt. El inserto también puede incluir (parte de) las secuencias E1B de Ad35 entre los nucleótidos 1550 y 1611 de la secuencia de Ad35 wt.

Ejemplo 15

Generación de líneas celulares productoras para la producción de vectores adenovirales recombinantes con la región temprana 1 y la región temprana 2A suprimidas

Generación de las células PER.C6-tTa

Aquí se describe la generación de líneas celulares para la producción de vectores adenovirales recombinantes que tienen la región temprana 1 (E1) y la región temprana 2A (E2A) suprimidas.

Las líneas celulares productoras complementan la delección de E1 y E2A de los vectores adenovirales recombinantes en *trans* mediante expresión constitutiva de ambos genes E1 y E2A. La línea celular de retinoblastos embrionarios humanos transformados con E1 de Ad35 pre-establecida PER.C6 (WO 97/00326) fue equipada adicionalmente con casetes de expresión de E2A.

El gen E2A adenoviral codifica una Proteína de Unión al ADN de 72 kDa que tiene una elevada afinidad por el ADN de hebra sencilla.

Debido a esta función, la expresión constitutiva de DBP es tóxica para las células. El mutante ts125E2A codifica una DBP que tiene una sustitución Pro→Ser del aminoácido 413. Debido a esta mutación, la DBP codificada por ts125E2A es completamente activa a la temperatura permisiva de 32°C, pero no se une a los ADNhs a la temperatura no permisiva de 39°C. Esto permite la generación de líneas celulares que expresan constitutivamente E2A, que no es funcional y no es tóxica a la temperatura no permisiva de 39°C. E2A sensible a la temperatura se vuelve funcional gradualmente una vez que la temperatura disminuye y se vuelve completamente funcional a una temperatura de 32°C, la temperatura permisiva.

A. Generación de plásmidos que expresan el gen E2A de tipo salvaje o ts125E2A sensible a la temperatura.

PcDNA3wtE2A: Se amplificó la región codificadora de la región temprana de tipo salvaje completa 2A (E2A) a partir del plásmido pBR/Ad.Bam-rITR (consigna ECACC P97082122) con los cebadores DBPpcr1 y DBPpcr2 utilizando el sistema Expand® Long Template PCR según el protocolo normalizado del proveedor (Boehringer Mannheim). La PCR fue realizada en un Biometra Trio Thermoblock, utilizando el siguiente programa de amplificación: 94°C durante 2 minutos, 1 ciclo; 94°C durante 10 segundos + 51°C durante 30 segundos + 68°C durante 2 minutos, 1 ciclo; 94°C durante 10 segundos + 58°C durante 30 segundos + 68°C durante 2 minutos, 10 ciclos; 94°C durante 10 segundos + 58°C durante 30 segundos + 68°C durante 2 minutos con 10 segundos de ampliación por ciclo, 20 ciclos; 68°C durante 5 minutos, 1 ciclo. El cebador DBPpcr1: **CGG GAT CCG CCA CCA TGG CCA GTC GGG AAG AGG AG** (5' a 3') contiene un único sitio de restricción BamHI (subrayado) 5' con respecto a la secuencia de Kozak (cursiva) y el codón de iniciación de la secuencia codificadora de E2A. El cebador DBPpcr2: **CGG AAT TCT TAA AAA TCA AAG GGG TTC TGC CGC** (5' a 3') contiene un único sitio de restricción EcoRI (subrayado) 3' del codón de terminación de la secuencia codificadora de E2A. Los caracteres en negrita hacen referencia a secuencias derivadas de la región codificadora de E2A. El fragmento de la PCR fue digerido con *BamHI/EcoRI* y clonado en pcDNA3 digerido con *BamHI/EcoRI* (Invitrogen), dando lugar a pcDNA3wtE2A.

PcDN3tsE2A: La región codificadora completa ts125E2A fue amplificada a partir de ADN aislado del mutante de adenovirus sensible a la temperatura H5ts125. El procedimiento de amplificación por PCR era idéntico al de la amplificación de wtE2A. El fragmento de PCR fue digerido con *BamHI/EcoRI* y clonado en pcDNA3 digerido con *BamHI/EcoRI* (Invitrogen), dando lugar a pcDNA3tsE2A. La integridad de la secuencia codificadora de wtE2A y tsE2A fue confirmada mediante secuenciación.

B. Características de crecimiento de células productoras para la producción de vectores adenovirales recombinantes cultivadas a 32, 37 y 39°C.

Las células PER.C6 fueron cultivadas en DMEM (Gibco BRL) con un suplemento de FBS al 10% (Gibco BRL) y MgCl₂ 10 mM en una atmósfera con CO₂ al 10% a 32°C, 37°C o 39°C. El día 0, se sembraron un total de 1 x 10⁶ células PER.C6 por matraz para el cultivo de tejidos de 25 cm² (Nunc) y las células fueron cultivadas a 32°C, 37°C o 39°C. El día 1-8, se contaron las células. La Figura 30 muestra que la tasa de crecimiento y la densidad celular final del cultivo de PER.C6 a 39°C son comparables con los de 37°C. La tasa de crecimiento y la densidad final del cultivo de PER.C6 a 32°C estaban ligeramente reducidos en comparación con los de 37°C o 39°C. No se observaba una muerte celular significativa a ninguna de las temperaturas de incubación. Por lo tanto PER.C6 funciona muy bien tanto a 32°C como a 39°C, la temperatura permisiva y no permisiva para ts125E2A, respectivamente.

C. Transfección de PER.C6 con vectores de expresión de E2A; formación de colonias y generación de líneas celulares

Un día antes de la transfección, se sembraron 2 x 10⁶ células PER.C6 por placa de cultivo de tejidos de 6 cm (Greiner) en DMEM, con un suplemento de FBS al 10% y MgCl₂ 10 mM y se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 10%. Al día siguiente, las células fueron transfectadas con 3, 5 o 8 µg de ADN plasmídico de pcDNA3, pcDNA3wtE2A o pcDNA3tsE2A por placa, utilizando LipofectAMINE PLUS® Reagent Kit según el protocolo normalizado del proveedor (Gibco BRL), excepto que las células fueron transfectadas a 39°C en una atmósfera de CO₂ al 10%. Después de la transfección, las células fueron mantenidas constantemente a 39°C, la temperatura no permisiva para ts125E2A. Tres días más tarde, las células fueron colocadas en DMEM con un suplemento de FBS al 10%, MgCl₂ 10 mM y 0,25 mg/ml de G418 (Gibco BRL), y las primeras colonias resistentes a G418 aparecieron 10 días después de la transfección. Como se muestra en la tabla 1, había una diferencia espectacular entre el número total de colonias obtenidas tras la transfección de pcDNA3 (~200 colonias) o pcDNA3tsE2A (~100 colonias) y pcDNA3wtE2A (sólo 4 colonias). Estos resultados indican que la toxicidad de E2A expresada constitutivamente puede ser superada utilizando un mutante sensible a la temperatura de E2A (ts125E2A) y cultivando las células a una temperatura no permisiva de 39°C.

De cada transfección, se escogieron numerosas colonias raspando las células de la placa con una pipeta. Las células desprendidas fueron colocadas con posterioridad en placas para el cultivo de tejidos de 24 pocillos (Greiner) y cultivadas adicionalmente a 39°C en una atmósfera de CO₂ al 10% en DMEM, con un suplemento de FBS al 10%, MgCl₂ 10 mM y 0,25 mg/ml de G418. Como se muestra en la tabla 1, el 100% de las colonias transfectadas con pcDNA3 (4/4) y el 82% de las colonias transfectadas con pcDNA3tsE2A (37/45) fueron establecidas en líneas celulares estables (las 8 colonias transfectadas con pcDNA3tsE2A restantes crecían lentamente y fueron descartadas). En contraste, sólo una colonia transfectada con pcDNA3wtE2A pudo ser establecida. Las otras 3 murieron directamente después de seleccionarlas.

A continuación, se determinaron los niveles de expresión de E2A en las diferentes líneas celulares mediante transferencia Western. Las líneas celulares fueron sembradas en placas para el cultivo de tejidos de 6 pocillos y los cultivos subconfluentes fueron lavados dos veces con PBS (NPBI) y lisados y raspados en RIPA (NP-40 1%, desoxicolato de sodio al 0,5% y SDS en PBS al 0,1%, con un suplemento de fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM y

0,1 mg/ml de inhibidor de tripsina). Al cabo de 15 minutos de incubación en hielo, los productos lisados fueron aclarados mediante centrifugación. Las concentraciones de proteína fueron determinadas mediante el análisis de proteínas de Bio-Rad, según los procedimientos normalizados del proveedor (BioRad). Se fraccionaron cantidades iguales del extracto de células completas mediante SDS-PAGE en gel al 10%. Las proteínas fueron transferidas a membranas Immobilon-P (Millipore) e incubadas con anticuerpo monoclonal α DBP B6. El anticuerpo secundario era anticuerpo anti-ratón de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (BioRad). Se realizaron el procedimiento de transferencia Western y las incubaciones según el protocolo proporcionado por Millipore. Los complejos fueron visualizados con el sistema de detección ECL según el protocolo del fabricante (Amersham). La Figura 31 muestra que todas las líneas celulares derivadas de la transfección con pcDNA3tsE2A expresaban la proteína E2A de 72 kDa (panel izquierdo, calles 4-14; panel medio, calles 1-13; panel derecho, calles 1-12). En contraste, la única línea celular derivada de la transfección con pcDNAwtE2A no expresaba la proteína E2A (panel izquierdo, calle 2). No se detectaba proteína E2A en el extracto de una línea celular de la transfección con pcDNA3 (panel izquierdo, calle 1), que servía como control negativo. El extracto de células PER.C6 transfectadas transitoriamente con pcDNA3ts125 (panel izquierdo, calle 3) servía como control positivo para el procedimiento de transferencia Western. Estos datos confirmaron que la expresión constitutiva de wt E2A es tóxica para las células y que utilizando el mutante ts125 de E2A se podría evitar esta toxicidad.

D. Complementación de la delección de E2A en vectores adenovirales en células PER.C6 que expresan constitutivamente ts125E2A en toda su longitud.

El adenovirus Ad5.d1802 es un vector derivado de Ad5 que tiene suprimida la mayor parte de la región codificadora de E2A y no produce DBP funcional. Se utilizó Ad5.d1802 para someter a ensayo la actividad complementadora en trans de E2A de las células PER.C6 que expresan constitutivamente ts125E2A. Las células PER.C6 parentales o el clon PER.C6tsE2A 3-9 fueron cultivadas en DMEM, con un suplemento de FBS al 10% y $MgCl_2$ 10 mM a 39°C y CO_2 al 10% en matraces de 25 cm² y o bien infectadas simuladamente o bien infectadas con Ad5.d1802 a un m.o.i. de 5. Con posterioridad las células infectadas fueron cultivadas a 32°C y las células fueron rastreadas en cuanto a la aparición del efecto citopático (ECP) determinado mediante los cambios en la morfología celular y la separación de las células del matraz. El ECP total aparecía en el clon PER.C6tsE2A 3-9 infectado con Ad5.d1802 en 2 días. No aparecía ECP en las células PER.C6 infectadas con Ad5.d1802 o las células simuladamente infectadas. Estos datos mostraban que las células PER.C6 expresaban constitutivamente ts125E2A complementado en trans para la delección E2A en el vector Ad5.d1802 a la temperatura permisiva de 32°C.

E. Cultivo en suspensión sin suero de las líneas celulares PER.C6tsE2A.

La producción a gran escala de vectores adenovirales recombinantes para la terapia génica humana requiere un método de cultivo fácil y graduable para la línea celular productora, preferiblemente un cultivo en suspensión en un medio desprovisto de cualquier constituyente humano o animal. Con este propósito, la línea celular PER.C6tsE2A c5-9 (denominada c5-9) fue cultivada a 39°C y CO_2 al 10% en un matraz para el cultivo de tejidos de 175 cm² (Nunc) en DMEM, con un suplemento de FBS al 10% y $MgCl_2$ 10 mM. A la sub-confluencia (confluencia del 70-80%), las células fueron lavadas con PBS (NPBI) y el medio fue remplazado por 25 ml de medio en suspensión libre de suero Ex-cell[®] 525 (JRH) con un suplemento de 1 x L-Glutamina (Gibco BRL), denominado más adelante SFM. Dos días más tarde, las células fueron desprendidas del matraz dando golpecitos y las células fueron centrifugadas a 1.000 rpm durante 5 minutos. El sedimento celular fue resuspendido en 5 ml de SFM y se transfirieron 0,5 ml de suspensión celular a un matraz para el cultivo de tejidos de 80 cm² (Nunc), junto con 12 ml de SFM de nueva aportación. Al cabo de 2 días, las células fueron cosechadas (todas las células están en suspensión) y sometidas a recuento en un contador celular Burkert. A continuación, las células fueron sembradas en un erlenmeyer para el cultivo de tejidos de 125 ml (Corning) a una densidad de siembra de 3×10^5 células por ml en un volumen total de 20 ml de SFM. Las células fueron cultivadas adicionalmente el día a 125 rpm en un aparato oscilatorio orbital (GFL) a 39°C en atmósfera de CO_2 al 10%. Las células fueron sometidas a recuento el día 1-6 en un contador celular Burkert. En la Figura 4, se muestra la curva de crecimiento medio de los 8 cultivos. PER.C6tsE2A c5-9 se comportaba bien en un cultivo en suspensión sin suero. La máxima densidad celular de aproximadamente 2×10^6 células por ml se alcanza a los 5 días de cultivo.

F. Características de crecimiento de PER.C6 y PER.C6/E2A a 37°C y 39°C.

Se cultivaron células PER.C6 o PER.C6ts125E2A (c8-4) en DMEM (Gibco BRL) con un suplemento de FBS (Gibco BRL) al 10% y $MgCl_2$ 10 mM en una atmósfera de CO_2 al 10% a 37°C (PER.C6) o a 39°C (PER.C6ts125E2A c8-4). El día 0, se sembraron un total de 1×10^6 células por matraz para el cultivo de tejidos de 25 cm² (Nunc) y las células fueron cultivadas a las respectivas temperaturas. En los momentos puntuales indicados, se contaron las células. El crecimiento de las células PER.C6 a 37°C era comparable con el crecimiento de PER.C6ts125E2A c8-4 a 39°C (Figura 33).

Esto muestra que la expresión constitutiva de DBP codificada por ts125E2A no tenía un efecto adverso sobre el crecimiento de las células a la temperatura no permisiva de 39°C.

G. Estabilidad de PER.C6ts125E2A

Durante varios pases, se cultivó la línea celular PER.C6ts125E2A clon 8-4 a 39°C y CO₂ al 10% en un matraz para el cultivo de tejidos de 25 cm² (Nunc) en MDEM, con un suplemento de FBS al 10% y MgCl₂ 10 mM en ausencia de presión de selección (G418). A la subconfluencia (confluencia del 70-80%), las células fueron lavadas con PBS (NPBI) y lisadas y raspadas en RIPA (NP-40 al 1%, desoxicolato de sodio al 0,5% y SDS en PBS al 0,1%, con un suplemento de fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM y 0,1 mg/ml de inhibidor de tripsina). Al cabo de 15 minutos de incubación en hielo, los productos lisados fueron aclarados mediante centrifugación. Las concentraciones de proteína fueron determinadas mediante el análisis de proteínas de BioRad, según los procedimientos normalizados del proveedor (BioRad). Se fraccionaron cantidades iguales de extracto de células completas mediante SDS-PAGE en geles al 10%. Las proteínas fueron transferidas a membranas Immobilon-P (Millipore) e incubadas con anticuerpo monoclonal αDBP B6. El anticuerpo secundario era un anticuerpo anti-ratón de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (BioRad). El procedimiento de transferencia Western y las incubaciones se realizaron según el protocolo proporcionado por Millipore. Los complejos fueron visualizados con el sistema de detección ECL según el protocolo del fabricante (Amersham). La expresión de DBP codificada por ts125E2A era estable durante al menos 16 pases, lo que equivale a aproximadamente 40 duplicaciones celulares (Figura 34). No se observó descenso en los niveles de DBP durante este período de cultivo, indicando que la expresión de ts125E2A era estable, incluso en ausencia de presión de selección por G418.

Ejemplo 16

Generación de líneas celulares de empaquetamiento que expresan tTA

A. Generación de un plásmido a partir del cual es expresado el gen tTA.

PcDNA3.1-tTA: El gen tTA, una fusión de los genes tetR y VP16, fue separado del plásmido pUHD 15-1 (Gossen y Bujard, 1992) mediante digestión utilizando las enzimas de restricción *Bam*HI y *Eco*RI. Primero, pUHD15-1 fue digerido con *Eco*RI. El plásmido linealizado fue tratado con la enzima de Klenow en presencia de dNTP para rellenar los extremos cohesivos *Eco*RI. Después, el plásmido fue digerido con *Bam*HI. El fragmento resultante, de 1025 pb de longitud, fue purificado en agarosa. Con posterioridad, el fragmento fue utilizado en una reacción de ligación con pcDNA3 3.1 HYGRO (-) (Invitrogen) digerido con *Bam*HI/*Eco*RV dando lugar a pcDNA3.1tTA. Tras la transformación en *E. Coli* DH5α competente (Life Techn.) y el análisis de las colonias resistentes a la ampicilina, se seleccionó un clon que mostraba un patrón de digestión como el esperado para pcDNA3.1-tTA.

B. Transfección de PER.C6 y PER.C6/E2A con el vector de expresión tTA; formación de colonias y generación de líneas celulares

Un día antes de la transfección, se sembraron 2x10⁶ células PER.C6 o PER.C6/E2A por placa de cultivo de tejidos de 60 mm (Greiner) en medio esencial modificado de Dulbecco (DMEM, Gibco BRL) con un suplemento de FBS al 10% (JRH) y MgCl₂ 10 mM y se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 10%. Al día siguiente, las células fueron transfectadas con 4-8 μg del ADN plasmídico pcDNA3.1-tTA utilizando LipofectAMINE PLUS[®] Reagent Kit según el protocolo normalizado del proveedor (Gibco BRL). Las células fueron incubadas con la mezcla LipofectAMINE PLUS[®]-DNA durante cuatro horas a 37°C y CO₂ al 10%. Después, se añadieron 2 ml de DMEM con un suplemento de FBS al 20% y MgCl₂ 10 mM y las células fueron incubadas adicionalmente a 37°C y CO₂ al 10%. Al día siguiente, las células fueron lavadas con PBS e incubadas en DMEM de nueva aportación con un suplemento de FBS al 10%, MgCl₂ 10 mM a 37°C (PER.C6) o a 39°C (Per.C6/E2A) en atmósfera de CO₂ al 10% durante tres días. Después, los medios fueron intercambiados por medios de selección; las células PER.C6 fueron incubadas con DMEM con un suplemento de FBS al 10%, MgCl₂ 10 mM y 50 μg/ml de higromicina B (GIBCO) mientras las células PER.C6/E2A fueron mantenidas en DMEM con un suplemento de FBS al 10%, MgCl₂ 10 mM y 100 μg/ml de higromicina B.

Las colonias de células que resistían la selección aparecían en tres semanas mientras las células no resistentes morían durante este período.

A partir de cada transfección, se escogió un número de colonias celulares resistentes a la higromicina, independientes raspando las células de la placa con una pipeta y se colocaron en placas de 2,5 cm² (Greiner) para un crecimiento adicional en DMEM conteniendo FBS al 10%, MgCl₂ 10 mM y con un suplemento de 50 μg/ml (células PER.C6) o 100 μg/ml (células PER.C6/E2A) de higromicina en una atmósfera de CO₂ al 10% y a 37°C o 39°C, respectivamente.

A continuación, se determinó si estas colonias celulares resistentes a la higromicina expresaban la proteína tTA funcional.

Por lo tanto, los cultivos de las células PER.C6/tTA o PER/E2A/tTA fueron transfectados con el plásmido pUHC 13-3 que contiene el gen informador de la luciferasa bajo el control del promotor 7xtetO (Gossens y Bujard, 1992). Para

demostrar que la expresión de la luciferasa estaba mediada por tTA, la mitad de los cultivos se mantuvo en medio sin doxiciclina. La otra mitad se mantuvo en medio con 8 µg/ml de doxiciclina (Sigma). Este último fármaco es un análogo de tetraciclina y se une a tTA e inhibe su actividad. Todas las líneas celulares PER.C6/tTA y PER/E2A/tTA rindieron elevados niveles de luciferasa, indicando que todas las líneas celulares expresaban la proteína tTA (Figura 35). Además, la expresión de la luciferasa resultaba sumamente suprimida cuando las células eran tratadas con doxiciclina. Colectivamente, los datos mostraron que los clones de las células PER.C6 y PER/E2A resistentes a la higromicina aislados y establecidos expresaban todos tTA funcional.

Tabla I

Serotipo	Elución [NaCl] mM	VP/ml	DICC50	Razón \log_{10} VP/DICC50
1	597	$8,66 \times 10^{10}$	$5,00 \times 10^7$	3,2
2	574	$1,04 \times 10^{12}$	$3,66 \times 10^{11}$	0,4
3	131	$1,19 \times 10^{11}$	$1,28 \times 10^7$	4,0
4	260	$4,84 \times 10^{11}$	$2,50 \times 10^8$	3,3
5	533	$5,40 \times 10^{11}$	$1,12 \times 10^{10}$	1,7
6	477	$1,05 \times 10^{12}$	$2,14 \times 10^{10}$	1,7
7	328	$1,68 \times 10^{12}$	$2,73 \times 10^9$	2,4
9	379	$4,99 \times 10^{11}$	$3,75 \times 10^7$	4,1
10	387	$8,32 \times 10^{12}$	$1,12 \times 10^9$	3,9
12	305	$3,64 \times 10^{11}$	$1,46 \times 10^7$	4,4
13	231	$4,37 \times 10^{12}$	$7,31 \times 10^8$	3,8
15	443	$5,33 \times 10^{12}$	$1,25 \times 10^9$	3,6
16	312	$1,75 \times 10^{12}$	$5,59 \times 10^8$	3,5
17	478	$1,39 \times 10^{12}$	$1,45 \times 10^9$	3,0
19	430	$8,44 \times 10^{11}$	$8,55 \times 10^7$	4,0
20	156	$1,41 \times 10^{11}$	$1,68 \times 10^7$	3,9
21	437	$3,21 \times 10^{11}$	$1,12 \times 10^8$	3,5
22	365	$1,43 \times 10^{12}$	$5,59 \times 10^7$	3,4
23	132	$2,33 \times 10^{11}$	$1,57 \times 10^7$	4,2
24	405	$5,12 \times 10^{12}$	$4,27 \times 10^8$	4,1
25	405	$7,24 \times 10^{11}$	$5,59 \times 10^7$	4,1
26	356	$1,13 \times 10^{12}$	$1,12 \times 10^8$	4,0
27	342	$2,00 \times 10^{12}$	$1,28 \times 10^8$	4,2
28	347	$2,77 \times 10^{12}$	$5,00 \times 10^7$	4,7
29	386	$2,78 \times 10^{11}$	$2,00 \times 10^7$	4,1
30	409	$1,33 \times 10^{12}$	$5,59 \times 10^8$	3,4
31	303	$8,48 \times 10^{10}$	$2,19 \times 10^7$	3,6
33	302	$1,02 \times 10^{12}$	$1,12 \times 10^7$	5,0
34	425	$1,08 \times 10^{12}$	$1,63 \times 10^{11}$	0,8
35	446	$3,26 \times 10^{12}$	$1,25 \times 10^{11}$	1,4
36	325	$9,26 \times 10^{12}$	$3,62 \times 10^9$	3,4
37	257	$5,86 \times 10^{12}$	$2,8 \times 10^9$	3,3
38	337	$3,61 \times 10^{12}$	$5,59 \times 10^7$	4,8
39	241	$3,34 \times 10^{12}$	$1,17 \times 10^7$	4,5
42	370	$1,95 \times 10^{12}$	$1,12 \times 10^8$	4,2
43	284	$2,42 \times 10^{12}$	$1,81 \times 10^8$	4,1
44	295	$8,45 \times 10^{11}$	$2,00 \times 10^7$	4,6
45	283	$5,20 \times 10^{11}$	$2,99 \times 10^7$	4,2
46	282	$9,73 \times 10^{12}$	$2,50 \times 10^8$	4,6
47	271	$5,69 \times 10^{11}$	$3,42 \times 10^7$	4,2
48	264	$1,68 \times 10^{12}$	$9,56 \times 10^8$	3,3
49	332	$2,20 \times 10^{12}$	$8,55 \times 10^7$	4,4
50	459	$7,38 \times 10^{12}$	$2,80 \times 10^9$	3,4
51	450	$8,41 \times 10^{11}$	$1,88 \times 10^8$	3,7

Leyenda de la tabla I:

Todos los adenovirus humanos utilizados en los experimentos de neutralización fueron producidos en células PER.C6 (número de consigna de la ECACC 96022940) (Fallaux y col., 1998) y purificados en CsCl como se

describe en el ejemplo 1. Se muestra la concentración de NaCl a la cual eluían los diferentes serotipos de la columna de HPLC. Las partículas de virus/ml (VP/ml) fueron calculadas a partir de un patrón de Ad5. El título del experimento (DICC50) fue determinado en células PER.C6 (número de consigna ECACC 96022940) como se describe en el ejemplo 1 mediante titulaciones realizadas paralelamente al experimento de neutralización. La DICC50 se muestra para los 44 virus utilizados en este estudio y refleja la dilución del virus necesaria para obtener un ECP en el 50% de los pocillos al cabo de 5 días. La razón de VP/DICC50 se representa como log₁₀ y es una medida de la infectividad de los diferentes lotes sobre las células PER.C6 (número de consigna en la ECACC 96022940).

5

10

Tabla II: Los virus AdApt35.LacZ escapan de la neutralización por el suero humano.

Virus	Dilución de suero humano						
	Sin Suero	10x	50x	250x	1250x	6250x	
AdApt.LacZ Moi:5 VP/cel	100%	0%	0%	0%	1%	40%	80%
AdApt.LacZ 250 µl de producto lisado bruto	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Tabla III: Porcentaje de muestras de fluido sinovial que contienen actividad neutralizadora

	% de muestras de FS con NA (todas positivas)	% de muestras de FS con NA (positivas a una dilución > 64x)
Ad5	72	59
Ad26	66	34
Ad34	45	19
Ad35	4	0
Ad48	42	4

15

Tabla IV: Número de focos obtenidos con los diferentes constructos de expresión de E1 en experimentos de transformación con BRK.

Medio de focos/placa:

	Constructo	1 µg	5 µg
Experimento 1	PIG.E1A.E1B	nd	60
	PIG.E1A.E1B	nd	35
	PRSVAd35E1	0	3
	PIG.Ad35.E1	3	7
Experimento 2	PIG.E1A.E1B	37	nd
	PIGAd35.E1	nd	2
Experimento 3	PIG.E1A.E1B	nd	140
	PIG.Ad35.E1	nd	20
	PIG270	nd	30

20

Referencias

Abrahamsen K, et al. (1997) Construction of an adenovirus type 7a E1A- vector. J Virol 71:8946-8951.
 Athappilly FK, et al. (1994). The refined crystal structure of hexon, the major coat protein of adenovirus type 2, at 2.9 Å resolution. J. Mol. Biol. 242, 430-455.
 Basler CF, et al. (1996). Sequence of the immunoregulatory early region 3 and flanking sequences of adenovirus type 35. Gene 170:249-54
 Bridge E, et al. (1993) Adenovirus early region 4 and viral DNA synthesis. Virology 193, 794-801.
 Brody SL and Crystal RG. (1994) Adenovirus mediated in vivo gene transfer. Ann. N. Y. Acad. Sci. 716:90-101.
 Boshart M, et al. (1985). A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. Cell 41, 521-530,
 Dijkema R, et al. (1979). Transformation of primary rat kidney cells by DNA fragments of weakly oncogenic adenoviruses. J. Virol. 32, No 3, 943-950.
 Fallaux FJ, et al. (1998). New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation

25

30

- of replication competent adenoviruses. *Hum. Gene Ther.* 9, 1909-1917.
- Gossen M, and H Bujard (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89; 5547-5551.
- 5 Flomenberg PR, et al. (1987). Molecular epidemiology of adenovirus type 35 infections in immunocompromised hosts. *J. Infect Dis.* 155(6): 1127-34.
- Francki RIB, et al. (1991). Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the international Committee on taxonomy of viruses. *Arch. Virol. Suppl.* 2: 140-144.
- Gahery-Segard H, et al. (1998). Immune response to recombinant capsid proteins of adenovirus in humans: Antifiber and anti-penton base antibodies have a synergistic effect on neutralizing activity. *J. Virol.* 72, 2388-2397.
- 10 He T-C, et al. (1998). A simplified system for generating adenovirus recombinants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 2509-2514.
- Hierholzer JC, et al. (1988) Adenoviruses from patients with AIDS: a plethora of serotypes and a description of five new serotypes of subgenus D (types 43-47). *J. Infect. Dis.* 158, 804-813.
- 15 De Jong et al. (1983). Adenovirus isolates from urine of patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Lancet* 1(8337): 1293-1296.
- Kay R, et al. (1990). Expression cloning of a cDNA encoding M1/69. *J. Immunol.* 145, 1952-1959.
- Kang WG, et al. (1989a). Molecular cloning and physical mapping of the DNA of human adenovirus type 35. *Acta Microbiol Hung* 36(1): 67-75.
- 20 Kang WG, et al. (1989b). Relationship of E1 and E3 regions of human Ad35 to those of human adenovirus subgroups A, C and D. *Acta Microbiol Hung* 36(4): 445-57.
- Levero M, et al. (1991). Defective and nondefective adenovirus vectors for expressing foreign genes in vitro and in vivo. *Gene* 101, 195-202.
- Li QG, et al. (1991). Genetic relationship between thirteen genomes of types of adenovirus 11, 34, and 35 with different tropisms. *Intervirology* 32, 338-350.
- 25 Prince HM. (1998). Gene transfer: a review of methods and applications. *Pathology* 30(4), 335-347.
- Robbins PD and Ghivizzani SC. (1998). Viral vectors for gene therapy. *Pharmacol Ther.* 80, 35-47.
- Schnurr, D and Dondero, M.E. (1993). Two new candidate adenovirus serotypes. *Intervirology* 36, 79-83.
- Schulick AH, et al. (1997). Established immunity precludes adenovirus-mediated gene transfer in rat carotid arteries. Potential for immunosuppression and vector engineering to overcome barriers of immunity. *J. Clin. Invest.* 99(2), 209-
- 30 19.
- Shabram PW, et al. (1997) Analytical anion-exchange HPLC of recombinant type-5 adenoviral particles. *Hum. Gene Ther.* 8(4): 453-465.
- Toogood CI et al. (1989) *J. Gen. Virol.* 70, 3203-3214
- 35 Toogood CI, et al. (1989) The adenovirus type 40 hexon: sequence, predicted structure and relationship to other adenovirus hexons. *J. Gen. Virol.* 70, 3203-14.
- Valderrama-Leon G, et al. (1985) Restriction endonuclease mapping of adenovirus 35, a type isolated from immunocompromised hosts. *J Virol.* 56(2):697-50.
- Wadell G. (1984) Molecular epidemiology of adenoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 110, 191-220.
- White E. (1995) Regulation of p53-dependent apoptosis by Ela and E1b. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 199, 34-58

LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> Crucell Holland B.V.
 Havenga, Menzo J.E.
 Bout, Abraham
 Vogels, Ronald

<120> Serotipo de Adenovirus y usos de los Mismos

10 <130> 0035 EP 01 DIV

<140> EP 04077434.1
 <141> 2004-08-27

15 <150> EP 99201545.3
 <151> 1999-05-17

<150> EP 00201738.2
 <151> 2000-05-16

20 <160> 88

<170> PatentIn Ver. 2.1

25 <210> 1
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: conector
 que contiene un sitio Pacl

<220>
 35 <221> característica_misc
 <222> (1)..(23)

<400> 1
 aattgtctta attaaccgct taa 23

40 <210> 2
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:
 oligonucleótido

50 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(19)

<400> 2
 55 aattgtctta attaaccgc 19

<210> 3
 <211> 19
 <212> ADN

60 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:
 oligonucleótido

65

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(19)

5 <400> 3
 aattgcggtt aattaagac 19

<210> 4
 <211> 39
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 15 ITR-EPH

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(39)

20 <400> 4
 cggaattctt aattaagtta acatcatcaa taatatacc 39

<210> 5
 25 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 30 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 Ad101

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (1).. (20)

35 <400> 5
 tgattcacat cggtcagtgc 20

<210> 6
 <211> 23
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 45 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 delta E2A.SnaBI

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(23)

50 <400> 6
 ggcgtacgta gccctgctga aag 23

55 <210> 7
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 delta E2A.DBP-start

65 <220>
 <221> característica_misc

<222> (1)..(35)

<400> 7
 ccaatgcatt cgaagtactt ccttctccta taggc 35

5

<210> 8
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador delta E2A.DBP-stop

15

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(22)

<400> 8
 ccaatgcata cggcgcagac gg 22

20

<210> 9
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 delta E2A.BamHI

30

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(21)

<400> 9
 gagtggatc ccatggacga g 21

35

<210> 10
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 LTR-1

45

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(47)

50

<400> 10
 ctgtacgtac cagtgactg gcctaggcat ggaaaaatac ataactg 47

<210> 11
 <211> 64
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 LTR-2

60

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(64)

65

<400> 11

ES 2 372 823 T3

gcggtaccctt cgaacccatgg taagcttggt accgctagcg ttaaccgggc gactcagtca 60
 atcg 64

5 <210> 12
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 HSA1

15 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(28)

<400> 12
 gcgccaccat gggcagagcg atggtggc 28

20 <210> 13
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 HSA2

30 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(50)

<400> 13
 gttagatcta agctgtcga catcgatcta ctaacagtag
 agatgtagaa 50

35 <210> 14
 <211> 10
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:
 oligonucleótido

45 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(10)

50 <400> 14
 ttaagtcgac 10

55 <210> 15
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: conector

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(23)

<400> 15

aattgtctta attaaccgca att 23

<210> 16
 <211> 67
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:
 10 oligonucleótido PLL-1

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(67)
 15

<400> 16 _ _
 gccatcccta ggaagcttgg taccggtgaa ttcgctagcg ttaacggatc ctctagacga 60
 gatctgg 67

<210> 17
 <211> 67
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:
 25 oligonucleótido PLL-2

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(67)
 30

<400> 17
 ccagatctcg tctagaggat ccgttaacgc tagcgaattc accggtacca agcttcctag 60
 ggatggc 67

<210> 18
 <211> 39
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 40 CMVplus

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(39)
 45

<400> 18
 gatcggtagc actgcagtgg tcaatattgg ccattagcc 39
 50

<210> 19
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 CMVminA

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(29)
 60

<400> 19
 gatcaagctt ccaatgcacc gttcccggc 29

5 <210> 20
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador

15 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(32)

<400> 20
 ggggtggcca ggttacctct aggctttgc aa 32

20 <210> 21
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador

30 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(29)

<400> 21
 ggggggatcc ataacaagt tcagaatcc 29

35 <210> 22
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 delta hex1

45 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(18)

<400> 22
 cctggtgctg ccaacagc 18

50 <210> 23
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 delta hex2

60 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(30)

<400> 23
 ccggatccac tagtggaag cgggcgcgcg 30

65 <210> 24

<211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 delta hex3

10 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(35)

15 <400> 24
 ccggatccaa ttgagaagca agcaacatca acaac 35

20 <210> 25
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 delta hex4

30 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(19)

35 <400> 25
 gagaaggca tggaggctg 19

40 <210> 26
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 Hex-up2

50 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(32)

55 <400> 26
 gactagtcaa gatggcyacc cchtgatga tg 32

60 <210> 27
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 Hex-do2

70 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(33)

75 <400> 27
 gctggccaat tgttatgk tkgcgttrcc ggc 33

80 <210> 28
 <211> 20
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 5 DP5-F
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(20)
 10
 <400> 28
 ctgttgctgc tgctaatagc 20
 <210> 29
 15 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 DP5-R
 <220>
 <221> característica_misc
 25 <222> (1)..(32)
 <400> 29
 cgcgatcct gtacaactaa ggggaataca ag 32
 30 <210> 30
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 DP3-F
 <220>
 40 <221> característica_misc
 <222> (1)..(33)
 <400> 30
 45 cgcgatccc ttaaggcaag catgtccatc ctt 33
 <210> 31
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 DP3-3R
 <220>
 55 <221> característica_misc
 <222> (1)..(27)
 <400> 31
 60 aaaacacggt ttacgcgtcg accttc 27
 <210> 32
 <211> 33
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador P3-
 for

5 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(33)

<400> 32
 10 gctcgatgta caatgaggag acgagccgtg cta 33

<210> 33
 <211> 33
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador P3-
 rev

20 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(33)

<400> 33
 25 gctcgactta agttagaag tgcggttga aag 33

<210> 34
 <211> 35
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 P17F

35 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(35)

<400> 34
 40 gctcgatgta caatgaggcg tgcggtgtg tcttc 35

<210> 35
 <211> 34
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 P17R

50 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(34)

<400> 35
 55 gctcgactta agttagaagg tgcgactga aagc 34

<210> 36
 <211> 42
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador NY-

up

5 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(42)

<400> 36
 cgacatatgt agatgcatta gtttggtta tgttcaacg tg 42

10 <210> 37
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador NY-down

20 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(18)

<400> 37
 ggagaccact gccatggt 18

25 <210> 38
 <211> 10
 <212> ADN
 <213> adenoviridae

30 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(10)
 <223> /obsérvese="Secuencia parcial de una ITR de adenovirus"

35 <400> 38
 catcatcaat 10

40 <210> 39
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> adenoviridae

45 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(14)
 <223> /obsérvese="Secuencia parcial de una ITR de adenovirus"

50 <400> 39
 ccaataatat acct 14

55 <210> 40
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> adenoviridae

60 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(21)
 <223> /obsérvese="Secuencia parcial de una ITR de adenovirus"

65 <400> 40
 aggtatatta ttgatgatgg g 21

<210> 41
 <211> 18
 <212> ADN
 5 <213> adenoviridae

 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(18)
 10 <223> /obsérvese="Secuencia parcial de una ITR de
 adenovirus"

 <400> 41
 15 catcatcaat aatatacc 18

 <210> 42
 <211> 13
 <212> ADN
 20 <213> adenoviridae

 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(13)
 25 <223> /obsérvese="Secuencia parcial de una ITR de
 adenovirus"

 <400> 42
 catcatcaat aat 13

 <210> 43
 <211> 47
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligo
 ExSalPacF

 <220>
 40 <221> característica_misc
 <222> (1)..(47)

 <400> 43
 45 tcgatggcaa acagctatta tgggtattat gggtcgaat taattaa 47

 <210> 44
 <211> 47
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligo
 ExSalPacR

 <220>
 55 <221> característica_misc
 <222> (1)..(47)

 <400> 44
 60 tcgattaatt aattcgaacc cataatacc ataatagctg ttgcca 47

 <210> 45
 <211> 42
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 PCLIPMSF

5 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(42)

<400> 45
 10 ccccaattgg tcgaccatca tcaataatat acctatttt gg 42

<210> 46
 <211> 22
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 pCLIPBSRGI

20 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(22)

<400> 46
 25 gcgaaaattg tcacttctg tg 22

<210> 47
 <211> 37
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ecolinker+

35 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1). (37)

<400> 47
 40 aattcggcgc gccgtcgacg atatcgatag cggccgc 37

<210> 48
 <211> 37
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Ecolinker-

50 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(37)

<400> 48
 55 aattgggcc gctatcgata tcgtcgacgg cgcgccg 37

<210> 49
 <211> 49
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: conector
 HindXba+

65

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(49)

5 <400> 49
 agctctagag gatccgtaa cgctagcga ttcaccgga ccaagctta 49

<210> 50
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: conector
 HindXba-

15

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(49)

20

<400> 50
 ctagtaagct tggtagcgt gaattcgcta gcgtaacgg atcctctag 49

<210> 51
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 35F1

30

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(44)

35

<400> 51
 cggaattct aattaatcga catcatcaat aatatacct atag 44

40

<210> 52
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 35R2

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(33)

50

<400> 52
 gttggtccta ggctgacacc tacgtaaaaa cag 33

55

<210> 53
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 35F3

65

<220>
 <221> característica_misc

<222> (1)..(30)
 <400> 53
 5 tggaggagat ctggtgagta ttgggaaaac 30
 <210> 54
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 35R4
 15 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(37)
 <400> 54
 20 cggaattctt aattaaggga aatgcaaadc tgtgagg 37
 <210> 55
 <211> 34
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 35F5
 30 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(34)
 35 <400> 55
 cggaattcgc ggccgcggtg agtattggga aaac 34
 <210> 56
 <211> 22
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 45 35R6
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(22)
 50 <400> 56
 cgccagatcg tctacagaac ag 22
 <210> 57
 55 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 60 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 35F7
 <220>
 <221> característica_misc
 65 <222> (1).. (23)

<400> 57
 gaatgctggc ttcagttgta atc 23

5 <210> 58
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 35R8

15 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(42)

<400> 58
 cggaattcgc gcccgcattt aatcatcat caataatata cc 42

20 <210> 59
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 35F11

30 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(33)

<400> 59
 ggggtaccga attctcgcta ggggtatttat acc 33

35 <210> 60
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 35F10

45 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(38)

<400> 60
 gctctagacc tgcaggttag tcagtttctt ctccactg 38

50 <210> 61
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 HBV-F

60 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(27)

65 <400> 61
 ggctctagag atccttcgcg ggacgtc 27

<210> 62
 <211> 26
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 HBV-R
 10
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(26)

 15 <400> 62
 ggcgaattca ctgccttcca ccaagc 26

 <210> 63
 <211> 12
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:
 25 oligonucleótido A-P1

 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(12)
 30
 <400> 63
 ctggtgggta at 12

 <210> 64
 <211> 14
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:
 40 oligonucleótido A-P2

 <220>
 <221> característica_misc
 45 <222> (1)..(14)

 <400> 64
 taaccaccag acgt 14

 50 <210> 65
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 55 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 DF35-1

 <220>
 60 <221> característica_misc
 <222> (1)..(20)

 <400> 65
 cactcaccac ctccaattcc 20
 65
 <210> 66

<211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 DF35-2

10 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(32)

<400> 66
 cgggatcccg tacgggtaga cagggttgaa gg 32

15 <210> 67
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 DF35-3

25 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(49)

<400> 67
 30 cgggatccgc tagctgaaat aaagtttaag tgttttatt taaatcac 49

<210> 68
 <211> 21
 <212> ADN

35 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 DF35-4

40 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(21)

45 <400> 68
 ccagttgcat tgcttggtg g 21

<210> 69
 <211> 27
 <212> ADN

50 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 degenerado

55 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(27)

60 <400> 69
 cckgtstacc cgtacgaaga tgaaagc 27

<210> 70
 <211> 30
 <212> ADN

65

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 5 degenerado
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(30)
 10
 <400> 70
 ccggctagct cagtcattt ctctgatata 30
 <210> 71
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 20 355ITR
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(31)
 25
 <400> 71
 gatccggagc tcacaacgtc atttccac g 31
 <210> 72
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 35 353ITR
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(25)
 40
 <400> 72
 cggaattcgc ggccgattt aaatc 25
 45
 <210> 73
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 55 35DE4
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(30)
 60
 <400> 73
 cccaagcttg cttgtgata tatattgtg 30
 <210> 74
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:
 oligonucleótido TATA-plus

5 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(45)

<400> 74
 10 agcttctta taaatttca gtgtagact agtaaattgc ttaag 45

<210> 75
 <211> 45
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial:
 oligonucleótido TATA-min

20 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(45)

25 <400> 75
 agctcttaag caatttacta gtctaact gaaaatttat aagaa 45

<210> 76
 <211> 37
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 tet3

35 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(37)

40 <400> 76
 ccggagctcc atggcctaac tcgagttac cactccc 37

<210> 77
 45 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 tet5

50 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(30)

<400> 77
 cccaagctta gctcgacttt cacttttctc 30

60 <210> 78
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligo BB1

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(17)
 5
 <400> 78
 gtccttaggc cacgggg 17
 <210> 79
 10 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligo BB2
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(13)
 20
 <400> 79
 gtggcctagg cac 13
 <210> 80
 25 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 270F
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(20)
 35
 <400> 80
 cacctctgcc taatcatctc 20
 <210> 81
 40 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 270R
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(27)
 50
 <400> 81
 gctctagaaa ttccactgcc ttcacc 27
 55
 <210> 82
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
 DBPpcr1
 65
 <220>
 <221> característica_misc

ES 2 372 823 T3

<222> (1)..(35)

<400> 82
5 cgggatccgc caccatggcc agtcggaag aggag 35

<210> 83
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador
DBPpcr2

15 <220>
<221> característica_misc
<222> (1)..(33)

<400> 83
20 cggaattctt aaaaatcaaa ggggttctgc cgc 33

<210> 84
<211> 34794
<212> ADN
25 <213> adenoviridae

<220>
<221> característica_misc
<222> (1)..(34794)
30 <223> /obsérvese="Secuencia de ácido nucleico de Ad35"

<400> 84
catcatcaat aatatacctt atagatggaa tggtgccaat atgtaaatga ggtgatttta 60
aaaagtgtgg gccgtgtggt gattggctgt ggggttaacg gttaaaagg gcggcgcggc 120
cgtgggaaaa tgacgtttta tgggggtgga gtttttttgc aagttgtcgc gggaaatggt 180
acgcataaaa aggcttcttt tctcacggaa ctacttagtt ttcccacggt atttaacagg 240
aaatgaggta gttttgaccg gatgcaagtg aaaattgctg attttcgcgc gaaaactgaa 300
tgaggaagtg tttttctgaa taatgtggtt tttatggcag ggtggagtat ttgttcaggg 360

ccaggtagac tttgacccat tacgtggagg tttcgattac cgtgtttttt acctgaattt 420
 ccgcgtagcc tgtcaaagtc ttctgttttt acgtaggtgt cagctgatcg ctagggtatt 480
 tataacctcag ggtttgtgtc aagaggccac tcttgagtgc cagcgagaag agttttctcc 540
 tctgcccggg cagtttaata ataaaaaat gagagatttg cgatttctgc ctcaggaaat 600
 aatctctgtct gagactggaa atgaaatatt ggagcttgtg gtgcacgccc tgatgggaga 660
 cgatccggag ccacctgtgc agctttttga gcttcctacg cttcaggaac tgtatgattt 720
 agaggttagag ggatcggagg attctaataga ggaagctgtg aatggctttt ttaccgattc 780
 tatgctttta gctgctaata aaggattaga attagatccg cctttggaca ctttcaatac 840
 tccagggggtg attgtggaaa gcggtacagg tgtaagaaaa ttacctgatt tgagtccgtg 900
 ggactgtgat ttgactgtct atgaagacgg gtttcctccg agtgatgagg aggaccatga 960
 aaaggagcag tccatgcaga ctgcagcggg tgagggagtg aaggctgcca atgttggtt 1020
 tcagttggat tgcccggagc ttctctggaca tggctgtaag tcttgtgaat ttcacaggaa 1080
 aaatactgga gtaaaaggaa tgttatgttc gctttgttat atgagaacgc actgccactt 1140
 tattttacagt aagtgtgttt aagttaaaat ttaaaggaat atgctgtttt tcacatgtat 1200
 attgagtgtg agttttgtgc ttcttattat aggtcctgtg tctgatgctg atgaatcacc 1260
 atctcctgat tctactacct cacctcctga tattcaagca cctgttcctg tggacgtgctg 1320
 caagcccatt cctgtgaagc ttaagcctgg gaaacgtcca gcagtggaga aacttgagga 1380
 cttgttacag ggtggggagc gacctttgga cttgagtaca cggaacgtc caagacaata 1440
 agtgttccat acctgtgtt acttaagtg acgtcaatat ttgtgtgaga gtgcaatgta 1500
 ataaaaatat gttactgtt cactggtttt tattgctttt tgggcgggga ctcaggata 1560
 taagtagaag cagacctgtg tggtagctc aggaagacta ggcaactgtt agagagcgtt tccgacggag 1680
 gggccatttt ggaagacctt aggaagacta tggtagctc tggtagctc tggtagctc tggtagctc 1740
 tctccggttt ttgtagctc tggtagctc tggtagctc tggtagctc tggtagctc 1800
 aacaggacta taaacaagaa tttgaaaagt tttgaaaagt tttatcagtt tttagctttt 1860
 ctcttaattt gggccatcag gttcacttta aagaaaaagt tttatatta gataaatgga 1920
 caaccccagg tagaactgt gctgctgtgg aggggatac ttttgattt catagccaca gcattgtgga 1980
 tcccgcagac tcatttcagc aggggatac tcttaggta ctggccagtg cagcctttgg 2040
 gaacatggaa ggttcgcaag atgaggacaa tcatgccagc ggttctggag gaggaacagc 2100
 gtgtagcggg aatcctgagg catccaccgg ctccagtgga ggagggggag tagctgactt 2160
 aagaggacaa cccgagagcc ggctggacc atctactggt atctactgct actggacggg atagggggct 2220
 gtctcctgaa ctgcaacggg gtggtactga tgctagatct gagttggctt taagttaa 2280
 taagagggag cgtcctgaaa ccatttgggt gcatgaggtt cagaagagg gaagggatga 2340
 gagtgcgaga agtttctgta ttgtaggaga aatattcact ggaacaggtg aaaacatgtt ggttggagcc 2400
 agaggatgat tggcgggtg ccttaaaaa ttatgccaag atagctttga ggctgata 2460
 acagtataag atcagtagac ggattaatat ccggaatgct tgttacatat ctggaaatgg 2520
 ggctgaggtg gtaatagata ctcaagacaa gacagttat agatgctgca tgatggat 2580
 gtggcctgga gatctcgta tggagcagt cacttttcta aatgttaagt tttagggaga 2640
 tggttataat ggaatagtg ttatggccaa taccaaaact atattgcatg gttgtagctt 2700
 ttttggtttc aacaatacct gtgtagatgc ctggggacag gttaggtac gggggtgtag 2760
 tttctatgct gttggattg ccacagctgg cagaaccaag agtcaattgt ctctgaagaa 2820
 atgcatattc caaagatgta acctgggcat tctgaatgaa ggcgaagcaa ggtccctca 2880
 ctgctgttct acagataact gatgttttat tttaatatag ggaatgcca cgtaaagca 2940
 taacatgatt tgtggtgctt ccgatgagag gccttatcaa atgctcactt gtgctggtg 3000
 gcattgtaat atgctggcta ctgtgcatat tgtttcccat caacgcaaaa aatggcctgt 3060
 ttttgatcac aatgtgttga ccaagtgcac catgcatgca ggtgggctga gaggaatgtt 3120
 tatgccttac cagtgtaaac tgaatcatgt gaaagtgtt ttggaaccag atgccttttc 3180
 cagaatgagc ctaacaggaa tctttgacat gaacacgcaa atctggaaga tctgaggta 3240
 tgatgatac agatcggagg tgcgcatg cgaatgcgga ggcaagcatg ccaggttcca 3300
 gccggtgtgt gtatagtgta ccgaagatct cagaccgat catttggtta ttgcccgcac 3360
 tggagcagag ttcggatcca gtggagaaga aactgactaa ggtgagtatt gggaaaactt 3420
 tggggtggga ttttcagatg gacagattga gtaaaaaatt gtttttctg tcttgcagct 3480
 gacatgagtg gaaatgctt ttttaagggg ggagtcttca gcccttatct gacagggcgt 3540
 ctcccattct gggcaggagt tcgtcagaat gttatgggat ctactgtgga tggagacc 3600
 gttcaaccog ccaattcttc aacgctgacc tatgctactt taagttcttc acctttggac 3660
 gcagctgcag ccgctgccgc cgctctgtc gccgctaaca ctgtgcttg aatgggttac 3720
 tatggaagca tcgtggctaa ttccacttcc tctaataacc cttctacact gactcaggac 3780
 aagttacttg tccttttggc ccagctggag gctttgacc aacgtctgg tgaacttct 3840
 cagcaggtgg ccgagttgag agtacaact gactctgctg tcggcacggc aaagtctaaa 3900
 taaaaaaat tccagaatca atgaataat aaacgagctt gttgttgatt taaaatcaag 3960
 tgtttttatt tcatttttgc cgcacggat gccttgacc accgatctcg atcattgaga 4020
 actcggtgga tttttccag aatcctatag aggtgggatt gaatgtttag atacatgggc 4080
 attaggccgt ctttgggtg gagatagctc cattgaaggg attcatgctc cggggtagtg 4140
 ttgtaaatca cccagtcata caaagtcgc agtgcattgt gttgcacaa atcttttga 4200
 agtaggctga ttgccacaga taagcccttg gtgtaggtt ttacaaacc gttgagctgg 4260
 gagggtgca ttcgaggtga aattatgtgc attttgatt ggatttttaa gttggcaata 4320

ES 2 372 823 T3

ttgccgccaa gatcccgctt tggggtcatg ttatgaagga ctaccaagac ggtgatccg 4380
 gtacatttag gaaatttatac gtgcagcttg gatggaaaag cgtggaaaaa tttggagaca 4440
 cccttgtgtc ctccgagatt ttccatgcac tcatccatga taatagcaat ggggccgtgg 4500
 gcagcggcgc gggcaaacac gttccgtggg tctgacacat catagttatg ttcctgagtt 4560
 aaatcatcat aagccatttt aatgaatttg gggcggagcg taccagattg ggtatgaat 4620
 gttccttcgg gccccggagc atagttcccc tcacagattt gcatttccca agctttcagt 4680
 tctgagggtg gaatcatgtc cacctggggg gctatgaaga acaccgtttc gggggcgggg 4740
 gtgattagtt gggatgatag caagtttctg agcaattgag atttgccaca tccggtgggg 4800
 ccataaataa ttccgattac aggttgacag tggtagttta gggaacggca actgccgtct 4860
 tctcgaagca agggggccac ctcgttcatc atttccctta catgcatatt tccccgacc 4920
 aaatccatta ggaggcgtc tcctcctagt gatagaagt ctgtgatgta ggaaaagttt 4980
 ttcagcgggt tttagaccgtc agccatgggc attttggaaa gaggtttgctg caaaaagtct 5040
 agtctgttcc acagttcagt gatgtgttct atggcatctc gatccagcag acctcctcgt 5100
 ttccgcggtt tggacggctc ctggagtagg gtatgagacg atgggcgtcc agcgtgcca 5160
 gggttccagt ctccaagggt ctcaagtgtc gactcagggt tgtttccgtc acagtgaagg 5220
 ggtgtgccc tgcttggggc ctggccaggg tgcgctcag actcattctg ctggtggaga 5280
 acttctgtcg cttggcggcc tgtatgtcgg ccaagtagca gtttaccatg agttcgtagt 5340
 tgagcgcctc ggctgcgtg cctttggcgc ggagcttacc tttggaagt ttcttgcata 5400
 ccgggcaagta taggcatttc agcgcataca gcttgggcgc aaggaaaatg gattctgggg 5460
 agtatgcata cgccggcag gaggcccaaa cagtttccca tccccaccg cagggttaaat 5520
 ccggttcatt ggggtcaaaa acaagtttc cgcatattt ttgatgctg tcttacctt 5580
 tggctccat aagttcgtgt cctcgttgag tgacaaaacag gctgtccgta tctccgtaga 5640
 ctgattttac aggcctctc tccagtgag tgccctcgctc ttcttcgtac aggaactctg 5700
 accactctga tacaaggcg cgcgtccagg ccagcaciaa ggaggctatg tgggaggggt 5760
 agcgatcgtt gcacaaccag aagttccacct tttccaaagt atgcaaacac atgtcacct 5820
 cttcaacatc caggaatgtg attggcttgt aggtgtattt cacgtgacct ggggtccccg 5880
 ctgggggggt ataaaaggg cgggttcttt gctcttctc actgtcttcc ggatcgtgt 5940
 ccaggaaact cagctgttg ggtaggtatt cctctcga ggcggcag acctctgcac 6000
 tcaggttgtc agtttctaag aacgaggagg atttgatatt gacagtgccg gttgagatgc 6060
 ctttcatgag gttttcgtcc atttgtcag aaaacacaa tttttattg tcaagtttg 6120
 tggcaaatga tccatacagg gcgttgata aaagtttggc aatggatcgc atggtttggt 6180
 tcttttctt gtccgcgcgc tctttggcgg cgatgttgag ttggacatac tcgctgcca 6240
 ggcactcca ttoggggaag atagttgta attcatctg cagattctc acttgccacc 6300
 ctcgattatg caaggttaatt tggtgccac ctgcctcga aggggttcat 6360
 tggccaaca gagcctacct cctttcctag aacagaaagg gggagtggt tctagcataa 6420
 gttcatcggg agggctcga tccatggtaa agattcccgg aagtaaatcc ttatcaaaa 6480
 agctgatggg agtgggtca tctaaggcca tttgccattc tcgagctgc agtgccgct 6540
 catatgggtt aaggggact ccccagggca tgggatgggt gagagcagag gcatacatgc 6600
 cacagatgtc atagacgtag atgggatcct caaagatgcc tatgtaggtt ggatagcatc 6660
 gccccctct gatactgtc cgcacatagt catatagttc atgtgatgg gctagcagcc 6720
 ccggacccaa gtgggtcga ttgggttttt ctgttctgta gacgatctgg cgaagatgg 6780
 cgtgagaatt ggaagagatg gtgggtcttt gaaaaatggt gaaatgggca tgaggtagac 6840
 ctacagagtc tctgacaaa gttggcataag attcttgaag cttggttacc agttcggcg 6900
 tgacaagtac gcttagggcg cagtgtcaa gtgttcttg aatgatgtca taacctggtt 6960
 ggttttctt tccccacagt tcgggttga gaaggtattc ttccgcatcc ttccagttc 7020
 ctctagcgg aaaccgtct ttgtctgcac ggtaagatcc tagcatgtag aactgattaa 7080
 ctgcctgta agggcagcag ccttctcta cgggtagaga gtatgcttga gcagctttc 7140
 gtagcgaagc gtgagtaagg gcaaaggtgt ctctgaccat gactttgaga aattggtatt 7200
 tgaagtccat gtcgtcacag gctccctgtt cccagagttg gaagtctacc cgtttcttgt 7260
 agggcgggtt gggcaaacg aaagtaacat cattgaagag aatcttacc gctctgggca 7320
 taaaattgct agtgatgctg aaaggctgtg gtacttccgc tcgattgttg atcacctgg 7380
 cagctaggac gatttcgtcg aaaccgttga tgttgttcc tacgatgtat aattctatga 7440
 aacgcggcgt gcctctgacg tgaggtagct tactgagctc atcaaagggt aggtctgtgg 7500
 ggtcagataa ggcgtagtgt tcgagagccc attcgtgcag gtgaggattt gcatgtagga 7560
 atgatgacca aagatctacc gccagtgctg tttgtaactg gtcccgtac tgacgaaaat 7620
 gccggccaat tgccattttt tctggagtga cacagtagaa ggttctggg tcttgttgc 7680
 atcgatccca cttgagttta atggctagat cgtgggcat gtgacgaga cgtcttctc 7740
 ctgagagttt catgaccagc atgaaaggaa ctagtgttt gccaaaggat cccatccagg 7800
 tgtaagttc cacatcgtag gtcaggaaga gtcttctgt gcgaggatga gagccgatcg 7860
 ggaagaactg gatctctgc caccagtgg aggtttggct gttgatgtga tggaaagtaga 7920
 agtttctgag gcgcggcag cactcgtgtt tgtgcttga cagacggcg cagtagtgc 7980
 agcgttgca gggttgtatc tcgtgaatga gctgtacctg gcttccctg acgagaaat 8040
 tcaagggaa gccgaggcct ggcgattgta tctcgtgctc ttctatattc gctgtatcg 8100
 cctgttcaat tctgttctg atgggttca tgctgacgag cccccgggg aggcaagtcc 8160
 agacctcggc gcgggagggg cggagctgaa ggacgagagc gcgagcgtg gagctgtcca 8220
 gagtccgtg acgctgcgga ctcaggttag taggtagggg cagaagatta acttgcata 8280

ES 2 372 823 T3

tcttttccag	ggcgtgcggg	aggttcagat	ggtacttgat	ttccacaggt	tcgtttgtag	8340
agacgtcaat	ggcttgcagg	gttccgtgtc	ctttggggcg	cactaccgta	cccttgtttt	8400
ttcttttgat	cggtggtggc	tctcttgctt	cttgcatgct	cagaagcgg	gacggggacg	8460
gcgcgccggg	ggcagcggtt	gttccggacc	cgggggcatg	gctggtagt	gcacgtcggc	8520
gcccgcgacg	ggcaggttct	ggtattgcgc	tctgagaaga	cttgcgtgcg	ccaccacgcg	8580
tcgattgacg	tcttgtatct	gacgtctctg	ggtgaaagct	accggccccg	tgagcttgaa	8640
cctgaaagag	agttcaacag	aatcaatttc	ggtatcgtta	acggcagctt	gtctcagtat	8700
ttctttgtacg	tcaccagagt	tgtcctggta	ggcgatctcc	gccatgaact	gctcgatttc	8760
ttcctcctga	agatctccgc	gacccgctct	ttcgacggtg	gccgcgaggt	cattggagat	8820
acggcccatg	agttgggaga	atgcattcat	gcccgcctcg	ttccagacgc	ggctgtaaac	8880
cacggccccc	tcggagtctc	ttggcgcgat	caccacctga	gcgaggttaa	gctccacgtg	8940
tctggtgaag	accgcatagt	tgcataggcg	ctgaaaaaag	tagttgagt	tggtggcaat	9000
gtgttcggcg	acgaagaaat	acatgatcca	tcgtctcagc	ggcatttcgc	taacatcgcc	9060
cagagcttcc	aagcgctcca	tggcctcgta	gaagtccacg	gcaaaattaa	aaaactggga	9120
gtttcgcgcg	gacacggtca	attcctcctc	gagaagacg	atgagttcgg	ctatggtggc	9180
ccgtacttctg	cgttcgaagg	ctcccgggat	ctcttcttcc	tcttctatct	cttcttccac	9240
taacatctct	tcttctgctt	caggcggggg	cgaggggggc	acgcggcgac	gtcgcgggcg	9300
cacgggcaaa	cggtcgtatg	atcgttcaat	gacctctccg	cgccggcggc	gcatggttcc	9360
agtgcgcgcg	cgcccgctct	cgcgcggtcg	cagagtaaaa	acaccgcccg	gcatctcctt	9420
aaagtgggta	ctgggaggtt	ctccgtttgg	gagggagagg	gcgctgatta	tacattttat	9480
taattggccc	gtagggactg	cgcgcagaga	tctgatctgt	tcaagatcca	cgggatctga	9540
aaacctttcg	acgaaagcgt	ctaaccagtc	acagtcacaa	ggtaggctga	gtacggcttc	9600
ttgtggggcg	gggtggttat	gtgttcggtc	tgggtcttct	gtttcttctt	catctcggga	9660
agggtgagacg	atgctgctgg	tgatgaaatt	aaagtaggca	gttctaagac	ggcggatggt	9720
ggcgaggagc	accaggtctt	tgggtccggc	ttgctggata	cgcaggcgat	tggccattcc	9780
ccaagcatta	tcctgacatc	tagcaagatc	ttttagtag	tcttgcatga	gccgttctac	9840
gggcacttct	tcctcaccgc	ttctgcatct	catacgtgtg	agtcctcaatc	cgcgcatggt	9900
ttgtaccagt	gccaagtcag	ctacgactct	ttcggcagag	atggcttgct	gtacttgggt	9960
aagggtggct	tgaagtcac	caaaatccac	aaagcgggtg	taagccccg	tattaatggt	10020
gtaagcacag	ttggccatga	ctgaccagtt	aaactgtctg	tgaccagggc	gcacgagctc	10080
gggtgattta	aggcgcgaat	aggcgcgggt	gtcaaagatg	taatcgttgc	agggtgcgcac	10140
cagatactgg	taccctataa	gaaaaatcgg	cggtggttgg	cggtagagag	gccatcgttc	10200
tgtagctgga	gcgccagggg	cgaggtcttc	caacataagg	cggtgatagc	cgtagatgta	10260
cctgacatc	caggtgattc	ctgcggcggt	agtagaagcc	cgaggaaact	cgctacgcg	10320
gttccaaatg	ttgctgtagc	gcatgaaata	gttcattgta	ggcacggttt	gaccagttag	10380
gcgcgcgacg	tcattgatgc	tctatagaca	cgagaaaaat	gaaagcgttc	agcgactcga	10440
ctccctagcc	tggaggaaacg	tgaacgggtt	gggtcgcggt	gtacccccgt	tcgagacttg	10500
tactcgagcc	ggccggagcc	gcggctaaacg	tggatttggc	actcccgtct	cgaccagccg	10560
tacaaaaatc	caggatacgg	aatcgagtcg	ttttgctggt	ttccgaatgg	cagggaaagt	10620
agtcctatct	tttttttttt	tttgccgctc	agatgcatcc	cgtgctgcga	cagatgcgcc	10680
cccaacaaca	gccccctcg	cagcagcagc	agcagcaacc	acaaaaggct	gtccctgcaa	10740
ctactgcaac	tgccgcccgtg	agcgggtcgg	gacagccccg	ctatgatctg	gacttggaag	10800
agggcgaagg	actggcacgt	ctaggtgcgc	cttcgccccg	gcggcatccg	cgagttcaac	10860
tgaaaaaaga	ttctcgcgag	gcgtatgtgc	cccaacagaa	cctatttaga	gacagaagcg	10920
gcgaggagcc	ggaggagatg	cgagcttccc	gctttaacgc	gggtcgtgag	ctgcgtcacg	10980
gtttggaccg	aagacgagtg	ttgcgagacg	aggatttcga	agttgatgaa	gtgacagggg	11040
tcagtcctgc	cagggcacac	gtggctgcag	ccaaccttgt	atcggttac	gagcagacag	11100
taaaggaaga	gcgtaacttc	caaaagtctt	ttaataatca	tgtgcgaacc	ctgattgccc	11160
gcgaagaagt	tacccttgg	ttgatgcatt	tgtgggattt	gatggaagct	atcattcaga	11220
accctactag	caaacctctg	accgcccagc	tgtttctggt	ggtgcaacac	agcagagaca	11280
atgaggcttt	cagagagggc	ctgctgaaca	tcaccgaacc	cgaggggaga	tggttgtatg	11340
atcttatcaa	cattctacag	agtatcatag	tgcaggagcg	gagcctgggc	ctggccgaga	11400
aggtagctgc	catcaattac	tcggttttga	gcttgggaaa	atattacgct	cgcaaaatct	11460
acaagactcc	atagcttccc	atagacaagg	aggtgaagat	agatgggttc	tacatgcgca	11520
tgacgctcaa	ggtcttgacc	ctgagcgatg	atcttggggt	gtatcgcaat	gacagaatgc	11580
atcgcgcggt	tagcgcacgc	aggaggcgcg	agttaaagca	cagggaaactg	atgcacagtt	11640
tgcaaaagac	tctgactgga	gctggaaccg	agggtgagaa	ttacttcgac	atgggagctg	11700
acttgcagtg	gcagcctagt	cgagggctc	tgagcggcgc	gacggcagga	tgtgagcttc	11760
cttacataga	agaggcggat	gaaggcgagg	aggaagaggg	cgagtacttg	gaagactgat	11820
ggcacaacc	gtgttttttg	ctagatggaa	cagcaagcac	cgatccccg	aatgcggggc	11880
gcgctgcaga	gccagccgct	cggcattaac	tcctcggacg	attggacceca	ggccatgcaa	11940
cgtatcatgg	cgttgacgac	tcgcaacccc	gaagccttta	gacagcaacc	ccaggccaac	12000
cgtctatcgg	ccatcatgga	agctgtagtg	ccttcccgat	ctaatcccac	tcatgagaag	12060
gtcctggcca	tcgtgaacgc	gttgggtggag	aacaaagcta	ttcgtccaga	tgaggccgga	12120
ctggtataca	accgctctct	agaacgcgtg	gctcgctaca	acagttagcaa	tgtgcaaac	12180
aaattggacc	gtatgataac	agatgtacgc	gaagccgtgt	ctcagcgca	aaggttccag	12240

ES 2 372 823 T3

cgtgatgcca acctggggtc gctgggtggc ttaaattgctt tcttgagtac tcagcctgct 12300
 aatgtgccgc gtgggcaaca ggattatact aactttttaa gtgctttgag actgatggta 12360
 tcagaagtac ctcagagcga agtgtatcag tccggctcctg attacttctt tcagactagc 12420
 agacagggct tgcagacggt aaatctgagc caagctttta aaaaccttaa aggtttgtgg 12480
 ggagtgcatg ccccggtagg agaaagagca accgtgtcta gcttgttaac tccgaactcc 12540
 cgctctgtat tactgttggg agctcctttc accgacagcg gtatcatcga cagtaattcc 12600
 tatttgggtt acctactaaa cctgtatcgc gaagccatag ggcaaagtca ggtggacgag 12660
 cagacctatc aagaaattac ccaagtcagt cgcgctttgg gacaggaaga cactggcagt 12720
 ttggaagcca ctctgaactt cttgcttacc aatcggtctc aaaagatccc tctcaatat 12780
 gctcttactg cggaggagga gaggatcctt agatatgtgc agcagagcgt gggattgttt 12840
 ctgatgcaag agggggcaac tccgactgca gcactggaca tgacagcgcg aaatatggag 12900
 cccagcatgt atgccagtaa ccgacctttc attaacaac tgctggacta cttgcacaga 12960
 gctgcccgtc tgaactctga ttatttcacc aatgccatct taaccgccca ctggctgccc 13020
 ccacctggtt tctacacggg cgaatatgac atgcccagacc ctaatgacgg atttctgtgg 13080
 gacgacgtgg acagcgatgt tttttcacct ctttctgatc atcgcacgtg gaaaaaggaa 13140
 ggcggtgata gaatgatttc ttctgcatcg ctgtccgggg tcatgggtgc taccgcgct 13200
 gagcccaggt ctgcaagtc ttttctagct ctaccctttt ctctacacag tgtacgtagc 13260
 agcgaagtgg gtagaataag tcgcccaggt ttaatgggag aagaggagta cctaaacgat 13320
 tctttgctca gaccggcaag agaaaaaat tcccaaaaca atggaataga aagtttgggtg 13380
 gataaaatga gtagatggaa gacttatgct caggatcaca gagacgagcc tgggatcatg 13440
 gggactacaa gtagagcgag ccgtagacgc cagcgccatg acagacagag gggctctgtg 13500
 tgggacgatg aggatcggc cgatgatagc agcgtgttgg acttgggtgg gagaggaagg 13560
 ggcaaacccg ttgctcattt gcgcccctgc ttgggtggta tgttgtgaaa aaaaataaaa 13620
 aagaaaaact caccaaggcc atggcgacga gcgtacgttc gtctctcttt attatctgtg 13680
 tctagtataa tgaggcgagt cgtgctaggg ggagcggtgg tgtatccgga gggctcctct 13740
 ccttcgtacg tagagctgat gcagcagcag caggcgacgg cgggtgatgca atccccactg 13800
 gaggctccct ttgtgctccc gcgatactg gcacctacgg agggcagaaa cagcattcgt 13860
 tactcggaac tggcacctca gtacgatacc accaggttgt atctggtgga caacaagtcg 13920
 gcgacattg ctctctgaa ctatcagaat gaccacagca acttcttgac caggtgtgtg 13980
 cagaacaatg actttacccc tacggaagcc agcaccaga ccattaactt tgatgaacga 14040
 tcgcggtggg gcggtcagct aaagaccatc atgcatacta acatgcaaaa cgtgaacgag 14100
 tatatgttta gtaacaagtt caaagcgcgt gtgatgggtg ccagaaaacc tcccgacggt 14160
 gctgcagttg gtagacttta tgatcacaag caggatattt tggaaatga gtggttcgag 14220
 tttactttgc cagaaggcaa cttttcagtt actatgacta tgatttggat gaacaatgcc 14280
 atcatagata attacttgaa agtgggtaga cagaatggag tgcttgaag tgacattggt 14340
 gttaaagttc acaccaggaa cttcaagctg ggatgggatc ccgaaaacaa gttgatcatg 14400
 cctggaggtg atacgtatga agccttccat cctgacattg tcttactgcc tggctgcgga 14460
 gtggatttta ccgagagtcg tttgagcaac cttcttggtg tcagaaaaaa acagccattt 14520
 caagagggtt taaagatttt ttatgaagtg ttagaaggtg gtaatatccc gcccctcttg 14580
 gatgtagatg cctatgagaa cagtaagaaa gaacaaaag ccaaaataga agctgctaca 14640
 gctgctgacg aagctaaagg aaacatagtt gccagcgact ctacaagggt tgctaaccgt 14700
 ggagaggtca gaggagacaa ttttgcgcca acacctgttc cgactgcaga atcattattg 14760
 gccgatgtgt ctgaaggaa ggacgtgaaa ctactattc aacctgtaga aaaagatagt 14820
 aagaatagaa gctataatgt gttggaagac aaaatcaaca cagcctatcg cagttggtat 14880
 cttctgtaca attatggcga tcccgaaaaa ggagtgcggt cctggacatt gctcaccacc 14940
 tcagatgtca cctgcgagag agagcagggt tactggtcgc tccagacat gatgaaggat 15000
 cctgtcactt tccgctccac tagacaagtc agtaactacc ctgtggtggg tgcagagctt 15060
 atgcccgtct tctcaagag cttctacaac gaacaagctg tgactccca gcagctccgc 15120
 cgttccacct cgcttacgca cgctttcctg agaaccagat tttaatccgt 15180
 ccgcccgcgc ccaccattac caccgtcagt gaaaacgttc ctgctctcac agatcacggg 15240
 accctgccgt tgcgcagcag tatccgggga gtccaacgtg tgaccgttac tgaccccaga 15300
 cgccgcacct gtcctactgt gtacaaggca ctgggcatag tcgcaccgcg cgtccttcca 15360
 agccgcactt tctaaaaaaa aaaaatgtcc attcttatct cgcccagtaa taacaccggt 15420
 tgggtctctg gcgctccaag caagatgtac ggagcgcac gcaaacgttc taccacaat 15480
 cccgtgcgtg ttcgcgaca ttttgcgct ccattgggtg cctcaaggg ccgactcgc 15540
 gttcgaacca ccgtcgatga tgtaatcgat caggtggtg ccgacgccc taattatact 15600
 cctactgcgc ctacatctac tgtggatgca gttattgaca gtgtagtggc tgacgctcgc 15660
 aactatgctc gacgtaagag ccggcgaagg cgcattgcca gacgccacc agtaccact 15720
 gccatgcbag ccgcaagagc tctgctacga agagctagac cagtggggcg aagagccatg 15780
 cttagggcgg ccagacgtgc agcttcgggc gccagcgccg cgaggtccc caggcaagca 15840
 gccgctgtcg cagcggcgac tattccgac atggcccaat cgcgaaagg caatgtatac 15900
 tgggtgcgtg agctgcccac cggccaacgt gtaccggtg gcaccgctcc cctcgcact 15960
 tagaagatac tgagctgctc ccgatgttgt gtcccagcgg cgaggatgtc caagcgaaca 16020
 tacaaggaag aatgctgca ggttatcgca cctgaaagct acggcaacc gttgaaggat 16080
 gaaaaaaaac cccgcaaat caagcgggtt aaaaaggaca aaaaagaaga ggaagatggc 16140
 gatgatgggc tggcggagtt tgtgcgagc tttgcccac ggcgacgct gcaatggcgt 16200

ES 2 372 823 T3

gggcgcaaa ttcgacatgt gttgagacct ggaacttcgg tggctctttac acccgcgag 16260
 cgttcaagcg ctacttttaa gcgttcctat gatgaggtgt acggggatga tgatatctt 16320
 gagcaggcgg ctgaccgatt aggcgagttt gcttatggca agcgtagtag aataacttcc 16380
 aaggatgaga cagtgtaaat acccttggat catggaaatc ccaccctag tcttaaacg 16440
 gtcactttgc agcaagtgtt acccgtaaact ccgcgaacag gtgttaaacc cgaaggtgaa 16500
 gatttgatc ccactatgca actgatggta cccaacgcc agaagttgga ggacgtttt 16560
 gagaaaagtaa aagtggatcc agataattcaa cctgaggtta aagtgagacc cattaagcag 16620
 gtagcgctgt gtctgggggt acaaaactgta gacattaaga tccccactga aagtatgaa 16680
 gtgcaaaactg aaccgcgaaa gcctactgcc acctccactg aagtcaaac ggatccatgg 16740
 atgcccctgc ctattacaac tgacgccgcc ggtcccactc gaagatccc acgaaagtac 16800
 ggtccagcaa gtctgtgat gcccaattat gttgtacacc catctattat tcctactcct 16860
 ggttaccgag gcaactgccta ctatcgagc cgaaacagta cctcccgcg tcgccgcaag 16920
 acactgcgaa atcgcagtcg tcgccgtaga cgcacaagca aaccgactcc cggcgccctg 16980
 gtgctgggaa tgtaccgcaa tggtagtgcg gaaccttga cactgccgag tgccggttac 17040
 catccgagta tcatcactta atcaatgttg ccgctgcctc cttgcagata tggcctcac 17100
 ttgtcgctt cgcggtccca tcaactggta ccgaggaaga aactcgccg gtagaagagg 17160
 gatgtgggga cgcggaatgc gacgctacag gcgacggcgt gctatccgca agcaattgag 17220
 ggggtggttt ttaccagcct taatcccaat tatcgctgct gcaattggcg cgataccagg 17280
 catagcttcc gtggcggttc aggcctcgca acgacattga cattggaaaa aaaaactata 17340
 aataaaaaaa aatacaatgg actctgacac tcctggctcct gtgactatgt tttcttagag 17400
 atggaagaca tcaattttc atccttggct ccgcgacacg gcacgaagcc gtacatgggc 17460
 acctggagcg acatcgccac gagccaactg aacgggggag ccttcaattg gagcagtatc 17520
 tggagcgggc ttaaaaattt tggctcaacc ataaaaacat acggaacaa agcttggaa 17580
 agcagtagac gacagcgct tagaataaaa cttaagacc agaacttcca acaaaaagta 17640
 gtcgatggga tagcttccgg catcaatgga gtggtagatt tggctaacca ggctgtgcag 17700
 aaaaaagata aagtcggtt ggacccgcg ccagcaacc caggtgaaat gcaagtgag 17760
 gaagaaatc ctcgcgcaaga aaaaagcgc gacaagcgtc cgcgtcccga tttggaagag 17820
 acgctggtga cgcgcgtaga tgaaccgcct tcttatgagg aagcaacgaa gcttggaaat 17880
 cccaccacta gaccgatagc cccaatggcc accggggtga tgaaccttc tcagttgat 17940
 cgaccctgca ccttggattt gcccctccc cctgctgcta ctgctgacc cgcttctaa 18000
 cctgtcgctg ccccgaaacc agtcgcccga gccaggtcac gtcccgggg cgctcctcgt 18060
 ccaaatgcgc actggcaaaa tactctgaac agcatcgctg gtctaggcgt gcaaaagtta 18120
 aaacgccgtc gctctttta ataaatag gtagtcgct taacttgct atctgtgtat 18180
 atgtgtcatt acacgccgtc acagcagcag aggaaaaaag gaagaggtcg tgcgtcgacg 18240
 ctgagttact ttcaagatgg ccaccccac gatgctgccc caatgggcat acatgcacat 18300
 cgccggacag tcttcttgg agtacctgag tccgggtctg gtgcagttcg cccgcgccac 18360
 agacacctac ttcaatctgg gaaataagtt tagaaatccc accgtagcgc cgaccacga 18420
 tgtgaccacc gaccgtagcc agcggctcat gttgcgctc gtgcccgctg accgggagga 18480
 caatacatac tcttacaag tgcggtaacc cctggcctg gcgacaaca gagtctgga 18540
 tatggccagc acgttctttg acattagggg cgtgttgac agaggtccca gtttcaaacc 18600
 ctattctggt acggcttaca actctctggc tctaaagc gctccaaatg catctcaatg 18660
 gattgcaaaa ggcgtaccac ctgcagcag cgaaggcaat ggtgaagaag aacatgaaac 18720
 agaggagaaa actgctactt acacttttgc caatgctcct gtaaaagccg aggtcfaat 18780
 taaaaagag ggcttaccac taggtttgga gatttcagct gaaaacgaa ctaaaccat 18840
 ctatgcagat aaactttatc agccagaacc tcaagtggga gatgaaact ggactgacct 18900
 agacggaaaa accgaagatc atggaggcag ggctctaaag cctactacta acatgaaacc 18960
 ctgttacggg tctatgca agcctactaa ttaaaaagt ggtcaggcaa aaccgaaaa 19020
 ctcggaaccg tcgagtgaaa aaattgaata tgatattgac atggaattt ttgataactc 19080
 atcgcaaaaga acaaaactca gtcctaaaat tgtcatgtat gcagaaaatg taggtttgga 19140
 aacgccagac actcatgtag gtaacaaacc tggacagaa gacacaagtt ccgaagctaa 19200
 ttgggacaa cagtctatgc ccaacagacc caactacatt ggcttcagag ataactttat 19260
 tggactcatg tactataaca gtaactgtaa catgggggtg ctggctggtc aagcgtctca 19320
 gttaaatgca gtggttgact tgcaggacag aaacacagaa ctttcttacc aactcttct 19380
 tgaactctgt ggcgacagaa ccagatactt tagcatgtgg aatcaggctg tggacagtta 19440
 tgaactctgt gacgtgta ttgaaaaaca tgggtggaa gatgaactc ccaactattg 19500
 ttttccactg gacggcatag gtgttccaac aaccagttac aaatcaatag ttccaaatgg 19560
 agaagataat aataattgga aagaacctga agtaaatgga acaagtgaga tcggacaggg 19620
 taatttgttt gccatggaaa ttaaccttca agccaacta tggcgaagt tcctttatc 19680
 caatgtggct ctgtatctcc caaatacacc ccgtccaatg tcaactctcc 19740
 agaaaaacaaa aacacctacg actacatgaa cggcggggtg gtgccccat ctctagtaga 19800
 cacctatgtg aacattggtg ccagggtgct tctggatgcc atggacaatg tcaaccatt 19860
 caaccaccac cgtaacgctg gcttgcgta ccgatctatg cttctgggta acggacgta 19920
 tgtgccttc cacatacaag tgcccaaaa attcttcgct gttaaaaacc tgctgcttct 19980
 cccagctcc tacacttatg agtggaact taggaaggat gtgaacatgg ttctacagag 20040
 ttccctcggg aacgacctgc gggtagatgg cgccagcatc agtttcacga gcatcaacct 20100
 ctatgtact tttttccca tggctcaaaa caccgctcc accctgaaag ccatgctgcg 20160

ES 2 372 823 T3

gaatgacacc aatgatcagt cattcaacga ctacctatct gcagctaaca tgctctacc 20220
 cattcctgcc aatgcaacca atattcccat ttccattcct tctcgcgaact gggcggttt 20280
 cagaggctgg tcatttacca gactgaaaac caaagaaact ccctcttgg ggtctggatt 20340
 tgacccttac tttgtctatt ctggttctat tccctacctg gatggtacct tctacctgaa 20400
 ccacactttt aagaaggttt ccatcatggt tgactcttca gtgagctggc ctggaaatga 20460
 caggttacta tctcctaacg aatttgaat aaagcgact gtggatggcg aaggctaaa 20520
 cgtagcccaa tgcaacatga ccaaagactg gttcttggta cagatgctcg ccaactaaa 20580
 catcggctat cagggcttct acattccaga aggatcaaaa gatcgcagt attcattttt 20640
 cagaaaactc cagcccatag gcaggcaggt ggtgatgag gtcaattaca aagacttcaa 20700
 ggcgctgcc ataccctacc aacacaacaa ctctggcttt gtgggttaca tggctccgac 20760
 catgcccga ggtaaccct atcccgctaa ctatccctat ccactcattg gaacaactgc 20820
 cgtaaatagt gttacgcaga aaaagtctt ttacagactg ggacagaata tgctctatgc 20940
 ctcgagcaac ttcattgcta tgggggcct tgagggtgat cccatggatg agcccacct 21000
 caactcagct catgctctgg acatgacct ttctcgaag tttctgacgt ggtcagagtg catcagccac accgcggcat 21060
 gctttatctt ctcttcgaag ttctcgaag gtacaccgtt ctccgcccgt aacgctacca cgtaaagaac 21120
 catcgaggca gtctacctgc gtacaccgtt ctccgcccgt ggtatccaaa acggtccag 21180
 ttcttgcttc ttgcaaatag ttgtccaaga cctgggttgc ggaccctatt ttttgggaa 21240
 cgagcaagag ctccagagcca ttgtccaaga ccccagataa ctcgctctgt ccattgtaaa 21300
 ctacgataag cgcttcccgg ggttcatggc ctgggtggct ttcggttggg acccacgttc 21360
 tacggcccga cgtgagacgg ggggagagca attctcggat gatcgtctca aacagattta 21420
 taacacctgc taactttttg atccttttgg cagcgtctct gttaccaagg accgctgtat 21480
 ccagttttaa tatgagggtc tctcgcggcg gggcccctgt tctgcccct gcggactttt 21540
 tacgtggaa aaatctacc ctcttctca ctggcctgac cgtcccattg acggaacc 21600
 ctgctgcatg ttccttcaag gactgcccga caacatgctt cattctccta aagtcagacc 21660
 caccatgaaa ttgtaactg agaccgtgca ccatttctt aatacccatt cgccttattt 21720
 caocctgtg gacaatcaaa aagcactcta cactgcgttc gaccgtatgg atgttcaata 21780
 tcgctctcat cgtacacaca tcgaaagggc catcacttta tttttttaca tgtatcaagg 21840
 atgactcatg taacaacagt gttcaataaa atgggttctg acgagaatca gaatgacc 21900
 ctctggat ta ctattttatt tacaagtcca tgggttgcca cttgaattcg ggaatcaca 21960
 caggcagtga tacgttgcgg aactgatact ggcaggatgt cactccacag ctttctggtc agctgcaaag 22020
 acttgggaa cgttatatcg gaaatcttga aatcacaatt aggaccagt cctcagcgc 22080
 gagagttgag gtacaccgga ttgcagcact gaaacacat cagcagcggg tgctcacgc 22140
 ttgccagcac ggtgggatct gcaatcatgc ccacatccag atcttcagca ttggcaatgc 22200
 tgaacgggt catcttgca gtctgcctac ccatggcggg caccacaatta ggctgtggt 22260
 tgcaatcgga ttgcaaggg atcagtatca tcttggcctg atcctgtctg attcctggat 22320
 acacggctct catgaaagca tcatattgct tgaaagcctg ctgggcttta ctaccctcgg 22380
 tataaaact cccgcaggac ctgctcgaaa actggttagc tgcacagccg gcatcattca 22440
 cacagcagcg ggcgtcattg ttggctattt gcaccacact tctgcccag cgtttttggg 22500
 tgattttgg tgcctcggga ttctccttta aggctcgttg tccgttctcg ctggccacat 22560
 ccatctcgt aatctgctcc ttctgaaatc taatatggc atgcagcagc ttcagcttgc 22620
 cctcataatc attgcaagca tgaggccaca acgcacagcc tgtacattcc caattatggt 22680
 gggcgatctg agaaaaagaa tgtatcatt cctgcagaaa tcttcccac atcgtgctca 22740
 gtgtcttgg actagtgaaa gttaaactgga tgcctcgggt ctcttcggtt acgtaactggt 22800
 gacagatgag cttgtattgt tcgtgttgc caggcattag tttaaaacag gttctaagtt 22860
 cgttatccag cctgtacttc tccatcagca gacacatcac tccatgcct ttctcccaag 22920
 cagacaccag gggcaagcta atcggattct taacagtgca ggcagcagct cctttagcca 22980
 gagggtcac tttagcagc ttctcaatgc ttcttttggc atccttctca acgatgcca 23040
 cgggggggta gctgaaacc actgctaaa gttgcgctc tctctttct tctcgtgt 23100
 cttgactgat gtcttgcag gggatattgt tggcttctct tggcttcttt ttgggggta 23160
 tcggaggag aggactctcg ctccgttccg gagacagggg ggattgtgac gtttcgctca 23220
 ccattaccaa ctgactgtcg gtagaagaac ctgaccccac acggcgacag gtgtttttct 23280
 tcgggggag aggtgagggc gattgcgaag ggctgcggtc cgacctgaa ggcgatgac 23340
 tggcagaacc ccttcccgt tcgggggtg gctccctgtg cggctcgtt aactgattc 23400
 cttcgcgct ggccattgt ttctcctagg cagagaaaca acagacatgg aaactcagcc 23460
 atgtctgca acatcgcac gagtgccatc acatctcgt ctcagcgagc aggaaaagga 23520
 gcagagctta agcattccac cgcccagtc tgcaccacc tctaccctag aagataagga 23580
 ggtcgacgca tctcatgaca tgcagaataa aaaagcgaaa gagctgaga cagacatcga 23640
 gcaagaccg ggctatgtga caccgggtgga acacagggaa gagttgaaac gctttctaga 23700
 gagagaggat gaaaactgcc caaaaacagc agcagataac tatcaccag atgctgaaa 23760
 tagggatcag aacaccgact acctcatagg gcttgacggg gaagacgccc tccttaaca 23820
 tctagcaaga cagtctca tagtcaagga tgcattattg gacagactg aagtcccat 23880
 cagtggtgaa gagctcagct gcgcctaca gcttaacct ttttcaactc gtactcccc 23940
 caaacgtcag ccaacggca cctgcgagcc aaatcctcgt ttaaactttt atccagcttt 24000
 tgctgtgcca gaagtactg ctacctatca catcttttt aaaaatcaaa aaattccagt 24060
 ctctgcccgc gctaactcga cccgcggca tgcctactc aatctgggac ctggttcacg 24120

cttacctgat atagcttctt tgggaagaggt tccaaagatc ttcgagggtc tgggcaataa 24180
 tgagactcgg gccgcaaatg ctctgcaaaa gggagaaaat ggcatggatg agcatcacag 24240
 cgttctggty gaattggaaag gcgataatgc cagactcgca gtactcaagc gaagcgtcga 24300
 ggtcacacac ttcgcatatc ccgctgtcaa cctgcccctt aaagtcataa cggcggatcat 24360
 ggaccagtta ctcatlaagc gcgcaagtcc cctttcagaa gacatgcatg acccagatgc 24420
 ctgtgatgag ggtaaacagc tggtcagtga tgagcagcta acccgatggc tgggcaccga 24480
 ctctccccgg gatttggaaag agcgtcgcaa gcttatgatg gccgtgggtgc tggttaccgt 24540
 agaactagag tgtctccgac gtttctttac cgattcagaa accttgcgca aactcgaaga 24600
 gaatctgcac tacactttta gacacggctt tgtgcggcag gcatgcaaga tatctaactg 24660
 ggaactcacc aacctggttt cctacatggg tattctgcat gagaatcgcc taggacaaag 24720
 cgtgctgcac agcaccctta agggggaagc ccgccgtgat tacatccgcg attgtgtcta 24780
 tctctacttg tgccacacgt ggcaaacggg catgggtgta tggcagcaat gtttagaaga 24840
 acagaacttg aaagagcttg acaagctcct acagaatct ctttaaggttc tgtggacagg 24900
 gttcgaacgag cgcaccgtcg cttccgacct ggcagacctc atcttcccag agcgtctcag 24960
 ggttactttg cgaaaacggat tgcctgactt tatgagccag agcatgctta acaattttcg 25020
 ctctttcatc ctggaaagct ccggtatcct gcccggccacc tgctgcgcaac tggccctccga 25080
 ctttgtgcct ctcaccctacc gcgagtggcc cccggccgcta tggagtcaact gctacctgtt 25140
 ccgtctggcc aactatctct cctaccactc ggtatgtatc gaggatgtga gcgagacgg 25200
 cttgctggag tgccactgcc gctgcaatct gtgcaacgccc caccgggtccc tagcttgcga 25260
 cccccagttg atgagcgaaa cccagataat aggcaccttt gaattgcaag gcccccagcag 25320
 ccaaggcgat gggctctctc ctgggcaaaag tttaaaactg accccgggac tgtggacctc 25380
 cgcctacttg cgcaagtttg ctccggaaga ttaccacccc tatgaaatca agttctatga 25440
 ggaccaatca cagcctccaa aggccgaact ttcggcttgc gtcacacccc agggggcaat 25500
 tctggcccaa ttgcaagcca tccaaaatc ccgccaagaa ttttactga aaaagggtaa 25560
 gggggtctac cttgaccccc agaccggcga ggaactcaac acaaggttcc ctcaggatgt 25620
 cccaacgacg agaaaacaag aagttgaagg tgcagccgca gcccccagaa gatatggagg 25680
 aagattggga cagtcaggca gaggagggc agggagcagc tctggaggac agtctggagg 25740
 aagacagttt ggaggaggaa aacgagggg cagagggagt ggaagaagta accgcccaga 25800
 aacagttatc ctcggtcgcg gagacaagca acagcgtac catctccgct ccgagtcgag 25860
 gaaccggcg gcgtcccagc agtagatggg acgagaccg acgcttccc aaccaacca 25920
 gcgcttccaa gcccgtaag aaggatcggc agggatataa gtcttggcg gggcataaga 25980
 atgcatcat cctctgcttg catgagtgc ggggcaacat atccttcacg cggcgctact 26040
 tgctattcca ccatggggtg aactttccgc gcaatgtttt gcattactac cgtcacctcc 26100
 acagccccta ctatagccag caaatcccga cagtctcgac agataaagac agcggcgggc 26160
 acctccaaca gaaaaccagc agcggcagtt agaaaataca acaaaagtgc agcaacagga 26220
 ggattaaaga ttacagccaa cgagccagcg caaacccgag agttaagaaa tcggatcttt 26280
 ccaaccctgt atgccatctt ccagcagagt cggggtcaag agcaggaact gaaaataaaa 26340
 aaccgatctc tgggttcgct caccagaagt tgtttgtatc acaagagcga agatcaactt 26400
 cagcgcactc tcgaggcgc cgaggctctc ttcaacaagt actgcgctc gactcttaaa 26460
 gagttagcag cgaccgcgtc tattcaaaaa aggcgggaat tacatcatcc tcgacatgag 26520
 taaagaaat cccacgcctt accagtggag ttatcaacc caaatgggat tggcagcagg 26580
 cgcctcccag gactactcca cccgcatgaa ttggctcagc gccggcctt ctatgatttc 26640
 tcgagttaat gatatacgcg cctaccgaaa ccaaataact ttggaacagt tggaaacctc 26700
 caccacgccc cgccaacacc ttaatcccag aaattggccc gccgcctag tgtaccagga 26760
 aagtcccgt cccaccactg tattacttcc tcgagacgce caggccgaag tccaaatgac 26820
 taatgcaggt gcgcagttag ctggcggtc caccctatgt cgtcacaggc cgtcacaggc 26880
 tataaaaacg ctgatgatca gaggccgagg tatccagctc aacgacgagt cggtagcagc 26940
 tccgcttggg ctacgaccag acggaatctt tcagatggc ggctgcggga gatcttctt 27000
 caccctcgt caggctgttc tgactttgga aagttcgtct tcgcaacccc gctcgggagg 27060
 aatcgggacc gttcaatttg cggacgagtt tactcctct gtctacttca acccttctc 27120
 cggatctcct gggcactacc cggacgagtt cataccgaac ttcgacgca tttagcagtc 27180
 agtggagcgc tacgattgat gtctggtgac gcggctgagc tatctcggct gcgacatcta 27240
 gaccactgcc gccgctttcg ctgctttgcc cgggaaacta ttgagttcat ctacttcgaa 27300
 ctccccagg atcaccctca aggtccggc cacggagtgc ggattactat cgaaggcaaa 27360
 atagactctc gcctgcaacg aattttctcc cagcggcccg tgctgatcga gcgagaccag 27420
 ggaaacacca cggtttccat ctactgcatt tgtaatcacc ccgattgca tgaaagcctt 27480
 tgctgtctta tgtgtactga gtttaataaa aactgaatta agactctcct acggactgcc 27540
 gcttcttcaa cccgattttt acaaccagaa gaacaaaact tttctgtcg tccaggactc 27600
 tghtaaactc accttctcta ctcaaaact agaagctcaa cgactacacc gcttttccag 27660
 aagcattttc cttactaata ctactttcaa aaccggaggt gagctccacg gtctccctac 27720
 agaaaaacct tgggtggaag cgggccttgt agtactagga attcttgcg gtgggcttgt 27780
 gattattctt tgctacctat acacaccttg cttactttc ctagtgggtg tgtggtattg 27840
 gtttaaaaaa tggggcccat actagtcttg cttgttttac tttcgtttt ggaaccgggt 27900
 tctgccaatt acgatccatg tctagacttt gacccagaaa actgcacact tacttttga 27960
 cccgacacaa ccgcatctg tggagttctt attaagtgc gatgggaatg caggctcgtt 28020
 gaaattacac acaataacaa aacctggaac aataccttat ccaccacatg ggagccagga 28080

ES 2 372 823 T3

gttcccagagt ggtacactgt ctctgtccga ggtcctgacg gttccatccg cattaagtaac 28140
aacactttca tttttctgca aatgtgcgat ctggccatgt tcatgagcaa acagtattct 28200
ctatggcctc ctagaagga caacatcgta acgttctcca ttgcttattg cttgtgcgct 28260
tgcttctta ctgcttact gtgctatgc atacacctgc ttgtaaccac tcgcatcaaa 28320
aacgccaata acaaagaaaa aatgcttaa cctcttctg tttacagaca tggcttctct 28380
tacctctc atattgtca gcattgtcac tgccgctcac ggacaaacag tcgtctctat 28440
cccactagga cataattaca ctctcatagg accccaatc acttcagagg tcactggac 28500
caaactggga agcgttgatt actttgatat aatctgtaac aaaacaaaac caataatagt 28560
aacttgcaac atacaaaaatc ttacattgat taatgttagc aaagtttaca gcggttacta 28620
ttatggttat gacagataca gtagtcaata tagaaattac ttggttcgtg ttaccagtt 28680
gaaaaccacg aaaatgccaa atattggcaaa gattcgatcc gatgacaatt ctctagaaaac 28740
ttttacatct cccaccacac ccgacgaaaa aaacatccca gattcaatga ttgcaattgt 28800
tgacgctggt gcagtggta tggcactaat aataatagc atgcttttat atgcttgctg 28860
ctacaaaaag tttcatccta aaaaacaaga tctcctacta aggcttaaca tttaatctct 28920
ttttatcacg ccatggtttc cactaccaca ttccttatgc ttactagtct cgcaactctg 28980
acttctgctc gctcaacct cactgtaact ataggctcaa actgcacact aaaaggacct 29040
caagtggttc atgtcttttg gtggagaata tatgacaatg gatggtttac aaaaccatgt 29100
gaccaacctg gtagattttt ctgcaacggc agagacctaa ccattatcaa cgtgacagca 29160
aatgacaaaag gcttctatta tggaaccgac tataaaagta gtttagatta taacattatt 29220
gtactgccaat ctaccactcc agcaccccgc acaactactt tctctagcag cagtgtcgt 29280
aacaatacaa tttccaatcc aacctttgcc gcgcttttaa aaccgactgt gaataattct 29340
acaacttcac atacaacaat ttccacttca acaatcagca tcatcgctgc agtgacaatt 29400
ggaatatcta ttcttgtttt taccataaacc tactacgcct gctgctatag aaaagacaaa 29460
cataaagggt atccattact tagatttgat atttaatttg ttcttttttt ttatttacag 29520
tatggtgaac accaatcatg gtacstagaa atttcttctt caccatactc atctgtgctt 29580
ttaatgtttg cgctactttc acagcagtag ccacagcaac ccagactgt ataggagcat 29640
ttgcttctta tgcacttttt gcttttgta cttgcatctg cgtatgtagc atagtctgcc 29700
tggttattaa ttttttccaa cttctagact ggatccttgt gcgaattgcc tacctgccc 29760
accatcccga ataccgcaac caaaatctcg cggcacttct tagactcact taaaacctg 29820
caggctatac taccaatatt tttgcttcta ttgcttccct acgctgtctc aaccccagct 29880
gcctatagta atccaccaga acaccttaga aaatgc aaaatgc tccaacaacc gtggtcattt 29940
cttgcttctc ctgagaaaa atcagaaatc ccccaaat taataatgat tgctggaata 30000
attaatataa tctgttgac cataatttca tttttgatat acccctatt tgattttggc 30060
tggaatgctc ccaatgcaca tgatcatcca caagaccag aggaacacat tccccacaa 30120
aacatgcaac atccaatagc gctaatagat tacgaaagt aaccacaacc cccactactc 30180
cctgctatta gttacttcaa cctaaccggc ggagatgact gaaactca ccactccaa 30240
ttccgctgag gatctgctcg atatggacgg cccgctctca gaacaacgac tgcccaact 30300
acgcatccgc cagcagcagg aacgcgtggc caaagagctc agagatgtca tccaaattca 30360
ccaatgcaaa aaaggcatat tctgtttggt aaaacaagcc aagatattcct acgagatcac 30420
cgctactgac catcgctctc cttacgaact tggcccccaa cgacaaaaat ttactgcat 30480
ggtgggaatc aaccccatag ttatcaccca acaaaagtga gatactaagg gttgcattca 30540
ctgctctgctc gatccatcg gattgcaccta caccctgctg aagaccctat gcgcccctaa 30600
agacctgcta ccaatgaatt aaaaaaaaaat gattaataaa aaactactta cttgaaatca 30660
gcaataaggt ctctgttgaa attttctccc agcagcacct cacttccctc ttcccaactc 30720
fggtattcta aaccccgttc agcggcatac tttctccata ctttaaagg gatgtcaaat 30780
tttagctcct ctctgtacc cacaatcttc atgtctttct tcccagatga ccaagagagt 30840
ccggtcagtg gactccttca accctgtcta cccctatgaa gatgaaagca cctccaaca 30900
ccccttata aaccaagggt ttatttcccc aaatggcttc acacaaagcc cagacggagt 30960
tcttacttta aaatgtttaa ccccactaac aaccacaggc ggatctctac agctaaaagt 31020
gggaggggga cttacagtgg atgacactga tggtacctta caagaaaaca tacgtgctac 31080
agcaccocatt actaaaaata atcactctgt agaactatcc attggaatg gattagaaac 31140
tcaaaaacat aaactatgtg ccaaatggg aaatgggta aaatttaaca acggtgacat 31200
ttgtataaag gatagtatta acaccttatg gactggaata aaccctccac ctaactgtca 31260
aattgtggaa aacactaata caaatgatgg caaacttact ttagtattag taaaaatgg 31320
aggcttggt aatggctacg tgtctctagt tgggtatca gacactgtga accaaatggt 31380
cacacaaaag acagcaaa caaattaag tccaatagg attatattt gactctctg gaaatctatt 31440
aactgaggaa tcagacttaa aaattccact taaaaataaa tcttctacag cgaccagtga 31500
aactgtagcc agcagcaaa cctttatgcc aagtactaca gcttatccct tcaacaccac 31560
tactagggat agtgaaaact acattcatgg aatatgttac tacatgacta gttatgatag 31620
aagtctatct ccttgaaaca tttctataat gctaaacagc cgatgatatt cttccaatgt 31680
tgcctatgac atacaatttg aatggaactc aaatgcaagt gaatctccag aaagcaacat 31740
agctacgctg accacatccc ccttttctt ttcttacct acagaagacg acaactaaaa 31800
taaagttaa gtgtttttat ttaaaatcac aaaatcgag tagttattt gcctccacct 31860
tcccatttga cagaatacac caatctctcc ccacgcacag ctttaaacat ttggatacca 31920
ttagagatag acattgtttt agattccaca ttccaacag tttcagagcg agccaatctg 31980
gggtcagtgat tagataaaaa tccatcgca tagtctttta aagcgtttc acagtccaac 32040

ES 2 372 823 T3

```

tgctgCGGat gCGactccGg agtttggatc acgggtcatct ggaagaagaa cGatgggaat 32100
cataatccGa aaacgggatc ggacgattgt gtctcatcaa acccacaagc agccgctgtc 32160
tgCGtCGctc cgtgCGactg ctgtttatgg gatcagggtc cacagtttcc tgaagcatga 32220
ttttaatagc ccttaacatc aactttctgg tgcgatgCGc gcagcaacgc attctgattt 32280
cactcaaatc ttgCGagtag gtacaacaca ttattacaat attgtttaat aaaccataat 32340
taaaagcGct cGagccaaaa ctcatatctg atataatcGc ccctgcatga ccatcatacc 32400
aaagtttaat ataaattaaa tgacgttccc tcaaaaaacac actaccaca tacatgatct 32460
cttttggcat gtgcatatta acaatctgtc tgtaccatgg acaacgttgg ttaatcatgc 32520
aaccCaatat aaccttccGg aaccacactg ccaacaccGc tccccagcc atgCattgaa 32580
gtgaaccctg ctgattacaa tgacaatgaa gaacccaatt ctctcGaccg tgaatcactt 32640
gagaatgaaa aatattctata gtggcacaac atagacataa atgcatgcat cttctcataa 32700
tttttaactc ctCaggattt agaaacatat cccagggaaat aggaagctct tgcagaacag 32760
taaagctggc agaacaagga agaccacgaa cacaacttac actatgCata gtcatagtat 32820
cacaatctgg caacagcggg tggctctcag tcatagaagc tCGggttca ttttcctcac 32880
aacgtggtaa ctgggctctg gtgtaagggt gatgtctgGc gcatgatgGc gagcgtgCGc 32940
gcaacctgtt cataatggag ttgcttctg acatttctGt attttgtata gcaaaacGcG 33000
gcccctggcag aacacactct tcttcGcctt ctatcctGcc gcttagcGtg ttcCGtGta 33060
tagttcaagt acagccacac tcttaagttg gtcaaaaagaa tgctggcttc agttgtaatc 33120
aaaactccat cGatctaat gtgtctgagg aaatcatcca cGgtagCata tGcaaatccc 33180
aaccaagcaa tgcaactgga ttgCGtttca agcaggagag gagagggag agacggaaga 33240
accatgttaa tttttattcc aaacgatctc gCagtaactc aaattgtaga tCGcGcagat 33300
ggcatctctc gccccactg tgttggtgaa aaagcacagc taaatcaaaa gaaatgCgat 33360
tttcaagggt ctcaacggtg gcttccaaca aagcctccac gCGcacatcc aagaacaaaa 33420
gaataccaaa agaaggagca ttttctaact cctcaatcat catattacat tCctgCacca 33480
ttccagata attttcagct ttccagcctt gaattattcG tgtcagttct tGtggttaat 33540
ccaatccaca cattacaaac aggtcccGga gggcgccctc caccaccatt cttaaacaca 33600
ccctcataat gacaaaaat cttgctcctg tGtcacctgt agCGaattga gaatggcaac 33660
atcaattgac atgcccctgg ctctaagttc ttctttaagt tctagttgta aaaactctct 33720
catattatca ccaaactgct tagccagaag cccccggga acaagagcag gggacgctac 33780
agtCGagtac aagCGcagac ctccccatt ggctccagca aaaacaagat tGgaataagc 33840
atattgggaa ccaccagtaa tatcatCGaa gttgctggaa atataatcag gcagagtttc 33900
ttgtagaaat tgaataaaaG aaaaatttGc caaaaaaaca ttcaaaacct ctgggatgca 33960
aatgcaatag gttaccgCGc tgcGctccaa cattgttagt tttgaattag tctgcaaaaa 34020
taaaaaaaaa acaagcgtca tatcatagta gcctgacgaa caggtggata aatcagctct 34080
tccatcacia gacaagccac aggtctcca gctcGaccct cGtaaaacct gtcacgtgta 34140
ttaacaaca gcaaccgaaG ttctcGcgg tgaccagcat gaataagtct tgatgaagca 34200
tacaatccag acatgttagc atcagttaaG gagaaaaaac agccaacata gcctttgggt 34260
ataattatgc ttaatcGtaa gtatagcaaa gccaccctc gCGgatacaa agtaaaaggc 34320
acaggagaat aaaaaatata attatttctc tGctgctgtt taggcaacgt cGccccggg 34380
ccctctaaat acacatacaa agcctcatca gccatggctt accagagaaa gtacagcggg 34440
cacacaacc acaagctcta aagtcaactc ccaacctstc cacaatatat atacacaagc 34500
cctaaactga cGtaatggga ctaaagtGta aaaaatcccg ccaaaccCa cacacacccc 34560
gaaactgCGt caccagggaa aagtacagtt tcaactcGc aatcccaaca agcgtcactt 34620
cctctttctc acggtagctG acatcccatt aacttacaac gtcattttcc cacggccGcG 34680
cGcccccttt taaccgttaa cccacagcc aatcaccaca cGgcccacac tttttaaaat 34740
cacctcattt acatattgGc accattccat ctataaggta tattattgat gatg 34794

```

<210> 85
 <211> 585
 5 <212> PRT
 <213> adenoviridae

<220>
 <221> CADENA
 10 <222> (1)..(585)
 <223> /obsérvese="Proteína Fibra de Adenovirus de serotipo 5"

<400> 85
 Met Leu Leu Gln Met Lys Arg Ala Arg Pro Ser Glu Asp Thr Phe Asn
 1 5 10 15
 Pro Val Tyr Pro Tyr Asp Thr Glu Thr Gly Pro Pro Thr Val Pro Phe
 20 25 30
 Leu Thr Pro Pro Phe Val Ser Pro Asn Gly Phe Gln Glu Ser Pro Pro

15

ES 2 372 823 T3

			85					90					95			
	His	Ser	Ile	Gly	Leu	Leu	Ile	Gly	Ser	Gly	Leu	Gln	Thr	Lys	Asp	Asp
				100					105					110		
	Lys	Leu	Cys	Leu	Ser	Leu	Glu	Asp	Gly	Leu	Val	Thr	Lys	Asp	Asp	Lys
			115					120					125			
	Leu	Cys	Leu	Ser	Leu	Gly	Asp	Gly	Leu	Ile	Thr	Lys	Asn	Asp	Val	Leu
		130					135					140				
	Cys	Ala	Lys	Leu	Gly	His	Gly	Leu	Val	Phe	Asp	Ser	Ser	Asn	Xaa	Ile
	145					150					155					160
	Thr	Ile	Glu	Asn	Asn	Thr	Leu	Trp	Thr	Gly	Ala	Lys	Pro	Ser	Ala	Asn
					165					170					175	
	Cys	Val	Ile	Lys	Glu	Gly	Glu	Asp	Ser	Pro	Asp	Cys	Lys	Leu	Thr	Leu
				180					185					190		
	Val	Leu	Val	Lys	Asn	Gly	Gly	Leu	Ile	Asn	Gly	Tyr	Ile	Thr	Leu	Met
			195					200					205			
	Gly	Ala	Ser	Glu	Tyr	Thr	Asn	Thr	Leu	Phe	Lys	Asn	Asn	Gln	Val	Thr
		210					215					220				
	Ile	Asp	Val	Asn	Leu	Ala	Phe	Asp	Asn	Thr	Gly	Gln	Ile	Ile	Thr	Tyr
	225					230					235					240
	Leu	Ser	Ser	Leu	Lys	Ser	Asn	Leu	Asn	Phe	Lys	Asp	Asn	Gln	Asn	Met
					245					250					255	
	Ala	Thr	Gly	Thr	Ile	Thr	Ser	Ala	Lys	Gly	Phe	Met	Pro	Ser	Thr	Thr
				260					265					270		
	Ala	Tyr	Pro	Phe	Ile	Thr	Tyr	Ala	Thr	Glu	Thr	Leu	Asn	Glu	Asp	Tyr
			275					280					285			
	Ile	Tyr	Gly	Glu	Cys	Tyr	Tyr	Lys	Ser	Thr	Asn	Gly	Thr	Leu	Phe	Pro
		290					295					300				
	Leu	Lys	Val	Thr	Val	Thr	Leu	Asn	Arg	Arg	Met	Leu	Ala	Ser	Gly	Met
	305					310					315					320
	Ala	Tyr	Ala	Met	Asn	Phe	Ser	Trp	Ser	Leu	Asn	Ala	Glu	Glu	Ala	Pro
					325					330					335	
	Glu	Thr	Thr	Glu	Val	Thr	Leu	Ile	Thr	Ser	Pro	Phe	Phe	Phe	Ser	Tyr
				340					345					350		
	Ile	Arg	Glu	Asp												
			355													

<210> 87
 <211> 325
 5 <212> PRT
 <213> adenoviridae

<220>
 <221> CADENA
 10 <222> (1)..(325)
 <223> /obsérvese="Proteína fibra de Adenovirus de serotipo 35"

<400> 87
 15 Met Leu Leu Gln Met Lys Arg Ala Arg Pro Ser Glu Asp Thr Phe Asn

<213> adenoviridae

<220>

<221> CADENA

5 <222> (1)..(325)

<223> /obsérvese="Proteína fibra de Adenovirus de serotipo 51"

<400> 88

```

Met Leu Leu Gln Met Lys Arg Ala Arg Pro Ser Glu Asp Thr Phe Asn
 1           5           10           15

Pro Val Tyr Pro Tyr Glu Asp Glu Ser Thr Ser Gln His Pro Phe Ile
          20           25           30

Asn Pro Gly Phe Ile Ser Pro Asn Gly Phe Thr Gln Ser Pro Asp Gly
          35           40           45

Val Leu Thr Leu Asn Cys Leu Thr Pro Leu Thr Thr Thr Gly Gly Pro
 50           55           60

Leu Gln Leu Lys Val Gly Gly Gly Leu Ile Val Asp Asp Thr Asp Gly
 65           70           75           80

Thr Leu Gln Glu Asn Ile Arg Val Thr Ala Pro Ile Thr Lys Asn Asn
          85           90           95

His Ser Val Glu Leu Ser Ile Gly Asn Gly Leu Glu Thr Gln Asn Asn
          100          105          110

Lys Leu Cys Ala Lys Leu Gly Asn Gly Leu Lys Phe Asn Asn Gly Asp
          115          120          125
    
```

10

ES 2 372 823 T3

Ile Cys Ile Lys Asp Ser Ile Asn Thr Leu Trp Thr Gly Ile Lys Pro
 130 135 140

Pro Pro Asn Cys Gln Ile Val Glu Asn Thr Asp Thr Asn Asp Gly Lys
 145 150 155 160

Leu Thr Leu Val Leu Val Lys Asn Gly Gly Leu Val Asn Gly Tyr Val
 165 170 175

Ser Leu Val Gly Val Ser Asp Thr Val Asn Gln Met Phe Thr Gln Lys
 180 185 190

Ser Ala Thr Ile Gln Leu Arg Leu Tyr Phe Asp Ser Ser Gly Asn Leu
 195 200 205

Leu Thr Asp Glu Ser Asn Leu Lys Ile Pro Leu Lys Asn Lys Ser Ser
 210 215 220

Thr Ala Thr Ser Glu Ala Ala Thr Ser Ser Lys Ala Phe Met Pro Ser
 225 230 235 240

Thr Thr Ala Tyr Pro Phe Asn Thr Thr Thr Arg Asp Ser Glu Asn Tyr
 245 250 255

Ile His Gly Ile Cys Tyr Tyr Met Thr Ser Tyr Asp Arg Ser Leu Val
 260 265 270

Pro Leu Asn Ile Ser Ile Met Leu Asn Ser Arg Thr Ile Ser Ser Asn
 275 280 285

Val Ala Tyr Ala Ile Gln Phe Glu Trp Asn Leu Asn Ala Lys Glu Ser
 290 295 300

Pro Glu Ser Asn Ile Ala Thr Leu Thr Thr Ser Pro Phe Phe Phe Ser
 305 310 315 320

Tyr Ile Ile Glu Asp
 325

REIVINDICACIONES

- 5 1.Un adenovirus recombinante, que comprende una delección en la región E1, volviendo dicha delección a dicho adenovirus incompetente para la replicación donde dicho adenovirus es un adenovirus humano de serotipo 11 (Ad11).
- 2.Un adenovirus recombinante según la reivindicación 1, donde dicho adenovirus comprende un gen de interés.
- 10 3. Un adenovirus recombinante según la reivindicación 2, donde dicho gen de interés es incorporado en la posición de la delección E1.
4. Un ácido nucleico que codifica un adenovirus recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
- 15 5. Una célula que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 4.
6. Una célula según la reivindicación 5, que completa los elementos necesarios para la replicación adenoviral que están ausentes del ácido nucleico según la reivindicación 4.
- 20 7. Una célula según la reivindicación 6, que se origina a partir de una célula PER.C6 cell (número de consigna ECACC 96022940).
- 25 8. Un método para producir un adenovirus recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende expresar un ácido nucleico según la reivindicación 4 en una célula según una cualquiera de las reivindicaciones 5-7, y cosechar el adenovirus recombinante resultante.

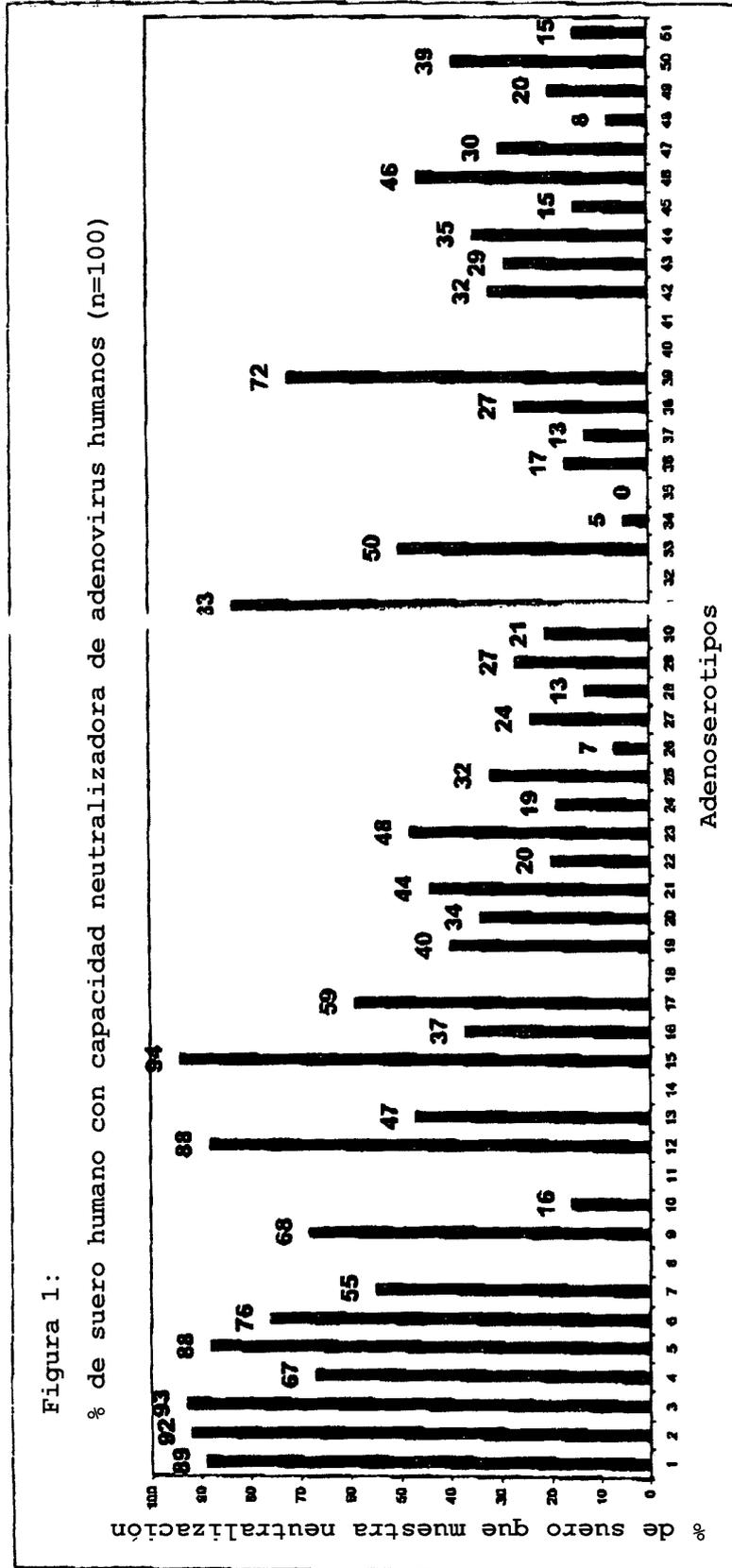


Figura 2

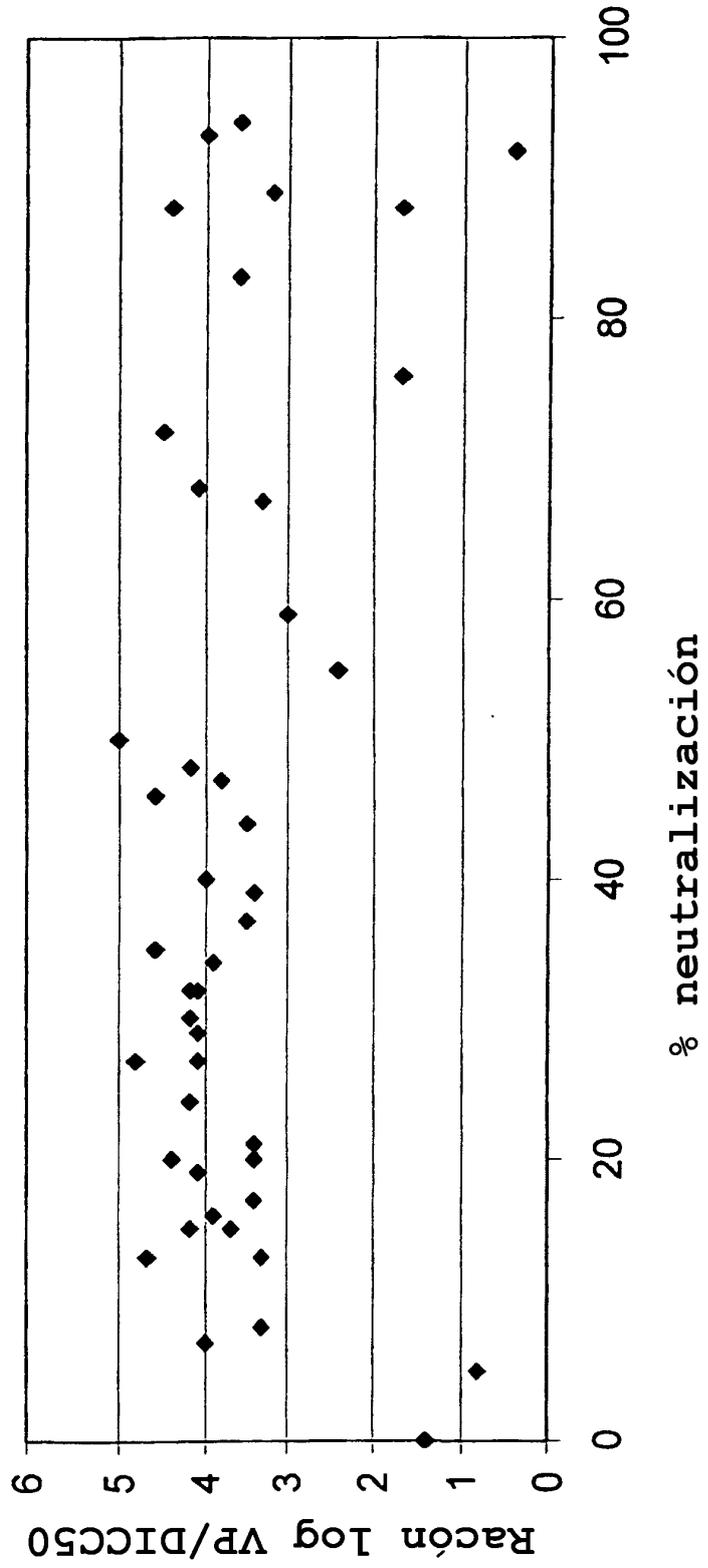


Figura 3: Sistema basado en el plásmido Ad35 para la generación de virus

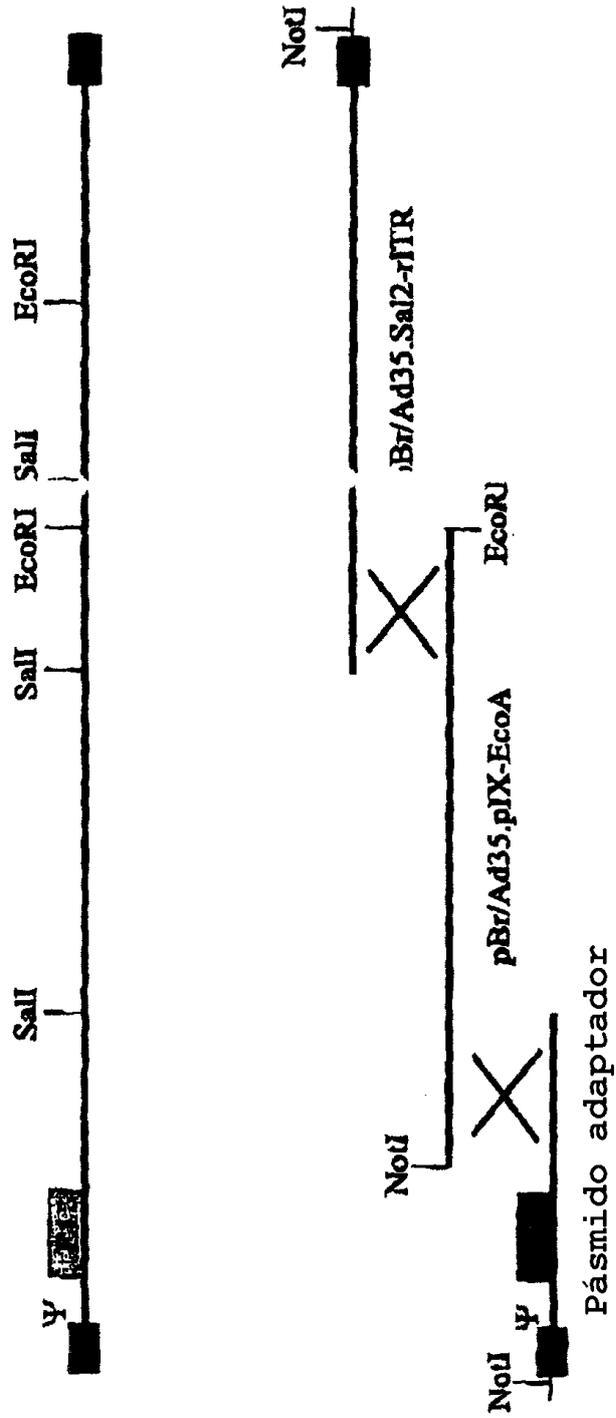


Figura 4
Neutralización en sueros humanos

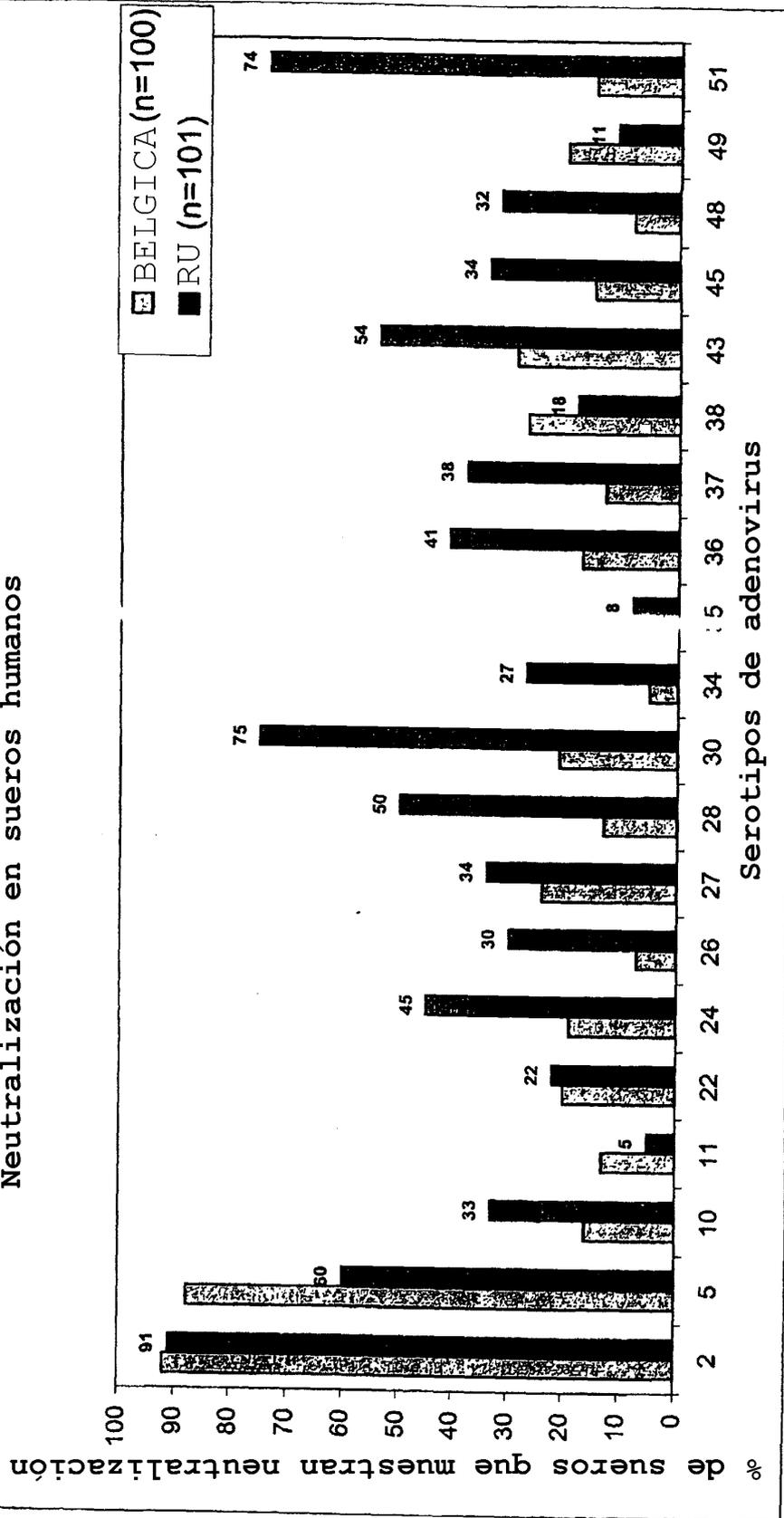


Figura 5
Neutralización en sueros humanos de diferentes localizaciones geográficas

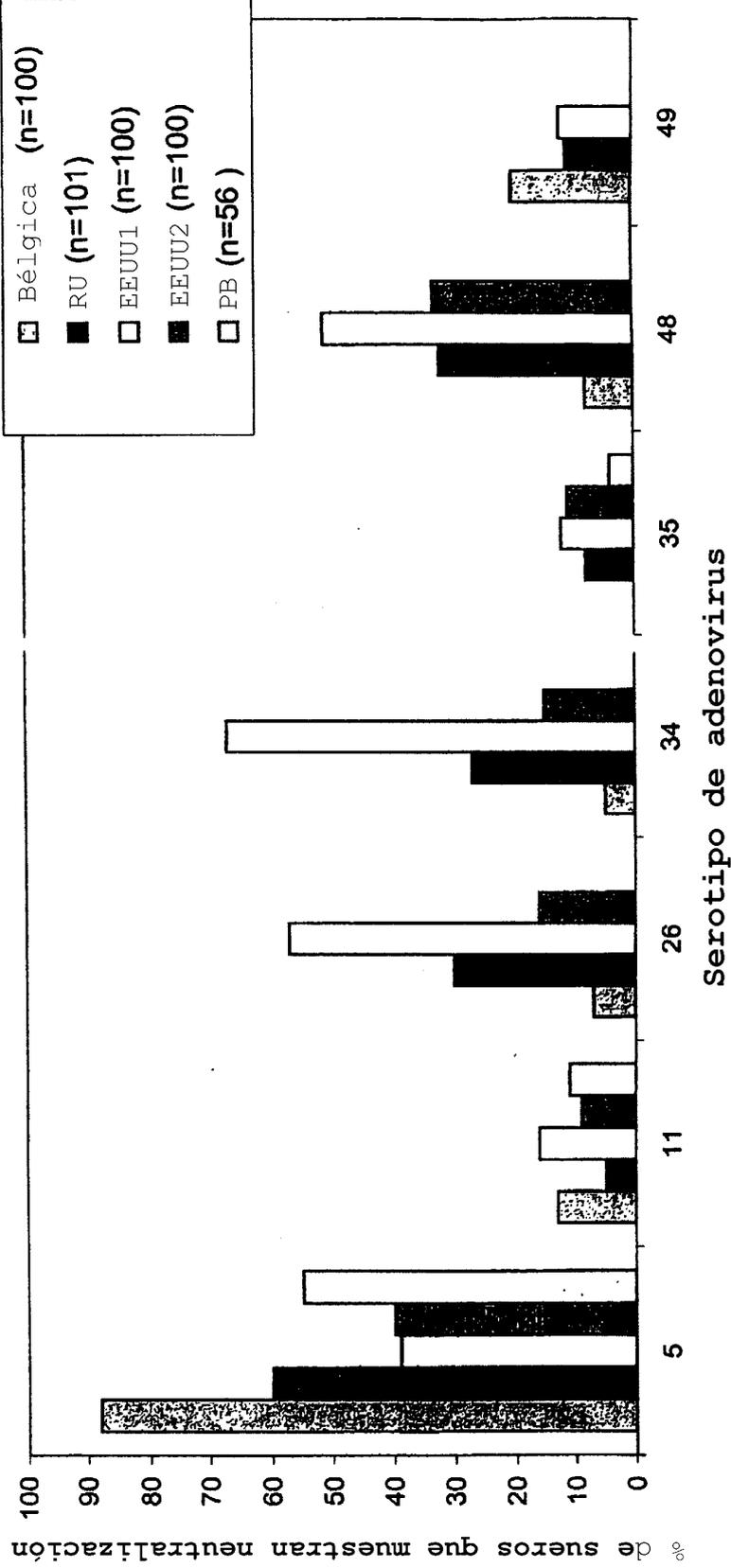


Figura 6: Secuencia completa de Ad35

```

1 CATCATCAAT AATATACCTT ATAGATGGAA TGGTGCCAAT ATGTAATGA GGTGATTTTA AAAAGTGTGG
71 GCCGTGTGGT GATTGGCTGT GGGGTTAACG GTTAAAAGGG GCGGCGCGGC CGTGGGAAAA TGACGTTTTA
141 TGGGGGTGGA GTTTTTTTGC AAGTTGTGCG GGAATATGTT ACGCATAAAA AGGCTTCTTT TCTCACGGAA
211 CTACTTAGTT TTTCCACGGT ATTTAACAGG AAATGAGGTA GTTTTGACCG GATGCAAGTG AAAATTGCTG
281 ATTTTCGCGC GAAAACTGAA TGAGGAAGTG TTTTCTGAA TAATGTGGTA TTTATGGCAG GGTGGAGTAT
351 TTGTTACAGG CCAGGTAGAC TTTGACCCAT TACGTGGAGG TTTTCGATTAC CGTGTTTTTT ACCTGAATTT
421 CCGCGTACCG TGTCAAAGTC TTCTGTTTTT ACGTAGGTTG CAGCTGATCG CTAGGGTATT TATACCTCAG
491 GGTGTTGTGC AAGAGGCCAC TCTTGAGTGC CAGCGAGAAG AGTTTTCTCC TCTGCGCCCG CAGTTAATA
561 ATAAAAAAT GAGAGATTG CGATTTCTGC CTCAGGAAAT AATCTCTGCT GAGACTGGAA ATGAAATATT
631 GGAGCTTGTG GTGCACGCC TCATGGGAGA CGATCCGGAG CCACCTGTGC AGCTTTTTGA GCCTCCACG
701 CTTCAGGAAC TGTATGATTT AGAGGTAGAG GGATCCGAGG ATTCTAATGA GGAAGCTGTG AATGGCTTTT
771 TTACCGATTG TATGCTTTTA GCTGCTAATG AAGGATTAGA ATTAGATCCG CCTTTGGACA CTTTCAATAC
841 TCAGGGGGT ATTGTGGAAA GCGGTACAGG TGTAAAGAAA TTACCTGATT TGAGTTCCGT GGACTGTGAT
911 TTGCACTGCT ATGAAGACGG GTTTCCCTCG AGTGATGAGG AGGACCATGA AAAGGAGCAG TCCATGCAGA
981 CTGCAGCGGG TGAGGGAGTG AAGGCTGCCA ATGTGTGGTT TCACTGGAT TGCCCGGAGC TTCTGGACA
1051 TGGCTGTAAG TCTGTGAAT TTCACAGGAA AAATACTGGA GTAAGGAAC TGTATGTTT CTTTTGTTAT
1121 ATGAGAACC GACTGCCACT TATTTACAGT AAGTGTGTT AAGTTAAAT TTAAGGAAT ATGCTGTTTT
1191 TCACATGTAT ATTAGAGTGT AGTTTTCTGC TTCTTATAT AGGTCCTGTG TCTGATGCTG ATGAATCACC
1261 ATCTCCTGAT TCTACTACCT CACCTCCTGA TATTCAGCA CCTGTTCCTG TGGACGTGCG CAAGCCCAT
1331 CTTGTGAAGC TTAAGCCTGG GAAACGTCCA CGAGTGGAGA AACTTGAGGA CTGTGTACAG GGTGGGGCAG
1401 GACCTTTGGA CTTGAGTACA CGGAAACGTC CAAGACAATA AGTGTCCAT ATCCGTGTTT ACTTAAGGTG
1471 ACCTCAATAT TTGTGTGAGA GTGCAATGTA ATAAAAATAT GTTAACTGTT CACTGGTTTT TATTGCTTTT
1541 TGGGCGGGGA CTCAGGTATA TAAGTAGAAG CAGACCTGTG TGGTTAGCTC ATAGGAGCTG GCTTTCATCC
1611 ATGGAGGTTT GGGGACCTTT GGAAGACCTT AGGAAGACTA GGCAACTGT AGAGAGCGCT TCGGACGGAG
1681 TCTCCGTTT TTGGAGATTC TGGTTCGCTA GTGAATTAGC TAGGGTAGTT TTTAGGATAA AACAGGACTA
1751 TAAACAAAGAA TTTGAAAAGT TGTGTTGAGA TTGCCCGAGA CTTTTTGAAG CTCTTAATTT GGGCCATCAG
1821 GTTCACTTTA AAGAAAAAGT TTTATCAGTT TTAGACTTTT CAACCCAGG TAGAACTGCT GCTGCTGTGG
1891 CTTTTCTTAC TTTTATATTA GATAAATGGA TCCCGCAGAC TCATTTACAGC AGGGGATACG TTTTGGATT
1961 CATAGCCACA GCATTTGGA GAACATGGAA GGTTCGCAAG ATGAGGACAA TCTTAGGTTA CTGGCCAGTG
2031 GACGCTTTGG TGTGAGCGGG AATCCTGAGG CATCCACCGG TCATGCCAGC GGTTCGGAG GAGGAACAGC
2101 AAGAGGACAA CCCGAGAGCC GGCCTGGACC CTCCAGTGGG GAGGGCGGAG TAGCTGACTT GTCTCCTGAA
2171 CTGCAACGGG TGCTTACTGG ATCTACTGCC ACTGGACGGG ATAGGGCGGT TAAGAGGGAG AGGGCATCCA
2241 GTGGTACTGA TGCTAGATCT GAGTTGGCTT TAAGTTTAAAT GAGTCCGAGA CGTCTGAAA CCATTTGGTG
2311 GCATGAGGTT CAGAAAGAGG AAGGGATGA AGTTTCTGTA TTGCAGGAGA AATATTCAC TGAACAGGTT
2381 AAAACATGTT GGTGAGGCC AGAGGATGAT TGGGCGGTGG CCATTAATAA TTATGCCAAG ATAGCTTTGA
2451 GGCCGTGATA ACAGTATAAG ATCAGTAGAC GGATTAATAT CCGGAATGCT TGTACATAT CTGGAATGG
2521 GCGTAGGGTG GTAATAGATA CTCAGACAA GACAGTTATT AGATGCTGCA TGATGGATAT GTGCGCTGGA
2591 GTAGTCGGTA TGGAAAGCAGT CACTTTTGT AATGTTAAGT TTAGGGGAGA TGGTTATAAT GGAATAGTGT
2661 TTAGTGCCAA TACCAAACT ATATTGCATG GTTGTAGCTT TTTTGGTTT AACAACTCT GTGTAGATGC
2731 CTGGGGACAG GTTAGGTGAC GGGGGTGTAG TTTCTATGCG TGTGGATTG CCACAGCTGG CAGAACCAG
2801 AGTCAATGTT CTCTGAAGAA ATGCATATTC CAAAGATGTA ACCTGGGCAT TCTGAATGAA GGCAGACAA
2871 GGGTCCGTCA CTGCGCTTCT ACAGATACTG GATGTTTTAT TTTAATTAAG GGAATGCCA GCGTAAAGCA
2941 TAACATGATT TGTGGTGTCT CCGATGAGAG GCCTTATCAA ATGCTCACTT GTGCTGGTGG GCATTTGTAAT
3011 ATGCTGGCTA CTGTGCATAT TGTTTCCCAT CAACGCAAAA AATGGCCTGT TTTTGTACAC AATGTGTGTA
3081 CCAAGTGCAC CATGCATGCA GGTGGGCGTA GAGGAATGTT TATGCTTAC CAGTGAACA TGAATCATGT
3151 GAAAGTGTG TTGGAACCAG ATGCCTTTT CAGAATGAGC CTAACAGGAA TCTTTGACAT GAACACGCAA
3221 ATCTGGGAAGA TCCTGAGGTA TGATGATACG AGATCGAGGG TGCCGCGCATG CGAATGCCGA GGCAGCAGT
3291 CCAGGTTCCA CCGGTGTGT GTAGATGTA CCGAAGATCT CAGACCGGAT CATTGGTTA TTGCCGAC
3361 TGGAGCAGAG TTCGGATCCA GTGGAAGA AACTGACTAA GGTGAGTATT GGGAAAACCT TGGGGTGGGA
3431 TTTTCAGAG GACAGATTGA GTA AAAATTT GTTTTTCTG CTTTCAGCT GACATGAGTG GAAATGCTC
3501 TTTAAGGGG GGAGTCTTCA GCCCTTATCT GACAGGGCGT CTCCCATCTT GGGCAGGAGT TCGTCAGAAT
3571 GTTATGGGAT CTACTGTGGA TGGAAAGACC GTTCAACCCG CCAATTTCTC AACGCTGACC TATGCTACTT
3641 TAAGTTCTTC ACCTTTGGAC GCAGCTGCAG CCGCTGCCG CCGCTCTGTC GCCGTAACA CTGTGCTTGG
3711 AATGGGTTAC TATGGAAGCA TCGTGGCTAA TTCCACTTCC TCTAATAACC CTCTTACACT GACTCAGGAC
3781 AAGTTACTTG TCCTTTTGGC CCAAGCTGGG GCTTTGACCC AACGTCTGGG TGAACTTTCT CAGCAGGTGG
3851 CCGAGTTGCG AGTACAAACT GAGTCTGCTG TCGGCACGGC AAAGTCTAAA TAAAAAAT TCCAGAATCA
3921 ATGAATAAAT AAACGAGCTT GTTGTGATT TAAAATCAAG TGTTTTTAT TCATTTTTCC CGCACGGTAT
3991 GCCTTGACC ACCGATCTCG ATCATTGAGA ACTCGGTGGA TTTTTCAG AATCCTATAG AGTGGGAT
4061 GAATGTTTAG ATACATGGGC ATTAGGCCGT CTTTGGGGTG GAGATAGCTC CATTGAAGGG ATTCATGCTC
4131 CCGGGTAGTG TTGTAATCA CCCAGTCATA ACAAGTCCG AGTGCATGTT GTTGCAAAAT ATCTTTTGA
4201 AGTAGGCTGA TTGCCACAGA TAAGCCCTTG GTGTAGGTTG TTACAAACCG GTTGTAGCTGG GAGGGTGA
4271 TTCGAGGTGA AATATGTGC ATTTTGGATT GGATTTTAA GTTGGCAATA TTGCCGCAA GATCCGCTC
4341 TGGGTTTCATG TTATGAAGGA CTACCAAGAC GGTGTATCCG GTACATTTAG GAAATTTATC GTGCAGCTG
4411 GATGGAAAAG CGTGGAAAAA TTTGGAGACA CCCTTGTGTC CTCCGAGATT TTCCATGCAC TCATCCATGA
4481 TAATGACAAAT GGGGCCGTGG GCAGCGCGCC GGGCAACAC GTTCCGTGGG TCTGACACAT CATAGTTATG
4551 TTCTGAGTT AAATCATCAT AAGCCATTTT AATGAATTTG GGGCGGAGCC TACCAGATTG GGTATGGAAT
4621 GTTCTTCCGG GCCCGGAGC ATAGTTCCCC TCACAGATTG GCATTTCCCA AGCTTTCAGT TCTGAGGGTG
4691 GAATCATGTC CACCTGGGGG GCTATGAAGA ACACCGTTTC GGGGGCGGGG GTGATTAGTT GGGATGATAG
4761 CAAGTTTCTG AGCAATTGAG ATTTGCCACA TCCGGTGGGG CCATAAATAA TTCCGATTAC AGGTGCAGG
4831 TGGTAGTTTA GGGAAACGCA ACTGCCGTCT TCTCGAAGCA AGGGGCCAC CTCTTACATC ATTTCCCTTA
4901 CATGCATATT TTCCCGCACC AAAATCCATTA GGAGGCGCTC TCCTCTAGT GATAGAAGTT CTTGTAGTGA
4971 GAAAAAGTTT TTAGCCGTTT TTAGACCCTC AGCCATGGGC ATTTTGGAAA GAGTTTGTCTG

```

5

10 Figura 6. continuación

5041 AGTCTGTCC ACAGTTCAGT GATGTGTTCT ATGGCATCTC GATCCAGCAG ACCTCCTCGT TTCGCGGGTT
5111 TGGACGGCTC TGGAGTAGG GTATGAGACG ATGGGCGTCC AGCGCTGCCA GGGTTCGGTC CTTCCAGGGT
5181 CTCAGTGTTC GAGTCAGGGT TGTTCCTGTC ACAGTGAAGG GGTGTGCGCC TGCTTGGGCG CTTGCCAGGG
5251 TGCCTTCCAG ACTCATTCTG CTGGTGGAGA ACTTCTGFCG CTTGCCGCC CTTATGTCCG CCAAGTAGCA
5321 GTTTACCATG AGTTCGTAGT TGAGCGCCTC GGCTGCGTGG CCTTTGGCGC GGAGCTTACC TTTGGAAGTT
5391 TTCTTGCCATA CCGGGCAGTA TAGGCATTTT AGCCCATACA GCTTTGGCGC AAGGAAAATG GATTTCTGGG
5461 AGTATGCATC CGCGCCCGAG GAGGCGCAAA CAGTTTACCA TTTCCACCAG CAGGTTAAAT CCGGTTTATT
5531 GGGGTCAAAG ACAAGTTTTT CGCCATATTT TTTGATGCGT TTCTTACCTT TGGTCTCCAT AAGTTCGTTG
5601 CCTCGTTGAG TGACAAAACG GCTGTCCGTA TCTCCGTAGA CTGATTTTAC AGGCTCTTTC TCCAGTGGAG
5671 TCCCTCGGTC TTCTTCGTAC AGGAACTCTG ACCACTCTGA TACAAAAGCG CGCGTCCAGG CCAGCACAAA
5741 GGAGGCTATG TGGGAGGGT AGCGATCGTT GTCAACCAGG GGGTCCACCT TTCCAAAAGT ATGCAAAAC
5811 ATGTCCACCT CTCAACATC CAGGAATGTG ATTGGCTTGT AGGTGTATTT CACGTGACCT GGGGTCCCGG
5881 CTGGGGGGGT ATAAAAGGGG GCGGTTCTTT GCTCTTCTCC ACTGTCTTCC GGATCGCTGT CCAGGAACGT
5951 CAGCTGTGAG GGTAGGTATT CCTCTCGAA GCGGGCATG ACCTCTGCAC TCAGGTTGTC AGTTTCTAAG
6021 AACGAGGAGG ATTTGATATT CACAGTCCCG GTTGAGATGC CTTTCATGAG GTTTTCGTC CTTTGGTCAG
6091 AAAACACAAT TTTTTTATTG TCAAGTTTGG TGGCAAATGA TCCATACAGG CCGTTGGATA AAAGTTTGGC
6161 AATGGAATCG ATGGTTTGGT TCTTTTCTTT GTCGCGCGC CTTTGGCGC CGATGTTGAG TTGGACATAC
6231 TCGGCTGCCA GGCATTTCCA TTCGGGGAAG ATAGTTGTTA ATTCATCTGG CACGATTTCT ACTTCCACC
6301 CTCGATTATG CAAGGTAATT AAATCCACAC TGGTGGCCAC CTCGCTCGA AGGGTTCAT TGGTCCAACA
6371 GAGCCTACCT CTTTCTTAG ATTTCCTAG AACGAAAAGG GGAAGTGGG TCTAGCATAA GTTCATCCGG AGGTCTGCA
6441 TCCATGGTAA AGATTCCTGG AAGTAAATCC TTATCAAAAT AGCTGATGGG AGTGGGGTCA TCTAAGGCCA
6511 TTTGCTACCG ATGCTTGGT CATATGGGTT AAGGGGACTG CCGGAGGCTA CCGGAGGCTA TGGGATGGG
6581 GAGAGCAGAG GCATACATGC CACAGATGTC ATAGACGTAG ATGGGATCCT CAAAGATGCC TATGTAGGTT
6651 GATAGCATGC GCGCCCTCT GATACTTGTG CGCACATAGT CATATAGTTC ATGTGATGGC GCTAGCAGCC
6721 CCGGACCCAA GTTGGTGGCA TTGGGTTTTT CTGTTCTGTA GACGATCTGG CGAAGATGG CGTGAGAAAT
6791 GGAAGAGATG GTGGGCTTTT GAAAAATGTT GAAATGGGCA TGAGGTAGAC CTACAGAGTC TCTGACAAA
6861 TGGGCATAAG ATCTTTGAAG CTTGGTTACC AGTTCGGCGG TGACAAAGTAC GTCTAGGGCG CAGTAGTCAA
6931 GTGTTTCTTG AATGATGTCA TAACCTTGGT GGTTTTTCTT TTCCACAGT TCGGGTGA GAAGGTATTC
7001 TTCGCGATCC TTCCAGTACT CTCTAGCCG AAACCCGTCT TTGCTGAC GGAAGATCC TAGCATGTAG
7071 AACTGATTAAC CTGCTTGTGA AGGGCAGCAG CCTTCTCTA CCGGTAGAGA GTATGCTTGA GCAGCTTTTC
7141 GTAGCGAAGC GTGAGTAAGG GCAAAGGTGT CTCTGACCAT GACTTTGAGA AATTTGGTAT TGAAGTCCAT
7211 GTGCTACACG GCTCCCTGTT CCGAGTGTG GAAATCTACC CGTTTTCTGT AGGCGGGCG GGGCAAAGCG
7281 AAGTAACATC CATTGAAGAG AATCTTACC GCTCTGGGCA TAAAATTGCG AGTGTGCGG AAAGGCTGTG
7351 GACTTCCCGC TCGATTGTTG ATCACCTGGG CAGCTAGGAC GATTTCTGCG AAACCGTTGA TGTGTGTGTC
7421 TACGATGTAT AATTCTATGA AACCGCGCGT GCCTCTGACG TGAGGTAGCT TACTGAGCTC ATCAAAAGTT
7491 AGGTCTGTGG GGTACAGTAA GCGGTAGTGT TCGAGAGCCC ATCTGTGACG GTGAGGATTT GCATGTAGGA
7561 ATGATGACCA AAGATTTACC GGTGTAAGT GAAATCTACC CGTTTTCTGT AGGCGGGCG GGGCAAAGCG
7631 TGCCATTTTT TCTGGAGTGA CACAGTAGAA GGTCTCTGGG TCTTGTGTC ATCGATCCCA CTTGAGTTTA
7701 ATGGCTAGAT CGTGGGCCAT GTTGACGAGA CGCTCTTCTC CTGAGAGTTT CATGACCAGC ATGAAAAGGA
7771 CTAGTTGTTT GCCAAGGAT CCCATCCAGG TGTAAAGTTT CACATCGTAG GTCAGGAAGA GTCTTTCTGT
7841 GCGAGGATGA GAGCCGATCG GGAAGAAGT GATTTCTGCG CACCAGTTGG AGGATTTGGT GTTGATGTGA
7911 TGGAAAGTGA AGTTTCTGCG GCGCGCCGAG CATTCGTGTT TGTGCTTGA CAGACGGCGC CAGTAGTCCG
7981 AGCCTTGCAC GGGTTGTATC TCGTGAATGA GCTGTACCTG GCTTCCCTTG ACAGAAAAT TCAAGTGGGA
8051 GCGGAGGCGT GCGGATTGTA TCTCGTGTCT TTCTATATTC GCTGTATCGG CTTGTTTATC TTCTGTPTCC
8121 ATGGTGGTCA TGTCTGACGAG CCCCCGCGG AGGCAAGTCC AGACCTCGG CCGGAGGGG CCGAGCTGAA
8191 GGACGAGAGC GCGCAGGCTG GAGCTGTCCA GAGTCTGAG ACCTGCGGA CTCAGGTTAG TAGGTAGGGA
8261 CAGAAGATTA AGTTTCTGTA TCTTTTCCAG GCGGTGCGGG AGTTTACAGT GGTACTTGT TCCACAGGT
8331 TCGTTGTAG AGACGTCAAT GCGTTGACG GTTCCGTGTC CTTTGGGCG CACTACCGTA CCTTTGTTTT
8401 TTCTTTTGTAG CCGTGGTGGC TCTTCTGCTT CTTCATGCT CAGAAGCGGT GACGGGGACG CCGCCCGGGC
8471 GGCAGCGGTT TCTCCGACC CCGGGGCATG GCTGGTAGTG GCACGTGCG CCGCGCACG GCGAGGTTCT
8541 GGTATTGCGC TCTGAGAAGA CTTGCGTGGC CCACCCAGCG TCGATTGACG TCTTGTATCT GACGCTCTGT
8611 GGTAAAAGCT ACCGGCCCGG TGAGCTTCAA CCGTGAAGAG AGTTCAACAG AATCAATTTT GGTATCGTTA
8681 ACCGCAGCTT GTCTCAGTAT TTCTTGTACG TCACCAGAGT TGCTCTGGTA GCGGATCTCC GCCATGAACT
8751 GCTCGATTTT TTCTCTCTGA AGATCTCCGC GACCCGCTCT TTCCAGGCTG CCGCGGAGGT CATTGGAGAT
8821 ACCGGCCATG AGTTGGGAGA ATGCATTCAT GCGCGCTCG TTCCAGACG GCGTGTAAAC CACGGCCCGC
8891 TCGGAGTCTC TTGCGCGCAT CACCACCTGA GCGAGGTTAA GCTCCACGTC TCTGTTGAAG ACCGCATAGT
8961 TGATAGGCGC CTGAAAAGG TAGTTGAGTG TGGTGGCAAT GTGTTGCGG CCGAAGAAAT ACATGATCCA
9031 TCGTCTCAGC GGCATTTCGC TAACATCGCC CAGAGCTTCC AAGCGCTCCA TGGCCTCGTA GAAGTCCACG
9101 GCAAAAATTA AAAACTGGGA GTTTCGCGCG GACACGGTCA ATCTCTCTC GAGAAGACGG ATGAGTTCCG
9171 CTATGGTGGC CCGTACTTCG CGTTCGAAGG CTCCCGGGAT CTCTTCTTCC TCTTCTATCT CTTCTTCCAC
9241 TAACATCTCT TCTTCTCTT CAGCGCGGGG CCGGAGGGGG ACGCGCGGAC GTCGACGGCG CACGGGCAA
9311 CCGTCCGATC ATCGTTCAAT GACCTCTCCG CCGCGCGGGC GCATGGTTTC AGTGACGGCG CCGCGCTTCT
9381 CGCGCGGTCG CAGAGTAAAA ACACCCCGCG GCATCTCTTT AAAGTGGTGA CTGGGAGGTT CTTCCGTTGG
9451 GAGGAGGAGG GCGCTGATTA TACATTTTAT TAATTTGGCC GTAGGGACTG CCGCGCAGGA TCTGATCGTG
9521 TCAAGATCCA CCGGATCTGA AAACCTTTCG ACGAAAAGCGT CTAACCACTC ACAGTCAAAA GGTAGGCTGA
9591 GTACGCTTTC TTGTTGGCGG GGTGTTTAT GTGTTGCGTC TGGTCTTCT GTTCTTCTT CATCTCGGGA
9661 AGGTGAGACG ATGCTGTGTT TGATGAAAT AAAGTAGGCA GTTCTAAGAC GCGGATGTT GCGGAGGAGC
9731 ACCAGGCTTT TGGGTCGGC TTGCTGGATA CGCAGCGGAT TGGCCATTC CCAAGCATTA TCTGACATC
9801 TAGCAAGATC TTTGTAGTAG TCTTGCATGA CCGCTTCTAC GGGCACTTCT TCTCACCCTG TCTGCCATG
9871 CATACGTGTC AGTCCAATC CGCGCATTTG TTGTACCACT GCCAAGTCA CTACGACTT TCGGCGAGG
9941 ATGGCTTGTCT GACTTGGGT AAGGGTGGCT TGAAGTCAAT CAAAATCCAC AAAGCGGTGG TAAGCCCTG
10011 TATTAATGGT GTAAGCACAG TTGGCCATGA CTGACCAAGT AACTGTCTGG TGACCGAGG CACGAGCTC
10081 GGTGTATTTA AGGCGCAAT AGGCGCGGGT GTCAAAGAT TAATCGTTG AGGTGCGCAC CAGATACTGG
10151 TACCTATAA GAAAATGCGG CCGTGGTTGG CCGTAGAGAG GCATCTGTT TGTAGCTGGA CCGCCAGGG

Figura 6. continuación

10221 CGAGGTCTTC CAACATAAGG CCGTGATAGC CGTAGATGTA CCTGGACATC CAGGTGATTC CTGCGCGGT
10291 AGTAGAAGCC CGAGGAAACT CCGGTACGCG GTTCCAAATG TTGCGTAGCG GCATGAAGTA GTTCATTGTA
10361 GGCACGGTTT GACCAGTGAG GCGCGCGCAG TCATTGATGC TCTATAGACA CCGAGAAAAT GAAAGCGTTC
10431 AGCGACTCGA CTCCGTAGCC TGGAGGAACG TGAACGGGTT GGGTCGCGGT GTACCCCGGT TCGAGACTTG
10501 TACTCGAGCC GGCCGAGGCC GCGGTAAACG TGGTATTGGC ACTCCCGTCT CGACCAGCC TACAAAAATC
10571 CAGGATACGG AATCGAGTCC TTTTGTGGT TFCGGAATGG CAGGGAAGTG AGTCCATTAT TTTTTTTTTT
10641 TTTGCCGCTC AGATGCATCC CGTGTGCGA CAGATGCGCC CCAACAACA GCCCCCTCG CAGCAGCAGC
10711 AGCAGCAACC ACAAAGGCT GTCCTGCAA CTACTGCAAC TGCCGCGGTG AGCGGTGCGG GACAGCCCGC
10781 CTATGATCTG GACTTGGAAAG AGGGCGAAGG ACTGGCACGT TTAGGTGCGC CTTCCGCCGA CCGGCATCCG
10851 CGAGTTCAAC TGA AAAAAGA TTCTCGCGAG GCGTATGTC CCCAACAGAA CCTATTTAGA GACAGAAGGG
10921 CGGAGGAGCC GAGGAGATG CGAGCTTCCC GCTTTAACCG GGGTCGTGAG TCGGTCACG GTTTGGACCG
10991 AAGACGAGTG TTGCGAGACG AGGATTTGCA AGTTGATGAA GTGACAGGGA TCAGTCTGTC CAGGGCACAC
11061 GTGGCTGCGC CCAACCTTGT ATCGGCTTAC GAGCAGACAG TAAAGGAAGA CGGTAACCTC CAAAAGTCTT
11131 TTAATAATCA TGTGCGAACC CTGATTGCCC GCGAAGAAGT TACCCTTGGT TTGATGCATT TGTGGGATT
11201 GATGGAAGAT ATCATTACAG ACCCTACTAG CAAACCTCTG ACCGCCAGC TGTTCCTGGT GGTGCAACAC
11271 AGCAGAGACA GAGGAGCTTT CAGAGAGGCG CTGCTGAACA TCACCGAACC CGAGGGGAGA TGGTTGTATG
11341 ATCTTATCAA CATTCTACAG AGTATCATAG TGCAGGAGCG GAGCCTGGGC CTGGCCGAGA AGTGTAGTGC
11411 CATCAATTAC TCGGTTTTGA GCTTGGGAAA ATATTACGCT CGCAAACTT ACAAGACTCC ATACGTTCCTC
11481 ATAGACAAGG AGTGAAGAT AGATGGGTTT TACATGCGCA TGACGCTCAA GGTCTTGACC CTGAGCGATG
11551 ATCTTGGGGT GTATCGCAAT GACAGAATGC ATCCGCGGGT TAGCGCCAGC AGGAGGCGCG AGTAAAGCGA
11621 CAGGGAAGCT GACGACAGT TGCAAGAGC TCTGACTGGA GCTGGAACCG AGGTGAGAA TTACTTCGAC
11691 ATGGGAGCTG ACTTCAGTG GCAGCTAGT GCGAGGCTC TGAGCGCGC GAGCGCAGGA TGTGAGCTTC
11761 CTTACATAGA AGAGGCGGAT GAAGGCGAGG AGGAAGAGGG CAGTACTTTG GAAGACTGAT GGCACAACCC
11831 GTGTTTTTTG TGTGCGAACC CTGATTGCCC GCGAAGAAGT TACCCTTGGT TTGATGCATT TGTGGGATT
11901 CGGCATTAACT CCTCGGACG ATTTGGACCA GGCATGCAA CGTATCATGG CGTTGACGAC TCGCAACCCC
11971 GAAGCCTTTA GACGCAACC CCAAGCCAAC CGTCTATCGG CCATCATGGA AGCTGTAGTG CTTCCCGAT
12041 CTAATCCAC TCATGAGAAG GTCTCGCCA TCGTGAACCG GTTGGTGGAG AACAAAGCTA TCTGTCGAGA
12111 TGAGGCCGGA TGTGATACA AGCTCTCTT AGAACGCTG GCTCGTACA ACAGTAGCAA TGTGCAAACT
12181 AATTTGGACC GTATGATAAC AGATGTACCG GAAAGCGTGT CTCAGCGCGA AAGGTTCCAG CGTGATGCCA
12251 ACCCTGGGTC GCTGTGGCG TTAATGCTT TCTTGAGTAC TCAGCCTGCT AATGTGCCG GTGGTCAACA
12321 GAGTATAACT AACTTTTTAA GTGCTTTGAG ACTGATGGTA TCAGAAGTCA CTCAGAGCGA AGTGTATCAG
12391 TCCGGTCTG ATTACTTCTT TCAGACTAGC AGCAGGGCT TGCAGACGGT AAATCTGAGC CAAGCTTTTA
12461 AAAACCTTAA AGGTTTGTGG GGAGTGCATG CCCCCTTAGG AGAAAGAGCA ACCGTGTCTA GCTTGTAACT
12531 TCCGAACCTC CGCTGTAT TACTGTGGT AGCTCCTTC ACCGACAGCG GTAGCATCGA CCGTAATTCC
12601 TATTTGGGTT ACCTACTAAA CCTGTATCGC GAAGCCATAG GGCAGAGTCA GGTGGACGAG CAGACCTATC
12671 AAGAAATTAC CCAAGTCACT GACAGGAAGA CACTGGCAGT TTGGAAGCCA CTCTGAACTT
12741 CTTGCTTACC AATCGGCTC AAAAGATCCC TCTCAATAT GCTCTTACTG CCGAGGAGGA GAGGATCTCT
12811 AGATATGTGC AGCAGAGCGT GGGATTGTTT CTGATGCAAG AGGGGGCAAC TCCGACTGCA GCACTGGACA
12881 TGACAGCGCG AATATGAGG CCCAGCATGT ATGCCAGTAA CCGACCTTTC ATTAACAAC TGCTGGACTA
12951 CTTGCACAGA GCTGCGGCTA TGAACCTGTA TTATTTCACC AATGCCATCT TAAACCCGCA CTGGCTGCC
13021 CCACCTGGTT TCTACACGGG CGAATATGAC ATGCCCGACC CTAATGACGG ATTTCTGTGG GACGACGTGG
13091 ACAGGAGTGT TTTTTCACCT CTTTCTGATC ATCCGACGTG GAAAAAGGAA GGGCGTGATA GAATGCATTC
13161 TTCTGCATCG CAGTATGAGC TCAATGGTGC TACCGCGGCT GAGCCCGAGT TCGCAAGTCC TTTTCTGAT
13231 CTACCTCTTT CTCTACACAG TGTACGTAGC AGCGAAGTGG GTAGAATAAG TCGCCCGAGT TTAATGGGG
13301 AAGAGGAGTA CCTAAACGAT TCCTTGCTCA GACCGGCAAG AGAAAAAAT TTCCCAACA ATGGAATAGA
13371 AAGTTTGGTG GATAAATGTA GTAGATGGAA GACTTATGCT CAGGATCACA GAGACATGCA TGGGATCATG
13441 GGGACTACAA GTAGAGCGAG CCGTAGACCG CAGCGCCATG ACAGACAGAG GGGTCTTGTG TGGGACGATG
13511 AGGATTCGGC CGATGATAGC AGCGTGTGG ACTTGGTGG GAGAGGAAGG GGCAACCCGT TTGCTCATT
13581 GCGCCCTCGC TTGGTGGTA TGTGTGAAA AAAAATAAAA AAGAAAAACT CACCAAGGCC ATGGCGACCA
13651 CGGTACGTTT GTTCTTCTT ATTATCTGTG TCTAGTATA TGAGCGAGT CCGTCTAGCG GGAGCGGTGG
13721 TGTATCCGGA GGGTCTCCTT CCTTCGTACG AGAGCGTAT GCAGCAGCAG CAGGCGACGG CCGTGTATGA
13791 ATCCCCACTG GAGGCTCCCT TTGTGCTTCC GCGATACCTG GCACCTACGG AGGGCAGAAA CAGCATTCGT
13861 TACTCGAAC TGGCACCTCA GTACGATACC ACCAGTGTG ATCTGGTGA CAACAAGTGC CCGGACATG
13931 CTTCTCTGAA CTATCAGRAA GACCACAGCA ACTTCTGAC CACGGTGTG CAGAACAACT ACTTACCCC
14001 TACGGAAGCC AGCACCAGA CCATTAACCT TGATGAACGA TCGCGGTGGG CCGGTCAGCT AAGACCATC
14071 ATGCATACTA ACATGCCAAA CGTGAACGAG TATATGTTTA GTAACAAGT CAAGCGCGT GTGATGGTGT
14141 CCAGAAAACC TCCCAGCGT GCTGCAGTTG GGGATACCTA TGATCACAAG CAGGATATTT TGGAAATAGA
14211 GTGGTTCGAG TTTACTTTG CAGAAGGCAA CTTTTCAGT ACTATGACTA TTGATTTGAT GAACAATGCC
14281 ATCATAGATA ATTACTGAA AGTGGGTAGA CAGAATGGAG TGCTTGAAG TGACATTGGT GTTAAGTTGG
14351 ACACCAGAA CTTCAAGCTG GATGGGATC CCGAAACCAA GTTGATCATG CCTGAGTGT ATACGTATGA
14421 AGCCTTCCAT COTGACATTG TCTTACTGCC TGGCTGCGGA GTGGATTTTA CCGAGAGTCC TTTGAGCAAC
14491 CTTCTTGGTA TCAGAAAAA ACAGCCATTT CAAGAGGTTT TTAAGATTTT GTATGAAGAT TTAGAAGGTG
14561 GTAATATTCC GGCCCTCTG GATGTAGATG CCTATGAGAA CAGTAAGAAA GAACAAAAAG CCAAAAATAGA
14631 AGCTGCTACA GCTGTGCAAG AAGCTAAGGC AAACATAGT GCCAGCGACT CTACAAGGGT TGCTAACGCT
14701 GGAGAGTCA GAGGACAAA TTTTGCGCCA ACACCTGTT CCACTGCGA ATCATTATTG GCCGATGTGT
14771 CTGAAGGAAC GGACGTGAAA CTCACTATTC AACCTGTAGA AAAAGATAGT AAGAATAGAA GCTATAATGT
14841 GTTGAAGAAC AAAATCAACA CAGCCTATCG CAGTTGGTAT CTTTCTGACA ATTATGGGCA TCCGAAAAA
14911 GGAGTGGCTT CCTGGACATT GCTCACCACC TCAGATGTCA CCTGCGGAGC AGAGCAGGTT TACTGGTCCG
14981 TTCCAGACTG GATGAAGGAT CCTGTCACT TCCGCTCCAC TAGACAAATC AGTAACTACC CTGTGGTGGG
15051 TGACAGACTT ATGCCGCTCT TCTCAAAGAG CTTCTAACAC GAACAAGCTG TGTACTCCCA CGAGCTCCCG
15121 CAGTCCACCT CGCTTACGCA CGCTTCAAC CGCTTCTCG AGAACAGAT TTTAATCCGT CCGCCGGCGC
15191 CCACCATTAC CACCGTCAGT GAAAACGTTT CTGCTCTAC AGATCAGGG ACCCTGCCGT TCGCAGCAG
15261 TATCCGGGGA GTCCAAAGTG TGACCCGTTAC TGACGCCAGA CGCCGACCTT GTCCCTACGT GTACAAGGCA
15331 CTGGCATAG TCGCACCGCG CGTCTTCA AGCCGCACTT TCAAAAAA AAAAATGTCC ATTTTATCT
15401 GCACCAGTAA TAACACCGGT TGGGTCTGCG CCGCTCAAG CAAGATGTAC GGAGGCGCAC GCAACGTTT

Figura 6. continuación

15471 TACCCAACAT CCCGTGCGTG TTCGGGACA TTTTCGCGCT CCATGGGGTG CCCTCAAGGG CCGCACTCGC
15541 GTTCGAACCA CCGTCGATGA TGTARTCGAT CAGGTGTTG CCGACGCCCG TAATTATACT CCTACTGCGC
15611 CTACATCTAC TGTGGATGCA GTTATTGACA GTGTAGTGGC TGACGCTCGC AACTATGCTC GACGTAAGAG
15681 CCGGCGAAGG CGCATTGCCA GACGCCACCG AGCTACCCT GCGATGGGAG CCGCAAGAGC TCTGCTACGA
15751 AGAGCTAGAC GCGTGGGGCG AAGAGCCATG CTTAGGGCGG CCAGACGTCG AGCTTCGGGC GCCAGCGCCG
15821 GCAGGTCCCG CAGGCAAGCA GCCCGTGTG CAGCGCGCAC TATTGGCCGAC ATGGCCCAAT CGCGAAGAGG
15891 CAATGTATAC TGGGTGCGTG ACGCTGCCAC CGGTCAACGT GTACCCCTGC GCACCCTGCC CCTCGCACT
15961 TAGAAGATAC TGAGCAGTCT CCGATGTTGT GTCGCCAGCG CGAGGATGTC CAAGCGCAA TACAAGGAAG
16031 AAATGCTGCA GGTATTCGCA CCTGAAGTCT ACGGCCAACC GTTGAAGGAT GAAAAAACC CCGCAAAAT
16101 CAAGCGGTTT AAAAAGGACA AAAAAGAAGA GGAAGATGCC GATGATGGG TGCGGGGATT TGTGCGGAG
16171 TTTGCCCCAC GCGGACGCGT GCAATGGCGT GGGCGCAAAG TTCGACATGT GTTGAGACCT GGAACCTCGG
16241 TGGTCTTTAC ACCCGCGGAG CGTTCARAGC CTACTTTTAA CGGTCTCTAT GATGAGGTGT ACGGGGATGA
16311 TGATATCTT GAGCAGGCGG CTGACCAGTT AGGCGAGTTT GCTTATGGCA AGCGTAGTAG AATAACTTCC
16381 AAGGATGAGA CAGTGTCAAT ACCCTTGGAT CATGGAAATC CCACCCCTAG TCTTAAACC GTCACTTTGC
16451 AGCAAGTGT ACCCGTAAC CCGGCAACAG GTGTAAACG CGAAGGTGAA GATTTGTATC CCACATGCA
16521 ACTGATGGTA CCCAAACGCC AGAAGTTGGA GGACGTTTTG GAGAAAGTAA AAGTGGATCC AGATATTCAA
16591 CCTGAGGTTA AAGTGAGACC CATTAAAGC GTAGCGCTG GTCTGGGGT ACAAACTGTA GACATTAGA
16661 TTCCCACTGA AAGTATGGAA GTGCAAACG AACCCGCAA GCCTACTGCC ACCTCCACTG AAGTGCAAAC
16731 GGATCCATGG ATGCCCATGC CTATTACAAC TGACGCCGCC GGTCCCACTC GAAGATCCCG ACGAAAGTAC
16801 GGTCCAGCAA GTCTGTTGAT GCCCAATTAT GTTGTACACC CATCTATTAT TCCTACTCCT GGTACCCGAG
16871 GCACTCGCTA CTATCGCAGC CGAAACAGTA CCTCCGCGG TCGCCGCAAG ACACCTGCAA ATCGCAGTCG
16941 TCGCGTAGA CGCACAGCA AACCGACTCC CGGCGCCCTG GTGCGGCAAG GTTACCCGAA TGTAGTGGC
17011 GAACCTTTGA CACTGCGCGT TGCGCGTTAC CATCCAGTA TCATCACTTA ATCAATGTTG CGCTGCCTC
17081 CTGCGAGATA TGGCCCTCAC TTGTCGCCCT CGCGTTCCA TCATGTTTA CCGAGGAAGA AACTCGGCC
17151 GTAGAAGAGG GATGTTGGGA CGCGGAATGC GACGCTACAG GCGACGGCGT GCTATCCGCA AGCAATTTGG
17221 GGGTGGTTTT TTACCCAGCT TAATTTCCAAT TATCGTGTCT GCAATTTGGCG CGATACCAGG CATAGCTTCC
17291 GTGGCGGTTT ACCCGTCGCA ACGACATTGA CATTGGAAAA AAAACGTATA AATAAAAAAA AATACAATGG
17361 ACTCTGACAC TCCCTGGTCT GTGACTATGT TTTCTTAGAG ATGGAAGACA TCAATTTTTT ATCTTTGGCT
17431 CCGCGACACG GCACGAAGCC GTACATGGGC ACCTGGAGCG ACATCGGCAC GAGCCAACTG AACGGGGGGC
17501 CCTTCAATTG GAGCAGTATC TGGAGCGGGC TTAATAATTT TGGCTCAACC AATAAAACAT ACGGGAACAA
17571 AGTTTGAAGC AGCAGTACAG GACAGGCGCT TAGAAATAAA GTTAAAGACC AGAACTTCCA ACAAAAAGTA
17641 GTCGATGGGA TAGCTCCCG CATCAATGGA GTGGTAGATT TGGCTAACCA GGCTGTGCGG AAAAAAGATA
17711 ACACTCGTTT ACCCGCCGCG CCAGCAACCC CAGGTGAAAT GCAAGTGGAG GAAGAAATTC CTCGCCAGA
17781 AAACCGAGGC GACAAAGGTC CGCTCCCGA TTTGGAAGAG ACGCTGGTGA CGCGCGTAGA TGAACCGCCT
17851 TCTTATGAGG AAGCAACGAA GCTTGGAAATG CCCACCACTA GACCGATPAG CCCAATGGCC ACCGGGGTGA
17921 TGAACCTTTC TCAAGTTGCAT CGAACCCGTA CCTTGGATTT GCCCCCTCCC CCGTGTGCTA CTGCTGTACC
17991 CGCTTCTAAG CCTGTCGCTG CCCCAGAAAC AGTCGCCGTA GCCAGGTCAC GTCCCGGGGG CGCTCCTGCT
18061 CCAATGCGCG ACTGGAACAA TACTCTGAAC AGCATCGTGG GTCTAGGCGT GCAAAAGTGA AACCGCCGTC
18131 GCTGCTTTTA ATTAATATG GAGTAGCGCT TAACTTGCTT ATCTGTGTAT ATGTGTACT ACACGCCGTC
18201 ACAGCAGCAG AGGAAAAAAG GAAAGGCTCG TGCGTCGACG CTGAGTTACT TTTCAAGATGG CCACCCATC
18271 GATGCTGCCC CAATGGGCAT ACATGCACAT CGCGGACAG GATGCTTCGG AGTACCTGAG TCCGGGCTG
18341 GTGCAGTTG CCGCGGCCAC AGACACCTAC TTCAACTGCG GAAATAAGTT TAGAATCCC ACCGTAGCCG
18411 CGACCCACGA TGTGACCACC GACCGTAGCC AGCGGCTCAT GTTCCGCTTC GTGCCCGTTG ACCGGGAGGA
18481 CAATACATAC TCTTACAAAG TGCGGTACAC CCTGGCCGTC GCGGACAAAC GAGTGTGGA TATGGCCAGC
18551 ACCTTCTTTG ACATTAGGGG CGTGTGGAC AGAGGTCCCA GTTTCAAACC CTATTTCTGT ACGGTTACA
18621 ACTCTCTGCG TCCTAARGGC GCTCCAAATG CATCTCAATG GATTGCAAAA GGCGTACCAA CTGCAGCAGC
18691 CGCAGGCAAT GGTGAAGAAG AACATGAAC AGAGGAGAAA ACTGCTACTT ACACCTTTGC CAATGCTCCT
18761 GTAAAAGCCG AGCTCAAAAT TACAAAAGAG GGCTTACCBA TAGTTTTGGG GATTTACAGT GAAAAAGTAA
18831 CTAACCCAT CTATGCAGAT AAACCTTATC AGCCAGAAC TCAAGTGGGA GATGAAACTT GGACTGACCT
18901 AGACGGAAAA ACCGAAGAGT ATGGAGGCGG GGCTTAAAG CCTACTACTA ACATGAAACC CTGTTACGGG
18971 TCTATGCGGA AGCCTACTAA TTTAAAAGGT GGTGAGGCAA AACCGAAA CCGGAAACCG TCGAGTGAAA
19041 AAATGGAATA TGATATTGAC ATGGAATTTT TTGATACTC ATCGCAAGA ACRAACTTCA GTCCTAAAAT
19111 TGTATGTTAT GCAGAAAATG TAGGTTTGGG AACGCCAGAC ACTCATGTAG TGTACAAACC TGGAACAGAA
19181 GACACAAGTT CCGAAGCTAA TTTGGGACAA CAGTCTATGC CCAACAGACC CAACTACATT GGCTTCAGAG
19251 ATAACCTTAT TGGACTCATG TACTATAACA GTACTGGTAA CATGGGGGTG CTGGCTGGTC AAGCGTCTCA
19321 GTAAATGCA GTGGTTGACT TGCAGGACAG AAACACAGAA CTTTCTTACC AACTCTGCTG TGAATCTCTG
19391 GCGGACAGAA CCAAGACTTT TAGCATGTTG AATCAGGCTG TGGACAGTTA TGATCTGAT GTACGTTGTA
19461 TTGAAAATCA TGGTGTGGAA GATGAACTTC CCAACTATTG TTTTCCACTG GACGGCATAG GTGTTCCAAAC
19531 AACCAAGTAC AAATCAATAG TTCCAAATGG AGAAGATAAT AATAATTTGGA AAGAACCTGA AGTAAATGGA
19601 ACAAGTGAGA TCGGACAGGG TAAATTTGTT GCCATGGAAA TTAACCTTCA AGCCAACTCA TGGCGAAGTT
19671 TCCTTATATC CAATGTGGCT CTGTATCTCC CAGACTCGTA CAAATACACC CCGTCCAATG TCACTCTTCC
19741 AGAAAACAAA AACACCTACG ACTACATGAA CCGCGGGGTG GTGCGCCAT CTCTAGTAGA CACCTATGTC
19811 AACATTGGTG CCAAGTGGTC TCTGGATGCC ATGGACAATG TCAACCCATT CAACCCACC CGTAACGCTG
19881 GCTTGCCTTA CCGATCTATG CTTCTGGGTA ACGGACGTTA TGTGCCCTTC CACATACAAAG TGCCCTCAAAA
19951 ATTTCTCGCT GTTAAAAACC TGCTGCTTCT CCCAGGCTCC TACACTTATG AGTGGAACTT TAGGAAAGGAT
20021 GTGAACATGG TTCTACAGAG TTCCCTCGGT AACGACCTGC GGGTAGATGG CGCCAGCATC AGTTTCACGA
20091 GCATCAACCT CTATGCTACT TTTTCCCCA TGGCTCACAA CACCCGPTCC ACCCTTGAAG CCATGCTGGC
20161 GAATGACACC AATGATCAGT CATTCACAGA CTACCTATCT GCAGCTAACA TGCTCTACCC CATTCCTGCC
20231 AATGCAACCA ATATTTCCAT TTCCATTCTT TCTCGCAACT GGGCGGCTTT CAGAGGCTGG TCATTTACCA
20301 CACTGAAAAC CAAAGAAACT CCCTCTTTGG GGTCTGGATT TGACCCCTAC TTTGCTTAT TGCTTCTAT
20371 TCCTACCTG CATGGTACCT TCTACTGAA CCACACTTTT AAGAAAGTTT CCATCATGTT TGAATCTTCA
20441 GTGAGCTGCG CTGGAATGA CAGGTTACTA TCTCCTAACG AATTTGAAAT AAAGCGCACT GTGGATGGCG
20511 AAGGCTACAA CGTAGCCCAA TGCAACATGA CCAAGACTG GTTCTTGGTA CAGATGCTCG CCAACTACAA
20581 CATCGGCTAT CAGGGCTTCT ACATTTCCAGA AGGATACAAA GATCGCATGT ATTCATTTT CAGAAACTTC
20651 CACCCATGGA GCAGGCAGGT GGTGATGAG GTCRAATTACA AAGACTTCAA GGCCTCGCC ATACCCATACC

5

Figura 6. continuación

10

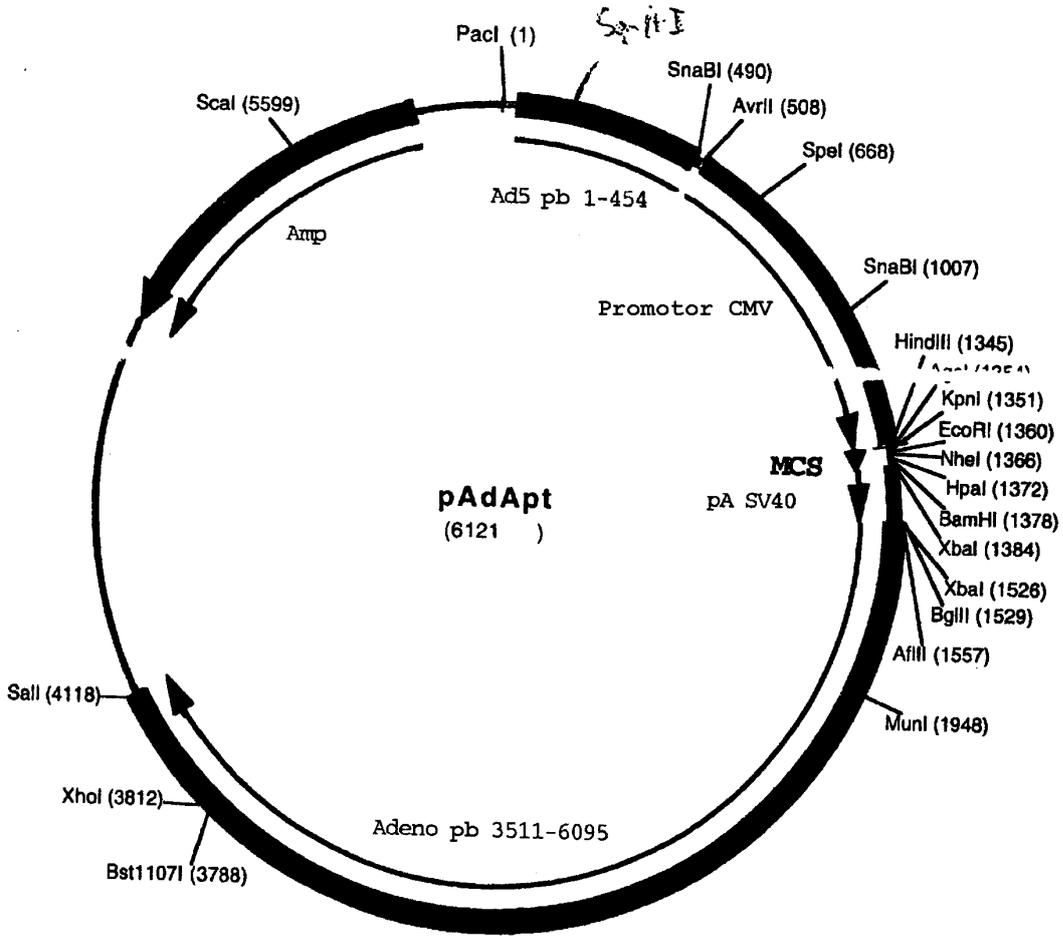
20721 AACACAACAA CTCTGGCTTT GTGGGTACAA TGGCTCCGAC CATGCGCCAA GGTC AACCCCT ATCCCCTAA
 20791 CTATCCCTAT CCACTCATTG GAACAACATGC CGTAAATAGT GTTACGCAGA AAAAGTTCCT GTGTGACAGA
 20861 ACCATGTGGC GCATACCGTT CTCGAGCAAC TTCATGTCTA TGGGGCCCT TACAGACTTG GGACAGAATA
 20931 TGCTCTATGC CAACTCAGCT CATGCTCTGG ACATGACCTT TGAGGTGGAT CCCATGGATG AGCCACCCT
 21001 GCTTATCTT CTCTCGAAG TTTTCGACGT GGTGAGATG CATCAGCCAC ACCGCGGCAT CATCGAGGCA
 21071 GTCTACCTGC GTACACCGTT CTCGGCCGGT AACGCTACCA CGTAAAGAAGC TTTCTGCTTC TTGCAAAATAG
 21141 CAGTGCACAC CATGGCCCTGC GGATCCCAAA ACGGCTCCAG CGAGCAAGAG CTCAGAGCCA TTGTCCAAGA
 21211 CCTGGGTGGC GAACCTATTT TTTTGGGAAC CTCAGATAAG CGCTTCCCGG GGTTCATGGC CCCCATAAG
 21281 CTCGCCCTGG CCATTGTAAA TACGGCCGGA CGTGAGACGG GGGGAGAGCA CTGGTTGGCT TTCGGTTGGA
 21351 ACCCACCTTC TAACACCTGC TACCTTTTGG ATCCTTTTGG ATTCTCGGAT GATCGTCTCA AACAGATTTA
 21421 CCAGTTTGAA TATGAGGGTC TCCTGCGCCG CAGCGCTCTT GCTACCAGG ACCGCTGTAT TACGCTGGAA
 21491 AAATCTACCC AGACCGTGCA GGGCCCCCGT TCTGCGCCCT GCGGACTTTT CTGCTGCATG TTCCTTCACG
 21561 CCTTTGTGCA CTGGCCCTGAC CGTCCCATGG ACGGAAACCC CACCATGAAA TTGCTAACTG GAGTGCCAAA
 21631 CAACATGCTT CATTCTCCTA AAGTCCAGCC CACCCTGTGT GACAATCAAA AAGCACTCTA CCATTTTCTT
 21701 AATACCCATT CGCCTTATTT TCGCTCTCAT CGTACACACA TCGAAAGGGC CACTGCGTTC GACCCGTATGG
 21771 ATGTTCAATA TGTACTCAGT TAAACAACGT GTTCAATAAA CATCACTTTA TTTTTTTACA TGTATCAAGG
 21841 CTCTGGATTA CTATTATTAT TACAAGTCGA ATGGGTTCTG ACAGAAATCA GAAATGACCCG CAGGCAGTGA
 21911 TACGTTGCGC AACTGATACT TGGGTTGCCA CTGGAATTCG GGAATCAACA ACTTGGGAGC CCGTATATCG
 21981 GGCAGGATGT CACTCCACAG CTTTCTGGTC AGCTGCAAGC CTCCAAGCAG GTCAGGAGCC GAAATCTTGA
 22051 AATCACAATT AGGACCAGTG CTCTGAGCGC GAGAGTTGCG GTACACCCGA TTGACAGCAT GAAACACCAT
 22121 CAGCGACGGA TGTCTCACGC TTGCTCCAGC TGGCCAGCAG GGTGGGATCT GCAATCATGC CCACCTCAGC ATCTTCAGCA
 22191 TTGCAATGC TGAAACGGGGT CATCTTGACG GTCTGCCTAC CCATGCGCGG CACCCAATTA GGCTTGTGGT
 22261 TGCATATGCA ATGCAGGGGG ATCAGTATCA TCTTGGCCCT ATCCTGTCTG ATTCTGGAT ACACGGCTCT
 22331 CATGAAGCA TCATATTGCT TGAAGCCTG CTGGCTTTA CTACCCTCGG TATAAAACAT CCGCAGGAC
 22401 CTGCTCGAAA ACTGGTTAGC TGCACAGCCG GCATCATTCA CACAGCAGCG GGCCTCATTG TTGGCTATTT
 22471 GCACCCACTT CTCGCCCCAG CGGTTTGGG TGATTTTGGT TCGCTCGGGA TTCCTTTA AGGCTCGTTG
 22541 TCCGTTCTCG CTGGCCACAT CCATCTCGAT AATCTGCTCC TTCTGAATCA TAAATTTGCC ATGACGGCAC
 22611 TTCAGTTGCG CCTTATTAATC ATTGCAGCCA TGAGCCACA ACGCACAGCC TGTACTTCC CAATTATGGT
 22681 GGGCGATCTG AGAAAAAGAA TGTATCATTC CCTGCAGAAA TCTTCCATC ATCGTGTCTA GTGCTTTGTG
 22751 ACTAGTGAAA GTTAACTGGA TGCCTCGGTG CTCTCGTCTT ACGTACTGGT GACAGATGCG CTTGTATTTG
 22821 TCGTGTGGCT CAGGCATTAG TTTAAACAG GTTCTAAGTT CGTTATCCAG CCTGTACTTC TCCATCAGCA
 22891 GACACATCAC TTCATGCGCT TTCTCCCAAG CAGACACAGG GGGCAAGCTA ATCGGATCTT TAACAGTGCA
 22961 GCGTGGCGTC CGACTTGAAC GAGGGTCACT TTTAGCGATC TTCTCAATGC TTTTTTAGCC ATCTTCTCA
 23031 ACGATGGCCA CCGGCGGGTA GCTGAAACCC ACTGTACAAA GTTGGCCCTC TTCTCTTCT CTCTCGCTGT
 23101 CTTGACTGAT GTCTTGATG GGGATATGTT TGGTCTTCTT TGGCTTCTTT TTGGGGGTA TCGGAGGAGG
 23171 AGGACTGTGCT TCCTGTTCCG GAGACAGGGA GGATTTGTGAC GTTTCGCTCA CCATTACCAA CTGACTGTCC
 23241 GTAGAAGAAC CTGACCCAC ACGGCGACAG GTGTTTTTCT TCGGGGGCAG AGGTGGAGGC GATTGCCAAG
 23311 GCGTGGCGTC CGACTTGAAC GCGGATGAC TGGCAGAAC CCTTCCCGCT TCGGGGGTGT GCTCCCTGTG
 23381 GCGTCCGCTT AACTGATTTT CTTGCGGGCT GGCCATTGTG TTCTCTTAGG CAGAGAAAACA ACAGCATGG
 23451 AAATCAGCC ATTTGCTGTCA ACATCGCCAC GAGTGCATC ACATCTCGTC CTCAGCGAGC AGGAAAAGGA
 23521 GCAGAGCTTA AGCATTCAC CGCCAGTCC TGCCACCACC TCTACCCTAG AAGATAAGGA GGTGACGCA
 23591 TCTCATGACA TGCAAGATAA AAAAGCGAAA GAGTCTGAGA CAGACATCGA GCAAGACCCG GGCTATGTGA
 23661 CACCGGTGGA ACACGAGGAA GAGTTGAAAC GCTTTCTAGA GAGAGAGGAT GAAAACCTGC CAAAACAGCG
 23731 ACGAGATAAC TATCACCAAG ATGCTGAAA TAGGGATCAG AACACCGACT ACCTCATAGG GCTTGACGGC
 23801 GAAGACGGC TCCTTAAACA TCTAGCAAGA CAGTGCCTCA TAGTCAAGGA TGCATTATTG GACAGAATG
 23871 AAGTGCCCAT CAGTGTGGA GAGCTCAGT GCGCCTACGA GCTTAACTT TTTTCACTC TACTCCTCC
 23941 CAACCGTCA CCAAAACGGCA CCTGCGAGCC AAATCCTCGC TTAACCTTT ATCCAGCTTT TGCTGTGCA
 24011 GAAGTACTGG CTACCTATCA CATCTTTTT AAAAATCAAA AAATTCAGT CTCCTGCCG GCTAATCGCA
 24081 CCGCGCCGA TGCCCTACT AATCTGGGAC CTGGTTCAG CTTACCTGAT ATAGCTTCTT TGAAGAGGT
 24151 TCCAAAGATC TTCGAGGGTC TGGGCAATA TAGAGCTCG GCGCAAAATG CTCGCAAAA GGGAGAAAAT
 24221 GGCATGGATG AGCATCACAG CGTTCCTGGT GAATTGGAAG GCGATAATGC CAGACTCGCA GTACTCAAGC
 24291 GAAGCGTCA GGTACACAC TTCGCATATC CCGCTGTCAA CCTGCCCCCT AAAGTCAATG CCGCGGTGAT
 24361 GGACCACTGA CTCATTAAAG GCGCAAGTCC CCTTTCAGAA GACATGCATG ACCCAGATGC CTGTGATGAG
 24431 GGTAAACCA TGCTCAGTGA TGAGCAGCTA ACCCGATGGC TGGCACCGA CTCCTCCCGG GATTTGGAAG
 24501 AGCTCGCAA GCTTATGATG GCCGTGGTGC TGGTTACCGT AGAATAGAG TGTCTCCGAC GTTCTTTTAC
 24571 CGATTAGAAA ACCTTGCGCA AACTCGAAGA GAATCTGCAC TACACTTTTA GACACGGCTT TGTGCGGAGC
 24641 GCATGCAAGA TATCTAACCT GGAACCTACC AACCTGGTTT CCTACATGGG TATTCTGCAT GAGAATCGCC
 24711 TAGGACAAAG CGTGTGCA AGCACCTTA AGGGGGAAGC CCGCCGTGAT TACATCCGCG ATTTGTGCTA
 24781 TCTTACCTG TGCCACACCT GGCAAACCG CATGGGTGTA TGGCAGCAAT GTTTAGAAAG ACAGAACTTG
 24851 AAAGAGCTG ACAAGCTCTT ACAGAAATCT CTTAAGGTTT TGTGGACAGG GTTCCGACGAG CGCACCGTCC
 24921 CTTCCGACCT GGCAGACCTA ATCTTCCAG AGCGTCTCAG GGTACTTTT CGAAACGGAT TGCCGACTT
 24991 TATGAGCCAG AGCATGCTTA ACAATTTTCG CTCTTTCATC CTGGAACCGT CCGGTATCCT GCCCGCCACC
 25061 TGCTGCGCAC TGCCCTCCGA CTTTGTGCTT CTCACCTACC GCGAGTGGCC CCGCCCGCTA TGGAGTCACT
 25131 GCTACCTGTT CCGTCTGGCC AACTATCTCT CTTACCCTC GGATGTGATC GAGGATGTGA CCGGAGCGG
 25201 CTTGCTGGAG TGCCACTGCC GCTGCAATCT GTGCAGCC CACCGGTCCC TAGCTTGCAA CCCCAGTTG
 25271 ATGACGAAA CCCAGATAAT AGGCACCTTT GAATTGCAAG GCCCCAGCAG CCAAGCGGAT GGGTCTTCT
 25341 CTGGGCAAG TTTAAACTG ACCCCGGGAC TGTGGACCTC CGCCTACTTG CGCAAGTTT CTCCGGAAGA
 25411 TTACCACCCC TATGAAATCA AGTTCATGA GGACCAATCA CAGCCTCCAA AGGCCGAACT TTCGGCTTG
 25481 GTCATCACCC AGGGGGCAAT TCTGGCCCAA TTGCAAGCCA TCCAAAATC CCGCAAGAA TTTCTACTGA
 25551 AAAAGGGTAA GGGGGTCTAC CTTGACCCCC AGACCGCGA GGAATCAAC ACAAGGTTCC CTCAGGATGT
 25621 CCCAACGACG AGAAAAACA AAGTTGAAG TGCAGCCGCC GCCCCAGAA GATATGGAGG AAGATTGGGA
 25691 CAGTCAGGCA GAGGAGGGCG AGGAGGACAG TCTGGAGGAC AGTCTGGAGG AAGACAGTTT GGAGGAGGAA
 25761 AACGAGGAG CAGAGGAGGT GGAAGAGTA ACCCGCAC AARCAGTTAT CTCGGCTGAG GAGCAAGCA
 25831 ACAGCGCTAC CATCTCCGCT CCGAGTCGAG GAACCCGGC GCGTCCAGC AGTAGATGGG ACGAGACCGG
 25901 ACGTTCCCG AACCCAACCA GCGCTTCCAA GACCGGTAAG AAGGATCGGC AGGATACAA GTCTGGCGG

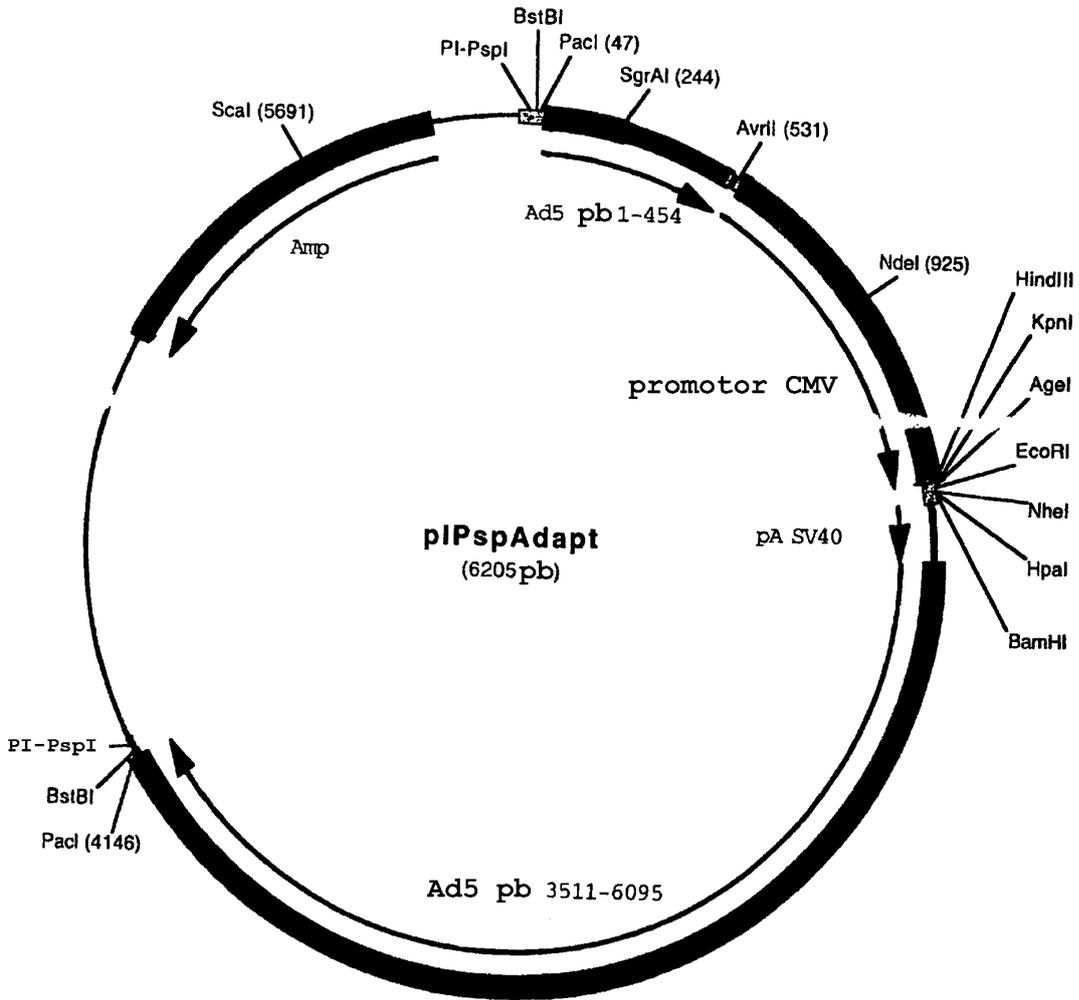
Figura 6. continuación

25971 GGGCATAAGA ATGCCATCAT CTCCTGCTTG CATGAGTGCG GGGGCAACAT ATCCTTCACG CGGCGCTACT
 26041 TGCTATTCCA CCATGGGGTG AACCTTCCCG GCAATGTTTT GCATTACTAC CGTCACCTCC ACAGCCCTCA
 26111 CTATAGCCAG CAAATCCCGA CAGTCTCGAC AGATAAAGAC AGCGGGGGCG ACCTCCAACA GAAAACCCAG
 26181 AGCGGCAGTT AGAAAATACA CAACAAGTGC AGCAACAGGA GGATTAAAGA TTACAGCCAA CGAGCCAGCG
 26251 CAAACCCGAG AGTTAAGAAA TCGGATCTTT CCACCCCTGT ATGCCATCTT CCAGCAGAGT CGGGGTCAAG
 26321 AGCAGGAAC TAAAAATAAA AACCGATCTC TCGCTTCGCT CACCAGAAGT TGTTTGATC ACAAGACCGA
 26391 AGATCAACTT CAGCGCACTC TCGAGGACGC CGAGGCTCTC TTCAACAAGT ACTGCGCGCT GACTCTTAAA
 26461 GAGTAGGCGA GTAGCCGCTT TATCAAAAA AGCGGGGAAT TACATCATCC TCGACATGAG TAAAGAAAT
 26531 CCCACGCCCT ACATGTGGAG TTATCAACCC CAAATGGGAT TGGCAGCAGG CGCCTCCAG GACTACTCCA
 26601 CCCGCATGAA TTGGCTCAGC GCCGGGCCCT CTATGATTTT TCGAGTTAAT GATATACGGG CCTACCAGAA
 26671 CCAAACTACT TTGGAAACAGT CAGCTCTTAC CACCACGCCG CGCCAACACC TTAATCCAG AAATTGGCCC
 26741 GCCGCCCTAG TGTACCAGGA AAGTCCCGCT CCCACCACTG TATTACTTCC TCGAGACGCC CAGGCCGAAG
 26811 TCCAAATGAC TAATGCAGGT GCGCAGTTAG CTGGCGGCTC CACCCTATGT CGTCACAGGC CTCGGCATAA
 26881 TATAAAACGC CTGATGATCA GAGGCCGAGG TATCCAGCTC AACGCAGAGT CGGTGAGCTC TCCGCTGGGT
 26951 CTACGACCAG ACGGAATCTT TCAGATTGCC GGCTGCGGGA GATCTTCCCT CACCCTTCGT CAGGCTGTTT
 27021 TGACTTTGGA AAGTTCTCTT TCGCAACCCC GCTCGGGCGG AATCGGGACC GTTCAATTTG TAGAGGAGTT
 27091 TACTCCCTCT GTCTACTTCA ACCCTTCTCT CGGATCTCCT GGGCACTACC CGGACGAGTT CATACCGAAC
 27161 TTGCGACGGA TTACGCGAGT AGTGGACGGC TACGATTGAT GTCTGGTGAC GCGGCTGAGC TATCTCGGCT
 27231 GCGACATCTA GACCACTGCC GCCGCTTTCG CTGCTTTGCC GGGGAECTTA TTGAGTTCAT CTACTTCGAA
 27301 CTCCCAAGG ATCACCTTCA AGGTCCGGCC CACGGAGTGC GGATTACTAT CGAAGGCAA ATAGACTCTC
 27371 GCCTGCAACG AATTTCTTCC CAGCGGCCCG TGCTGATCGA GCGAGACCAG GGAACACCA CGGTTTCCAT
 27441 CTACTGCATT TGTAATCACC CCGGATTGCA TGAAGCCCTT TGCTGTCTTA TGTGTACTGA GTTTAATAAA
 27511 AACTGAATTA AGACTCTCTT ACCGACTGCC GCTTCTTCAA CCCGGATTTT ACAACCAGAA GAACAAAAT
 27581 TTTCTGTGCG TCCAGGACTC TGTTAACTTC ACCTTCTCTA CTCACAAATC AGAAGCTCAA GCAGTACACC
 27651 GCTTTTCCAG AAGCATTFTT CCTACTAATA CTACTTTCAA AACCGGAGGT GAGCTCCACG GTCTCCCTAC
 27721 AGAAAACCC TGGGTGGAAG CGGGCCTTGT AGTACTAGGA ATTCTTGGCG GTGGGCTTGT GATTATTCTT
 27791 TGCTACCTAT ACACACCTTG CTTCACTTTC CTAGTGGTGT TGTGGTATTT GTTTAAAAAA TGGGGCCCAT
 27861 ACTAGTCTTG CTAGCTTCTT TTTCCGCTTTT GGAACCGGGT TCTGCCAATT ACGATCCATG CTAGACTTTT
 27931 GACCCAGAAA ACTGCACACT TACTTTTGCA CCCGACACAA GCGGCATCTG TGGAGTTCCT ATTAAGTGGG
 28001 GATGGGAATG CAGTCCGTTT GAAATTACAC ACAATAACAA AACCTGGAAC AATACCTTAT CCACCACATG
 28071 GGAGCCAGGA GTTCCCGAGT GGTACACTGT CTCGTGCCGA GGTCTGTGAG GTTCCATCCG CATTAGTAAC
 28141 AACACTTTCA TTTTCTTGA AATGTGCGAT CTGGCCATGT TCATGAGCAA ACAGTATTCT CTATGGCCCTC
 28211 CTAGCAAGGA CAACTACGTA ACGTTCTCCA CTCTGTGCGT CTTGTGCGCT TGCCTTCTTA CTGCTTACT
 28281 CCTCGTATGC ATACACTGCG TTGTAACCAC TCGCATCAA AACGCCAATA ACAAGAAAA AATGCCCTTAA
 28351 CCTCTTTCTG TTACAGACA TGGCTTCTCT TACATCTCTC ATATTGTGCA GCATTGTAC GTCGCTCAC
 28421 GGACAACAG TCGTCTCTAT CCCACTAGGA CATAATTACA CTCTCATAGG ACCCCCAATC ACTTCAGAGG
 28491 TCATCTGGAC CAACTGGGGA AGCGTTGATT ACTTTGATAT AATCTGTAAC AAAACAAAAC CAATAATAGT
 28561 AACTTGCAAC CTTAATAAATC TTACTATTGAT TAAATTTAGC AAAGTTTACA GCGGTTACTA TTAGGTTAT
 28631 GACAGATACA GTACTCAATA TAGAAAATAC TTGGTTCGCT TTACCCAGTT GAAAACCACG AAAATGCCAA
 28701 ATATGGCAAA GATTGATCC TTGCAATTTG TGCAGCGGTG GCAGTGGTGA TGGCACTAAT AATAATATGC
 28771 AAACATCCCA GATTCAAATGA TTGCAATTTG TGCAGCGGTG GCAGTGGTGA TGGCACTAAT AATAATATGC
 28841 ATGCTTTTAT ATGCTGTGCG CTCACAAAAG TTTTATCCTA AAAACAAGA TCTCCTACTA AGGCTTAACA
 28911 TTTAATTTCT TTTTATACAG CCATGTTTTC CACTACCACA TTCTTATGC TTACTAGTCT CGCAACTCTG
 28981 ACTTCTGCTC GCTCACACCT CACTGTAACT ATAGGCTCAA ACTGCACACT AAAAGGACCT CAAGGTGGCT
 29051 ATGTCTTTTG GTGGAGAATA TATGACAAATG GATGGTTTAC AAAACCATGT GACCAACCTG TTAGATTTTT
 29121 CTGCAACGGC AGAGACCTAA CCATATCAA CGTGACAGCA AATGACAAAG GCTTCTATTA TGAACCCGAC
 29191 TATAAAAGTA GTTTAGATTA TAACATTATT GTACTGCCAT CTACCCTCC AGCACCCTCC ACAACTACTT
 29261 TCCTTAGCAG CAGTGTCCCT AACAAATACAA TTTCCAAATC AACCTTTGCG GCGCTTTTAA AACGCACTGT
 29331 GAAATAATCT ACAACTTAC ATACAACAAT TTCCACTTCA ACAATCAGCA TCATCGCTGC AGTGACAAAT
 29401 GGAATATCTA TTCTTGTTTT TACCATAACC TACTACGCCCT GCTGCTPATAG AAAAGACAAA CATAAAGGTG
 29471 ATCCATTACT TAGATTGATG ATTTAATTTG TTTCTTTTTT TTATTACAG TATGGTGAAC ACCAATCATG
 29541 GTACCTAGAA ATTTCTTCTT CACCATACTC ATCTGTGCTT TTAATGTTT GCTACTTTT ACAGCAGTAG
 29611 CCACAGCAAC CCCAGACTGT ATAGGAGCAT TTGCTTCTTA TGCATTTTTT GCTTTTGTTA CTGCACTCTG
 29681 CGTATGTAGC ATAGTCTGCC TGGTTATTA TTTTTCCTCA CTCTAGACT GGTTCCTTGT GCGAATGGCC
 29751 TACCTGGCCG AACATCCGGA ATACCCGAAC CAAAATATCG CCGCACTTCT TAGACTCATC TAAAACCATG
 29821 CAGGCTATAC TACCATAATT TTTGCTTCTA TTGCTTCCCT ACGTGTCTC AACCCAGCT GCCTATAGTA
 29891 CTCCACCAGA ACACCTTAGA AAATGCAAT TCCAACAACC GTGGTCATTT CTGCTTGTCT ATCGAGAAA
 29961 ATCAGAAATC CCCCCAAAT TAAATAATGAT TGCTGGAATA ATTAATAATA TCTGTTGCAC CATAATTTCA
 30031 TTTTGTGATAT ACCCCCTATT TGATTTTGGC TGGAAATGCT CCAATGCACA TGATCATCCA CAAGACCCAG
 30101 AGGAACACAT TCCCCCAAA AACATGCAAC ATCCAATAGC GCTAATAGAT TACGAAAAGT AACCAACACC
 30171 CCCACTACTC CTGTCTATTA GTTACTTCAA CCTAACCGGC GGAGATGACT GAAACACTCA CCACCTCCAA
 30241 TTCCGCGCAG GATCTGTCTG ATATGGACGG CCGCGTCTCA GAACAACGAC TTGCCCACTC ACGCATCCGC
 30311 CAGCAGCAGG AACCGGTGGC CAAGAGCTC AGAGATGTC TCCAATTTCA CCAATGCAAA AAAGGCATAT
 30381 TCTGTTGGT AAAACAAGCC AAGATATCTT ACGAGATCAC CGTACTGAC CATCGCTCT CTACGAACT
 30451 TGGCCCCCAA CGACAAAAAT TTACCTGCAT GGTGGGAATC AACCCATAG TTATCACCCA ACAAAAGTGA
 30521 GATACTAAGG GTTGATTTCA CTGCTCCTGC GATTCCATCG AGTGACCTA CACCCTGCTG AAGACCCAT
 30591 GCGGCCAAG AGACCTGTCA CCAATGAAT AAAAAAAT GATTAATAA AAATCACTTA CTGAAATCA
 30661 GCAATAAGT CTCTGTGAA ATTTTCTCCC AGCAGCACT CACTTCCCT TTCCCAACTC TGGTATTCTA
 30731 AACCCGCTT AGCGGCATAC TTTCTCCATA CTTTAAAGG GATGTCAA TTTAGCTCCT CTCTGTACC
 30801 CACAATCTTC ATGTCTTCT TCCAGATGA CCAAGAGAGT CCGGCTCAGT GACTCTTCA ACCCTGTCTA
 30871 CCCCTATGAA GATGAAAGCA CCTCCACAA CCCCTTATA AACCCAGGT TTATTTCCTC AAATGGCTT
 30941 ACACAAAGCC CAGACGGAGT TCTTACTTTA AAATGTTTAA CCCCACTAAC AACCAAGCC GATCTCTAC
 31011 AGTAAAAGT GGGAGGGGA CTTACAGTGG ATGACACTGA TGGTACCTTA CAAGAAAAA TACGTGCTAC
 31081 AGCACCCATT ACTAAAAATA ATCACTCTGT AGAACTATCC ATTTGAAATG GATTAGAAAC TCAAAACAT
 31151 AAACATGTG CCAATTTGGG AAATGGGTTA AAATTTAACA ACGGTGACAT TTGTATAAAG GATAGTATTA

Figura 6. continuación

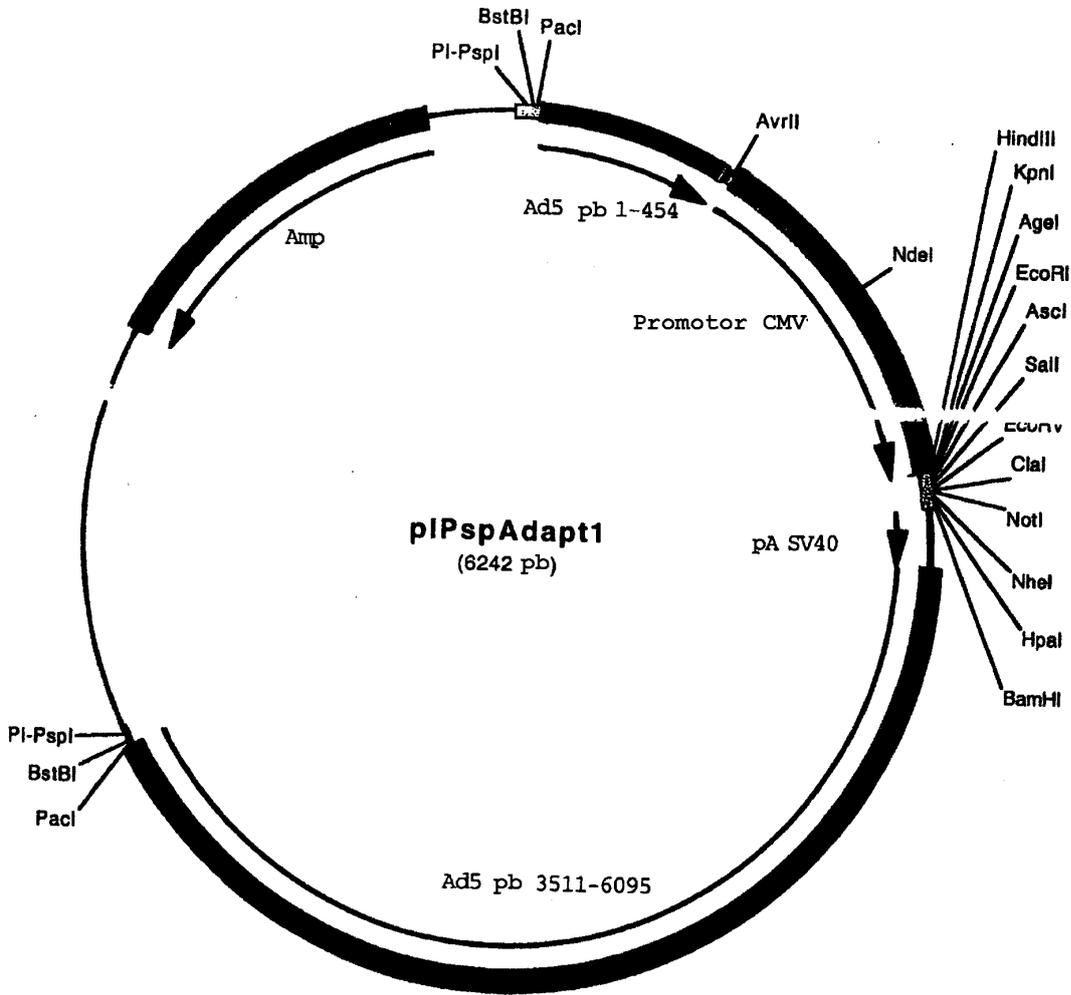
31221 ACACCTTATG GACTGGAATA AACCTCCAC CTAAGTGTCA AATTGTGGAA AACACTAATA CAAATGATGG
31291 CAAACTTACT TTAGTATTAG TAAAAATGG AGGGCTTGT AATGGCTACG TGCTCTAGT TGGTGTATCA
31361 GACACTGTGA ACCAAATGTT CACACAAAAG ACAGCAAACA TCCAATTAAG ATTTATATTT GACTCTTCTG
31431 GAAATCTATT AACTGAGGAA TCAGACTTAA AAATCCACT TAAAAATAAA TCTTCTACAG CGACCAATGA
31501 AACTGTAGCC AGCAGCAAAG CCTTATGACC AAGTACTACA GCTTATCCCT TCAACACCAC TACTAGGGAT
31571 AGTGAAACT ACATTCATGG AATATGTTAC TACATGACTA GTTATGATAG AAGTCTATTT CCCTGAACA
31641 TTTCTATAAT GCTAAACAGC CGTATGATTT CTTCCAATG TGCCATGCCC ATACAATTG AATGGAATCT
31711 AAATGCAAGT GAATCTCCAG AAAGCAACAT AGCTACGCTG ACCACATCCC CCTTTTCTT TCTTACATT
31781 ACAGAAGAGC ACAACTAAAA TAAAGTTTAA GTGTTTTTAT TAAAAATCAC AAAATTCGAG TAGTTATTTT
31851 GCCTCCACCT TCCCATTTGA CAGAATACAC CAATCTCTCC CCACGCACAG CTTTAAACAT TTGGATACCA
31921 TTAGAGATAG ACATTGTTTT AGATTCCACA TTCCAACAG TTTCAGAGCG AGCCAATCTG GGGTCAGTGA
31991 TAGATAAAAA TCCATCGCGA TAGTCTTTTA AAGCGCTTC ACAGTCCAAC TGCTGCGGAT GCGACTCCGG
32061 AGTTTGGATC ACGGTCTACT GGAAGAAGAA CGATGGGAAT CATAATCCGA AAACGGTATC GGACGATTGT
32131 GTCTCATCAA ACCCACAAGC AGCCGCTGTC TCGCTCGCTC CGTGCGACTG CTGTTTATGG GATCAGGGT
32201 CACAGTTFCC TGAAGCATGA TTTTAAATAG CCTAACATC AACTTCTGG TGCGATGCGC GCAGCAACGC
32271 ATTCGATTT CACTCAAATC TTTGCACTAG GTACAACACA TTATTACAAT ATTTGTTAAT AAACCATAA
32341 TAAAGCGCT CCAGCCAAAA CTCATATCTG ATATAATCGC CCCTGCATGA CCATCATACC AAAGTTAAT
32411 ATAAATTTAA TGACGTTCCT CAAAAACAC ACTACCCACA TACATGATCT CTTTGGCAT GTGCATATTA
32481 ACAATCTGTC TGTACCATGG ACAACGTTGG TTAATCATGC AACCCAATAT AACCTCCGG AACCCACTG
32551 CCAACACCCG TCCCCAGCC ATGCATTGAA GTGAACCTG CTGATTACAA TGACAATGAA GAACCAAT
32621 CTCTCGACCG TGAATCACTT GAGAATGAAA AATATCTATA GTGGCACAA ATAGACATAA ATGCATGCAT
32691 CTTCTCATAA TTTTAACTC CTGAGGATTT AGAAACATAT CCCAGGGAAT AGGAAGCTCT TGCGAAGAC
32761 TAAAGCTGGC AGAACAAAGG AGACCACGAA CACAACCTAC ACTATGCATA GTCATAGTAT CACAATCTGG
32831 CAACAGCGGG TGGTCTTCAG TCATAGAAGC TCGGGTTTCA TTTTCTCTAC AACGTGGTAA CTGGGCTCTG
32901 GTGTAAGGGG GATGCTGTCG GCATGATGTC GAGCGTGCGC GCAACCTTGT CATAATGGAG TTGCTTCTG
32971 ACATTCTCGT ATTTGTATA GCAAAACGCG GCCCTGGCAG AACACACTCT TCTTCGCTT CTATCCTGCC
33041 GCTTAGCGTG TCCCGTGTGA TAGTCAAGT ACAGCCACAC TCTTAAAGTG GTCAAAAGAA TGCTGGCTTC
33111 AGTTGTAATC AAAACTCCAT CGCATCTAAT TGTTCTGAGG AAATCATCCA CGGTAGCATA TGCAAAATCCC
33181 AACCAAGCAA TGCAACTGGA TTGCGTTTCA AGCAGGAGAG GAGAGGGAAG AGACGGAAGA ACCATGTTAA
33251 TTTTATTTCC AAACGATCTC GCAGTACTTC AAATGTAGA TCGCGCAGAT GGCATCTCTC GCCCCACTG
33321 TGTTGGTGAA AAAGCACAGC TAAATCAAAA GAAATGCGAT TTTCAAGGTG CTCACCGGTG GCTTCCAACA
33391 AAGCCTCCAC GCGCACATCC AAGAACAAAA GAATACAAAA AGAAGGAGCA TTTTCTAAT CCTCAATCAT
33461 CATATTACAT TCCTGCACCA TTCCAGATA ATTTTCAGCT TTCCAGCCTT GAATATTCG TGTCAGTCT
33531 TGTGGTAAAT CCAATCCACA CATTACAAAC AGTCCCGGA GGGCGCCCTC CACCACCAT TTTAAACACA
33601 CCCTCATAAT GACAAAATAT CTTGCTCCTG TGTCACCTGT AGCGAATTGA GAATGGCAAC ATCAATTGAC
33671 ATGCCCTTGG CTCTAAGTTC TTCTTTAAGT TCTAGTTGTA AAACTCTCT CATATTATCA CCAACTGCT
33741 TAGCCAGAA GCGCCCGGGA ACAAGAGCAG GGGACGCTAC AGTGCACTAC AAGCGCAGAC CTCCCAATT
33811 GGCTCCAGCA AAAACAAGAT TGAATAAAGC ATATTGGGAA CCACCAGTAA TATCATCGAA GTTCTGGAA
33881 ATATAATCAG GCAGAGTTTC TTGTAGAAAT TGAATAAAG AAAAATTTGC CAAAAAACA TTTCAAACT
33951 CTGGGATGCA AATGCAATAG GTTACCGCGC TCGCTFCAA CATTGTAGT TTTGAATTAG TCTGCAAAA
34021 TAAAAAATAA ACAAGCGTCA TATCATAGTA GCCTGACGAA CAGGTGGATA AATCAGTCTT TCCATCACA
34091 GACAAGCCAC AGGGTCTCCA GCTCGACCTT CGTAAAACCT GTCATCGTGA TTAACAACA GCACCGAAAG
34161 TTCTCGCGG TGACCAAGCAT GAATAAGTCT TGATGAAGCA TACAATCCAG ACATGTTAGC ATCAGTTAAG
34231 GAGAAAAAAC AGCCAAACATA GCCTTTGGGT ATAAATATGC TTAATCGTAA GTATAGCAA GCCACCCCTC
34301 GCGGATACAA AGTAAAAGGC ACAGGAGAA TAAAAATATA ATTATTTCTC TGCTGCTGTT TAGGCAACGT
34371 CGCCCCCGGT CCCTCTAAAT ACACATACAA AGCCTCATCA GCCATGGCTT ACCAGAGAAA GTACAGCGGG
34441 CACACAAACC ACAAGCTCTA AAGTCACTCT CCAACCTSTC CACAATATAT ATACACAAGC CCTAAACTGA
34511 CGTAATGGGA CTAAAGTGTA AAAAATCCCG CCAACCCAA CACACACCCC GAACTGCGT CACCAGGGAA
34581 AAGTACAGTT TCACTTCCGC AATCCCAACA AGCGTCACTT CCTCTTTCTC ACGGTACGTC ACATCCCATT
34651 AACTTACAAC GTCATTTTCC CACGGCCGCG CCGCCCTTT TAACCGTTAA CCCACAGCC AATCACCACA
34721 CCGCCACAC TTTTAAAAAT CACCTCATTT ACATATTGGC ACCATTCCAT CTATAAGGTA TATTATTGAT
34791 GATG



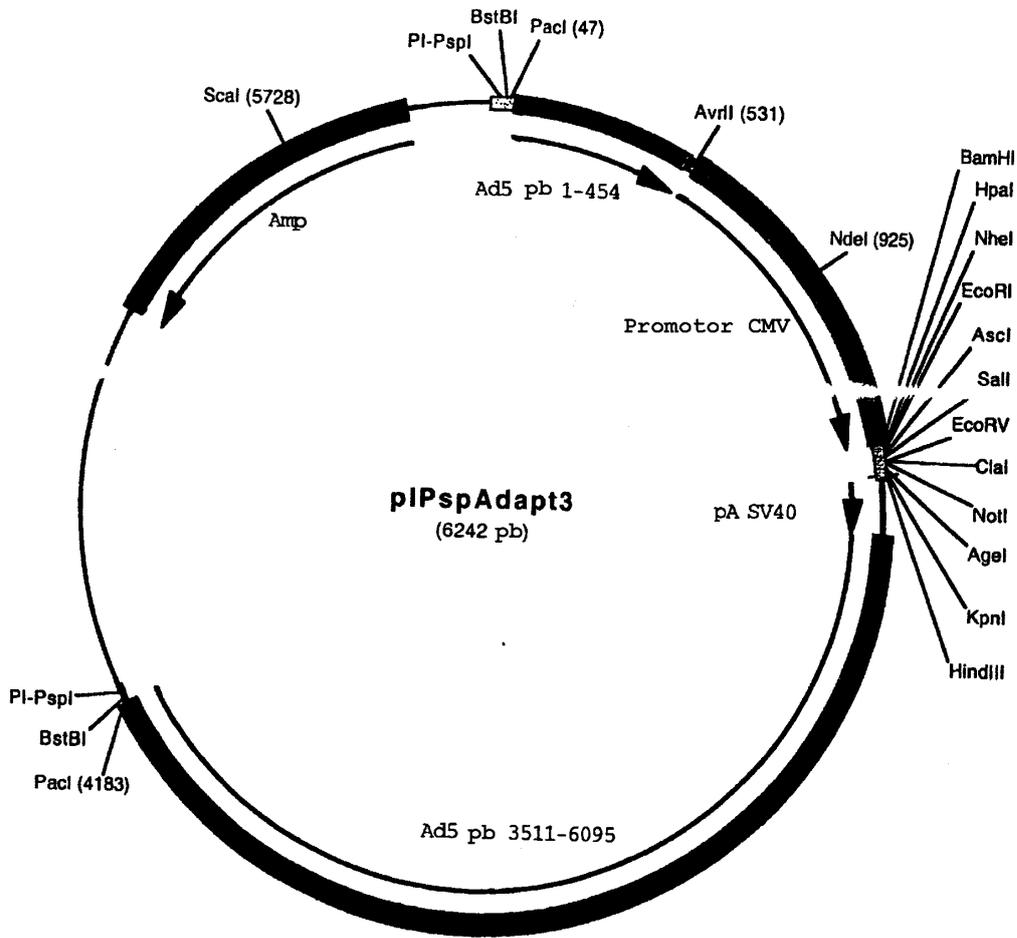


143

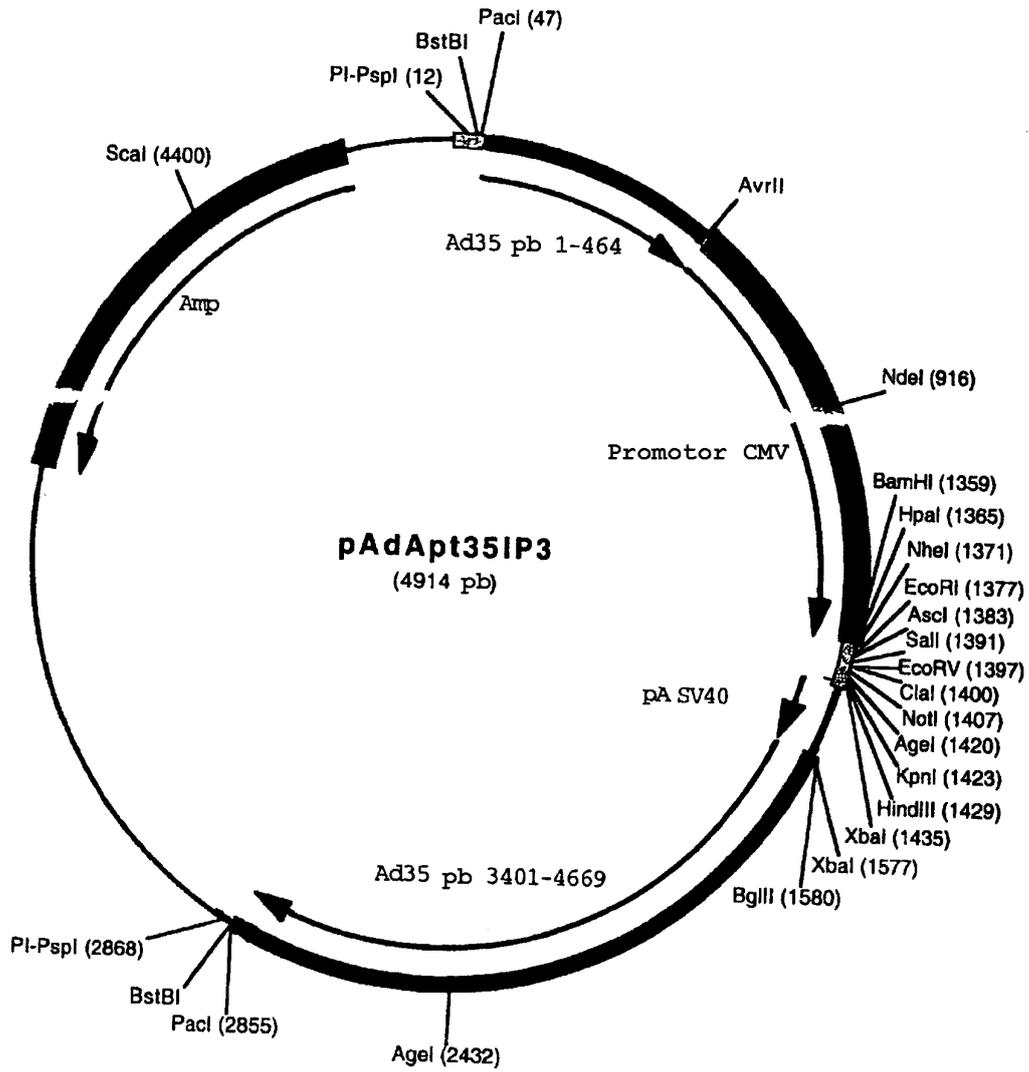
5



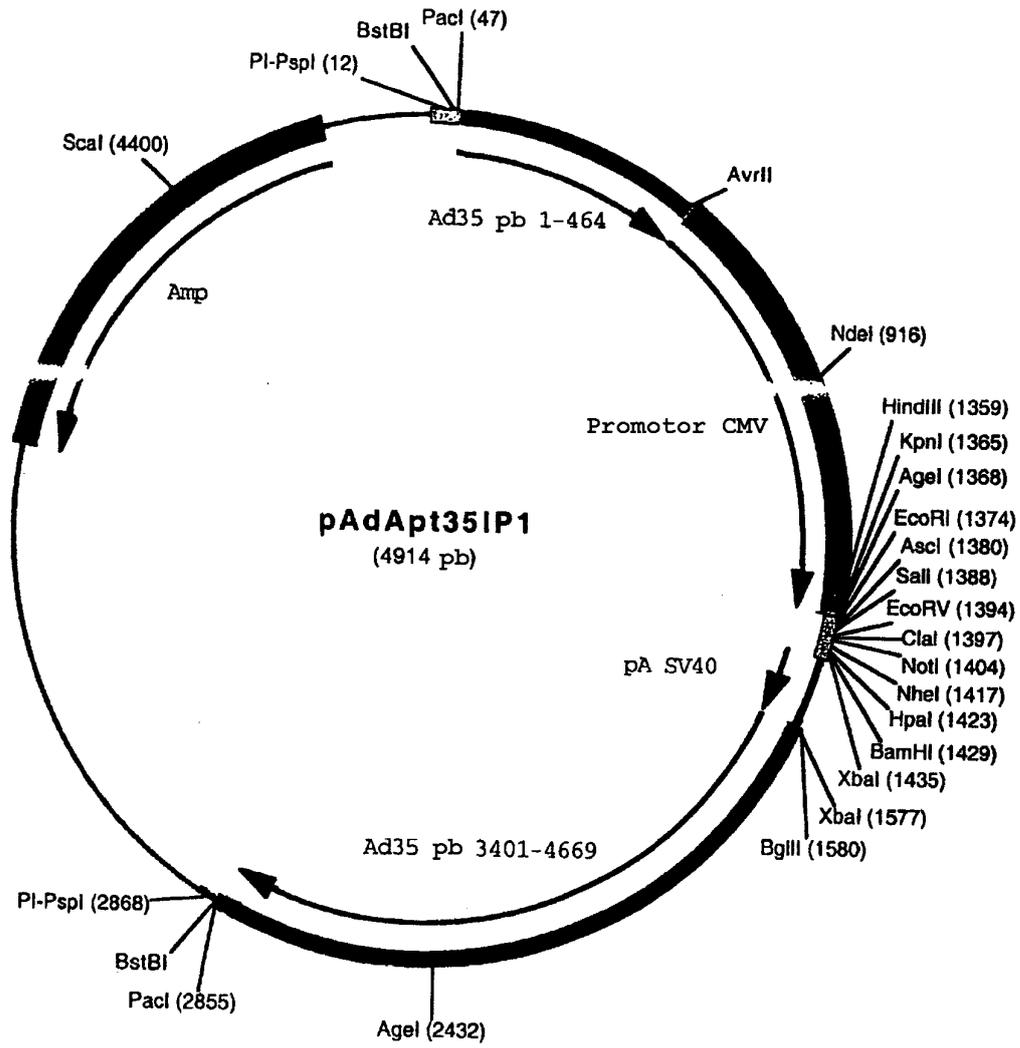
144



144

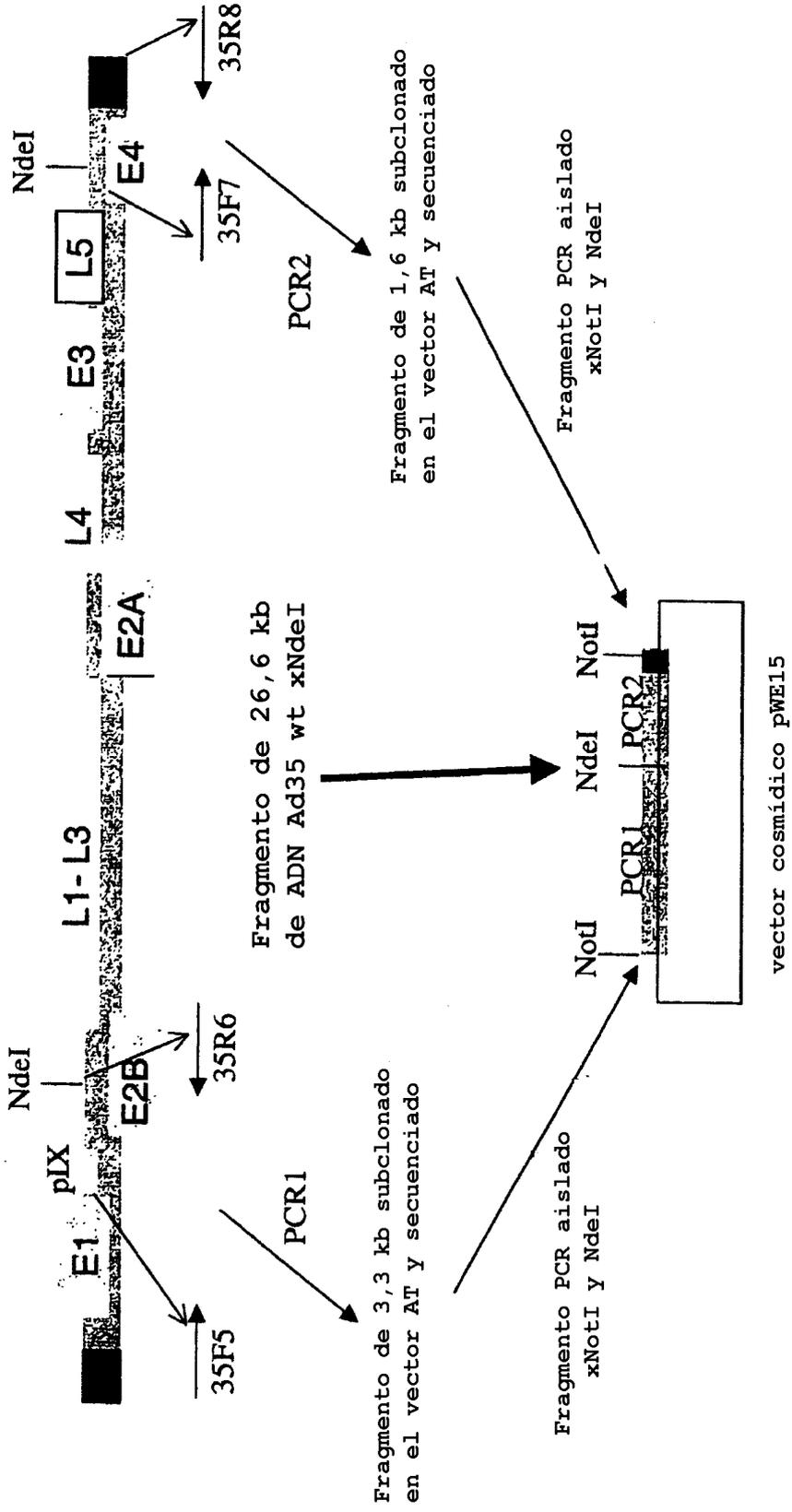


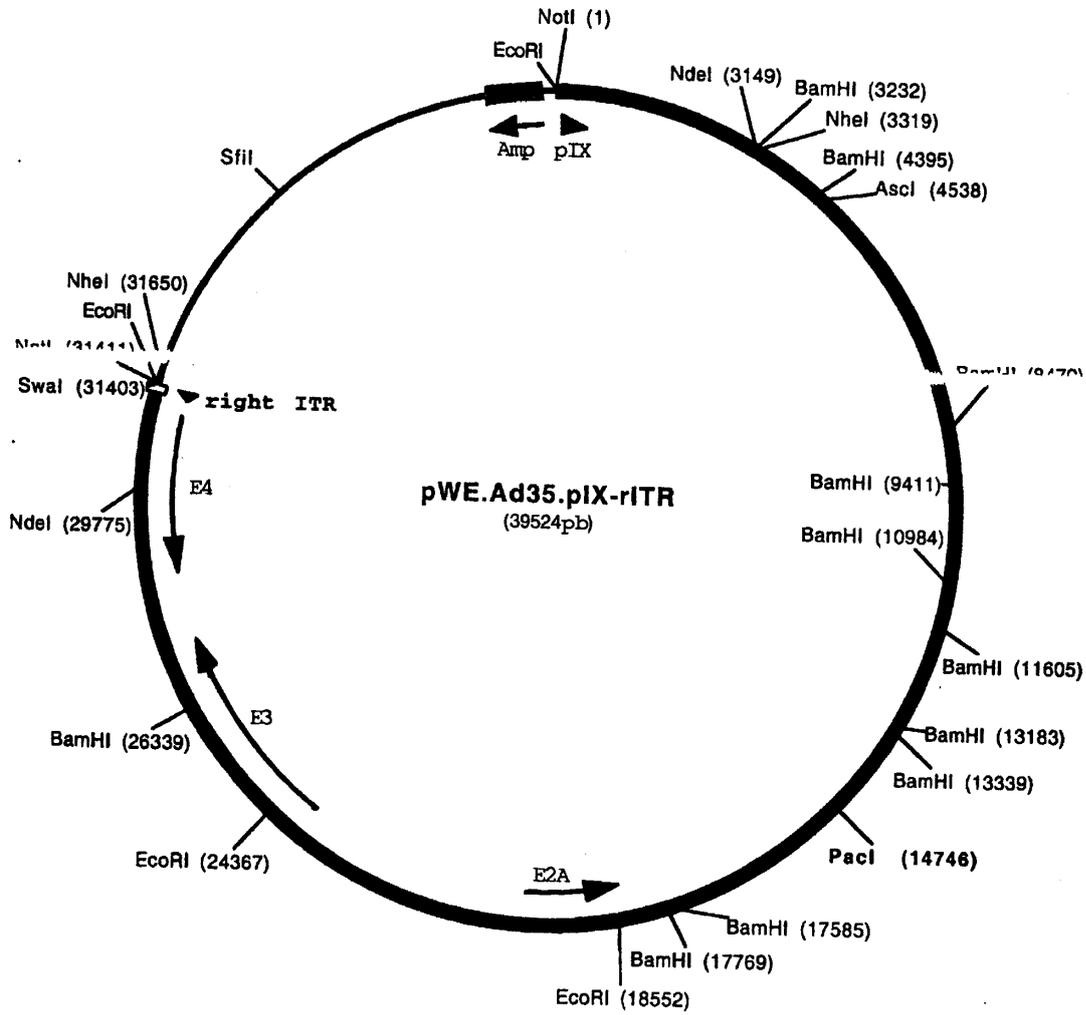
122

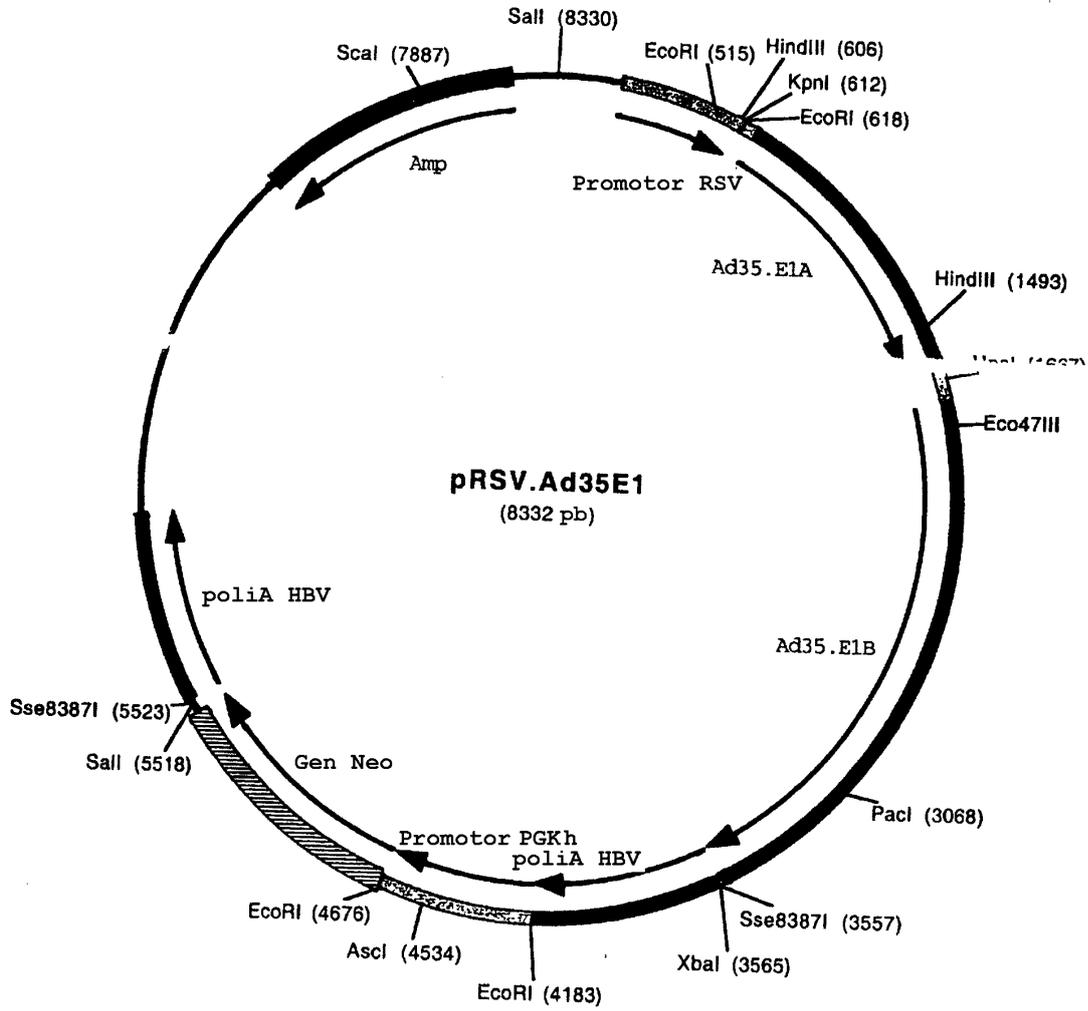


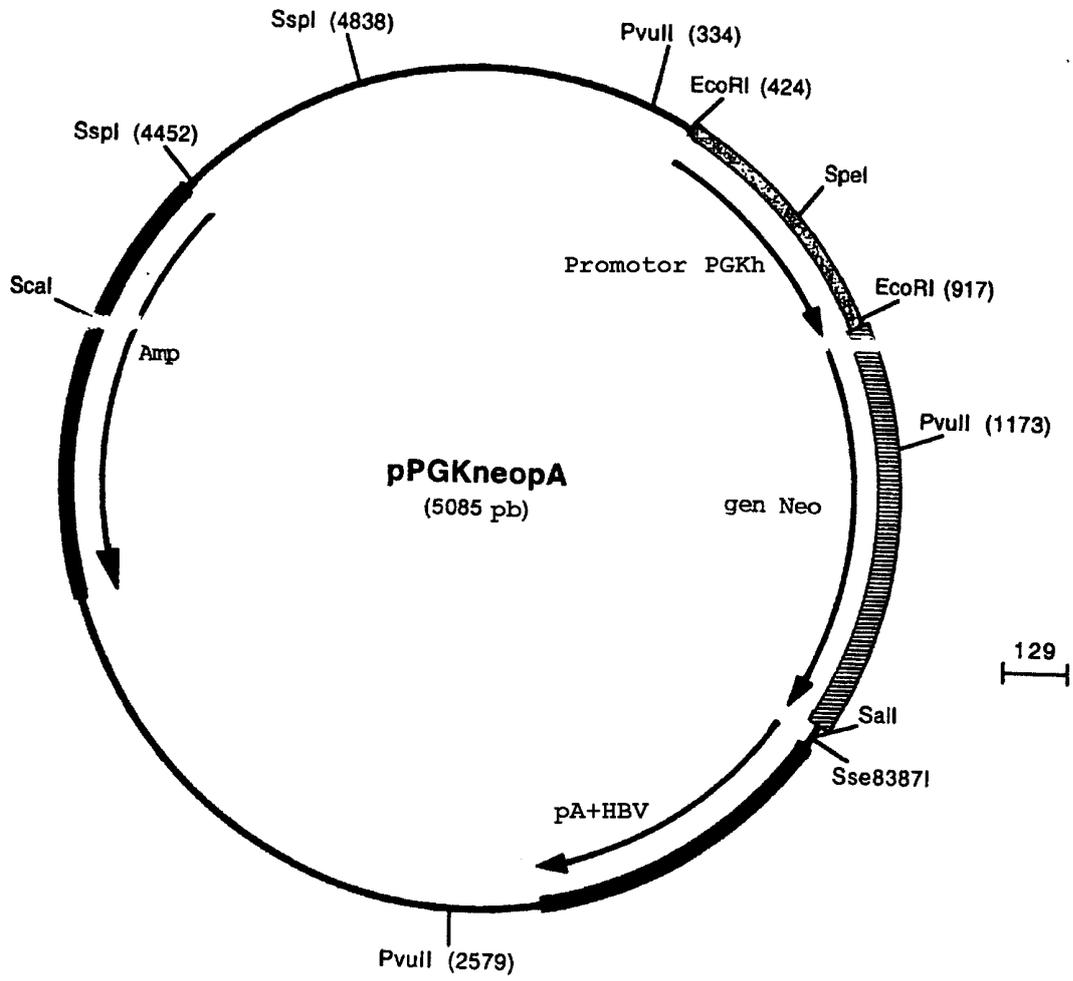
122

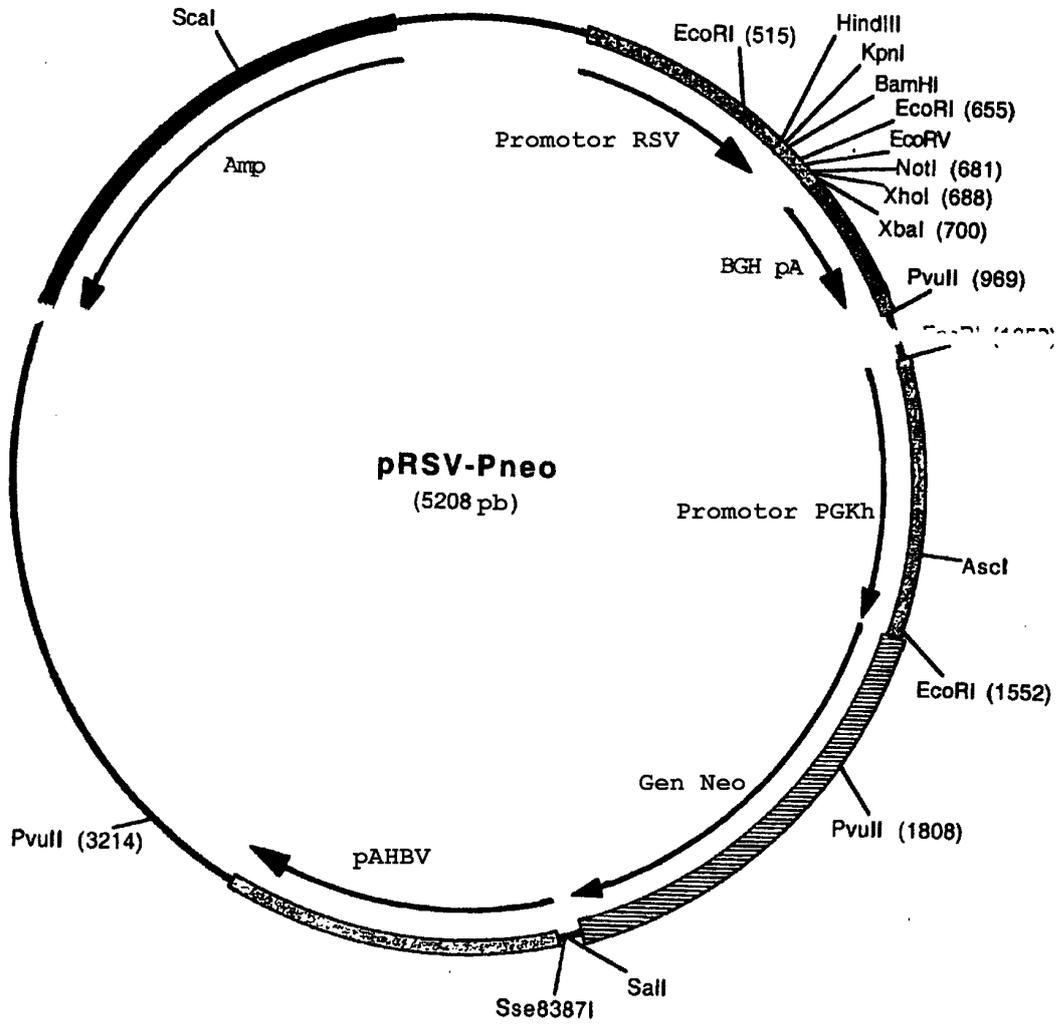
Figura 13
Construcción del vector cosmídico pWE.Ad35.pIX-rITR

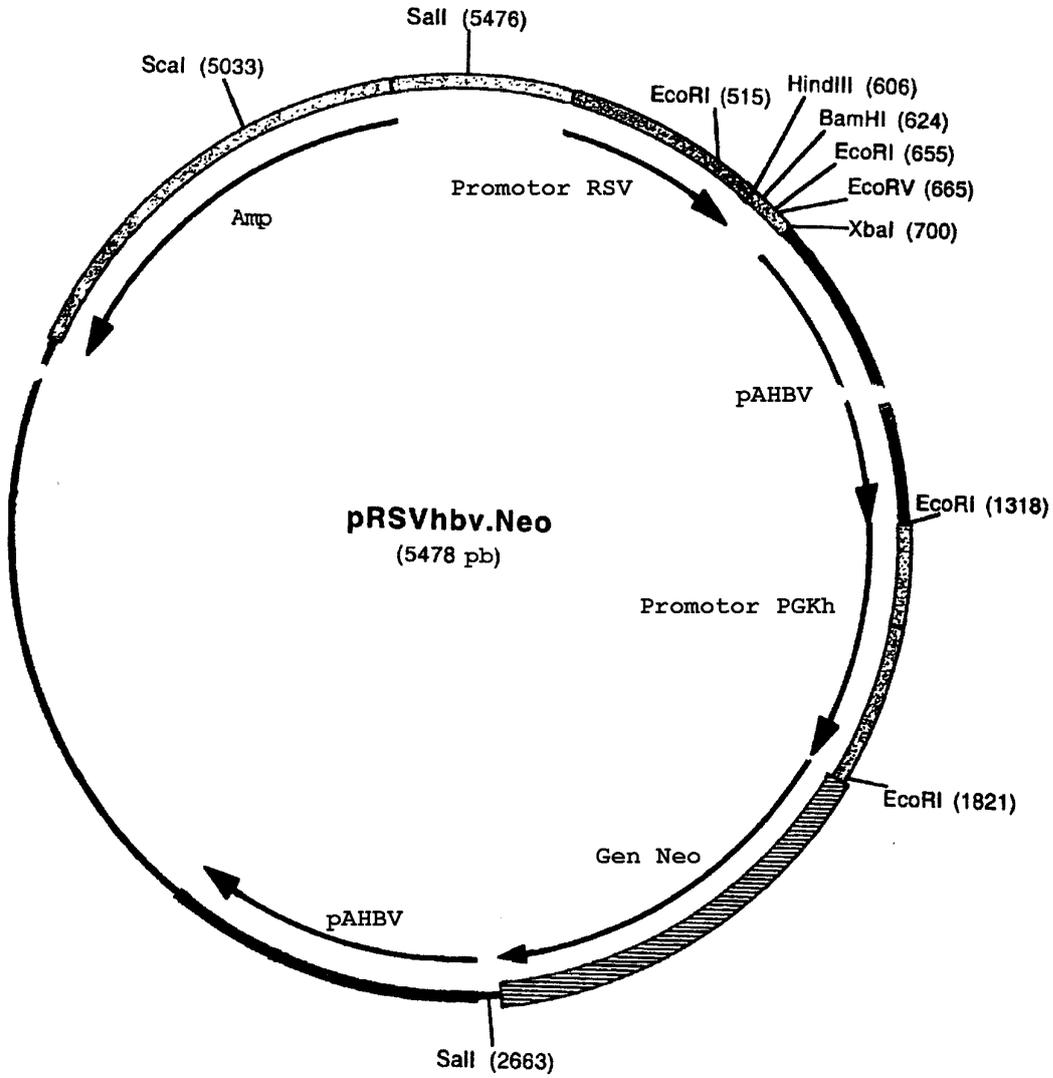


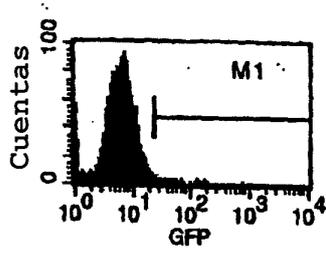




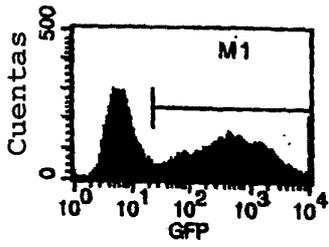




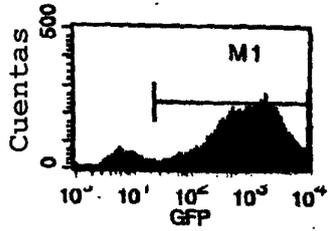




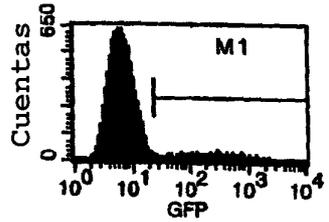
control



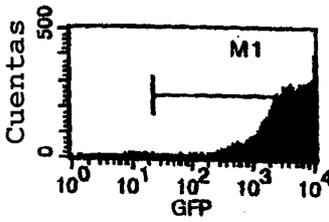
Ad 5



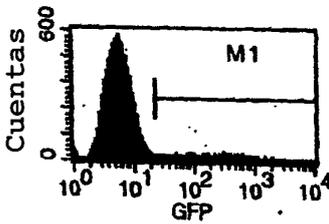
Ad5fib16



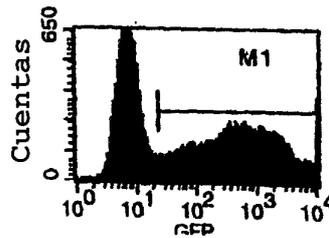
Ad5fib17



Ad5fib35

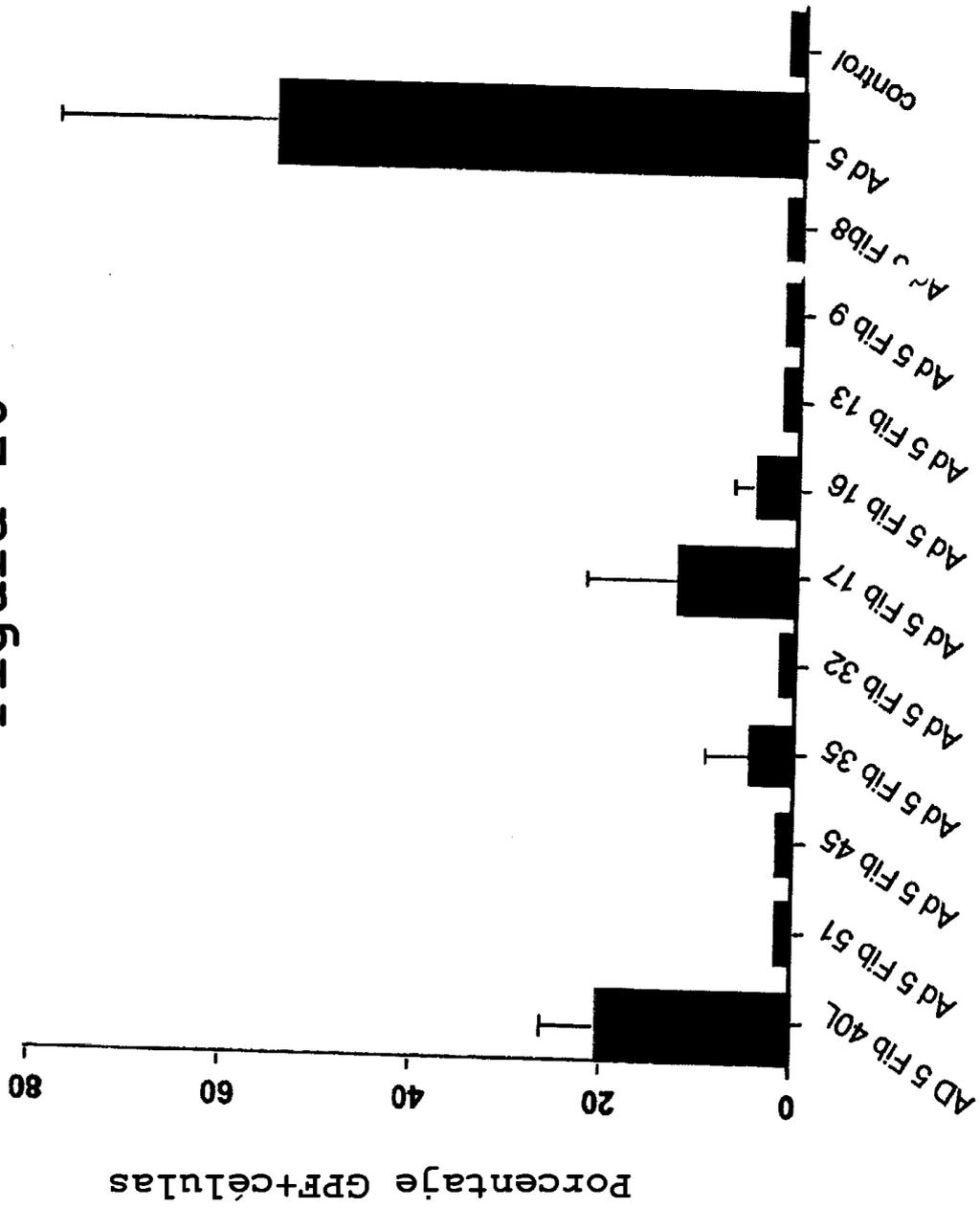


Ad5fib40-L



Ad5fib51

Figura 20



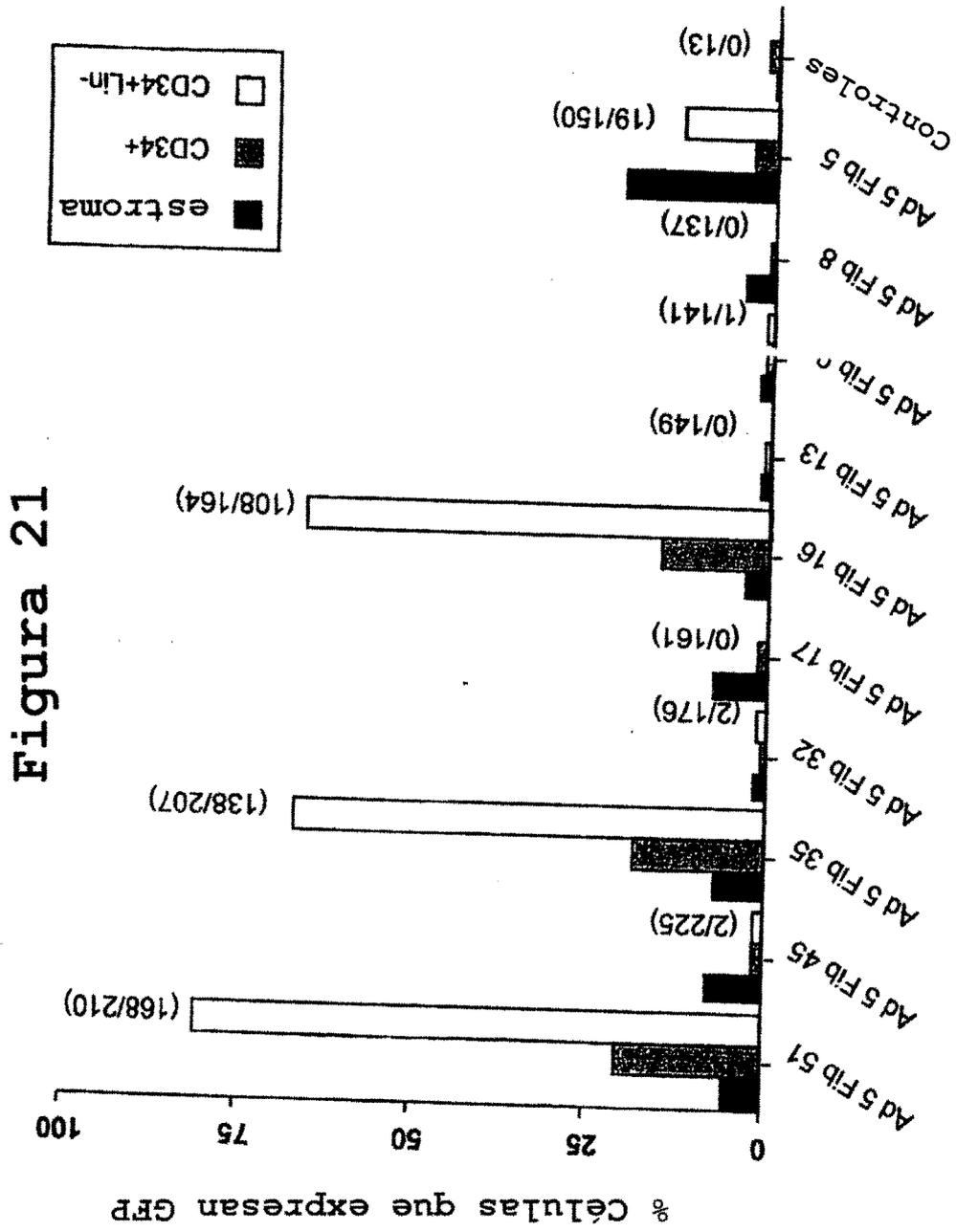
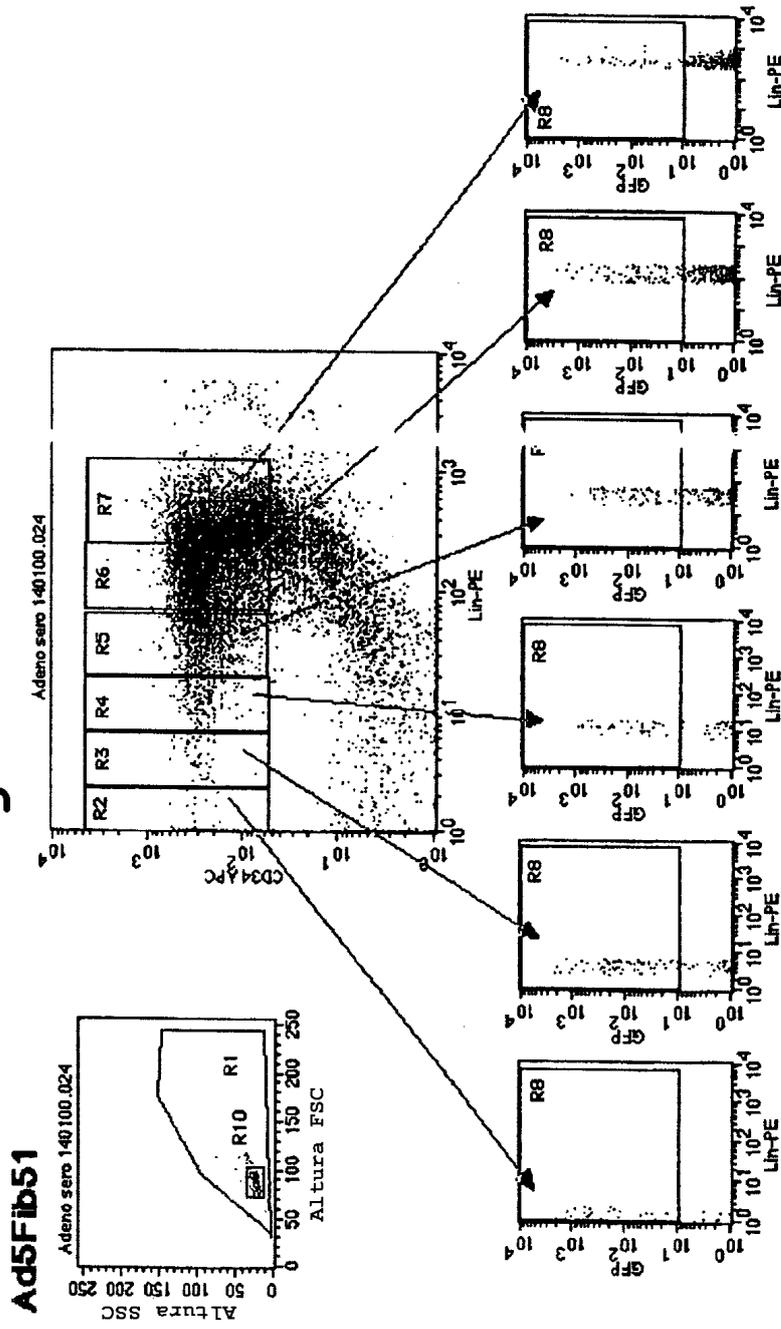


Figura 22a



GFP+células (%)

91 73 52 43 28 15

% de células en R1

0.38 0.36 1.36 8.5 31 34

Pico ch 352

128 107 67 74 80

Figura 22b

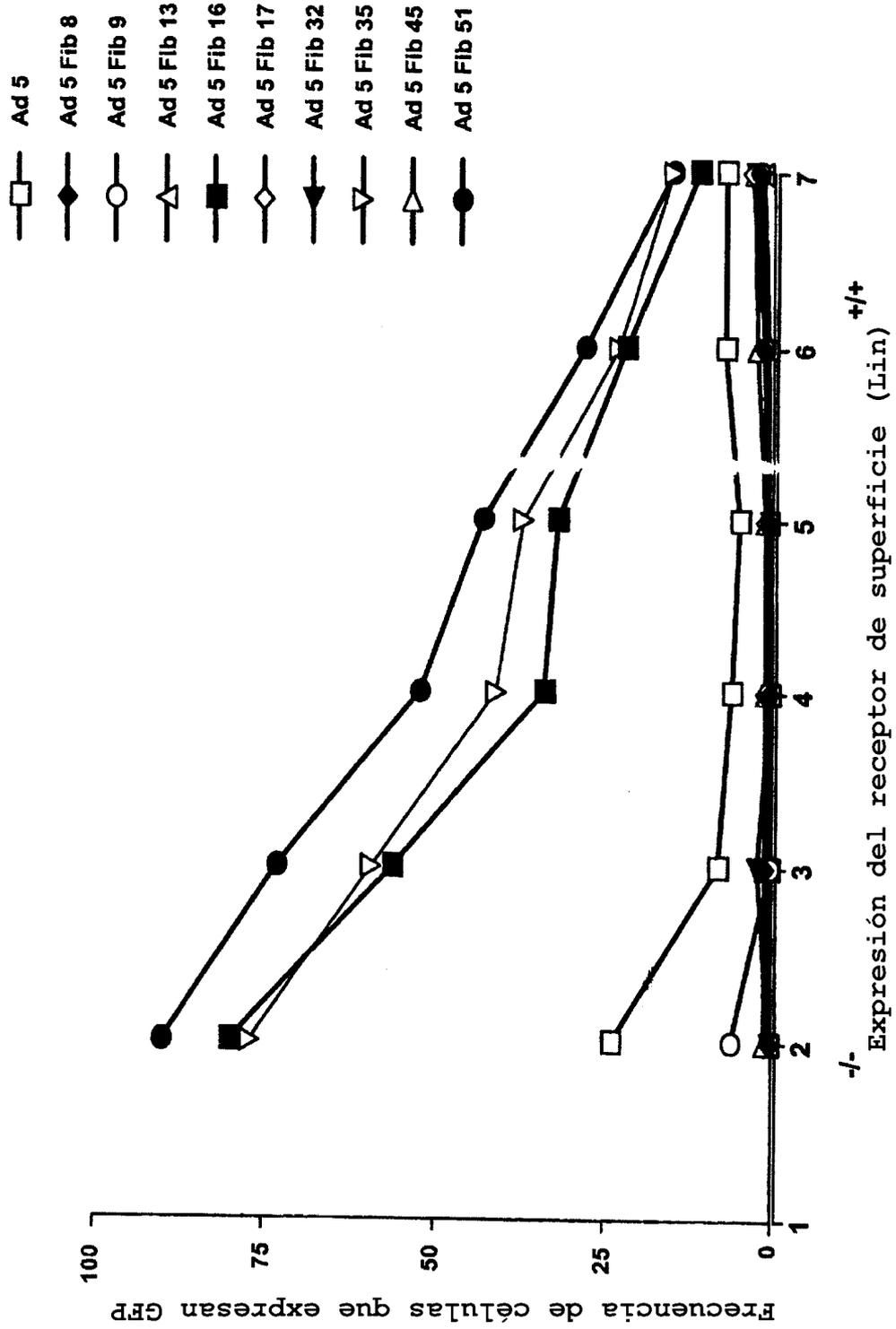


FIGURA 23

1 MLLQMKRRARPS EDTFNPVYPYD TETGPP TVPFLTPPFVSP proteina Fib 5
 1 MLLQMKRRARPS EDTFNPVYPY EDESSSQH-PF INP GFIIS proteina Fib 16
 1 MLLQMKRRARPS EDTFNPVYPY EDESTSQH-PF INP GFIIS proteina Fib 35
 1 MLLQMKRRARPS EDTFNPVYPY EDESTSQH-PF INP GFIIS proteina Fib 51

41 NGFOESPPGVLSLRLSEPLVTSNGMLALKMGNGLSLDEAG proteina Fib 5
 40 NGFAQSPFGVLTLLKCVNPLTTAGGFLQLKLVGSSLTVDITD proteina Fib 16
 40 NGFTQSPFGVLTLLKCLTFLTTTQGSLLQLKVGGLTVDDTD proteina Fib 35
 40 NGFTQSPFGVLTLLNCLTFLTTTGLELQLKLVGGLTVDDTD proteina Fib 51

81 NLT SQNVTVSPPLKKT KSNINLEISAPLTVTSEALTVAA proteina Fib 5
 80 GSLEENIT-AAAPLTKTINHSLIGLLIGSQLQT----- proteina Fib 16
 80 GTLOENIR-ATAFITKNNH SVELS IGNGL ET----- proteina Fib 35
 80 GTLOENIR-VTAFITKNNH SVELS IGNGL ET----- proteina Fib 51

121 AAPLMVAGNTLTMOSQAPLTVHDSKLSIATOGPLTVSEGK proteina Fib 5
 110 -----RDDKLCLSLEDGLVTKDDEK proteina Fib 16
 110 -----QNNKLC----- proteina Fib 35
 110 -----QNNKLC----- proteina Fib 51

161 LALQTSGLPTTDSSTLTITAS PPLTTATGSLGIDLKEPI proteina Fib 5
 129 LCL----- proteina Fib 16
 116 ----- proteina Fib 35
 116 ----- proteina Fib 51

201 YTONGKLGKLYGAPLHVTDDELNTLTVATGPGVTINNTSLO proteina Fib 5
 132 ----- proteina Fib 16
 116 ----- proteina Fib 35
 116 ----- proteina Fib 51

241 TKVTGALGFDSQGNMQLNVAGGLRIDSONRRLLILDVSYPP proteina Fib 5
 132 ----- proteina Fib 16
 116 ----- proteina Fib 35
 116 ----- proteina Fib 51

281 DAQNQLNLR LGQGPLFINSAHNLDINYNKGLYLFTASNNS proteina Fib 5
 132 -----SLGDS----- proteina Fib 16
 116 ----- proteina Fib 35
 116 ----- proteina Fib 51

321 KKLEVNLS TAKGLMFDATAIAINAGDGL EFGSPNAPTNP proteina Fib 5
 137 ----- proteina Fib 16
 116 ----- proteina Fib 35
 116 ----- proteina Fib 51

361 LKTKIGHGLEFDSNKAMVPKLGTGLSPDSTG AITVGNKNN proteina Fib 5
 137 LITN-----NDVLC AKLGLHGLVFDSSNX-ITIE NN proteina Fib 16
 116 -----AKLGNGLKFPNN-GDTICIKDSIN proteina Fib 35
 116 -----AKLGNGLKFPNN-GDTICIKDSIN proteina Fib 51

401 DKLT LWTT PAPSNCRL--NAEKDAKLT LVLT KCGSQIL proteina Fib 5
 166 --TLWTGAKP SANCVIKEGEDSPDC KLT LVLVKNGGLIN proteina Fib 16
 137 --TLWTGINFPFNCQIVENTNTNDG KLT LVLVKNGGLVN proteina Fib 35
 137 --TLWTGINKPFPNCQIVENTNTNDG KLT LVLVKNGGLVN proteina Fib 51

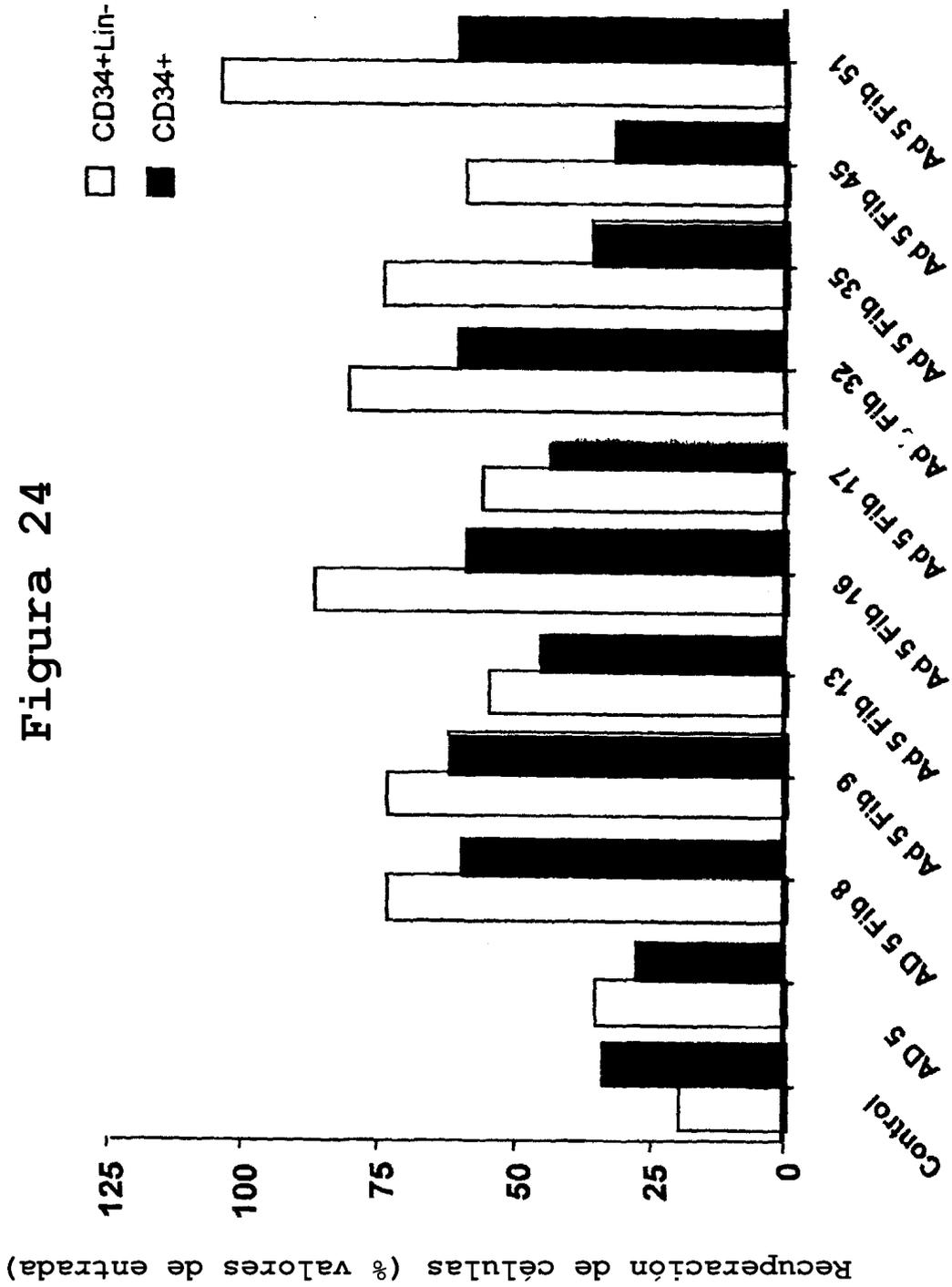
438 ATVSVLAVKGS LAPISGTVQSAHLIIRFDENG VLLNNSP proteina Fib 5
 203 GYITLMGASEYNTL FKNQVTDY NLAFDNTGQIITYLS proteina Fib 16
 174 GYVSLVGVSDTVNQMP TQKTANIQLRLYFDSSGNLLTEES proteina Fib 35
 174 GYVSLVGVSDTVNQMP TQKSATIO LRLYFDSSGNLLTDES proteina Fib 51

477 LDPEYNNFRNGDLTEGTAYTNAVGFMPNLSAYPKSHGRTA proteina Fib 5
 243 SLKSNLNEKDNQNMATGTITSAKGFMPSTTAYE F I--TY proteina Fib 16
 214 DLKIP LKKSSTA-TSETVASSKA FMPSTTAYE F N--TT proteina Fib 35
 214 NLKIP LKKSSTA-TSEATTS SKA FMPSTTAYE F N--TT proteina Fib 51

517 KSNIVSQVYLNGLD--KTK-----PVTLLTITLNGTQETG proteina Fib 5
 280 ATETLNEDYIYGECYKIST-NGTLFP LKVTITLNRRLAS proteina Fib 16
 250 TRDS--ENYIHGICYYMTSYDRSLFPLNISIMLNSRMISS proteina Fib 35
 250 TRDS--ENYIHWGICYYMTSYDRSLVPLNISIMLNSRTISS proteina Fib 51

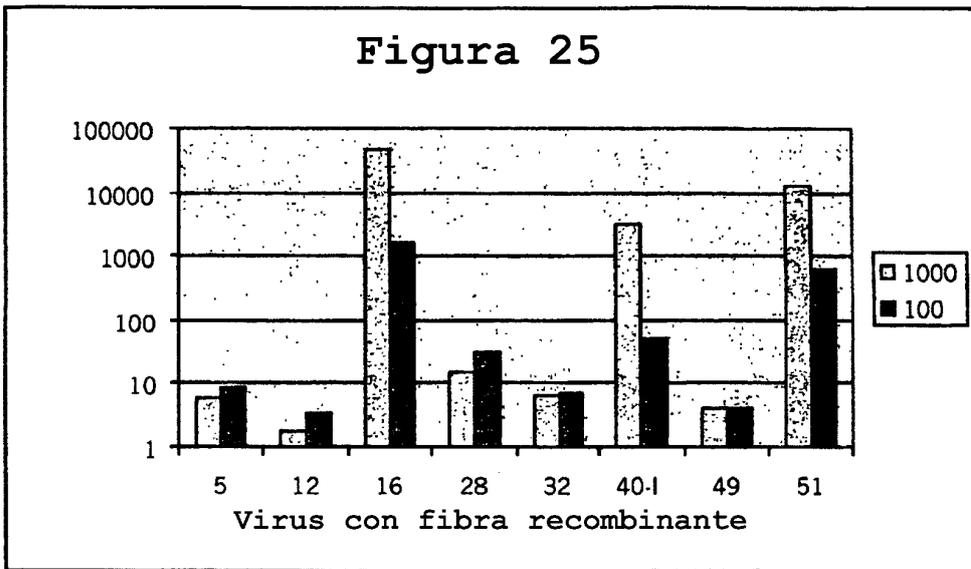
548 DTFPSAYSMSFSWDWSGHNYINE--IFATSSYTF SYIAO proteina Fib 5
 319 GM--AYAMNFSWSLNAEAPETTEVTLITSPFFPSYIRE proteina Fib 16
 288 NV--AYAIQFEWNLNASESPESNIMTLTTSPPFP SYITE proteina Fib 35
 288 NV--AYAIQFEWNLNAKESPE SNIA TLTTSPPFP SYITL proteina Fib 51

585 E. proteina Fib 5
 356 D. proteina Fib 16
 325 D. proteina Fib 35
 325 D. proteina Fib 51



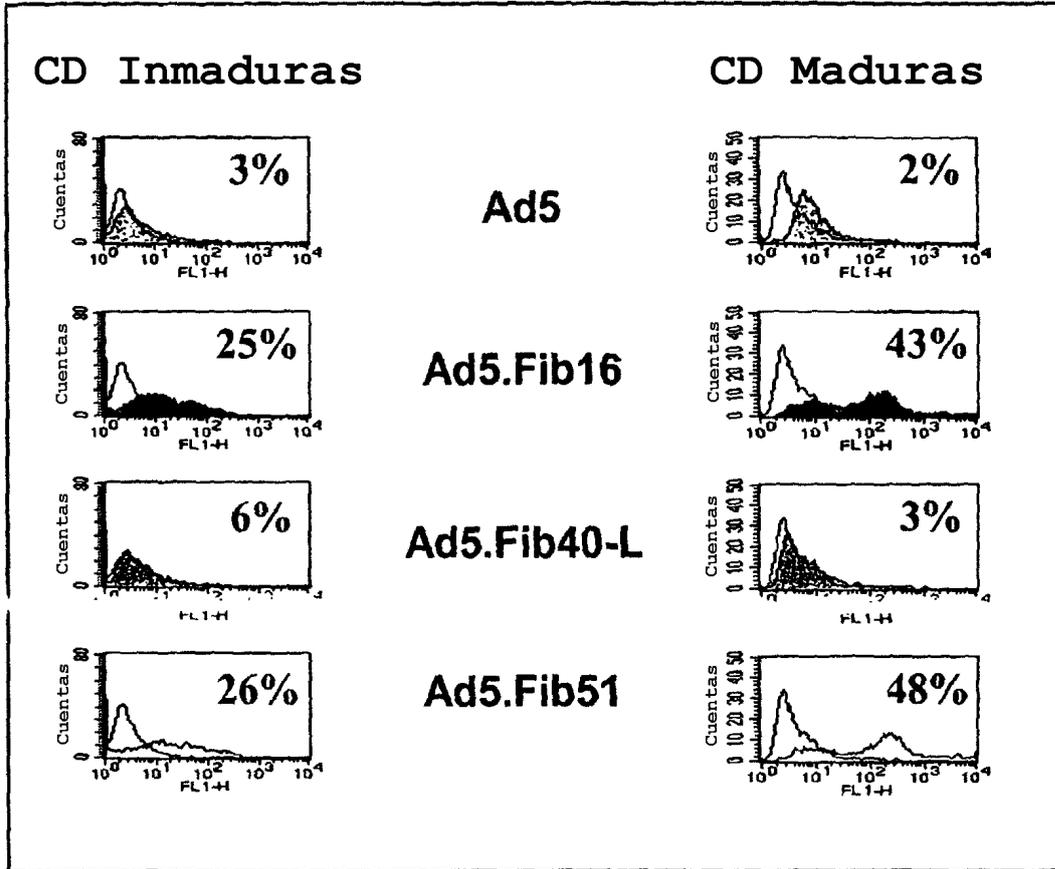
5

10



5

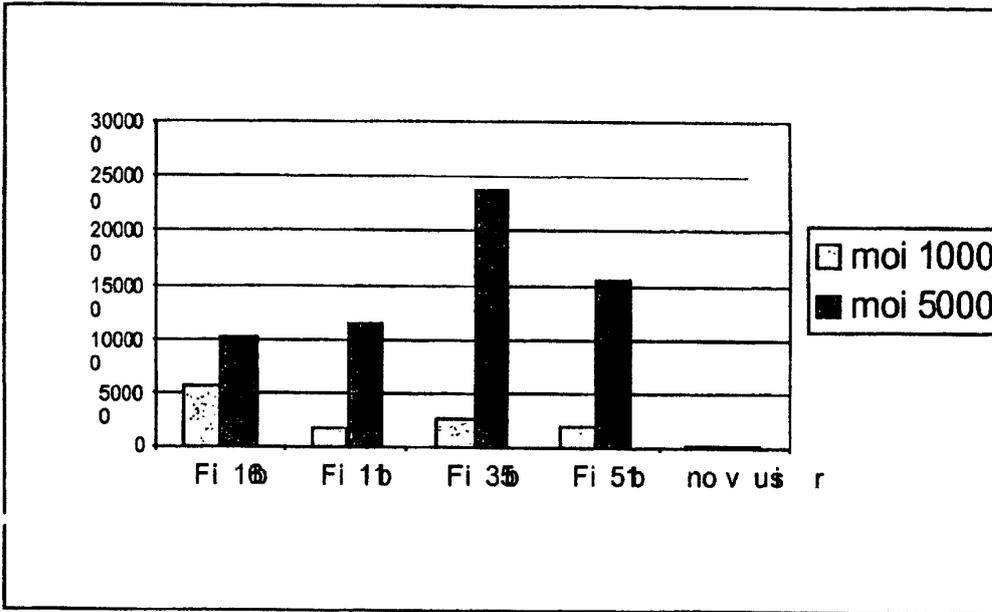
Figura 26



5

10

Figura 27



5

Figura 28

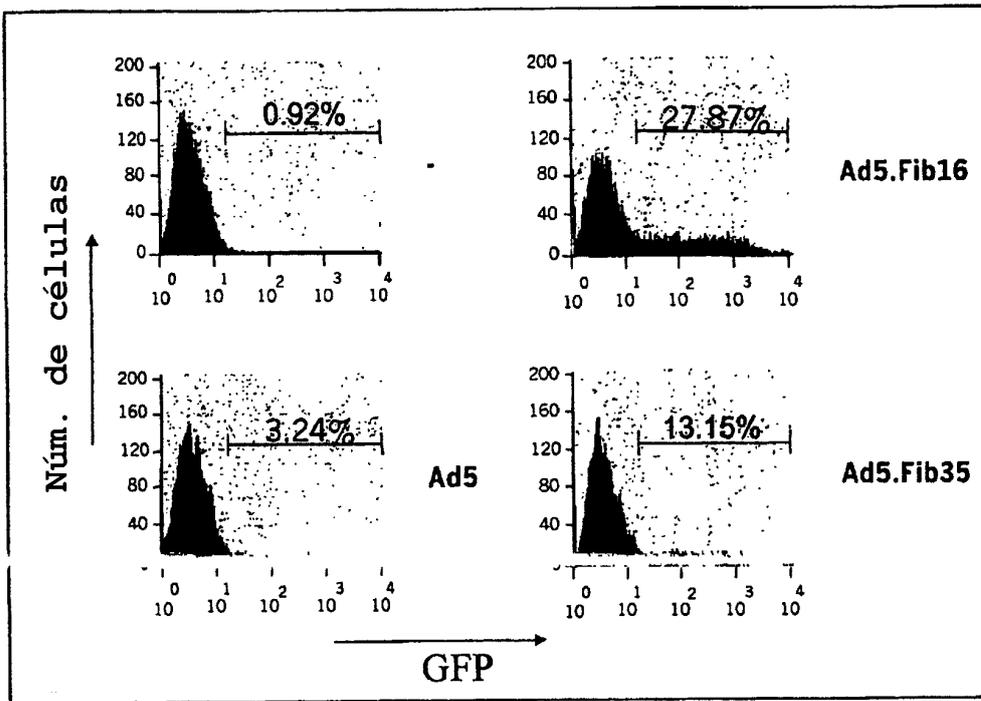


Figura 29

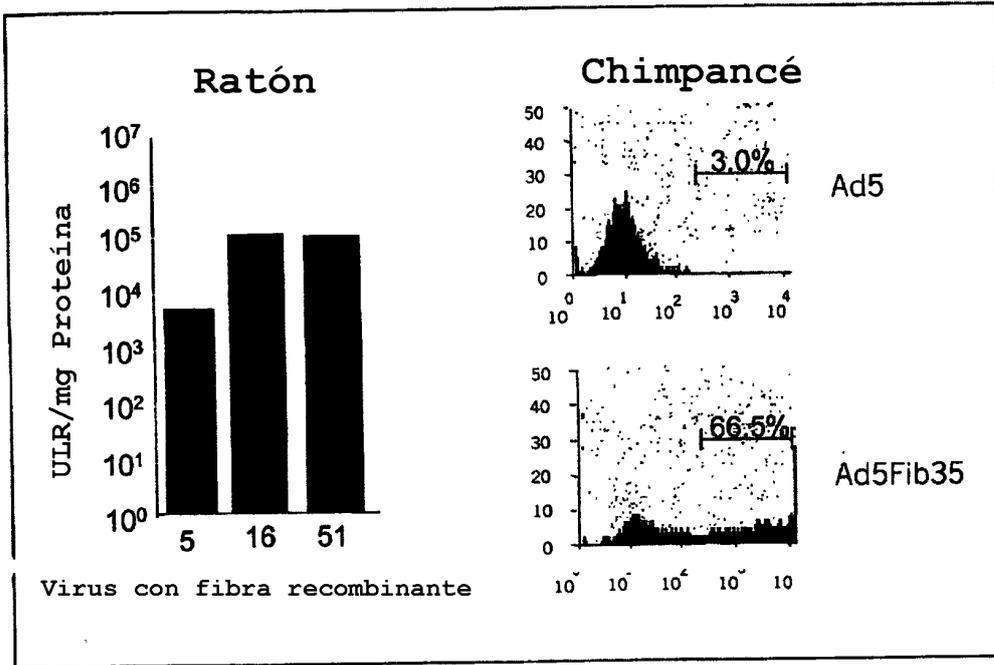


Figura 30 Crecimiento dependiente de la temperatura de
PER.C6

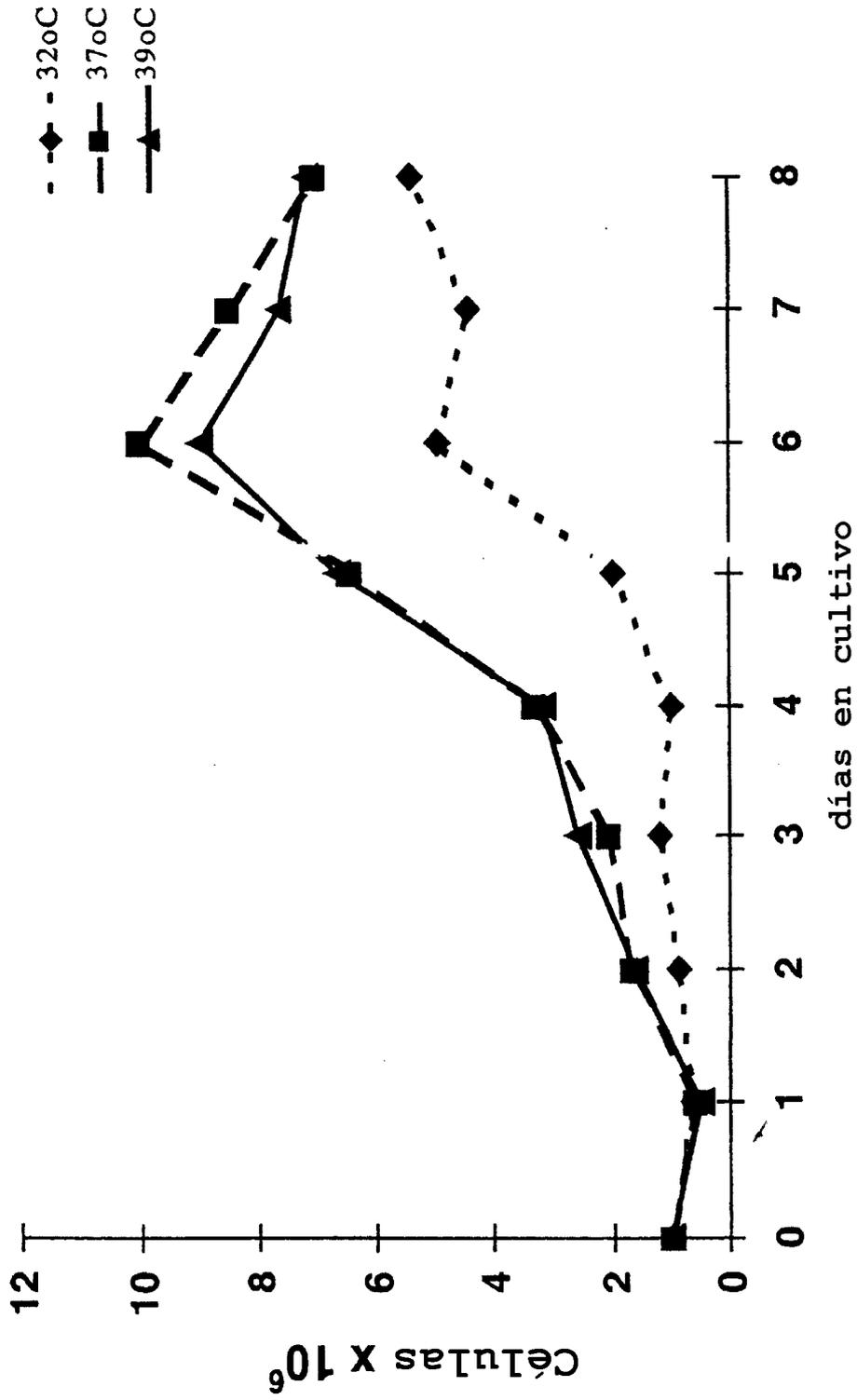


Figura 31 Niveles de DBP en células PER.C6 transfectadas con pCDNA3, pCDNA3wtE2A o pCDNA3ts125E2A

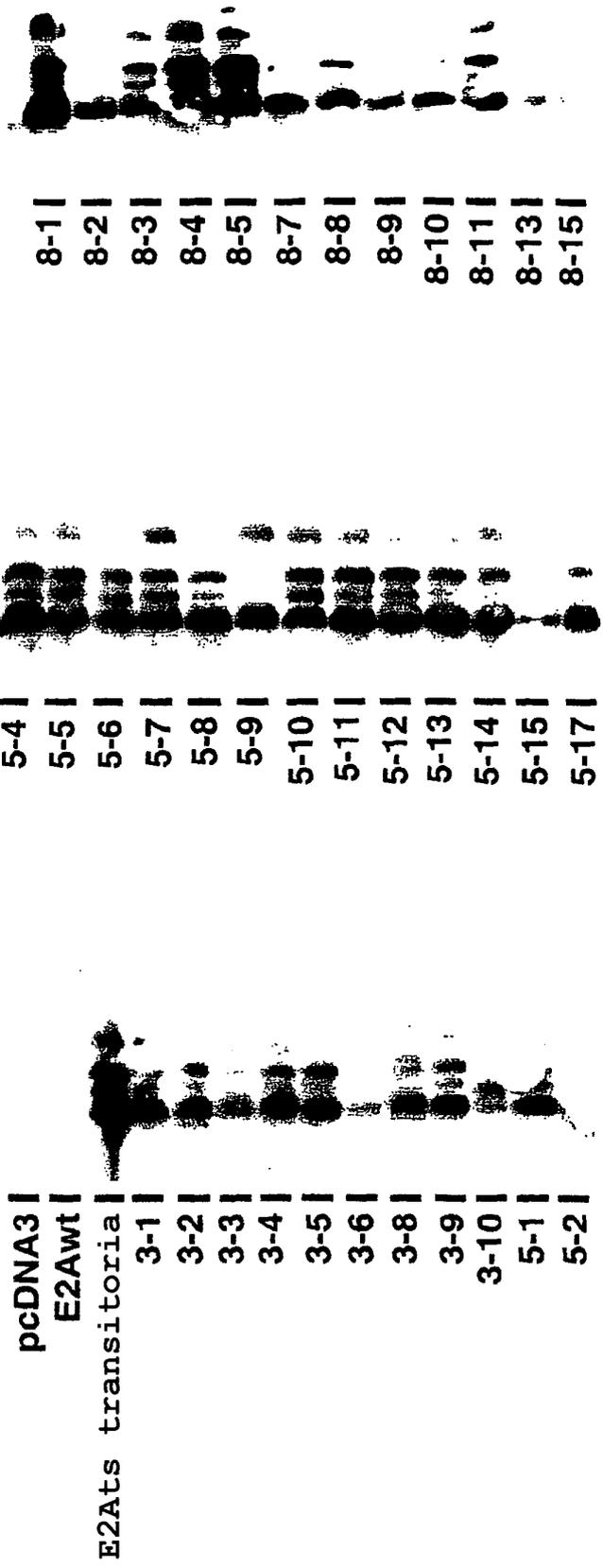


Figura 32 Crecimiento en suspensión de PER.C6ts125E2A C5-9

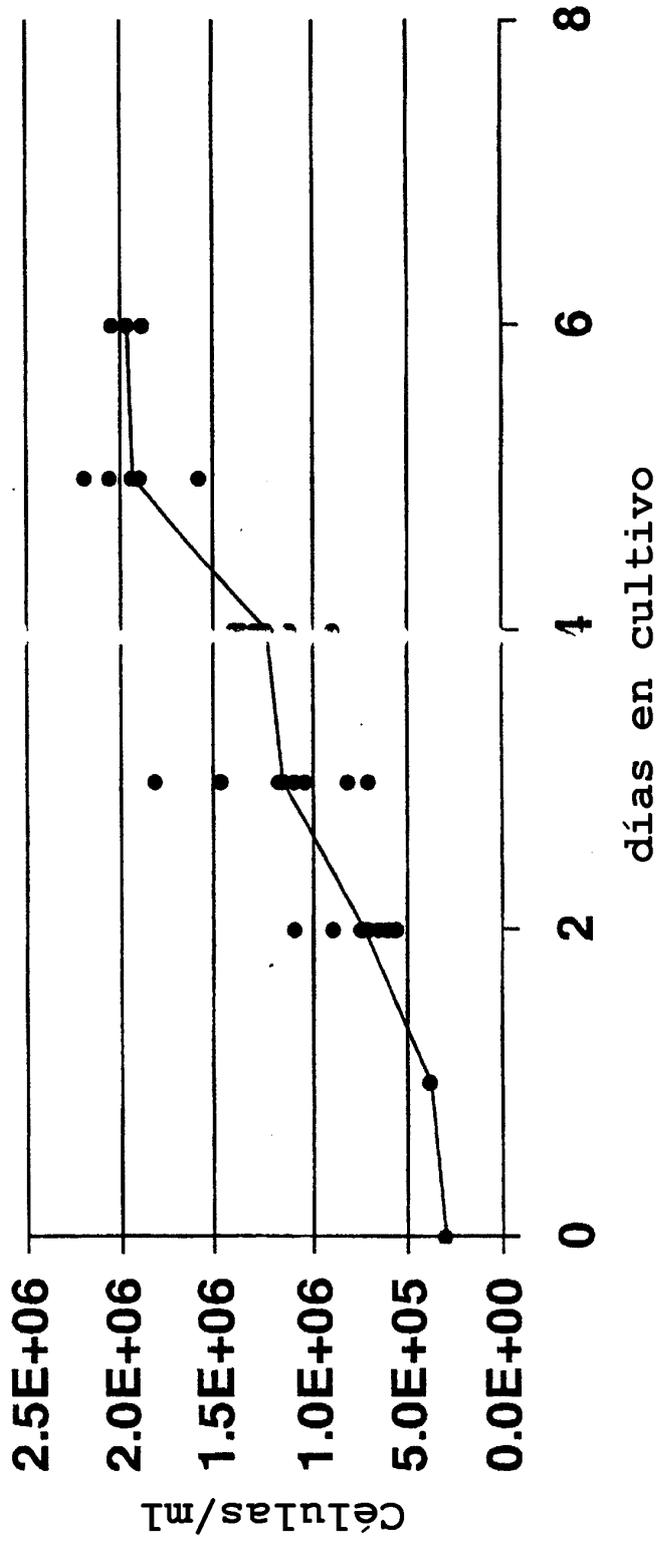


Figura 33 Curva de crecimiento para PER.C6 y PER.C6tsE2A

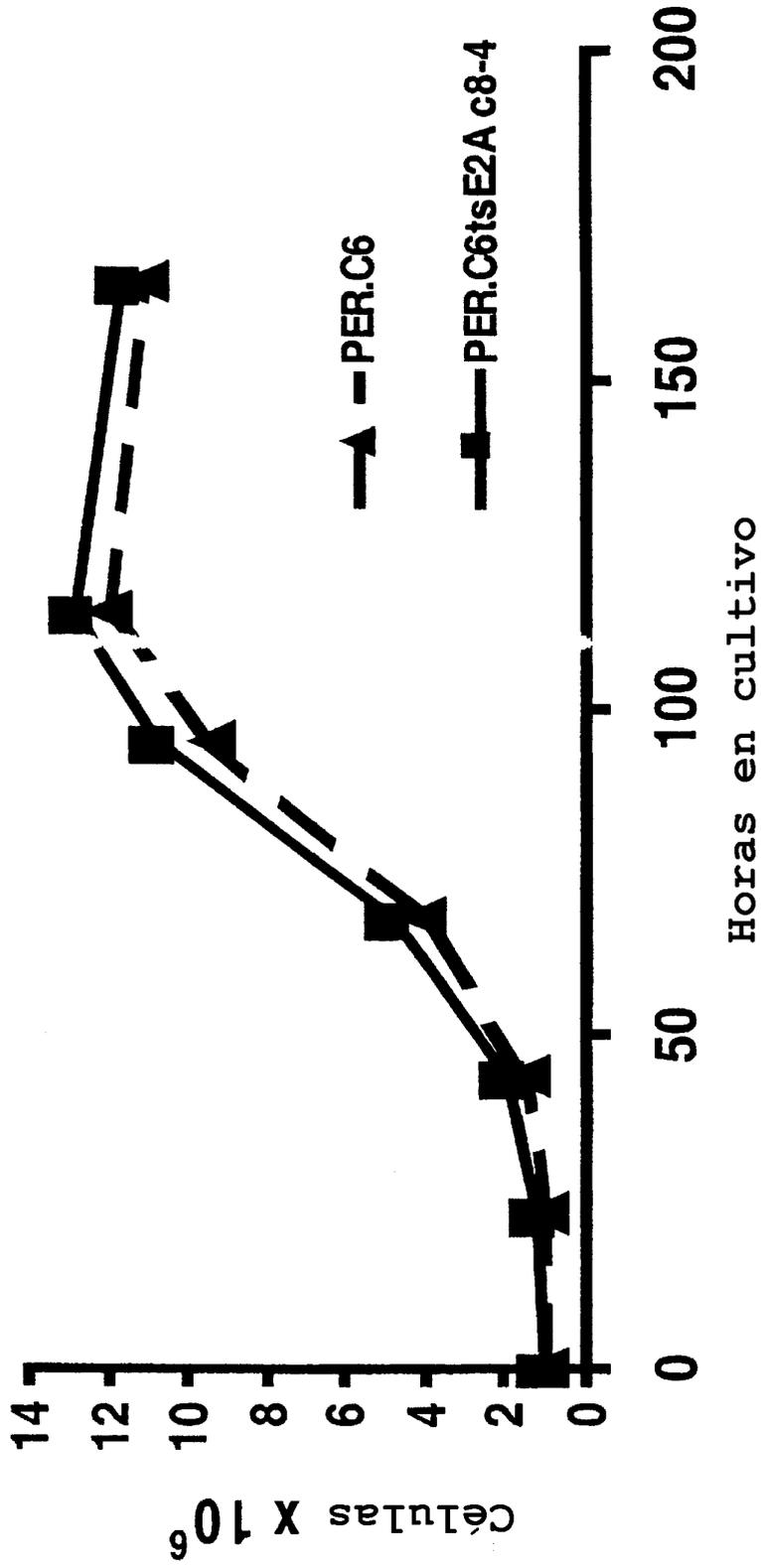


Figura 34 Estabilidad de PER. C6ts125E2A

