

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 470 440**

21 Número de solicitud: 201231427

51 Int. Cl.:

**C12N 15/85** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**14.09.2012**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**23.06.2014**

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (CSIC) (50.0%)**

**Serrano nº 117**

**28006 Madrid ES y**

**UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (50.0%)**

72 Inventor/es:

**VELASCO SAMPEDRO, Eladio Andrés;**

**ACEDO BÉCARES, Alberto y**

**DÍEZ GÓMEZ, Beatriz**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

54 Título: **Plásmido pSAD para ensayos funcionales de splicing**

57 Resumen:

Plásmido pSAD para ensayos funcionales de splicing. La presente invención se refiere a un vector génico útil para ensayos funcionales de splicing obtenido a partir del plásmido pSPL3b, que comprende: una delección del intrón de pSPL3b; una sustitución del MCS de pSPL3b por un casete lacZ sin sitio críptico aceptor de splicing; una mutación de fortalecimiento del sitio aceptor de splicing de pSPL3b; una mutación de inhabilitación de al menos una diana de restricción de pSPL3b; y consiste preferentemente en SEQ ID No: 79. Es asimismo objeto de la invención, un procedimiento de obtención del vector anterior. La invención también se refiere a un minigen que comprende dicho vector con una secuencia nucleotídica clonada en el MCS de lacZ, así como una célula que comprende un vector o minigen de los anteriores. Además, también hace referencia al uso del vector o minigen en ensayos funcionales de splicing, protegiendo también un método para este tipo de ensayos.

ES 2 470 440 A1

## DESCRIPCIÓN

## PLÁSMIDO pSAD PARA ENSAYOS FUNCIONALES DE SPLICING

**Sector de la técnica**

5 La presente invención se encuadra dentro del campo de la Biología Molecular y Biomedicina. En concreto, la presente invención se refiere a vectores plasmídicos para la realización de ensayos funcionales de splicing, que son de utilidad para la identificación de mutaciones deletéreas de *splicing* en genes de predisposición causantes de enfermedad, pudiendo servir como herramienta para el diagnóstico molecular de cáncer familiar y, en general, de todas las enfermedades hereditarias, y para el conocimiento básico de los mecanismos reguladores de esta etapa esencial de la expresión génica.

**Estado de la técnica anterior**

10 El procesamiento del pre-ARNm o "*splicing*" es una etapa esencial en la expresión de los genes eucariotas, en el cual se eliminan los intrones y se unen secuencialmente los exones (codificantes para proteína). De los aproximadamente 20.000 genes del genoma humano, alrededor del 90% de los transcritos primarios presentan *splicing* alternativo dando lugar a múltiples isoformas proteicas (Kalsotra and Cooper, 2011). El *splicing* alternativo es un mecanismo crucial para el control de la expresión génica y la generación de diversidad en el proteoma. Por ello, su regulación es extraordinariamente precisa determinando cuándo y dónde se produce una isoforma determinada. La simple regla general ["sitio donador (GU)-punto de ramificación (A)-tracto de pirimidinas-sitio aceptor (AG)"] no basta para explicar una regulación tan específica del splicing alternativo. Este proceso está controlado por una serie de complejos ribonucleoproteicos, factores de splicing y otras secuencias exónicas e intrónicas en cis denominadas enhancers y silenciadores de splicing (Cartegni et al., 2002). A estos motivos se unen factores de *splicing* específicos (básicamente proteínas SR-enhancers y hnRNP-silenciadores). Los enhancers fomentan la inclusión del exón en el ARNm maduro mediante el reclutamiento de la maquinaria de *splicing*, mientras que los silenciadores reprimen la inclusión del exón. Las proteínas hnRNPs y SR son factores esenciales para el *splicing* constitutivo y alternativo específico de tejido. Cualquier mutación que afecte a cualquiera de las secuencias reguladoras mencionadas puede afectar el splicing y estar asociada a una enfermedad.

Por otro lado, en las enfermedades hereditarias generalmente se consideran mutaciones causantes de enfermedad aquéllas que afectan a la proteína, ya sea truncándola (mutaciones *nonsense* y *frameshift*) o alterando su función (mutaciones de cambio de amino ácido o *missense*), o aquéllas que alteran el procesamiento del ARNm o splicing. Recientemente ha tomado especial relevancia en Biomedicina la correlación entre *splicing* aberrante y enfermedad como consecuencia de la lista creciente de mutaciones patogénicas ligadas a un *splicing* defectuoso de genes responsables de enfermedades hereditarias (Wang and Cooper, 2007). Un análisis bioinformático, estimaba que aproximadamente un 60% de las mutaciones potencialmente deletéreas podría afectar el mecanismo de *splicing* (Lopez-Bigas et al., 2005). Además de las mutaciones clásicas que afectan a los sitios donador y aceptor, cabe señalar que la eliminación o alteración de enhancers y silenciadores puede afectar el proceso de *splicing*. Por ello, cualquier variante de ADN, considerada a priori como un mero polimorfismo (p.e. variantes sinónimas), debe ser revisada por un posible efecto deletéreo a través del procesamiento del pre-ARNm. Precisamente, uno de los grandes problemas en la realización del Consejo Genético en enfermedades hereditarias es la detección en los pacientes de variantes de ADN de efecto clínico desconocido (UVs) cuya implicación en la enfermedad es desconocida. De hecho una gran fracción de las variantes detectadas en el rastreo de un gen de predisposición son de este tipo (hasta un 15% de las pacientes con cáncer de mama/ovario son portadoras de UVs), siendo necesaria su clasificación como meros polimorfismos o mutaciones patogénicas de cara a la activación de los protocolos de prevención y/o al establecimiento de terapias paliativas y/o curativas. Para estudiar el efecto de un cambio en el ADN sobre el *splicing* y su implicación en una enfermedad es necesario estudiar el ARN del paciente, que en muchas ocasiones no está disponible para el laboratorio de diagnóstico molecular. Es aquí donde entran en juego los plásmidos o vectores de exon trapping como el propuesto en esta patente. Estos vectores disponen de un "minigen" compuesto por un promotor eucariota, dos exones constitutivos y un intrón. Se clona el exón en estudio y las secuencias intrónicas flanqueantes dentro del intrón del vector en la orientación adecuada: "exón 1 vector – [intrón – sitio aceptor – exón en estudio – sitio donador – intrón] – exón 2 vector". Al introducir esta construcción, a la que llamamos minigen híbrido (plásmido reportero de splicing o *splicing reporter minigenes*), en células eucariotas humanas en cultivo (por ejemplo, células HeLa), se produce una reacción heteróloga de *splicing* entre los exones del vector y el exón en estudio, produciéndose un transcrito que contiene los dos exones constitutivos del vector de splicing y el exón clonado entre ambos. Para estudiar el efecto de cualquier mutación detectada en pacientes, bastará con generarla mediante un sencillo protocolo de mutagénesis dirigida sobre el minigen *wild type*, y ensayarla como se ha descrito arriba, de tal manera que estos plásmidos reporteros de splicing permiten realizar ensayos funcionales de splicing sin necesidad de ARN del paciente. No sólo eso, estos vectores son muy útiles para la investigación básica de los mecanismos reguladores del *splicing*, identificación de secuencias reguladoras y factores de *splicing* implicados en el procesamiento de cada exón.

Sin embargo, los vectores para la construcción de minigenes son muy escasos. De hecho el más extendido es el plásmido pSPL3 (Invitrogen) que está descatalogado desde hace años. Este vector ha sido empleado en trabajos de investigación de los inventores de la presente invención (Acedo et al, 2012; Sanz et al, 2010) y presenta una serie de limitaciones. En primer lugar, su elevado tamaño (6,1 Kb) complica la clonación de insertos largos con varios exones consecutivos, necesarios para el mantenimiento del “contexto genómico” en las reacciones de *splicing*. En segundo lugar, la selección de las colonias recombinantes es ardua y laboriosa porque todas las colonias (con inserto o no) son resistentes a Ampicilina, pero no existe un segundo método de selección de los clones con inserto, por lo que forzosamente hay que rastrear todas las colonias obtenidas tras la transformación, y el rendimiento (proporción de colonias recombinantes) suele ser muy bajo. En tercer lugar, se han descrito la presencia de sitios crípticos de *splicing* y pseudoexones que pueden interferir en la reacción de *splicing* (Burn et al., 1995).

Otro vector comercial es el pExontrap (Mobitec), aunque ha sido poco utilizado en la bibliografía. Sin embargo, según evidencias experimentales obtenidas por los autores de la presente invención, las reacciones de RT-PCR producen productos de *splicing* inespecíficos comparados con los obtenidos con el uso del plásmido pSPL3, y por consiguiente su uso no resulta siempre conveniente. Otro vector es el pSpliceExpress (no comercial y de uso poco extendido) derivado del pExontrap cuya clonación está basado en la recombinación con la enzima Clonasa (Kishore et al, 2008) y, por tanto, no se emplean enzimas de restricción.

En consecuencia, existe la necesidad de disponer de nuevos vectores para la construcción de minigenes que permitan clonar fragmentos de DNA de mayor tamaño o con un mayor número de exones, y que a la vez minimicen los productos de *splicing* inespecíficos que pueden dar lugar a resultados erróneos. Además, sería conveniente que estos vectores dispusieran de un segundo sistema de selección que permitiera identificar fácilmente aquellos clones que contienen vectores con insertos de ADN en su secuencia.

### **Bibliografía**

Acedo A, Sanz DJ, Durán M, Infante M, Pérez-Cabornero L, Miner C, Velasco EA (2012) Comprehensive splicing functional analysis of DNA variants of the BRCA2 gene by hybrid minigenes. Breast Cancer Res 14:R87.

Burn TC, Connors TD, Klinger KW, Landes GM (1995) Increased exon-trapping efficiency through modifications to the pSPL3 splicing vector. Gene 161:183-187.

Cartegni L, Chew SL, Krainer AR (2002) Listening to silence and understanding nonsense: Exonic mutations that affect splicing. Nat Rev Genet 3:285-298.

Hertel KJ (2008) Combinatorial control of exon recognition. J Biol Chem 283:1211-1215.

Kalsotra A, Cooper TA (2011) Functional consequences of developmentally regulated alternative splicing. Nat Rev Genet 12:715-729.

Kishore S, Khanna A, Stamm S (2008) Rapid generation of splicing reporters with pSpliceExpress. Gene 427:104-110.

Lopez-Bigas N, Audit B, Ouzounis C, Parra G, Guigo R (2005) Are splicing mutations the most frequent cause of hereditary disease? FEBS Lett 579:1900-1903.

Sanz DJ, Acedo A, Infante M, Duran M, Perez-Cabornero L, Esteban-Cardenosa E, Lastra E, Pagani F, Miner C, Velasco EA (2010) A high proportion of DNA variants of BRCA1 and BRCA2 is associated with aberrant splicing in breast/ovarian cancer patients. Clin Cancer Res 16:1957-1967.

Wang GS, Cooper TA (2007) Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. Nat Rev Genet 8:749-761.

### **Descripción de la invención**

En base a lo anterior, la presente invención describe un vector génico útil para ensayos funcionales de *splicing*, denominado vector o plásmido pSAD (*Splicing And Disease*). El vector pSAD es un derivado del plásmido pSPL3b (SEQ ID No: 1) que tiene un tamaño menor (deleción de al menos 1,2 Kb) para facilitar su manipulación y el clonaje de grandes fragmentos con varios exones. En segundo lugar, se ha mejorado su capacidad de selección al introducir un casete *LacZ* (colonias azules/blancas). Además *LacZ* contiene un sitio de clonación múltiple (también referido en la presente descripción como MCS o polylinker) más completo que el del propio pSPL3b (27 vs. 10 dianas de restricción, respectivamente). Finalmente se ha realizado mutagénesis dirigida de dos dianas *HindIII*, una *XbaI* y una *Sall*, un sitio críptico aceptor, y también se ha potenciado el sitio aceptor del exón constitutivo nº 2 del vector mediante una triple mutagénesis para evitar reacciones cruzadas anómalas de

splicing. Su fácil manejo permite ensayar cualquier exón de cualquier gen humano y estudiar el efecto de las mutaciones sobre el splicing en cualquier enfermedad hereditaria, así como el estudio de los mecanismos básicos reguladores de este proceso en cada exón.

5 A lo largo de la presente descripción, el término “diana de restricción” puede encontrarse igualmente referido como “sitio de restricción” o simplemente como “diana”, y hace referencia a una secuencia de nucleótidos que es reconocida por una determinada enzima de restricción, como por ejemplo son entre otras las enzimas de restricción *EcoRI*, *HindIII*, *XbaI* y *SaI*.

Un primer aspecto de la invención se refiere a un vector génico útil para ensayos funcionales de splicing obtenido a partir de una serie de modificaciones del plásmido pSPL3b de secuencia SEQ ID No: 1, que comprende:

- 10 a. una deleción de al menos 1,2 kilobases del intrón de SEQ ID No: 1, preferentemente donde dicha deleción del intrón comprende la eliminación de los nucleótidos comprendidos entre las posiciones 1299 y 2498 de SEQ ID No: 1;
- b. una sustitución del sitio de clonación múltiple (MCS) de SEQ ID No: 1 por un casete *lacZ*, donde dicho casete *lacZ* comprende una primera mutación de eliminación de un primer sitio crítico aceptor de splicing;
- 15 c. una segunda mutación de fortalecimiento de un segundo sitio aceptor de splicing, en al menos tres nucleótidos comprendidos entre las posiciones 2835 y 2875 (más preferentemente entre las posiciones 2841 y 2857) de SEQ ID No: 1;
- 20 d. al menos una tercera mutación de inhabilitación de al menos una diana de restricción comprendida entre las posiciones 340 y 2623 de SEQ ID No: 1, y donde dicha mutación comprende al menos una modificación de un nucleótido de la secuencia de la diana.

El plásmido pSPL3b de partida, que consiste en SEQ ID No: 1, presenta las siguientes características:

- Exón constitutivo 1 del plásmido pSPL3b, que comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 349 y 696 de SEQ ID No: 1;
- 25 - Exón constitutivo 2 del plásmido pSPL3b, que comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 2856 y 3121 de SEQ ID No: 1;
- Sitio donador de splicing del exón constitutivo 1 del plásmido pSPL3b, que comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 690 y 704 de SEQ ID No: 1;
- Sitio aceptor de splicing del exón constitutivo 2 del plásmido pSPL3b, que comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 2835 y 2875 de SEQ ID No: 1;
- 30 - Intrón del plásmido pSPL3b, que comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 697 y 2855 de SEQ ID No: 1;
- Sitio de clonación múltiple de pSPL3b, que comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 1010 y 1122 de SEQ ID No: 1;
- 35 - Primera diana *HindIII* de pSPL3b, que comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 340 y 345 de SEQ ID No: 1, con corte en posición 341;
- Segunda diana *HindIII* de pSPL3b, que comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 2618 y 2623 de SEQ ID No: 1, con corte en posición 2619;
- Primera diana *XbaI* de pSPL3b, que comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 679 y 684 de SEQ ID No: 1, con corte en posición 680;
- 40 - Primera diana *SaI* de pSPL3b, que comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 685 y 690 de SEQ ID No: 1, con corte en posición 686;
- Primera diana *EcoRI* de pSPL3b, que comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 1010 y 1015 de SEQ ID No: 1, con corte en posición 1011;
- 45 - Primera diana *NdeI* de pSPL3b, que comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 1117 y 1122 de SEQ ID No: 1, con corte en posición 1119.

Según se entiende la invención, la deleción del intrón de SEQ ID No: 1 definida en **a** reduce el tamaño del plásmido pSPL3b por eliminación de al menos 1,2 kilobases (1200 pares de bases) de una secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 797 y 2755 de SEQ ID No: 1, y hasta un máximo de 1846 nucleótidos para mantener la funcionalidad del intrón y el sitio de clonación múltiple de pSPL3b. Dicha deleción comprende la eliminación de al menos 1,2 kilobases que se localizan entre las posiciones (797)..(1009) y (1123)..(2755) de SEQ ID No: 1, resultando preferida una deleción de los nucleótidos comprendidos entre las posiciones 1299 y 2498 de SEQ ID No: 1. De este modo, la deleción según la invención mantiene inalterados al menos los 113 nucleótidos correspondientes al sitio de clonación múltiple de pSPL3b (posiciones 1010 a 1122 de SEQ ID No: 1), 100 nucleótidos del intrón contiguos al exón constitutivo 1 del plásmido pSPL3b (posiciones 697 a 796 de SEQ ID No: 1) y 100 nucleótidos del intrón contiguos al exón constitutivo 2 del plásmido pSPL3b (posiciones 2756 a 2855 de SEQ ID No: 1). La deleción del intrón máxima (1846 pb) daría lugar a un intrón final

de tan sólo 313 pb (incluyendo el MCS de pSPL3b) por delección de la secuencia de nucleótidos comprendidas entre las posiciones (797)..(1009) y (1123)..(2755) de SEQ ID No: 1.

En una realización preferida, la delección del intrón comprende la eliminación de los nucleótidos comprendidos entre las posiciones 1299 y 2498 de SEQ ID No: 1.

5 En la presente invención, el término casete *lacZ* se refiere a una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia codificante del gen del péptido alfa de la  $\beta$ -galactosidasa (gen *lacZ*), incluyendo promotor y terminación de la transcripción y traducción, es decir, los elementos necesario para tener la funcionalidad de dicho gen *lacZ*. Aunque el uso de casetes *lacZ* está muy extendido, cualquier casete *lacZ* conocido por un  
10 especialista del campo es susceptible de ser empleado en la presente invención, como por ejemplo son los casetes *lacZ* que se encuentran en plásmidos ya descritos como pUC18, pGEM, etc. Sin embargo, son especialmente preferidos para la presente invención aquellos casetes *lacZ* que tienen un MCS más completo, como por ejemplo el casete *lacZ* comprendido en el plásmido pBluescript II KS (-) (Stratagene) SEQ ID No: 21 (preferentemente la secuencia comprendida entre las posiciones 445 y 949 de SEQ ID No: 21).

15 Según la invención, la secuencia del casete *lacZ* comprende además una mutación eliminadora de un sitio críptico aceptor de splicing, y se refiere a un cambio en al menos un nucleótido de la secuencia de *lacZ* que permite disminuir la fortaleza de dicho sitio críptico, manteniendo inalterada la secuencia de aminoácidos por la que codifica dicho gen *lacZ*. La fortaleza de sitios de splicing (aceptores o dadores), puede evaluarse mediante el uso de herramientas específicas para tal fin, como por ejemplo el software NNSPLICE ([http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)) que evalúa los sitios de splicing de una secuencia mediante un valor  
20 numérico en una escala de entre 0 y 1, de tal manera que cuanto más próximo a 1 sea el valor mayor es la fortaleza del sitio de splicing. Mediante el uso de este tipo de software, se comprobó que para eliminar el sitio críptico aceptor de splicing del casete *lacZ*, el codón 13 de la secuencia codificante de *lacZ* (tomando como primer codón de dicha secuencia codificante el codón de iniciación Met) tiene que consistir en un triplete que codifica para treonina seleccionado del grupo compuesto por: ACC, ACG y ACA. En consecuencia, la secuencia del casete *lacZ* que comprende la mutación eliminadora de dicho sitio críptico aceptor se refiere a un casete *lacZ* donde el codón 13 de la secuencia codificante de *lacZ* es distinto de ACT, y consiste en un triplete nucleotídico que se selecciona entre ACC, ACG o ACA. No obstante, resulta más preferido el codón ACA, ya que debilita en mayor medida el sitio críptico aceptor de splicing. A modo de ejemplo, cuando el casete *lacZ* es la secuencia comprendida entre las posiciones 445 y 949 de SEQ ID No: 21 [plásmido pBluescript II KS (-)], la secuencia codificante de *LacZ* se refiere a la hebra complementaria entre las posiciones 816 y 454 de la SEQ ID No: 21. En concreto, el sitio críptico aceptor al que hace referencia esta invención comprende la secuencia complementaria en las posiciones 780 a 778 de SEQ ID No: 21 que corresponde al codón 13 (triplete de nucleótidos ACT que codifica para treonina) de la secuencia codificante de *lacZ*, tomando como primer codón de dicha secuencia codificante el codón de iniciación Met (ATG en secuencia complementaria, posiciones 816 a 814 de SEQ ID No: 21). En consecuencia, la mutación para eliminar o debilitar el sitio críptico aceptor consiste en cambiar el tercer nucleótido de dicho triplete (adenina, A) en posición 778 de la SEQ ID No: 21 en la secuencia de ADN codificante por un nucleótido seleccionado entre timina (T), citosina (C) o guanina (G), dando lugar a los codones codificantes en la secuencia complementaria para treonina ACA, ACG y ACC, respectivamente. No obstante, resulta más preferido el cambio por timina (codón ACA), ya que como se menciona anteriormente debilita en  
35 mayor medida el sitio críptico aceptor de splicing.  
40

En una realización preferida, el casete *lacZ* de la sustitución definida en **b** es SEQ ID No: 2. Esto quiere decir que, la sustitución definida en **b** comprende sustituir la secuencia de nucleótidos comprendidos entre las posiciones 1016 y 1116 de SEQ ID No: 1 por SEQ ID No: 2, de tal manera que en una realización preferida dicha sustitución comprende la eliminación de la secuencia comprendida entre las posiciones 1011 y 1118 de SEQ ID  
45 No: 1 con enzimas *EcoRI* y *NdeI*, y una inserción posterior del casete *lacZ* SEQ ID No: 2 con extremos *MunI* y *NdeI*. Un ejemplo preferido de casete *lacZ* con extremos *MunI* y *NdeI* consiste en la secuencia nucleotídica comprendida entre las posiciones 1010 y 1521 de SEQ ID No: 3. De este modo, la sustitución definida en **b** consiste en reemplazar con dicha secuencia nucleotídica los nucleótidos comprendidos entre las posiciones 1011 y 1118 de SEQ ID No: 1. Particularmente, SEQ ID No: 2 comprende entre las posiciones 370 y 372 la secuencia complementaria TAC del codón de iniciación Met (ATG) de *lacZ*, y entre los nucleótidos 334 y 336 de SEQ ID No: 2 se localiza la secuencia complementaria del codón 13 (TGT) que comprende la mutación para eliminar o debilitar el sitio críptico aceptor de splicing anteriormente mencionado.

El tamaño de un sitio aceptor de splicing varía entre los algoritmos usados para su búsqueda, pero se considera que 17 nucleótidos es un tamaño óptimo para definir la fortaleza de un sitio aceptor, donde los 15 primeros nucleótidos corresponden al extremo 3' del intrón y los dos nucleótidos siguientes pertenecen al extremo 5' del exón. Por tanto, la segunda mutación del sitio aceptor de splicing, como se define anteriormente en el apartado **c**, se dirige principalmente a los nucleótidos comprendidos entre las posiciones 2841 y 2857 de SEQ ID No: 1, de tal manera que por medio de dicha segunda mutación la secuencia entre dichas posiciones responde a una secuencia consenso de sitio aceptor de splicing SEQ ID No: 34.  
55

En realizaciones preferidas, para obtener un fortalecimiento del segundo sitio aceptor de splicing, el vector génico comprende una segunda mutación que consiste en al menos:

- c.1. un primer cambio de Adenina por Timina en el nucleótido en posición 2846 de SEQ ID No: 1 (2846A>T),
- c.2. un segundo cambio de Guanina por Timina en el nucleótido en posición 2849 de SEQ ID No: 1 (2849G>T),
- c.3. un tercer cambio de Adenina por Guanina en el nucleótido en posición 2856 de SEQ ID No: 1 (2856A>G).

Con el cambio de los tres nucleótidos definidos en c.1, c.2 y c.3, según el software NNSPLICE que evalúa los sitios de splicing (valor entre 0 y máximo 1), se pasa de un valor del sitio aceptor de 0,64 del pSPL3b a un valor de 0,99 con los tres cambios.

El plásmido pSPL3b SEQ ID No: 1 comprende entre las posiciones 340 y 2867 de su secuencia [preferentemente entre las posiciones (340)..(1009) y (1123)..(2623) de SEQ ID No: 1] distintas dianas de restricción que bien se pueden encontrar en el sitio del MCS del casete *lacZ* (p. e. las dianas *HindIII* comprendidas entre las posiciones 340 a 345 y 2618 a 2623 de SEQ ID No: 1, la diana *XbaI* comprendida entre las posiciones 679 y 684 de SEQ ID No: 1 o la diana *SaI* comprendida entre las posiciones 685 y 690 de SEQ ID No: 1), o bien pueden generar extremos compatibles con dianas del MCS del casete *lacZ* (como puede ser la diana *BglII* comprendida entre las posiciones 2862 y 2867 de SEQ ID No: 1 que genera extremos compatibles con la diana *BamHI* del MCS de *lacZ*), resultando conveniente su eliminación mediante mutaciones en la secuencia de dichas dianas. Por tanto, para aumentar la versatilidad del vector, ya que son enzimas de restricción muy comunes y que se usan habitualmente para clonar, el vector génico comprende una tercera mutación como se definió en d que se selecciona entre:

- d.1. una modificación de al menos un nucleótido en la secuencia de una primera diana *HindIII* comprendida entre las posiciones 340 y 345 de SEQ ID No: 1, siendo preferida la modificación que consiste en un cambio de Guanina por Adenina en el nucleótido en posición 342 de SEQ ID No: 1 (342G>A); y además una modificación de al menos un nucleótido en la secuencia de una segunda diana *HindIII* comprendida entre las posiciones 2618 y 2623 de SEQ ID No: 1, siendo preferida la modificación que consiste en un cambio de Guanina por Adenina en el nucleótido en posición 2620 de SEQ ID No: 1 (2620G>A);
- d.2. una modificación de al menos un nucleótido en la secuencia de una tercera diana *XbaI* comprendida entre las posiciones 679 y 684 de SEQ ID No: 1, siendo preferida la modificación que consiste en un cambio de Timina por Citosina en el nucleótido en posición 679 de SEQ ID No: 1 (679T>C);
- d.3. una modificación de al menos un nucleótido en la secuencia de una cuarta diana *SaI* comprendida entre las posiciones 685 y 690 de SEQ ID No: 1, siendo preferida la modificación que consiste en un cambio de Guanina por Adenina en el nucleótido en posición 685 de SEQ ID No: 1 (685G>A);

y cualquier combinación de las mismas.

De este modo, para eliminar la diana *HindIII* heredada del plásmido SEQ ID No: 1, la tercera mutación del vector génico objeto de la presente invención tiene que comprender una de las modificaciones de la primera diana *HindIII* definidas en d.1 y una de las modificaciones de la segunda diana *HindIII* definidas en d.1. Por tanto, en una realización preferida, el vector génico comprende las mutaciones de las dos dianas *HindIII* definidas en d.1, como por ejemplo el vector que consiste en la secuencia SEQ ID No: 3 (pSAD v5.0).

Sin embargo, para eliminar la diana *XbaI* heredada del plásmido SEQ ID No: 1 es suficiente con que el vector génico presente como tercera mutación una cualquiera de las modificaciones definidas en d.2, y para eliminar la diana *SaI* heredada del vector SEQ ID No: 1, dicho vector génico tiene que presentar una tercera mutación que consista en una de las modificaciones definidas anteriormente en d.3.

No obstante, la mayor versatilidad se obtiene cuando el vector génico comprende una de las mutaciones definidas en d.1, una de las mutaciones definidas en d.2 y una de las mutaciones definidas en d.3. De hecho, en una realización preferida, el vector génico objeto de la presente invención comprende los tres tipos de mutaciones definidas en d.1, d.2 y d.3, como el descrito más adelante en uno de los ejemplos, que consiste en SEQ ID No: 4 (pSAD v6.0).

En una realización preferida del vector génico definido en este aspecto de la invención, así como de cualquiera de sus realizaciones anteriores, dicho vector consiste en un plásmido de secuencia nucleotídica SEQ ID No: 79. En dicha secuencia, el nucleótido en posición 679 se selecciona independientemente entre timina (T) o citosina (C) y el nucleótido en posición 685 se selecciona independientemente entre guanina (G) o adenina (A). Cuando el nucleótido en posición 679 es timina y el nucleótido en posición 685 es guanina, dicho vector es el vector denominado pSAD v5.0 que consiste en SEQ ID No: 3. Cuando el nucleótido en posición 679 es citosina y el nucleótido en posición 685 es adenina, dicho vector es el vector denominado pSAD v6.0 que consiste en SEQ ID No: 4.

En otra realización preferida del vector génico de este aspecto de la invención, así como de cualquiera de sus realizaciones anteriores, dicho vector consiste en un plásmido de secuencia nucleotídica seleccionada entre SEQ ID No: 3 (pSAD v5.0) ó SEQ ID No: 4 (pSAD v6.0).

El vector pSAD v5.0 de secuencia SEQ ID No: 3 presenta las siguientes características:

- Exón constitutivo 1 heredado del plásmido pSPL3b, que comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 349 y 696 de SEQ ID No: 3;
- Exón constitutivo 2 heredado del plásmido pSPL3b, que comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 2059 y 2323 de SEQ ID No: 3;
- Sitio donador de splicing del exón constitutivo 1, que comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 690 y 704 de SEQ ID No: 3;
- Sitio aceptor de splicing del exón constitutivo 2, que comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 2038 y 2078 de SEQ ID No: 3;
- Gen de resistencia a ampicilina, que comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 3139 y 3999 de SEQ ID No: 3;
- Gen lacZ, que comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 1015 y 1519 de SEQ ID No: 3;
- Sitio de clonación múltiple (del gen lacZ), que comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 1223 y 1330 de SEQ ID No: 3;
- Promotor SV40, que comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 23 y 345 de SEQ ID No: 3.

El vector pSAD v6.0 de secuencia SEQ ID No: 4 presenta las siguientes características:

- Exón constitutivo 1 heredado del plásmido pSPL3b, que comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 349 y 696 de SEQ ID No: 4;
- Exón constitutivo 2 heredado del plásmido pSPL3b, que comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 2059 y 2323 de SEQ ID No: 4;
- Sitio donador de splicing del exón constitutivo 1, que comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 690 y 704 de SEQ ID No: 4;
- Sitio aceptor de splicing del exón constitutivo 2, que comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 2038 y 2078 de SEQ ID No: 4;
- Gen de resistencia a ampicilina, que comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 3139 y 3999 de SEQ ID No: 4;
- Gen lacZ, que comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 1015 y 1519 de SEQ ID No: 4;
- Sitio de clonación múltiple (del gen lacZ), que comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 1223 y 1330 de SEQ ID No: 4;
- Promotor SV40, que comprende la secuencia de nucleótidos comprendida entre las posiciones 23 y 345 de SEQ ID No: 4.

Los vectores génicos SEQ ID No: 3 (pSAD v5.0) y SEQ ID No: 4 (pSAD v6.0) han sido transformados independientemente en la cepa de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ .

**Cepa *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  transformada con el plásmido pSAD v5.0 SEQ ID No: 3 (CECT 8152)**

La siguiente cepa transformada con dicho plásmido SEQ ID No: 3 (pSAD v5.0) ha sido depositada el 23 de MAYO de 2012 en la **Colección Española de Cultivos Tipo** (CECT), Edificio 3 CUE, Parc Científic Universitat de Valencia, Catedrático Agustín Escardino 9, Paterna, 46980 Valencia (ESPAÑA), por Eladio A. Velasco Sampedro, INSTITUTO DE BIOLOGÍA Y GENÉTICA MOLECULAR del CSIC, C/ Sanz y Forés 3, 47003 Valladolid (ESPAÑA).

El depósito de la cepa anterior (y que comprende el plásmido SEQ ID No: 3) cuya referencia es pSAD v5.0, fue recibido por la CECT con el número de acceso **CECT 8152** una vez dicha Autoridad Internacional para el Depósito declaró que dicha cepa en cuestión era viable.

**Cepa *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  transformada con el plásmido pSAD v6.0 SEQ ID No: 4 (CECT 8153)**

5 La siguiente cepa transformada con dicho plásmido SEQ ID No: 4 (pSAD v6.0) ha sido depositada el 23 de MAYO de 2012 en la **Colección Española de Cultivos Tipo** (CECT), Edificio 3 CUE, Parc Científic Universitat de Valencia, Catedrático Agustín Escardino 9, Paterna, 46980 Valencia (ESPAÑA), por Eladio A. Velasco Sampedro, INSTITUTO DE BIOLOGÍA Y GENÉTICA MOLECULAR del CSIC, C/ Sanz y Forés 3, 47003 Valladolid (ESPAÑA).

10 El depósito de la cepa anterior (y que comprende el plásmido SEQ ID No: 4) cuya referencia es pSAD v6.0, fue recibido por la CECT con el número de acceso **CECT 8153** una vez dicha Autoridad Internacional para el Depósito declaró que dicha cepa en cuestión era viable.

En la presente memoria, todos los vectores génicos útiles para ensayos de splicing definidos anteriormente pueden ser igualmente referidos como “*vectores de la invención*” o “*plásmidos de la invención*”.

15 Los vectores de la invención anteriormente definidos presentan las siguientes ventajas:

- Reducción de tamaño del plásmido (pSPL3: 6,031 Kb vs. 4,993 Kb de pSAD), lo cual permite la clonación de insertos de mayor tamaño con varios exones.
- Mejora de la capacidad de selección de colonias "recombinantes" (con inserto) mediante la introducción del gen *LacZ* ( $\beta$ -galactosidasa) procedente del pBluescript II KS(-) que permite una selección por color en presencia de X-Gal e IPTG (colonias azules-no recombinantes/colonias blancas – con inserto).
- Nuevo sitio de clonación múltiple (**MCS**) dentro de *LacZ* (27 sitios de restricción) superando el polylinker de pSPL3 (10 sitios), lo cual dota de mayor versatilidad para la selección de las enzimas de clonaje.
- Eliminación de dos de los tres sitios *HindIII* mediante mutagénesis dirigida, lo cual permite el uso de *HindIII* del MCS para clonaje.
- Eliminación de un sitio crítico aceptor de splicing presente en *LacZ* mediante mutagénesis dirigida para evitar posibles reacciones artefactuales de splicing.
- Fortalecimiento del sitio aceptor del exón constitutivo 2 del vector mediante triple mutagénesis dirigida. De acuerdo al software NNSPLICE, el sitio aceptor previo de pSPL3 era débil (score 0,64). De este modo se potencia hasta 0,99 (máximo 1,0), lo cual evita la selección errónea de sitios críticos en las reacciones de *splicing*.

Uno de los objetivos de la presente invención es la realización de ensayos funcionales de splicing mediante la construcción de “minigenes híbridos” en los vectores o plásmidos de la invención, dentro de lo cual se pueden distinguir 2 aplicaciones fundamentales:

- Conocimiento básico de los mecanismos reguladores del procesamiento del ARN mensajero (splicing). Cualquier exon puede ser clonado y estudiado con el vector pSAD.
- Biomedicina: estudio de enfermedades genéticas. Se trata de la principal aplicación:
  - Estudio de la correlación entre splicing aberrante de genes responsables de estas enfermedades y susceptibilidad genética a dichas enfermedades.
  - Estudio del efecto de variantes de ADN sobre el procesamiento del ARN mensajero.
  - Clasificación de variantes de ADN de significado clínico desconocido como inocuas o mutaciones causantes de enfermedad, de importancia esencial para el Consejo Genético en enfermedades hereditarias. De hecho, la mayoría de las variantes de ADN detectadas en pacientes no pueden ser clasificadas como polimorfismos o patogénicas. Cualquier exón de cualquier gen humano puede ser estudiado en el vector pSAD sin necesidad de ARN del paciente (principal hándicap en este tipo de estudios).



Un segundo aspecto de la invención se refiere a un minigen útil para ensayos funcionales de splicing, que comprende un vector de la invención como cualquiera de los definidos anteriormente y además al menos una secuencia de nucleótidos clonada en el sitio de clonación múltiple del casete o gen *lacZ* de dicho vector. La inserción de tan solo un nucleótido en el sitio de clonación múltiple del vector de la invención es suficiente para interrumpir la pauta de lectura de la proteína *lacZ* y dar colonias blancas en vez de azules. Por tanto, teniendo en cuenta que mediante el empleo de plásmidos se ha conseguido clonar hasta 20 kilobases (20000 nucleótidos), el vector de la invención permite identificar una secuencia de nucleótidos clonada en el MCS de *lacZ* con un tamaño comprendido entre 1 y 20000 nucleótidos.

Según la invención, preferentemente la secuencia de nucleótidos insertada en el minigen comprende al menos la secuencia de un exón de un gen, siendo preferidos los exones de genes de predisposición a una enfermedad. Aunque existen exones cuyas secuencias contienen 1 ó 2 nucleótidos (Coyne et al. *Genome Biology* 2011, 12:R100), para el reconocimiento del exón durante la reacción de splicing es necesario que la secuencia de nucleótidos insertada comprenda, además de la secuencia del exón, las secuencias de nucleótidos de los intrones que flanquean a dicho exón en el gen, sugiriéndose un mínimo de 100 nucleótidos que incluyan los sitios naturales aceptor y donador y el punto de ramificación natural de cada exón para el correcto funcionamiento del minigen. Por tanto, en el ámbito de la presente invención, el término “minigen útil para ensayos funcionales de splicing” hace referencia preferentemente a cualquier construcción en el vector pSAD v5.0 (SEQ ID No: 3) o en el vector pSAD v6.0 (SEQ ID No: 4) que contenga al menos un exón y sus secuencias intrónicas flanqueantes completas o parciales, donde las secuencias intrónicas flanqueantes contienen el sitio aceptor, el punto de ramificación y el sitio donador. Por regla general se sugiere incluir un mínimo de 100 nucleótidos del intrón, aunque estas cifras pueden variar dependiendo del intrón ya que existen secuencias reguladoras, como por ejemplo el punto de ramificación, que no tienen una posición fija. No obstante, en el caso de intrones pequeños puede ser necesario mantener la totalidad del intrón.

Como se mencionó anteriormente, el tamaño mínimo de un intrón humano es de alrededor 80-100 nucleótidos (tamaño medio de los intrones humanos pequeños 92 pb), resultando conveniente mantener en el inserto al menos 100 nucleótidos de las secuencias intrónicas flanqueantes. Sin embargo, los intrones pueden tener decenas de kilobases, resultando poco práctico insertar el intrón completo debido al aumento excesivo del tamaño del minigen, y por ello se suelen insertar de 100 a 400 nucleótidos (incluidos ambos límites) dependiendo de la composición de las secuencias intrónicas flanqueantes, sobre todo en lo referente a la presencia de secuencias repetitivas, tales como SINES o LINES. Por lo tanto, la secuencia de nucleótidos normalmente comprende, además de los nucleótidos del exón, entre 100 y 400 nucleótidos de cada una de las regiones intrónicas flanqueantes más próximas al exón. Esto quiere decir, que la secuencia de nucleótidos insertada en el minigen cuando comprende un exón preferentemente consistiría en al menos:

- entre los 100 y 400 últimos nucleótidos del extremo 3' del intrón precedente a dicho exón, y que corresponden con los nucleótidos más próximos a dicho exón;
- la secuencia de nucleótidos del exón;
- entre los 100 y 400 primeros nucleótidos del extremo 5' del intrón posterior a dicho exón, y que corresponden con los nucleótidos más próximos a dicho exón.

En la secuencia de nucleótidos insertada anterior, más preferentemente, los nucleótidos del intrón precedente están unidos al extremo 5' del exón, mientras que los nucleótidos del intrón posterior están unidos al extremo 3' de dicho exón, de tal manera que la secuencia insertada (o inserto) comprende la secuencia de nucleótidos en la orientación adecuada como aparece en el gen natural. En ejemplos de realización preferidos, se obtuvieron minigenes que comprenden una secuencia de nucleótidos insertada con un tamaño comprendido entre 1,5 y 6 kilobases.

Según la invención, genes adecuados para insertar en el minigen son genes que poseen exones e intrones en su secuencia de tal manera que para su expresión en un organismo requieren una etapa de procesamiento del pre-ARNm o “*splicing*”, como por ejemplo son entre otros los genes de organismos eucariotas cuya secuencia está recogida en la base de datos ENSEMBL (<http://www.ensembl.org/>), resultando preferidos aquellos genes de predisposición a una enfermedad.

En el ámbito de la invención, el término “genes de predisposición a una enfermedad” se refiere a aquellos genes que cuando presentan una mutación se incrementa el riesgo de padecer una enfermedad hereditaria. Así por ejemplo, mutaciones en los genes *BRCA* (*BRCA1* y/o *BRCA2*) incrementan significativamente el riesgo de padecer cáncer de mama y ovario, y el riesgo de otros tipos de tumores. Dentro de esta categoría, caben citar los genes *PALB2*, *Abraxas*, *XRCC2*, *BRIP1*, *ATM*, *RAD50*, *RAD51C*, *RAD51D*, *CHEK2*, *NBS1*, *TP53* y *PTEN* (todos ellos implicados en cáncer de mama y/o ovario hereditario), así como otros genes responsables de enfermedades hereditarias como *CFTR* (Fibrosis Quística), *NF1* (Neurofibromatosis tipo I), *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2*

(síndrome de Lynch), *PKD1* y *PKD2* (Poliquistosis renal del adulto), entre otros, así como los genes y enfermedades descritos en el catálogo OMIM (“Online Mendelian Inheritance in Man”) de enfermedades hereditarias humanas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>), o los genes de organismos eucariotas cuya secuencia está recogida en la base de datos ENSEMBL (<http://www.ensembl.org/>).

- 5 En realizaciones preferidas, el gen de predisposición a una enfermedad es un gen implicado en síndromes cancerosos hereditarios, como los genes *BRCA1* y/o *BRCA2* de predisposición a cáncer de mama y ovario, cuyas secuencias son ampliamente conocidas y pueden encontrarse en bases de datos como ENSEMBL (ver [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Transcript/Exons?db=core;g=ENSG0000012048;r=17:41196312-41277500;t=ENST00000357654](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Exons?db=core;g=ENSG0000012048;r=17:41196312-41277500;t=ENST00000357654) para la secuencia anotada del gen *BRCA1* y [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Transcript/Exons?db=core;g=ENSG00000139618;r=13:32889611-32973347;t=ENST00000380152](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Exons?db=core;g=ENSG00000139618;r=13:32889611-32973347;t=ENST00000380152) para la secuencia anotada del gen *BRCA2*). Más preferentemente, el gen de predisposición a una enfermedad es el gen *BRCA2*.

15 En una realización preferida, el minigen como se definió anteriormente y en cualquiera de sus realizaciones preferidas, consiste en uno que se selecciona del grupo compuesto por: SEQ ID No: 5 (MGBR2\_EX19-24), SEQ ID No: 6 (MGBR2\_EX19-25), SEQ ID No: 7 (MGBR2\_EX19-26), SEQ ID No: 8 (MGBR2\_EX19-27), SEQ ID No: 9 (MGBR2\_EX25-26), SEQ ID No: 10 (MGBR2\_EX10), SEQ ID No: 11 (MGBR2\_EX4-7), SEQ ID No: 12 (MGBR2\_EX3-7), SEQ ID No: 13 (MGBR2\_EX3-8), SEQ ID No: 14 (MGBR2\_EX3-9), SEQ ID No: 15 (MGBR2\_EX2-9), SEQ ID No: 16 (MGBR2\_EX17-18), SEQ ID No: 17 (MGBR2\_EX16-18) y SEQ ID No: 18 (MGBR2\_EX16-20).

20 El minigen MGBR2\_EX19-24 con secuencia SEQ ID No: 5 consiste en el plásmido pSAD v5.0 (SEQ ID No: 3) clonado con exones 19, 20, 21, 22, 23 y 24, y secuencias flanqueantes de los intrones 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 24 del gen *BRCA2* de *Homo sapiens*, de tal manera que:

- la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1316 y 4180 de SEQ ID No: 5 comprende a los exones 19, 20, 21, 22, 23 y 24, y secuencias flanqueantes de los intrones 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 24 del gen *BRCA2*;
- la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1–1315 y 4181–7849 de SEQ ID No: 5 corresponde al plásmido pSAD v5.0.

El minigen MGBR2\_EX19-25 con secuencia SEQ ID No: 6 consiste en el plásmido pSAD v5.0 (SEQ ID No: 3) clonado con exones 19, 20, 21, 22, 23, 24 y 25 y secuencias flanqueantes de los intrones 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 y 25 del gen *BRCA2* de *Homo sapiens*, de tal manera que:

- la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1316 y 5127 de SEQ ID No: 6 comprende a los exones 19, 20, 21, 22, 23, 24 y 25 y secuencias flanqueantes de los intrones 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 y 25 del gen *BRCA2*;
- la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1–1315 y 5128–8796 de SEQ ID No: 6 corresponde al plásmido pSAD v5.0.

35 El minigen MGBR2\_EX19-26 con secuencia SEQ ID No: 7 consiste en el plásmido pSAD v5.0 (SEQ ID No: 3) clonado con exones 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 y 26 y secuencias flanqueantes de los intrones 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 y 26 del gen *BRCA2* de *Homo sapiens*, de tal manera que:

- la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1316 y 5959 de SEQ ID No: 7 comprende a los exones 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 y 26 y secuencias flanqueantes de los intrones 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 y 26 del gen *BRCA2*;
- la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1–1315 y 5960–9628 de SEQ ID No: 7 corresponde al plásmido pSAD v5.0.

El minigen MGBR2\_EX19-27 con secuencia SEQ ID No: 8 consiste en el plásmido pSAD v5.0 (SEQ ID No: 3) clonado con exones 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 y 27 y secuencias flanqueantes de los intrones 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 y 26 del gen *BRCA2* de *Homo sapiens*, de tal manera que:

- la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1316 y 6935 de SEQ ID No: 8 comprende a los exones 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 y 27 y secuencias flanqueantes de los intrones 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 y 26 del gen *BRCA2*;
- la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1–1315 y 6936–9820 de SEQ ID No: 8 corresponde al plásmido pSAD v5.0.

## ES 2 470 440 A1

El minigen MGBR2\_EX25-26 con secuencia SEQ ID No: 9 consiste en el plásmido pSAD v5.0 (SEQ ID No: 3) clonado con exones 25 y 26 y secuencias flanqueantes de los intrones 24, 25 y 26 del gen *BRCA2* de *Homo sapiens*, de tal manera que:

- 5
- la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1265 y 3991 de SEQ ID No: 9 comprende a los exones 25 y 26 y secuencias flanqueantes de los intrones 24, 25 y 26 del gen *BRCA2*;
  - la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1–1264 y 3992–7675 de SEQ ID No: 9 corresponde al plásmido pSAD v5.0.

El minigen MGBR2\_EX10 con secuencia SEQ ID No: 10 consiste en el plásmido pSAD v5.0 (SEQ ID No: 3) clonado con exon 10 y secuencias flanqueantes de los intrones 9 y 10 del gen *BRCA2* de *Homo sapiens*, de tal manera que:

- 10
- la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1277 y 3236 de SEQ ID No: 10 comprende al exon 10 y secuencias flanqueantes de los intrones 9 y 10 del gen *BRCA2*;
  - la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1–1276 y 3237–6920 de SEQ ID No: 10 corresponde al plásmido pSAD v5.0.

El minigen MGBR2\_EX4-7 con secuencia SEQ ID No: 11 consiste en el plásmido pSAD v5.0 (SEQ ID No: 3) clonado con exones 4, 5, 6 y 7 y secuencias flanqueantes de los intrones 3, 4, 5, 6 y 7 del gen *BRCA2* de *Homo sapiens*, de tal manera que:

- 15
- la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1283 y 3610 de SEQ ID No: 11 comprende a los exones 4, 5, 6 y 7 y secuencias flanqueantes de los intrones 3, 4, 5, 6 y 7 del gen *BRCA2*;
- 20
- la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1–1282 y 3611–7294 de SEQ ID No: 11 corresponde al plásmido pSAD v5.0.

El minigen MGBR2\_EX3-7 con secuencia SEQ ID No: 12 consiste en el plásmido pSAD v5.0 (SEQ ID No: 3) clonado con exones 3, 4, 5, 6 y 7 y secuencias flanqueantes de los intrones 2, 3, 4, 5, 6 y 7 del gen *BRCA2* de *Homo sapiens*, de tal manera que:

- 25
- la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1283 y 4377 de SEQ ID No: 12 comprende a los exones 3, 4, 5, 6 y 7 y secuencias flanqueantes de los intrones 2, 3, 4, 5, 6 y 7 del gen *BRCA2*;
- 30
- la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1–1282 y 4378–8061 de SEQ ID No: 12 corresponde al plásmido pSAD v5.0.

El minigen MGBR2\_EX3-8 con secuencia SEQ ID No: 13 consiste en el plásmido pSAD v5.0 (SEQ ID No: 3) clonado con exones 3, 4, 5, 6, 7 y 8 y secuencias flanqueantes de los intrones 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 del gen *BRCA2* de *Homo sapiens*, de tal manera que:

- 35
- la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1283 y 4931 de SEQ ID No: 13 comprende a los exones 3, 4, 5, 6, 7 y 8 y secuencias flanqueantes de los intrones 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 del gen *BRCA2*;
- 40
- la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1–1282 y 4932–8600 de SEQ ID No: 13 corresponde al plásmido pSAD v5.0.

El minigen MGBR2\_EX3-9 con secuencia SEQ ID No: 14 consiste en el plásmido pSAD v5.0 (SEQ ID No: 3) clonado con exones 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 y secuencias flanqueantes de los intrones 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 del gen *BRCA2* de *Homo sapiens*, de tal manera que:

- 40
- la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1283 y 5550 de SEQ ID No: 14 comprende a los exones 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 y secuencias flanqueantes de los intrones 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 del gen *BRCA2*;
- 45
- la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1–1282 y 5551–9219 de SEQ ID No: 14 corresponde al plásmido pSAD v5.0.

El minigen MGBR2\_EX2-9 con secuencia SEQ ID No: 15 consiste en el plásmido pSAD v5.0 (SEQ ID No: 3) clonado con exones 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 y secuencias flanqueantes de los intrones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 del gen *BRCA2* de *Homo sapiens*, de tal manera que:

- 5 - la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1246 y 6222 de SEQ ID No: 15 comprende a los exones 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 y secuencias flanqueantes de los intrones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 del gen *BRCA2*;
- la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1–1245 y 6223–9891 de SEQ ID No: 15 corresponde al plásmido pSAD v5.0.

10 El minigen MGBR2\_EX17-18 con secuencia SEQ ID No: 16 consiste en el plásmido pSAD v5.0 (SEQ ID No: 3) clonado con exones 17 y 18 y secuencias flanqueantes de los intrones 16, 17 y 18 del gen *BRCA2* de *Homo sapiens*, de tal manera que:

- la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1270 y 2775 de SEQ ID No: 16 comprende a los exones 17 y 18 y secuencias flanqueantes de los intrones 16, 17 y 18 del gen *BRCA2*;
- 15 - la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1–1269 y 2776–6497 de SEQ ID No: 16 corresponde al plásmido pSAD v5.0.

El minigen MGBR2\_EX16-18 con secuencia SEQ ID No: 17 consiste en el plásmido pSAD v5.0 (SEQ ID No: 3) clonado con exones 16, 17 y 18 y secuencias flanqueantes de los intrones 15, 16, 17 y 18 del gen *BRCA2* de *Homo sapiens*, de tal manera que:

- 20 - la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1270 y 3530 de SEQ ID No: 17 comprende a los exones 16, 17 y 18 y secuencias flanqueantes de los intrones 15, 16, 17 y 18 del gen *BRCA2*;
- la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1–1269 y 3531–7252 de SEQ ID No: 17 corresponde al plásmido pSAD v5.0.

25 El minigen MGBR2\_EX16-20 con secuencia SEQ ID No: 18 consiste en el plásmido pSAD v5.0 (SEQ ID No: 3) clonado con exones 16, 17, 18, 19 y 20 y secuencias flanqueantes de los intrones 15, 16, 17, 18, 19 y 20 del gen *BRCA2* de *Homo sapiens*, de tal manera que:

- la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1270 y 4671 de SEQ ID No: 18 comprende a los exones 16, 17, 18, 19 y 20 y secuencias flanqueantes de los intrones 15, 16, 17, 18, 19 y 20 del gen *BRCA2*;
- 30 - la secuencia de nucleótidos entre las posiciones 1–1269 y 4672–8340 de SEQ ID No: 18 corresponde al plásmido pSAD v5.0.

De los minigenes anteriores SEQ ID No: 5 a SEQ ID No: 18, el minigen SEQ ID No: 8 (denominado MGBR2\_EX19-27) contiene un inserto de 5620 pb.

35 En la presente memoria, todos los minigenes útiles para ensayos de splicing definidos anteriormente en este aspecto de la invención, así como cualquiera de sus realizaciones preferidas, pueden ser igualmente referidos como “*minigenes de la invención*”.

Un tercer aspecto de la invención se refiere a una célula (eucariota o procariota) que comprende un vector génico de la invención o un minigen de la invención. Las células que comprenden este tipo de vectores o minigenes son de utilidad a la hora de realizar ensayos funcionales de splicing o para la clonación de distintos fragmentos con exones, o para la transformación, almacenamiento y replicación de los vectores y los diferentes minigenes. De hecho, para ensayos funcionales de splicing se transfectan a células eucariotas, como por ejemplo son entre otras las células de origen humano HeLa, las células derivadas de tumor de mama humano MCF-7, las células de carcinoma hepatocelular humano Hep3B, las células no tumorales de epitelio mamario humano MCF10A o las células COS de mono verde africano. Para los experimentos de clonaje de fragmentos de exones, mantenimiento y replicación de plásmidos y construcciones derivadas se emplean células procariotas, principalmente cepas de *Escherichia coli* capaces de hacer complementación en  $\alpha$  de la  $\beta$ -galactosidasa (p. ej. la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  ampliamente utilizada u otras cepas de *E. coli* como son entre otras XL1-Blue, XL10-Gold, JM83, JM101, JM103, JM105, JM107, JM109 y JM110). Las células que comprenden el vector o el minigen de la invención pueden obtenerse siguiendo los procedimientos habituales de transfección en células eucariotas o transformación en células procariotas, conocidos por cualquier especialista en el campo.

En una realización preferida, la célula anterior que comprende un vector génico de la invención, o un minigen de la invención, es una bacteria, y más preferentemente es la cepa de *E. coli* DH5α.

En otra realización preferida, cuando dicha célula es una bacteria, dicha bacteria se selecciona entre CECT 8152 o CECT 8153. Como se mencionó anteriormente, la cepa CECT 8152 es una cepa de *Escherichia coli* DH5α transformada con el plásmido pSAD v5.0 (SEQ ID No: 3). La cepa CECT 8153 es una cepa de *Escherichia coli* DH5α transformada con el plásmido pSAD v6.0 (SEQ ID No: 4).

En la presente memoria, cualquiera de las células definidas anteriormente en este aspecto de la invención que comprende un vector génico o un minigen de la invención con utilidad para ensayos de splicing, así como en cualquiera de sus realizaciones preferidas, puede ser igualmente referida como "célula de la invención".

Un cuarto aspecto de la invención hace referencia a un procedimiento de obtención de un vector génico de la invención que, a partir del plásmido pSPL3b de secuencia SEQ ID No: 1, comprende las siguientes etapas:

**A.1.** reducir el tamaño del plásmido SEQ ID No: 1 mediante delección de al menos 1,2 kilobases del intrón por una primera mutagénesis dirigida con un primer par de cebadores específicos para dicha delección, donde la secuencia de un cebador comprende una secuencia de al menos 25 nucleótidos consecutivos comprendidos entre las posiciones 1125 y 1394 de SEQ ID No: 1 (preferentemente los 25 nucleótidos comprendidos entre las posiciones 1274 y 1298), donde dicha secuencia se encuentra unida por el extremo 3' a una secuencia de al menos 25 nucleótidos consecutivos comprendidos entre las posiciones 2349 y 2617 de SEQ ID No: 1 (preferentemente los 25 nucleótidos comprendidos entre las posiciones 2499 y 2523), y la secuencia del otro cebador es la complementaria;

**A.2.** amplificar un casete *lacZ* con extremos *MunI* y *NdeI* mediante PCR con una enzima de alta fidelidad (por ejemplo, Phusion de Finnzymes) y un segundo par de cebadores, donde uno de los cebadores comprende en su secuencia una diana *MunI* (y preferentemente dicha secuencia comprende SEQ ID No: 85), y otro cebador comprende en su secuencia una diana *NdeI* (y preferentemente la secuencia de dicho cebador comprende SEQ ID No: 86);

**A.3.** eliminar el sitio de clonación múltiple del plásmido SEQ ID No: 1 mediante enzimas de restricción *EcoRI* y *NdeI*, y clonar el casete *lacZ* amplificado en **A.2**;

**A.4.** eliminar un sitio críptico aceptor fuerte de splicing del casete *lacZ*, mediante una segunda mutagénesis dirigida con un tercer par de cebadores, donde uno de los cebadores comprende SEQ ID No: 87 (y preferentemente consiste en SEQ ID No: 24) y el otro cebador comprende SEQ ID No: 88 (y preferentemente consiste en SEQ ID No: 25);

**A.5.** fortalecer el sitio aceptor de splicing canónico del segundo exón constitutivo, comprendido entre las posiciones 2835 y 2875 de SEQ ID No: 1, mediante una tercera mutagénesis dirigida a las posiciones 2846, 2849 y 2856 con un cuarto par de cebadores, donde uno de los cebadores comprende SEQ ID No: 26, y el otro cebador comprende SEQ ID No: 27;

**A.6.** inhabilitar al menos una diana de restricción comprendida entre las posiciones 340 y 2623 de SEQ ID No: 1 [preferentemente entre las posiciones (340)..(345), (679)..(684), (685)..(690) y/o (2618)..(2623) de SEQ ID No: 1] mediante al menos una cuarta mutagénesis dirigida a modificar un nucleótido comprendido en la secuencia de dicha diana, con al menos un quinto par de cebadores específicos que comprendan en su secuencia la mutación o modificación de dicho nucleótido.

Según el procedimiento anterior, dicho quinto par de cebadores con la mutación deseada en su secuencia, comprende:

- un cebador que consiste en una secuencia de un fragmento de 20 a 50 nucleótidos de SEQ ID No: 1 (más preferentemente entre 35 y 42 nucleótidos), donde dicho fragmento comprende la secuencia nucleotídica entre las posiciones (340)..(345), (679)..(690) ó (2618)..(2623) de SEQ ID No: 1 y donde al menos un nucleótido entre dichas posiciones se encuentra modificado;

- y otro cebador que consiste en la secuencia complementaria del anterior.

Esto quiere decir que, para eliminar las dos dianas *HindIII* se requiere una doble mutagénesis dirigida, una de ellas con un par de cebadores con la mutación de la diana *HindIII* en posición (340)..(345) de SEQ ID No: 1, como pueden ser los cebadores SEQ ID No: 28 y SEQ ID No: 29, y otra con otro par de cebadores con la mutación de la diana *HindIII* en posición (2618)..(2623) de SEQ ID No: 1, como son por ejemplo los cebadores SEQ ID No: 30 y SEQ ID No: 31. Por otra parte, las dianas *XbaI* entre las posiciones (679)..(684) de SEQ ID No:

1 y *Sall* entre las posiciones (685)..(690) de SEQ ID No: 1, aunque se pueden inhabilitar una u otra de manera independiente, la utilización del par de cebadores SEQ ID No: 32 y SEQ ID No: 33 conduce a su eliminación simultánea, ya que en sus respectivas secuencias comprenden una mutación en un nucleótido de dicha diana *XbaI* y una mutación de dicha diana *Sall*.

5 En cuanto a los cebadores para amplificar el casete *lacZ*, además de incluir en su secuencia las dianas *MunI* o *NdeI*, se entiende que comprenden también al menos los primeros 20 nucleótidos de los extremos de la secuencia del casete *lacZ* que se amplifica. Es decir, uno de los cebadores contiene unido al extremo 3' de la secuencia de la diana *MunI* una secuencia de al menos 20 nucleótidos (preferentemente entre 21 y 23 nucleótidos) del extremo 5' de una de las hebras de ADN del casete *lacZ* que se desea amplificar. Así por ejemplo, el cebador SEQ ID No: 22 comprende los primeros 23 nucleótidos del casete *lacZ* de pBluescript II KS (-) de secuencia SEQ ID No: 2 unidos al extremo 5' de SEQ ID No: 85, donde esta última secuencia comprende el sitio de restricción *MunI* en su extremo 3'. Por otra parte, el otro cebador contiene unido al extremo 3' de la secuencia de la diana *NdeI* una secuencia de al menos 20 nucleótidos del extremo 5' (preferentemente entre 21 y 23 nucleótidos) de la hebra complementaria de dicho casete *lacZ*. En este caso, un ejemplo es el cebador SEQ ID No: 23, el cual comprende los primeros 21 nucleótidos del extremo 5' de la secuencia complementaria a SEQ ID No: 2 unidos al extremo 5' de SEQ ID No: 86, donde esta última secuencia comprende el sitio de restricción *NdeI* en su extremo 3'.

A lo largo de la presente descripción, el término "cebador" puede encontrarse igualmente referido como "primer" y hace referencia a la secuencia de nucleótidos habitualmente empleadas en el estado de la técnica y que sirven como punto de partida para la replicación del ADN.

En una realización preferida del procedimiento de obtención de un vector génico de la invención, la delección de al menos 1,2 kilobases del intrón comprende la eliminación de los nucleótidos comprendidos entre las posiciones 1299 y 2498 de SEQ ID No: 1 y se lleva a cabo mediante el primer par de cebadores que comprende un cebador que consiste en SEQ ID No: 19 y un cebador que consiste en SEQ ID No: 20.

25 En otra realización preferida de dicho procedimiento, o de la realización anterior, el casete *lacZ* amplificado en la etapa **A.2** se obtiene por amplificación del plásmido pBluescript II KS (-), de secuencia SEQ ID No: 21, con el cebador SEQ ID No: 22 que comprende en su secuencia una diana *MunI* y con el cebador SEQ ID No: 23 que comprende en su secuencia una diana *NdeI*.

30 En otra realización preferida de dicho procedimiento, o de cualquiera de sus realizaciones anteriores, el quinto par de cebadores para inhabilitar la diana de restricción se selecciona entre al menos uno de los siguientes:

**A.6.1.** un cebador que comprende SEQ ID No: 28 y un cebador que comprende SEQ ID No: 29, para eliminar mediante mutagénesis dirigida la diana *HindIII* comprendida entre las posiciones 340 y 345 de SEQ ID No 1, y además un cebador que comprende SEQ ID No: 30 y un cebador que comprende SEQ ID No: 31, para eliminar mediante otra mutagénesis dirigida la diana *HindIII* comprendida entre las posiciones 2618 y 2623 de SEQ ID No 1;

**A.6.2.** un cebador que comprende SEQ ID No: 32 y un cebador que comprende SEQ ID No: 33, para eliminar la diana *XbaI* comprendida entre las posiciones 679 y 684 de SEQ ID No: 1 y la diana *Sall* comprendida entre las posiciones 685 y 690 de SEQ ID No: 1.

40 Un quinto aspecto de la invención se refiere al uso de un vector génico de la invención, o de un minigen de la invención o de una célula de la invención en ensayos funcionales de splicing.

Un sexto aspecto de la invención se refiere al uso de un vector génico de la invención, o de un minigen de la invención o de una célula de la invención, para detectar una mutación en al menos un exón y/o intrón de un gen que produce un splicing defectuoso.

45 Un séptimo aspecto de la invención se refiere a un método para ensayo funcional de splicing caracterizado porque, a partir de un vector génico de la invención, comprende los siguientes pasos:

**B.1.** clonar al menos una secuencia de nucleótidos que comprende al menos un exón de un gen y sus secuencias intrónicas flanqueantes, con la orientación adecuada del sitio aceptor y donador de splicing, en una o dos dianas de restricción del sitio de clonación múltiple de un vector de la invención, o bien mediante inserción dirigida de un megaprimero que contiene el exón en dicho MCS, para obtener un minigen wild-type;

**B.2.** transformar el minigen wild-type anterior en una cepa bacteriana;

**B.3.** cultivar la cepa bacteriana transformada en presencia de ampicilina, X-Gal e IPTG y seleccionar colonias blancas;

**B.4.** aislar el minigen wild-type de una colonia blanca seleccionada del cultivo anterior y generar un minigen mutante que comprenda una mutación en el exón o secuencias intrónicas del gen, donde dicho minigen mutante se obtiene mediante mutagénesis dirigida sobre el minigen wild-type aislado por PCR y polimerasa de alta fidelidad [p. ej. Pfu Turbo (Agilent) o Phusion entre otras] con cebadores específicos que comprendan en su secuencia dicha mutación de acuerdo al protocolo descrito en <http://www.methodbook.net/pcr/pcrmut.html>;

**B.5.** transfectar el minigen mutante a una célula eucariota (preferentemente una célula HeLa);

**B.6.** extraer el ARN producido en un cultivo de la célula eucariota transfectada,

**B.7.** sintetizar cDNA a partir del ARN extraído mediante RT-PCR con cebadores específicos de los exones constitutivos del vector;

**B.8.** secuenciar y analizar el cDNA sintetizado en el paso **B.7.**

### **Breve descripción del contenido de las figuras**

**Figura 1.** Representación del vector pSAD y procedimiento de clonaje en este vector. El inserto con los exones se genera mediante PCR con una polimerasa de alta fidelidad y unos primers en cuyos extremos tienen dianas para enzimas de restricción seleccionadas para que los sitios aceptor y donador del exón en estudio estén en la orientación apropiada con los exones constitutivos del vector. Se transforman células DH5 $\alpha$  de *E. coli* seleccionando con Ampicilina-X-Gal-IPTG las colonias de color blanco ya que se ha interrumpido el gen LacZ. En pSAD y en la construcción se señalan las posibles reacciones de splicing, que se producirán una vez hayan sido introducidos en células eucariotas.

**Figura 2.** Esquema básico de construcción de un minigen en el nuevo vector pSAD y ensayos funcionales de splicing. Aplicaciones en el Consejo Genético de enfermedades hereditarias.

**Figura 3. Ensayos funcionales de splicing del vector pSAD v5.0.** Se transfectaron células HeLa con los plásmidos pSAD sin inserto y los minigenes del gen *BRCA2* MGBR2\_EX19-24 (exones 19 a 24), MGBR2\_EX19-25 (exones 19 a 25), MGBR2\_EX19-26 (exones 19 a 26), MGBR2\_EX19-27 (exones 19 a 27), y MGBR2\_EX17-18 (exones 17 y 18), MGBR2\_EX16-18 (exones 16 a 18) y MGBR2\_EX16-20 (exones 16 a 20). Tras RT-PCR con los primers específicos (SEQ ID No: 75 y SEQ ID No: 76) de los exones constitutivos del vector los productos fueron cargados en un gel de agarosa al 1,2%. Se puede observar que los vectores pSAD sin insertos generan un ARNm de 184 pb, mientras que los minigenes de *BRCA2* construidos en pSAD generan transcritos de los tamaños esperados (los tamaños están indicados en nucleótidos debajo de cada banda amplificada). Se puede observar una escalera creciente en tamaño del producto de la RT-PCR según se van incorporando nuevos exones a los transcritos de cada minigen (de MGBR2\_EX19-24 a MGBR2\_EX19-27 -1109 a 2174 nucleótidos-, y de MGBR2\_EX17-18 a MGBR2\_EX16-20 -710 a 1199 nucleótidos-).

### **EJEMPLOS**

**EJEMPLO 1. Construcción de los vectores génicos para ensayos funcionales de splicing pSAD v5.0 (SEQ ID No: 3) y pSAD v6.0 (SEQ ID No: 4).**

El punto de partida para la construcción de los vectores SEQ ID No: 3 y SEQ ID No: 4 es el vector pSPL3b de secuencia SEQ ID No: 1 (Burn et al.,1995). Las modificaciones que se han realizado se pueden resumir en los siguientes puntos:

**I.1) Reducción de tamaño del vector.** El plásmido pSPL3b (SEQ ID No: 1) tiene un intrón de 2159 pares de bases (pb). Para reducir su tamaño se provocó una delección intrónica de 1,2 Kilobases (Kb) mediante mutagénesis dirigida (primers SEQ ID No: 19 y SEQ ID No: 20 cuyas secuencias son, respectivamente, 5' GGATCAAAGCCTAAAGCCATGTGTAGGAAACTACTTTGCACCACTGCTG 3' y 5' CAGCAGTGGTGCAAAGTAGTTTTCTACACATGGCTTTAGGCTTTGATCC 3'). El nuevo vector, pSPL3b $\Delta$ 1200, fue secuenciado para confirmar la delección y transfectado en células HeLa. Mediante RT-PCR con primers (cebadores) específicos de los exones del vector se comprobó que la reacción de *splicing* se producía un producto del tamaño esperado (184 nucleótidos), en el cual se eliminaba el intrón y se unían

secuencialmente los dos exones del vector. Al vector lo denominamos pSAD v1.0 (*Splicing And Disease*) y consiste en SEQ ID No: 35.

**I.2) Introducción del gen *LacZ* (pSAD v2.0).** A continuación se amplificó el gen *LacZ* con su sitio de clonación múltiple (MCS) con una polimerasa de alta fidelidad a partir del plásmido pBluescriptKS KS II (-) (Stratagene) SEQ ID No: 21. Se utilizaron un primer *forward* SEQ ID No: 22 con un sitio de restricción *MunI* (C<sup>^</sup>AATTG, compatible con *EcoRI*: G<sup>^</sup>AATTC) en su 5' y un primer *reverse* SEQ ID No: 23 con un sitio *NdeI* (Forward: 5' CACACACAATTGTAACGCTTACAATTTCCATTCGC 3'; Reverse: 5' CACACACATATGGCGGGCAGTGAGCG CAACGCA 3'. El MCS de pSPL3b del 1200 (pSAD 1.0 o SEQ ID No: 35) tiene unos extremos *EcoRI-NdeI*, de modo que se eliminó mediante corte con estas enzimas y se introdujo mediante ligación con el casete *LacZ* de extremos *MunI-NdeI* anteriormente amplificado. De este modo, la nueva construcción tiene una fusión *EcoRI-MunI* (G<sup>^</sup>AATTG) que no regenera ninguna de las 2 enzimas de restricción, permitiendo el uso de la diana *EcoRI* del MCS de *LacZ* para clonaje. Las colonias transformantes se seleccionaron en Ampicilina, X-Gal e IPTG, y se seleccionaron las colonias azules. Se comprobó mediante secuenciación la fidelidad de la secuencia de *LacZ*. Con la introducción del casete *LacZ* se incrementa la capacidad selectiva del vector en el clonado de fragmentos, facilitando el rastreo de colonias, ya que aquéllas que sean de color azul nos indicarán que el vector no tiene ningún inserto mientras que las de color blanco indicarán que hay un inserto en el MCS de *LacZ* que interrumpe dicho gen. De este modo se evita un rastreo de colonias arduo y laborioso como ocurre con pSPL3 y otros vectores de *splicing*. Mediante la introducción del gen *LacZ* se obtuvo el plásmido SEQ ID No: 36, también referido en la presente memoria como pSAD v2.0.

**I.3) Mutagénesis dirigida de un sitio críptico aceptor de *LacZ* (pSAD v3.0).** Con el software NNSPLICE ([http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)) se comprobó que el gen *LacZ* presentaba un sitio aceptor críptico fuerte (NNSPLICE= 0,98) que podía interferir en las reacciones de *splicing*. Afectaba al aminoácido en posición 13 de *LacZ* que codifica para Treonina (TTTGTTCCCTTT AGT GAGGGTTAATT, subrayado el sitio críptico, y en el codón 13 en negrita –la hebra codificante de *LacZ* es la complementaria-), por lo que diseñamos 2 primers de mutagénesis, un primer *forward* SEQ ID No: 24 y un primer *reverse* SEQ ID No: 25, de modo que se mantuviera la Thr13 (Forward: 5' CAGCTTTTGTCCCTTTTGTGAGGGTTAATTGCGCGCT 3', Reverse: 5' AGCGCGCAATTAACCCTCACAAAAGGGAACAAAAGCTG 3', subrayado el nucleótido que muta), se pasa de un codón ACT a un codón ACA, ambos codificantes para Thr y así se elimina el sitio aceptor críptico. Se seleccionaron las colonias azules y se secuenciaron los plásmidos para comprobar que se había introducido la mutación. Asimismo, como en el punto I.1, comprobamos en ensayos funcionales de *splicing* en células HeLa que no existía ninguna anomalía en la reacción de *splicing*. De esto modo se obtuvo el plásmido pSAD v3.0 (SEQ ID No: 37).

**I.4) Mutagénesis dirigida de dos dianas *HindIII* (pSAD v4.0).** El nuevo vector pSAD v3.0 presentaba un total de 3 dianas *HindIII*: 2 heredadas del pSPL3b (posiciones 341 y 2619 de la secuencia original SEQ ID No: 1 de pSPL3b), y una presente en el sitio de clonación múltiple. Las 2 *HindIII* de pSPL3b inhabilitaban para su uso la diana *HindIII* del MCS, por lo que se decidió eliminarlas mediante doble mutagénesis dirigida con los cebadores para la diana *HindIII* en posición 341, *forward* (SEQ ID No: 28, 5' CTAGGCTTTTGCAAAAACTGGACTGTGTTTACT 3') y *reverse* (SEQ ID No: 29, 5' AGTAAACACAGTCCAAGTTTTTTGCAAAAGCCTAG 3'), y para la diana *HindIII* en posición 2619, *forward* (SEQ ID No: 30, 5' GAAATTAACAATTACACAACTTAATACACTCCTTAATTGAA 3') y *reverse* (SEQ ID No: 31, 5' TTCAATTAAGGAGTGATTAAGTTTGTGTAATTGTTAATTTTC 3'). Nuevamente se seleccionaron colonias azules resistentes a ampicilina y se comprobó la presencia de las mutaciones mediante secuenciación del nuevo plásmido pSAD v4.0 (SEQ ID No: 38). Asimismo se comprobó que la reacción de *splicing* se producía sin ningún tipo de anomalía en células eucariotas.

**I.5) Fortalecimiento del sitio aceptor del exón constitutivo nº 2 de pSAD (pSAD v5.0).** Mediante análisis con NNSPLICE se comprobó que el sitio aceptor del exón 2 del vector pSAD v.4.0 (heredado de pSPL3b) era débil (0,64, TATTCACCATTATCGTTTCAGACCTGGAGATCTCCCGAG). Se realizó mutagénesis dirigida, introduciendo 3 mutaciones en 3 posiciones críticas (+1A>G del exón, y -7G>T y -10A>T del intrón) en una sola pareja de primers de mutagénesis: SEQ ID No: 26 (5' GGGATATTCACCATTITCTTTTCAGGCTGGAGATCTCCCGA 3') y SEQ ID No: 27 (5' TCGGGAGATCTCCAGGCTGAAAAGAAATGGTGAATATCCC 3'), donde se han subrayado las posiciones mutadas. De este modo el nuevo sitio de *splicing* pasaba a tener un valor de 0,99 según NNSPLICE (máximo 1,0). También comprobamos su eficiencia en reacciones de *splicing* mediante transfección en células HeLa. La estructura final, el esquema de clonado y la secuencia completa del plásmido pSAD se puede observar en las Figuras 1 y 2. Se comprobó el funcionamiento de esta versión del vector mediante ensayos funcionales de *splicing*.

**I.6) Eliminación de las dianas *XbaI* y *SaI* en posición heredadas de pSPL3b (pSAD v6.0).** El vector pSAD 5.0 presentaba una diana *XbaI* y *SaI* en las posiciones 680 y 686 de la SEQ ID No: 3 heredadas de pSPL3b que inhabilitaban las dianas *XbaI* en la posición 1248 y *SaI* en la posición 1305 del MCS. Se eliminaron ambas dianas de pSPL3b mediante doble mutagénesis dirigida con una única pareja de cebadores, *forward*, SEQ ID No: 32 (5' TGACAAGCTGCACGCCCTAGAATCGACCCAGCAGTAA 3'), y *reverse*, SEQ ID No: 33 (5'



TTACTGCTGGGTCGATTCTAGGGCGTGCAGCTTGCA 3'). Se seleccionaron las colonias azules, y se verificó en células HeLa que la reacción de splicing tenía lugar sin ningún tipo de anomalía.

**I.7) Comprobación de su funcionamiento con un inserto de varios exones (ver siguientes ejemplos – Ejemplos 2 a 7–).**

5 En conclusión, se puede decir que los nuevos plásmidos pSAD SEQ ID No: 3 y SEQ ID No. 4 aportan las siguientes ventajas:

- Facilidad de manipulación al tratarse de un vector de menor tamaño.
- Mayor capacidad de selección de colonias recombinantes, ya que aparte de la resistencia a Ampicilina, común a todos estos vectores, aporta la selección con β-Galactosidasa (LacZ), que en presencia de X-Gal e IPTG, permite distinguir colonias azules (con el vector íntegro) y blancas (posibles colonias con inserto).
- Mayor versatilidad, ya que *LacZ* aporta su MCS con hasta 27 sitios de restricción diferentes, lo cual permite elegir la enzima de restricción apropiada para cada experimento de clonado. Además se han eliminado 2 dianas *HindIII*, una *XbaI* y otra *Sall* de pSPL3b (SEQ ID No: 1), lo cual habilita las dianas correspondientes del MCS de *LacZ* SEQ ID No: 2.
- Eliminación de un sitio críptico de *splicing* que podría interferir en la reacción de *splicing*.
- Potenciación del sitio aceptor del exón constitutivo 2 de los vectores SEQ ID No: 3 y SEQ ID No: 4 (común a pSPL3b) para facilitar su reconocimiento por la maquinaria de *splicing*. De este modo se asegura la presencia del exón 2 de pSAD en los ensayos funcionales de *splicing*.

20 **EJEMPLO 2. Construcción de los minigenes SEQ ID No: 5 (MGBR2\_EX19-24), SEQ ID No: 6 (MGBR2\_EX19-25), SEQ ID No: 7 (MGBR2\_EX19-26) y SEQ ID No: 8 (MGBR2\_EX19-27).**

La construcción del minigen SEQ ID No: 8 es compleja y muy laboriosa. Para la construcción de este minigen se partió de otro que previamente se había clonado en el vector se pSPL3b SEQ ID No: 1 y de éste se generó un inserto completo para clonar en el vector pSAD. Además, se utilizaron dos métodos de clonaje: el clásico con enzimas de restricción y otro que hemos denominado en la presente memoria como "cloning por mutagénesis de inserción", mediante la síntesis de un "megaprimer" (inserto) por PCR con cebadores forward y reverse con zonas de hibridación en las secuencias flanqueantes a la zona de inserción, que funciona eficazmente para clonar fragmentos de en torno a 1 kb. A continuación se describe el esquema de construcción del minigen SEQ ID No: 8, mediante un procedimiento por el que se obtuvieron sucesivamente los minigenes SEQ ID No: 5, SEQ ID No: 6 y SEQ ID No: 7.

**2.1. Clonaje de los exones 19 a 24 del gen *BRCA2* en el vector pSPL3b (SEQ ID No: 1).**

Para el clonaje de los exones 19-24 en pSPL3b (SEQ ID No: 1) se empleó un procedimiento que comprendió las siguientes etapas:

35 **II.1)** Amplificación del inserto de los exones 21-22-23-24 y secuencias intrónicas del gen *BRCA2* mediante una polimerasa de alta fidelidad y los cebadores Forward: SEQ ID No: 39 (5' CACACACTCGAGCCTTCTTTGGGTGTTTTATGCT 3'); y Reverse: SEQ ID No: 40 (5' CACACAGGATCCAAATCAGAGTTCAAAGAGGCT 3'). Tamaño del fragmento: 3.736 pb.

**II.2)** Digestión del plásmido pSPL3b y el inserto con los exones 21 a 24 con las enzimas de restricción *XhoI* y *BamHI*. Purificación de ambos fragmentos de geles de bajo punto de fusión.

40 **II.3)** Ligación de plásmido e inserto de los exones 4 a 7 con la ligasa FastLink (Epicentre) en un ratio molar inserto:vector de 3:1 a 5:1, transformación de la cepa DH5α y selección en presencia de Ampicilina.

**II.4)** Rastreo mediante PCR de colonias (con los primers del inserto o una combinación mixta de primer específico de pSPL3b y primer específico del inserto). Selección de colonias que amplifican el fragmento del tamaño esperado.

45 **II.5)** Secuenciación para comprobar la fidelidad de las secuencias clonadas. Esta construcción constituye el minigen pSPL3b-MGBR2\_EX21-24, cuya secuencia consiste en SEQ ID No: 82.

**II.6)** Generación de una delección de 2000 pb del intrón 21 de *BRCA2* sobre la construcción pSPL3b\_EX21-24 con los cebadores SEQ ID No: 41 (5' TTAAATGCAGGCAAACTTGTTTTTAGCCATCTGTAATGTAGTTGGTGA 3') y SEQ ID No: 42 (5'

TCACCAACTACATTACAGATGGCTAAAAACAAGTTTTGCCTGCATTTTAA 3'). Esta delección del intrón para mejorar la manipulación del minigen reduciendo su tamaño. La delección se genera mediante una PCR de mutagénesis dirigida con Pfu Turbo polimerasa, tratamiento con 10 unidades de *DpnI* (especifica de secuencias metiladas) durante una hora para eliminar el minigen original con el intrón 21 completo, transformación de células DH5 $\alpha$  y selección en presencia de Ampicilina. Se comprueba la delección mediante PCR de colonias y secuenciación del plásmido obtenido, cuya secuencia consiste en SEQ ID No: 83 y se denomina pSPL3b-MGBR2\_EX21-24del2000.

**II.7)** Amplificación del inserto de los exones 19-20 de *BRCA2* y secuencias intrónicas del gen *BRCA2* mediante una polimerasa de alta fidelidad y los cebadores Forward: SEQ ID No: 43 (5' TCTGGAGCTCGAGCACACATCCGGAATAGCATTAAGAAGCTTGTAGCA 3'); y Reverse: SEQ ID No: 44 (5' CCAAGCATAAAACACCCAAAGAAGGATTACAAATGGCTTAGACCTGA 3'). Tamaño del fragmento: 1214 pb.

**II.8)** El producto PCR de la etapa anterior se purifica mediante extracción de geles de agarosa de bajo punto de fusión y columnas Wizard SV Gel and PCR clean-up system (Promega).

**II.9)** El producto purificado se utiliza como "megaprimer" con una polimerasa de alta fidelidad y se clona por un método que hemos denominado "Inserción por mutagénesis dirigida" (protocolo adaptado de GeneMorph II EZClone Domain Mutagenesis Kit de Agilent: [www.genomics.agilent.com/files/Manual/200552\\_C01.pdf](http://www.genomics.agilent.com/files/Manual/200552_C01.pdf)), el cual se puede usar de forma alternativa a las enzimas de restricción en fragmentos de aproximadamente 1 Kb.

**II.10)** Se digiere la reacción con 10 unidades de *DpnI* (especifica de secuencias metiladas) durante una hora para eliminar el minigen original con los exones 21-24, y se mantiene intacta la molécula recién sintetizada con los exones 19 al 24. Se transforman células DH5 $\alpha$  y se lleva a cabo su selección en presencia de Ampicilina. Se comprueba la presencia de los exones 19-20 mediante PCR de colonias y secuenciación. El minigen final 19-24 contiene un inserto de 2865 pb con los exones 19, 20, 21, 22, 23 y 24, y se denomina pSPL3b-MGBR2\_EX19-24 cuya secuencia consiste en SEQ ID No: 84.

## **2.2. Clonaje de los exones 19 a 24 del gen *BRCA2* en el vector pSAD v5.0 (SEQ ID No: 3) y posterior inserción de los exones 25, 26 y 27 del gen *BRCA2*.**

Una vez descrito como se hizo el clonaje de los exones 19 a 24 del gen *BRCA2* en pSPL3b, se pasó a clonar dichos exones a pSAD v5.0 (SEQ ID No: 3), siguiendo el siguiente procedimiento:

**II.11)** Se amplifica el inserto de pSPL3b-MGBR2\_EX19-24 (SEQ ID No: 84) con polimerasa de alta fidelidad y los primers SEQ ID No: 45 (5' CACACACTCGAGCACACATCCGGAATAGCATTAAGAAGCTTGTAGCA 3') y SEQ ID No: 46 (5' CACACAGGATCCCACACAGGTACCAAATCAGAGGTTCAAAGAGGCT 3'). Tamaño del producto PCR: 2901 pb.

**II.12)** Digestión del plásmido pSAD 5.0 y el inserto de los exones 19 a 24 amplificado en II.11 con las enzimas de restricción *XhoI* y *KpnI*. Purificación de ambos fragmentos de geles de bajo punto de fusión.

**II.13)** Ligación de plásmido e inserto de los exones 19-24 con la ligasa FastLink (Epicentre) en un ratio molar inserto:vector de 3:1 a 5:1, transformación de la cepa DH5 $\alpha$  y selección en presencia de Ampicilina y X-Gal. Selección de colonias blancas.

**II.14)** Rastreo mediante PCR de colonias (con los primers del inserto o una combinación mixta de un primer del plásmido -T7- y un primer específico del inserto). Selección de colonias que amplifican el fragmento del tamaño esperado.

**II.15)** Secuenciación para comprobar la fidelidad de las secuencias clonadas. Esta construcción constituye el minigen MGBR2\_EX19-24 cuya secuencia consiste en SEQ ID No: 5.

**II.16)** Se amplifica el inserto correspondiente al exón 25 del gen *BRCA2* a partir de ADN genómico humano con polimerasa de alta fidelidad y los primers SEQ ID No: 47 (5' GTAAGCCTCTTTGAACCTCTGATTTAATCTGTACTCCTGTTAGCAAT 3') y SEQ ID No: 48 (5' CAAAAGGGAACAAAAGCTGGGTACCTCAGTGTCTCTTATCTGGGATT 3'). Tamaño del fragmento: 997 pb.

**II.17)** El producto PCR se purifica mediante extracción de geles de agarosa de bajo punto de fusión y columnas Wizard SV Gel and PCR clean-up system (Promega).

**II.18)** El fragmento purificado anterior se utiliza como "megaprimer" con una polimerasa de alta fidelidad y se clona por el método de "Inserción por mutagénesis dirigida" en MGBR2\_EX19-24 (SEQ ID No: 5).

**II.19)** Se digiere la reacción PCR con 10 unidades de *DpnI* durante una hora para eliminar el minigen original con los exones 19-24, y se mantiene intacta la molécula recién sintetizada con los exones 19 al 25. Se transforman

células DH5 $\alpha$  y selección en presencia de Ampicilina. Se comprueba la presencia del exón 25 mediante PCR de colonias y secuenciación. El minigen final 19-25 contiene un inserto de 3812 pb con los exones 19, 20, 21, 22, 23, 24 y 25, y se denomina MGBR2\_EX19-25 cuya secuencia consiste en SEQ ID No: 6.

5 **II.20)** Se amplifica el inserto correspondiente al exón 26 del gen *BRCA2* con polimerasa de alta fidelidad y los primers SEQ ID No: 49 (5' CACACAGGTACCAGTAAATAGAGCTAGGACTTGA 3') y SEQ ID No: 50 (5' CACACAGGTACCTTGATTGTCATCTACTGTGATT 3'). Tamaño del producto PCR: 850 pb.

**II.21)** Digestión de la construcción MGBR2\_EX19-25 y el inserto del exón 26 con las enzimas de restricción *KpnI*. Purificación de ambos fragmentos de geles de bajo punto de fusión y columnas Wizard de Promega.

10 **II.22)** Ligación de MGBR2\_EX19-25 y exón 26 con la ligasa FastLink (Epicentre) en un ratio molar inserto:vector de 3:1 a 5:1. Transformación de la cepa DH5 $\alpha$  y selección en presencia de Ampicilina.

**II.23)** Rastreo mediante PCR de colonias (con los primers del inserto o una combinación mixta de un primer del plásmido -por ejemplo T7- y un primer específico del inserto). Selección de colonias que portan el inserto del tamaño esperado y en la orientación apropiada.

15 **II.24)** Secuenciación para comprobar la fidelidad de las secuencias clonadas. Esta construcción constituye el minigen MGBR2\_EX19-26 cuya secuencia consiste en SEQ ID No: 7.

20 **II.25)** Amplificación del inserto del exón 27 del gen *BRCA2* con polimerasa de alta fidelidad y los primers SEQ ID No: 51 (5' CCAGCTTTTGTCCCTTTTGTGAGGGTCTTCCTTCCTTTTCATGTCATTT 3') y SEQ ID No: 52 (5' ATCTGTCTCTGTCTCTCTCCACCTAATTTCTTTTCTCATTGTGCAAC 3'). Tamaño del fragmento: 994 pb. Mediante este procedimiento con estos cebadores se causaría la sustitución del exón constitutivo número 2 y parte del intrón del vector (752 pb) por el exón 27 (último exón) y parte del intrón 26 de *BRCA2* (944 pb).

**II.26)** El producto PCR se purifica mediante extracción de geles de agarosa de bajo punto de fusión y columnas Wizard SV Gel and PCR clean-up system (Promega).

**II.27)** El fragmento purificado se utiliza como "megaprimer" con una polimerasa de alta fidelidad y se clona por el método de "Inserción por mutagénesis dirigida" en MGBR2\_EX19-26 (SEQ ID No: 7).

25 **II.28)** Se digiere la reacción PCR con 10 unidades de *DpnI* durante una hora para eliminar el minigen original con los exones 19-26, y se mantiene intacta la molécula recién sintetizada con los exones 19 al 27. Se transforman células DH5 $\alpha$  y selección en presencia de Ampicilina. Se comprueba la presencia del exón 27 mediante PCR de colonias y secuenciación. El minigen final 19-27 contiene un inserto de 5.620 pb con los exones 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 y 27 y se denomina MGBR2\_EX19-27 cuya secuencia consiste en SEQ ID No: 8.

30 **EJEMPLO 3. Construcción del minigen SEQ ID No: 9 (MGBR2\_EX25-26).**

A continuación se describe el esquema de construcción del minigen SEQ ID No: 9, mediante un procedimiento que comprendió las siguientes etapas:

35 **III.1)** Amplificación del inserto de los exones 25 y 26 del gen *BRCA2* con la polimerasa Phusion (Finnzymes) de alta fidelidad y los primers Forward: SEQ ID No: 53 (5' CACACAGGATCCTATACCTGCTTCCACATGACCT 3'); y Reverse: SEQ ID No: 54 (5' CACACACTCGAGGCCACATAACAACCACATTTTC 3'). Tamaño del fragmento: 2751 pb.

**III.2)** Digestión del plásmido pSAD 5.0 (SEQ ID No: 3) y el inserto de los exones 25 y 26 con las enzimas de restricción *BamHI* y *XhoI*. Purificación de ambos fragmentos de geles de bajo punto de fusión y columnas Wizard SV Gel and PCR clean-up system (Promega).

40 **III.3)** Ligación de plásmido e inserto de los exones 25-26 con la ligasa FastLink (Epicentre) en un ratio molar inserto:vector de 3:1 a 5:1 y transformación de la cepa DH5 $\alpha$  y selección en presencia de Ampicilina y X-Gal. Selección de colonias blancas.

45 **III.4)** Rastreo mediante PCR de colonias (con los primers del inserto o una combinación mixta de un primer del plásmido -T7- y un primer específico del inserto). Selección de colonias que portan el inserto del tamaño esperado.

**III.5)** Secuenciación para comprobar la fidelidad de las secuencias clonadas. Esta construcción constituye el minigen MGBR2\_EX25-26, cuya secuencia consiste en SEQ ID No: 9.

**EJEMPLO 4. Construcción del minigen SEQ ID No: 10 (MGBR2\_EX10).**

A continuación se describe el esquema de construcción del minigen SEQ ID No: 10, mediante un procedimiento que comprendió las siguientes etapas:

5 **IV.1)** Amplificación del inserto del exón 10 del gen *BRCA2* con polimerasa de alta fidelidad y los primers Forward: SEQ ID No: 55 (5' CACACACTGCAGACACAAAAACAAAGCCTATTGA 3'); y Reverse: SEQ ID No: 56 (5' CACACACTCGAGAAGAGTGATGGATATACACAAA 3'). Tamaño del fragmento: 1984 pb.

**IV.2)** Digestión del plásmido pSAD 5.0 (SEQ ID No: 3) y el inserto del exón 10 con las enzimas de restricción *PstI* y *XhoI*. Purificación de ambos fragmentos de geles de bajo punto de fusión y columnas Wizard SV Gel and PCR clean-up system (Promega).

10 **IV.3)** Ligación de plásmido e inserto del exón 10 con la ligasa FastLink (Epicentre) en un ratio molar inserto:vector de 3:1 a 5:1 y transformación de la cepa DH5 $\alpha$  y selección en presencia de Ampicilina y X-Gal. Selección de colonias blancas.

15 **IV.4)** Rastreo mediante PCR de colonias (con los primers del inserto o una combinación mixta de un primer del plásmido -T7- y un primer específico del inserto). Selección de colonias que portan el inserto del tamaño esperado.

**IV.5)** Secuenciación para comprobar la fidelidad de las secuencias clonadas. Esta construcción constituye el minigen MGBR2\_EX10, cuya secuencia consiste en SEQ ID No: 10.

**EJEMPLO 5. Construcción de los minigenes SEQ ID No: 11 (MGBR2\_EX4-7), SEQ ID No: 12 (MGBR2\_EX3-7), SEQ ID No: 13 (MGBR2\_EX3-8), SEQ ID No: 14 (MGBR2\_EX3-9) y SEQ ID No: 15 (MGBR2\_EX2-9).**

20 A continuación se describe el esquema de construcción del minigen SEQ ID No: 14, mediante un procedimiento por el que se obtuvieron sucesivamente los minigenes SEQ ID No: 11, SEQ ID No: 12 y SEQ ID No: 13, y que comprendió las siguientes etapas:

25 **V.1)** Amplificación del inserto de los exones 4, 5, 6 y 7 del gen *BRCA2* mediante Polimerasa de alta fidelidad y los primers Forward: SEQ ID No: 57 (5' CACACAGAATTCTCTGGTACATTGGTAGGTTTTCA 3'); y Reverse: SEQ ID No: 58 (5' CACACACTCGAGCCAAATACTGCCTCTTAAACGC 3'). Tamaño del fragmento: 2352 pb.

**V.2)** Digestión del plásmido pSAD 5.0 (SEQ ID No: 3) y el inserto de los exones 4 a 7 con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XhoI*. Purificación de ambos fragmentos de geles de bajo punto de fusión.

30 **V.3)** Ligación de plásmido e inserto de los exones 4 a 7 con la ligasa FastLink (Epicentre) en un ratio molar inserto:vector de 3:1 a 5:1 y transformación de la cepa DH5 $\alpha$  y selección en presencia de Ampicilina y X-Gal. Selección de colonias blancas.

**V.4)** Rastreo mediante PCR de colonias (con los primers del inserto o una combinación mixta de un primer del plásmido -T7- y un primer específico del inserto). Selección de colonias que amplifican el fragmento del tamaño esperado.

35 **V.5)** Secuenciación para comprobar la fidelidad de las secuencias clonadas. Esta construcción constituye el minigen MGBR2\_EX4-7, cuya secuencia consiste en SEQ ID No: 11.

**V.6)** Amplificación del inserto del exón 3 del gen *BRCA2* mediante Polimerasa de alta fidelidad y los primers Forward: SEQ ID No: 59 (5' CACACAGAATTCCACACATCCGGACACACATTCTGAAGCCATCTTGTAACCTTTT GTGAA 3'); y Reverse: SEQ ID No: 60 (5' CACACAGAATTCTTGGCATAAGAAAGACGTAATT 3'). Tamaño del fragmento: 808 pb.

40 **V.7)** Digestión de la construcción MGBR2\_EX4-7 (SEQ ID No: 11) y el inserto del exón 3 con la enzima de restricción *EcoRI*. Purificación de ambos fragmentos de geles de bajo punto de fusión.

**V.8)** Ligación de MGBR2\_EX4-7 (SEQ ID No: 11) y el exón 3 con la ligasa FastLink (Epicentre) en un ratio molar inserto:vector de 3:1 a 5:1. Transformación de la cepa DH5 $\alpha$  y selección en presencia de Ampicilina.

45 **V.9)** Rastreo mediante PCR de colonias (con los primers del inserto o una combinación mixta de un primer del plásmido -por ejemplo T7- y un primer específico del inserto). Selección de colonias que portan el inserto del tamaño esperado y en la orientación apropiada.

- V.10)** Secuenciación para comprobar la fidelidad de las secuencias clonadas. Esta construcción constituye el minigen MGBR2\_EX3-7, cuya secuencia consiste en SEQ ID No: 12.
- V.11)** Amplificación del inserto del exón 8 del gen *BRCA2* mediante Polimerasa de alta fidelidad y los primers Forward: SEQ ID No: 61 (5' CACACACTCGAGGTCATAACCTCACAGCATCATCT 3'); y Reverse: SEQ ID No: 62 (5' CACACAGGTACCCACACAAAAGCTTCAACTTTAACAGAGAGACAGCA 3'). Tamaño del amplificado: 572 pb.
- V.12)** Digestión de la construcción MGBR2\_EX3-7 (SEQ ID No: 12) y el inserto del exón 8 con las enzimas de restricción *XhoI* y *KpnI*. Purificación de ambos fragmentos de geles de bajo punto de fusión.
- V.13)** Ligación de MGBR2\_EX3-7 y exón 8 con la ligasa FastLink (Epicentre) en un ratio molar inserto:vector de 3:1 a 5:1. Transformación de la cepa DH5 $\alpha$  y selección en presencia de Ampicilina.
- V.14)** Rastreo mediante PCR de colonias (con los primers del inserto o una combinación mixta de un primer del plásmido -por ejemplo T7- y un primer específico del inserto). Selección de colonias que amplifican el fragmento del tamaño esperado.
- V.15)** Secuenciación para comprobar la fidelidad de las secuencias clonadas. Esta construcción constituye el minigen MGBR2\_EX3-8, cuya secuencia consiste en SEQ ID No: 13.
- V.16)** Amplificación del inserto del exón 9 del gen *BRCA2* mediante Polimerasa de alta fidelidad y los primers Forward: SEQ ID No: 63 (5' CACACAAAGCTTTCCTAGTGCGCAAGATTTTCAT 3'); y Reverse: SEQ ID No: 64 (5' CACACAGGTACCTGGTGCCAATTA AAAAGAGTAG 3'). Tamaño del amplificado: 649 pb.
- V.17)** Digestión de la construcción MGBR2\_EX3-8 (SEQ ID No: 13) y el inserto del exón 8 con las enzimas de restricción *HindIII* y *KpnI*. Purificación de ambos fragmentos de geles de bajo punto de fusión.
- V.18)** Ligación de MGBR2\_EX3-8 (SEQ ID No: 13) y el exón 9 con la ligasa FastLink (Epicentre) en un ratio molar inserto:vector de 3:1 a 5:1. Transformación de la cepa DH5 $\alpha$  y selección en presencia de Ampicilina.
- V.19)** Rastreo mediante PCR de colonias (con los primers del inserto o una combinación mixta de un primer del plásmido -por ejemplo T7- y un primer específico del inserto). Selección de colonias que portan el inserto del tamaño esperado.
- V.20)** Secuenciación para comprobar la fidelidad de las secuencias clonadas. Esta construcción constituye el minigen MGBR2\_EX3-9, cuya secuencia consiste en SEQ ID No: 14.
- V.21)** Amplificación del inserto del exón 2 del gen *BRCA2* con la polimerasa Phusion de alta fidelidad y los primers Forward: SEQ ID No: 65 (5' CACACACGGCCGAAACTAAATCGTATGAAAATCCT 3'); y Reverse: SEQ ID No: 66 (5' CACACATCCGATAAGCTACATAAACA AAAAGCAC 3'). Tamaño del amplificado: 739 pb.
- V.22)** Digestión de la construcción MGBR2\_EX3-9 y el inserto del exón 2 con la enzima de restricción *EagI* y *BspEI*. Purificación de ambos fragmentos de geles de bajo punto de fusión.
- V.23)** Ligación de MGBR2\_EX3-9 y exón 2 con la ligasa FastLink (Epicentre). Transformación de la cepa DH5 $\alpha$  y selección en presencia de Ampicilina.
- V.24)** Rastreo mediante PCR de colonias (con los primers del inserto o una combinación mixta de un primer del plásmido -por ejemplo T7- y un primer específico del inserto). Selección de colonias que portan el inserto del tamaño esperado.
- V.25)** Secuenciación para comprobar la fidelidad de las secuencias clonadas. Esta construcción constituye el minigen MGBR2\_EX2-9, cuya secuencia consiste en SEQ ID No: 15.
- EJEMPLO 6. Construcción de los minigenes SEQ ID No: 16 (MGBR2\_EX17-18), SEQ ID No: 17 (MGBR2\_EX16-18), y SEQ ID No: 18 (MGBR2\_EX16-20).**

A continuación se describe el esquema de construcción del minigen SEQ ID No: 18 con los exones 16 al 20 del gen *BRCA2*, mediante un procedimiento por el que se obtuvieron sucesivamente los minigenes SEQ ID No: 16, y SEQ ID No: 17, y que comprendió las siguientes etapas:

- VI.1)** Amplificación del inserto de los exones 17 y 18 del gen *BRCA2* mediante Polimerasa de alta fidelidad y los primers Forward: SEQ ID No: 67 (5' GCTCTAGAACTAGTGGATCCCCGGTCAGTATGATACTTTGATACATGT

## ES 2 470 440 A1

3'); y Reverse: SEQ ID No: 68 (5' ATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGTGGAAATAGGGATCTGATCAA 3'). Tamaño del fragmento: 1556 pb.

**VI.2)** El producto PCR anteriormente amplificado se purifica mediante extracción de geles de agarosa de bajo punto de fusión y columnas Wizard SV Gel and PCR clean-up system (Promega).

5 **VI.3)** El fragmento purificado se utiliza como “megaprimer” con una polimerasa de alta fidelidad y se clona por el método de “Inserción por mutagénesis dirigida” en pSAD v5.0 (SEQ ID No: 3).

**VI.4)** Se digiere la reacción PCR de la etapa VI.3 con 10 unidades de *DpnI* durante una hora para eliminar el plásmido pSAD utilizado como ADN molde de la reacción de inserción, y se mantiene intacta la molécula recién sintetizada con los exones 17 y 18.

10 **VI.5)** Transformación de la cepa DH5 $\alpha$  y selección en presencia de Ampicilina y X-Gal. Selección de colonias blancas.

**VI.6)** Rastreo mediante PCR de colonias (con los primers del inserto o una combinación mixta de un primer del plásmido -T7- y un primer específico del inserto). Selección de colonias que portan el inserto del tamaño esperado.

15 **VI.7)** Secuenciación para comprobar la fidelidad de las secuencias clonadas. Esta construcción constituye el minigen MGBR2\_EX17-18, cuya secuencia consiste en SEQ ID No: 16.

**VI.8)** Amplificación del inserto del exón 16 del gen *BRCA2* mediante Polimerasa de alta fidelidad y los primers Forward: SEQ ID No: 69 (5' GCTCTAGAACTAGTGGATCCCCCGGCCCTTTTGTTCATCTAAGT 3'); y Reverse: SEQ ID No: 70 (5' GACATGTATCAAAGTATCATACTGAATAAATGCCTAAGAAAAATGT 3'). Tamaño del producto PCR: 805 pb.

20 **VI.9)** El producto PCR se purifica mediante extracción de geles de agarosa de bajo punto de fusión y columnas Wizard SV Gel and PCR clean-up system (Promega).

**VI.10)** El fragmento purificado se utiliza como “megaprimer” con una polimerasa de alta fidelidad y se clona por el método de “Inserción por mutagénesis dirigida” en MGBR2\_EX17-18 (SEQ ID No: 16).

25 **VI.11)** Se digiere la reacción PCR con 10 unidades de *DpnI* durante una hora para eliminar el plásmido MGBR2\_EX17-18 molde original, y se mantiene intacta la molécula recién sintetizada con los exones 16, 17 y 18.

**VI.12)** Transformación de la cepa DH5 $\alpha$  con 5  $\mu$ l de la reacción anterior y selección en presencia de Ampicilina.

**VI.13)** Rastreo mediante PCR de colonias (con los primers del inserto o una combinación mixta de un primer del plásmido -T7- y un primer específico del inserto). Selección de colonias que portan el inserto del tamaño esperado.

30 **VI.14)** Secuenciación para comprobar la fidelidad de las secuencias clonadas. Esta construcción constituye el minigen MGBR2\_EX16-18, cuya secuencia consiste en SEQ ID No: 17.

**VI.15)** Amplificación del inserto de los exones 19 y 20 del gen *BRCA2* mediante PCR con polimerasa de alta fidelidad y los primers Forward: SEQ ID No: 71 (5' CACACACTCGAGATAGCATTAAAGAACTTGTAGCA 3'); y Reverse: SEQ ID No: 72 (5' CACACAGGTACCATTACAAATGGCTTAGACCTGA 3'). Tamaño del fragmento: 1165 pb.

35 **VI.16)** Digestión de la construcción MGBR2\_EX16-18 (SEQ ID No: 18) y el inserto 19-20 con las enzimas de restricción *XhoI* y *KpnI*. Purificación de ambos fragmentos de geles de bajo punto de fusión.

**VI.17)** Ligación de MGBR2\_EX16-18 (SEQ ID No: 18) y los exones 19-20 con la ligasa FastLink (Epicentre) en un ratio molar inserto:vector de 3:1 a 5:1. Transformación de la cepa DH5 $\alpha$  y selección en presencia de Ampicilina.

40 **VI.18)** Rastreo mediante PCR de colonias (con los primers del inserto o una combinación mixta de un primer del plásmido -por ejemplo T7- y un primer específico del inserto). Selección de colonias que portan el inserto del tamaño esperado.

**VI.19)** Secuenciación para comprobar la fidelidad de las secuencias clonadas.

45 **VI.20)** Eliminación de los restos del MCS de pSAD v5.0 entre los exones 18 y 19 mediante una delección generada con los primers Forward: SEQ ID No: 73 (5' TGCTTTGATCAGATCCCTATTCCACATAGCATTAAAGAACTTGTAGCAGTA 3') y Reverse: SEQ ID No: 74 (5' TACTGCTACAAGTTCTTAATGCTATGTGGAAATAGGGAT

CTGATCAAAGCA 3') mediante mutagénesis dirigida. Se digiere la reacción PCR con 10 unidades de *DpnI*. Estos dos últimos cebadores fueron diseñados para producir una delección de la secuencia del MCS de pSAD v5.0 existente entre los insertos de los exones 18 y 19 del gen *BRCA2*.

**VI.21)** Transformación de la cepa DH5 $\alpha$  y selección en presencia de Ampicilina.

- 5 **VI.22)** Secuenciación de varios clones para comprobar que se ha generado correctamente la delección. Esta construcción constituye el minigen MGBR2\_EX16-20, cuya secuencia consiste en SEQ ID No: 18. Este minigen contiene un inserto final de 3402 pb con los exones 16-17-18-19-20 y las secuencias intrónicas flanqueantes correspondientes.

**EJEMPLO 7. Comprobación del funcionamiento de los diferentes minigenes.**

- 10 A continuación se describe el procedimiento común para la comprobación del correcto funcionamiento de los distintos minigenes obtenidos a partir de uno de los vectores pSAD objeto de la presente invención.

**VII.1)** Transfección de células HeLa con 1  $\mu$ g de cada minigen y 2  $\mu$ l de Lipofectamine 2000 (Invitrogen).

**VII.2)** A las 24-48 horas, purificación de ARN con el kit Nucleospin RNA II (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante y cuantificación de la concentración de ARN en un espectrofotómetro.

- 15 **VII.3)** Retrotranscripción de 200 ng de ARN con el kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis (Roche) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

20 **VII.4)** Amplificación de 3  $\mu$ l de cDNA con la polimerasa GoTaq HotStart (Promega) y los primers específicos de los exones constitutivos del vector pSAD, Forward del exón constitutivo 1 del vector: SEQ ID No: 75 (5' TCACCTGGACAACCTCAAAG 3') o SEQ ID No: 80 (5' TGCTAAGCTGAGTGAAGT 3'), y Reverse del exón constitutivo 2 del vector: SEQ ID No: 76 (5' TGAGGAGTGAATTGGTCGAA 3') o SEQ ID No: 81 (5' GGAGTGAATTGGTCGAATG 3'), en las siguientes condiciones en el termociclador: (95°C, 2 min) + (35 ciclos x [95°C, 30 s / 63°C, 30 s / 72°C, 30 s-2 min]) + (72°C, 5 min). En los 35 ciclos, el intervalo de tiempo de la tercera etapa del ciclo a 72°C, el intervalo de tiempo varía entre 30 segundos y 2 minutos, dependiendo de la longitud del fragmento a amplificar, y es menor cuanto menor es dicha longitud.

- 25 **VII.5)** Comprobación en gel de agarosa y secuenciación del producto de la RT-PCR.

En la tabla 1 se presentan los tamaños de los productos RT-PCR de los minigenes SEQ ID No: 5, SEQ ID No: 6, SEQ ID No: 7, SEQ ID No: 8, SEQ ID No: 9, SEQ ID No: 10, SEQ ID No: 11, SEQ ID No: 12, SEQ ID No: 13, SEQ ID No: 14, SEQ ID No: 15, SEQ ID No: 16, SEQ ID No: 17 y SEQ ID No: 18, junto con el tamaño de los productos RT-PCR de los vectores génicos pSAD v5.0 (SEQ ID No:3) y pSAD v6.0 (SEQ ID No: 4).

30 Tabla 1

	Minigen	Tamaño total de la construcción (pb)	Tamaño del inserto clonado (pb)	Tamaño del ARN sintetizado (nucleótidos)
SEQ ID No: 3	pSAD v5.0		-	184
SEQ ID No: 4	pSAD v 6.0		-	184
SEQ ID No: 11	MGBR2_EX4-7	7294	2328	499
SEQ ID No: 12	MGBR2_EX3-7	8061	3095	748
SEQ ID No: 13	MGBR2_EX3-8	8600	3649	798
SEQ ID No: 14	MGBR2_EX3-9	9219	4268	910
SEQ ID No: 15	MGBR2_EX2-9	9891	4977	1016
SEQ ID No: 10	MGBR2_EX10	6920	1960	1300
SEQ ID No: 16	MGBR2_EX17-18	6497	1506	710
SEQ ID No: 17	MGBR2_EX16-18	7252	2261	898
SEQ ID No: 18	MGBR2_EX16-20	8340	3402	1199
SEQ ID No: 5	MGBR2_EX19-24	7849	2865	1109
SEQ ID No: 6	MGBR2_EX19-25	8796	3812	1354
SEQ ID No: 7	MGBR2_EX19-26	9628	4644	1501
SEQ ID No: 8	MGBR2_EX19-27	9820	5620	2174
SEQ ID No: 9	MGBR2_EX25-26	7675	2727	576

**EJEMPLO 8. Ensayo funcional de *splicing* con los vectores pSAD SEQ ID No: 3 (pSAD v5.0) y SEQ ID No: 4 (pSAD v6.0).**

El esquema básico de trabajo de un ensayo funcional de *splicing* en pSAD es el siguiente (Figura 2):

- 5 **VIII.1)** Cloning del exon(es) junto con las secuencias intrónicas flanqueantes en las dianas de restricción del MCS de *LacZ* con la orientación apropiada de los sitios aceptores y donadores para que se pueda llevar a cabo la reacción de *splicing*.
- VIII.2)** Transformación en la cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli*. Selección de colonias blancas (con inserto) en Ampicilina, X-Gal e IPTG. Rastreo de colonias por PCR. Obtención de ADN plasmídico de alta pureza. Comprobación de la integridad del inserto mediante secuenciación.
- 10 **VIII.3)** Generación de mutaciones sobre el minigen *wild type* (<http://www.methodbook.net/PCR/PCRmut.html>) con primers específicos de cada mutación.
- VIII.4)** Transfección transitoria de células eucariotas en cultivo (por ejemplo HeLa) con 1  $\mu$ g de plásmido y Lipofectamina 2000 (Invitrogen).
- VIII.5)** Extracción de ARN a las 24-48 horas.
- 15 **VIII.6)** RT-PCR: Síntesis de cDNA a partir de 200 ng de ARN con Transcriptasa reversa (kit Transcriptor de Roche) y PCR con los primers específicos de los exones del vector que consisten en SEQ ID No: 77 (RT\_SD6-FW 5' TCTGAGTCACCTGGACAACC 3') y en SEQ ID No: 78 (RT\_SA2-RV 5' ATCTCAGTGGTATTTGTGAGC 3'), donde el primer RT\_SD6-FW (SEQ ID No: 77) está marcado con FAM (6-carboxyfluorescein).
- 20 **VIII.7)** Electroforesis en gel de agarosa y/o electroforesis capilar en secuenciador automático ABI3130. Este método ha sido puesto a punto recientemente por nuestro laboratorio (Acedo et al 2012, Breast Cancer Research 14: R87) y permite una resolución precisa (diferencias de 1 solo nucleótido) de todas las isoformas de *splicing* presentes. Análisis informático con el software Peak Scanner v1.0 (Applied Biosystems).
- 25 **VIII.8)** Secuenciación de todos los productos de la RT-PCR con el kit Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) y electroforesis en secuenciador ABI3130. Análisis con el software Sequencing Analysis (Applied Biosystems) y alineamiento de secuencias obtenidas con la secuencia patrón mediante CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

En condiciones normales el experimento completo puede estar finalizado en unas tres semanas. Sin embargo, la generación de mutaciones y ensayo funcional de *splicing* en células HeLa puede realizarse en tan sólo 10 días.

- 30 Se realizó una construcción en pSAD que contenía los exones 19, 20, 21, 22, 23 y 24 del gen *BRCA2* (tamaño total del inserto: 2865 pb; SEQ ID No: 5), uno de los principales genes de predisposición a cáncer de mama/ovario hereditario. El fragmento está orientado de modo que se produzcan correctamente las reacciones de *splicing* con los exones constitutivos de pSAD (V1-19-20-21-22-23-24-V2). Como en ocasiones anteriores, se comprobó que la construcción producía un ARNm del tamaño esperado (1109 nucleótidos) mediante RT-PCR con primers específicos (SEQ ID No: 77 y SEQ ID No: 78) de los exones del vector (Figura 3). Del mismo modo se comprobó que funcionaban
- 35 correctamente las construcciones MGBR2\_EX19-25 (exones 19 a 25), MGBR2\_EX19-26 (exones 19 a 26), MGBR2\_EX19-27 (exones 19 a 27), MGBR2\_EX17-18 (exones 17 y 18), MGBR2\_EX16-18 (exones 16 a 18), MGBR2\_EX16-20 (exones 16 a 20), MGBR2\_EX25-26 (exones 25 y 26), MGBR2\_EX10 (exón 10), MGBR2\_EX4-7 (exones 4 a 7), MGBR2\_EX3-7 (exones 3 a 7), MGBR2\_EX3-8 (exones 3 a 8), MGBR2\_EX3-9 (exones 3 a 9) y MGBR2\_EX2-9 (exones 2 a 9), que produjeron el ARNm del tamaño esperado mediante RT-PCR con primers
- 40 específicos (SEQ ID No: 77 y SEQ ID No: 78) de los exones del vector (Tabla 1 y Figura 3).

- En conclusión, la construcción de minigenes híbridos en pSAD, como las presentadas aquí con hasta 9 exones de *BRCA2*, es una herramienta muy útil para clasificar desde el punto de vista del *splicing* las variantes de ADN de significado clínico desconocido (hasta el 15% de las pacientes con cáncer de mama/ovario hereditario presentan una de estas variantes). Basta disponer de la construcción del minigen *wild type* y para generar sobre él la mutación detectada
- 45 en un paciente mediante mutagénesis dirigida para realizar el ensayo funcional de *splicing*, todo ello sin necesidad de provocar molestias al paciente para la obtención de una nueva muestra.



**REIVINDICACIONES**

1. Vector génico útil para ensayos funcionales de splicing obtenido a partir del plásmido pSPL3b SEQ ID No:1, caracterizado porque comprende:
  - a. una delección de al menos 1,2 kilobases del intrón de SEQ ID No: 1;
  - 5      b. una sustitución del sitio de clonación múltiple de SEQ ID No: 1 por un casete *lacZ*, donde dicho casete *lacZ* comprende una primera mutación de eliminación de un primer sitio críptico aceptor de splicing;
  - c. una segunda mutación de fortalecimiento de un segundo sitio aceptor de splicing, en al menos tres nucleótidos comprendidos entre las posiciones 2835 y 2875 de SEQ ID No: 1;
  - 10     d. al menos una tercera mutación de inhabilitación de al menos una diana de restricción comprendida entre las posiciones 340 y 2623 de SEQ ID No: 1, y donde dicha mutación comprende al menos una modificación de un nucleótido de la secuencia de la diana.
  
2. Vector génico según la reivindicación 1, donde la delección del intrón comprende la eliminación de los nucleótidos comprendidos entre las posiciones 1299 y 2498 de SEQ ID No: 1.
  
3. Vector génico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde el casete *lacZ* es SEQ ID No: 2.
  
- 15    4. Vector génico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la sustitución definida en **b** comprende una eliminación de la secuencia comprendida entre las posiciones 1011 y 1118 de SEQ ID No: 1 con enzimas *EcoRI* y *NdeI*, y una inserción posterior del casete *lacZ* con extremos *MunI* y *NdeI*.
  
5. Vector génico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la segunda mutación comprende:
  - 20     c.1. un primer cambio de Adenina por Timina en el nucleótido en posición 2846 de SEQ ID No: 1 (2846A>T),
  - c.2. un segundo cambio de Guanina por Timina en el nucleótido en posición 2849 de SEQ ID No: 1 (2849G>T),
  - c.3. un tercer cambio de Adenina por Guanina en el nucleótido en posición 2856 de SEQ ID No: 1 (2856A>G).
  
- 25    6. Vector génico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la tercera mutación se selecciona entre:
  - 30     d.1. una modificación de al menos un nucleótido en la secuencia de una primera diana *HindIII* comprendida entre las posiciones 340 y 345 de SEQ ID No: 1 y una modificación de al menos un nucleótido en la secuencia de una segunda diana *HindIII* comprendida entre las posiciones 2618 y 2623 de SEQ ID No: 1,
  - d.2. una modificación de al menos un nucleótido en la secuencia de una diana *XbaI* comprendida entre las posiciones 679 y 684 de SEQ ID No: 1,
  - d.3. una modificación de al menos un nucleótido en la secuencia de una diana *SaI* comprendida entre las posiciones 685 y 690 de SEQ ID No: 1,
  
- 35     y cualquier combinación de las mismas.
  
7. Vector génico según la reivindicación 6, donde la modificación de la primera diana *HindIII* definida en **d.1** consiste en un cambio de Guanina por Adenina en el nucleótido en posición 342 de SEQ ID No: 1 (342G>A).
  
8. Vector génico según una cualquiera de las reivindicaciones 6 ó 7, donde la modificación de la segunda diana *HindIII* definida en **d.1** consiste en un cambio de Guanina por Adenina en el nucleótido en posición 2620 de SEQ ID No: 1 (2620G>A).
- 40     9. Vector génico según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, donde la modificación definida en **d.2** consiste en un cambio de Timina por Citosina en el nucleótido en posición 679 de SEQ ID No: 1 (679T>C).

10. Vector génico según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, donde la modificación definida en **d.3** consiste en un cambio de Guanina por Adenina en el nucleótido en posición 685 de SEQ ID No: 1 (685G>A).
11. Vector génico según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, donde la tercera mutación comprende las modificaciones definidas en **d.1**.
- 5 12. Vector génico según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, donde la tercera mutación comprende las modificaciones definidas en **d.1**, **d.2** y **d.3**.
13. Vector génico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 que consiste en SEQ ID No: 79.
14. Vector génico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 que se selecciona entre SEQ ID No: 3 ó SEQ ID No: 4.
- 10 15. Minigen útil para ensayos funcionales de splicing, caracterizado porque comprende un vector definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 y al menos una secuencia de nucleótidos clonada en el sitio de clonación múltiple del casete *lacZ* de dicho vector.
16. Minigen según la reivindicación 15, donde la secuencia de nucleótidos clonada, comprende al menos un exón de un gen y las secuencias parciales o totales de nucleótidos de los intrones que flanquean a dicho exón en el gen.
- 15 17. Minigen según la reivindicación 16, donde el gen es un gen de predisposición a una enfermedad.
18. Minigen según la reivindicación 17, donde el gen de predisposición a una enfermedad es un gen BRCA.
19. Minigen según la reivindicación 18 que se selecciona entre SEQ ID No: 5, SEQ ID No: 6, SEQ ID No: 7, SEQ ID No: 8, SEQ ID No: 9, SEQ ID No: 10, SEQ ID No: 11, SEQ ID No: 12, SEQ ID No: 13, SEQ ID No: 14, SEQ ID No: 15, SEQ ID No: 16, SEQ ID No: 17 y SEQ ID No: 18.
- 20 20. Célula que comprende un vector génico definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, o un minigen definido en una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19.
21. Célula según la reivindicación 20, donde la célula es una bacteria.
22. Célula según la reivindicación 21, donde la bacteria es una cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$ .
- 25 23. Célula según una cualquiera de las reivindicaciones 21 ó 22, que es una seleccionada entre CECT 8152 ó CECT 8153.
24. Procedimiento de obtención de un vector génico definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, caracterizado porque, a partir del plásmido pSPL3b de secuencia SEQ ID No: 1, comprende las siguientes etapas:
- 30 **A.1.** reducir el tamaño del plásmido SEQ ID No: 1 mediante delección de al menos 1,2 kilobases del intrón por una primera mutagénesis dirigida con un primer par de cebadores específicos para dicha delección, donde la secuencia de un cebador comprende una secuencia de al menos 25 nucleótidos consecutivos comprendidos entre las posiciones 1125 y 1394 de SEQ ID No: 1, unida por su extremo 3' a una secuencia de al menos 25 nucleótidos consecutivos comprendidos entre las posiciones 2349 y 2617 de SEQ ID No: 1, y la secuencia del otro cebador es la complementaria;
- 35 **A.2.** amplificar un casete *lacZ* con extremos *MunI* y *NdeI* mediante PCR con un segundo par de cebadores, donde uno de los cebadores comprende en su secuencia un sitio de restricción *MunI*, y otro cebador comprende en su secuencia un sitio de restricción *NdeI*;
- 40 **A.3.** eliminar el sitio de clonación múltiple del plásmido SEQ ID No:1 mediante enzimas de restricción *EcoRI* y *NdeI*, y clonar el casete *lacZ* amplificado en **A.2**;
- A.4.** eliminar un sitio críptico aceptor fuerte de splicing del casete *lacZ*, mediante una segunda mutagénesis dirigida con un tercer par de cebadores, donde uno de los cebadores comprende SEQ ID No: 87 y el otro cebador comprende SEQ ID No: 88;

- A.5.** fortalecer el sitio aceptor de splicing comprendido entre las posiciones 2835 y 2875 de SEQ ID No: 1 mediante una tercera mutagénesis dirigida a las posiciones 2846, 2849 y 2856 con un cuarto par de cebadores, donde uno de los cebadores comprende SEQ ID No: 26, y el otro cebador comprende SEQ ID No: 27;
- 5 **A.6.** inhabilitar al menos una diana de restricción comprendida entre las posiciones 340 y 2623 de SEQ ID No: 1 mediante al menos una cuarta mutagénesis dirigida a modificar un nucleótido comprendido en la secuencia de dicha diana, con un quinto par de cebadores específicos que comprendan en su secuencia la modificación de dicho nucleótido.
- 10 **25.** Procedimiento según la reivindicación 24, donde se delecionan 1,2 kilobases del intrón mediante un cebador que comprende SEQ ID No: 19 y un cebador que comprende SEQ ID No: 20.
- 26.** Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 24 ó 25, donde el quinto par de cebadores para inhabilitar la diana de restricción se selecciona entre al menos uno de los siguientes:
- A.6.1.** un cebador que comprende SEQ ID No: 28 y un cebador que comprende SEQ ID No: 29, y además un cebador que comprende SEQ ID No: 30 y un cebador que comprende SEQ ID No: 31,
- 15 **A.6.2.** un cebador que comprende SEQ ID No: 32 y un cebador que comprende SEQ ID No: 33.
- 27.** Uso de un vector génico definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, o de un minigen definido en una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, o de una célula definida en una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23 en ensayos funcionales de splicing.
- 20 **28.** Uso de un vector génico definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, o de un minigen definido en una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, o de una célula definida en una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23, para detectar una mutación en al menos un exón y/o intrón de un gen que produce un splicing defectuoso.
- 29.** Método para ensayo funcional de splicing caracterizado porque, a partir de un vector génico definido en una de las reivindicaciones 1 a 14, comprende los siguientes pasos:
- 25 **B.1.** clonar al menos una secuencia de nucleótidos que comprende al menos un exón de un gen y sus secuencias intrónicas flanqueantes, con la orientación adecuada del sitio donador y aceptor de splicing, en el sitio de clonación múltiple de un vector definido en una de las reivindicaciones 1 a 14, para obtener un minigen wild-type;
- B.2.** transformar el minigen wild-type anterior en una cepa bacteriana;
- 30 **B.3.** cultivar la cepa bacteriana transformada en presencia de ampicilina, X-Gal e IPTG y seleccionar colonias blancas;
- B.4.** aislar el minigen wild-type de una colonia blanca seleccionada y generar un minigen mutante que comprenda una mutación en el exón o secuencias intrónicas del gen, donde dicho minigen mutante se obtiene mediante mutagénesis dirigida sobre el minigen wild-type aislado por PCR y polimerasa de alta fidelidad con cebadores específicos que comprendan en su secuencia dicha mutación;
- 35 **B.5.** transfectar el minigen mutante a una célula eucariota;
- B.6.** extraer el ARN producido en un cultivo de la célula eucariota transfectada,
- B.7.** sintetizar cDNA a partir del ARN extraído y realizar RT-PCR con cebadores específicos de los exones constitutivos del vector;
- 40 **B.8.** secuenciar y analizar el cDNA sintetizado en el paso **B.7.**

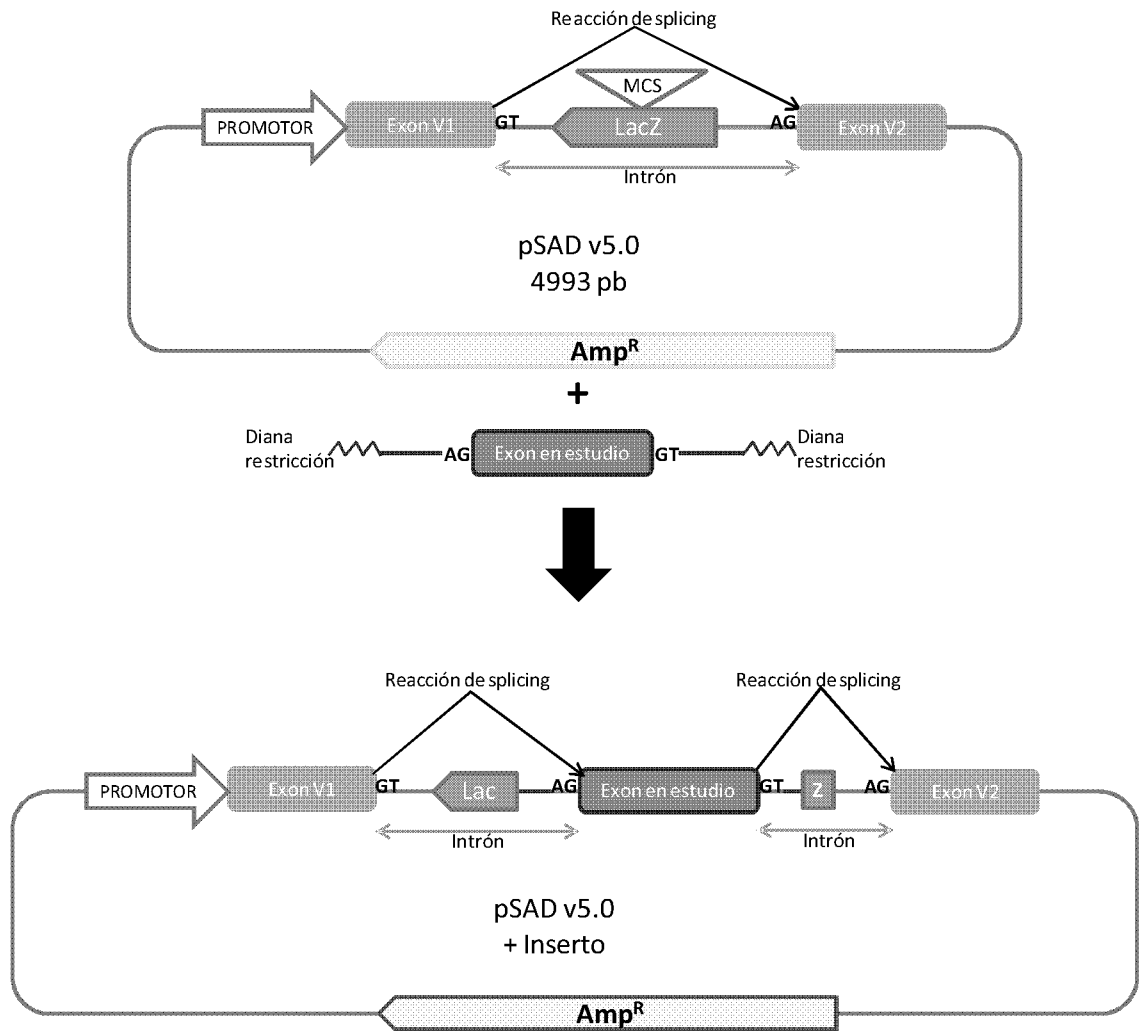


Figura 1

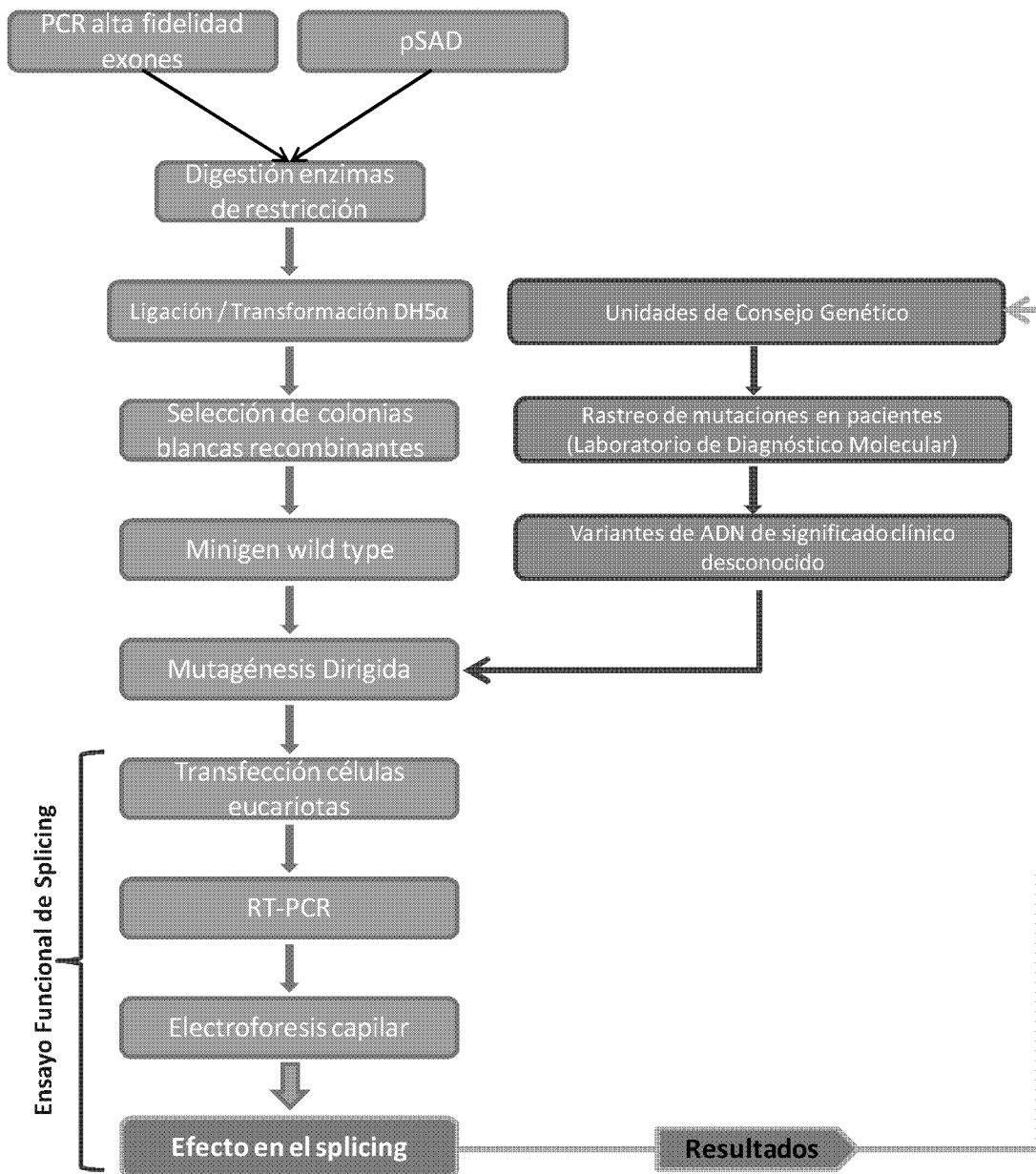


Figura 2

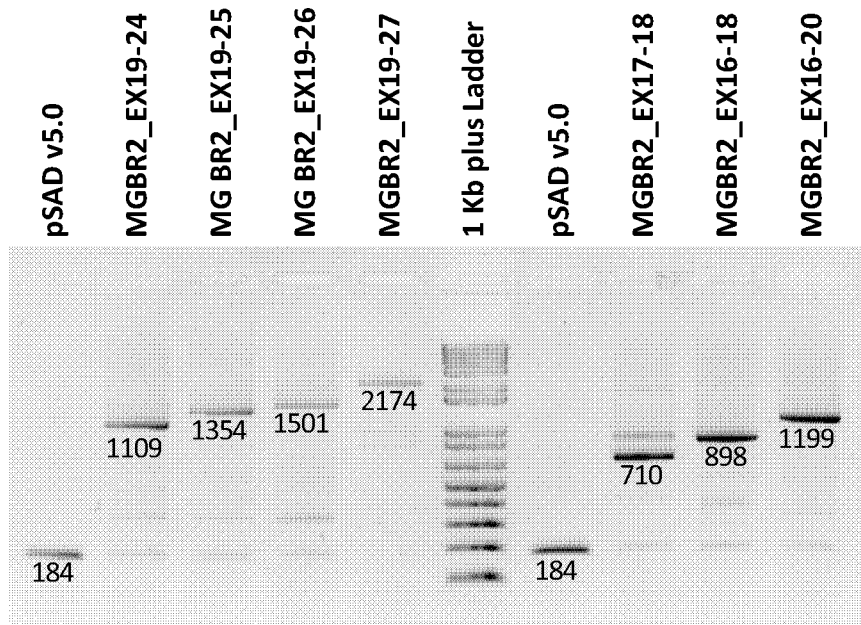


Figura 3

# ES 2 470 440 A1

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS  
UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

<120> Plásmido pSAD para ensayos funcionales de splicing

<160> 88

<170> BISSAP 1.0

<210> 1  
<211> 5792  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<221> source  
<222> 1..5792  
<223> /mol\_type="DNA"  
/note="Plásmido pSPL3b"  
/organism="Artificial Sequence"

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> 1299..2498  
<223> /note="Secuencia de la deleción de 1,2 kilopares del plásmido pSPL3b"

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> 1010..1122  
<223> /note="Sitio de clonación múltiple de pSPL3b"

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> 340..345  
<223> /note="Primera diana HindIII de pSPL3b. Corte en posición 341"

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> 2618..2623  
<223> /note="Segunda diana HindIII de pSPL3b. Corte en posición 2619"

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> 679..684  
<223> /note="Diana XbaI de pSPL3b. Corte en posición 680"

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> 685..690  
<223> /note="Diana SalI de pSPL3b. Corte en posición 686"

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> 2835..2875  
<223> /note="Sitio aceptor de splicing del exón constitutivo 2 del plásmido pSPL3b"

<220>  
<221> exon  
<222> 349..696  
<223> /note="Exón constitutivo 1 del plásmido pSPL3b"

<220>  
<221> exon  
<222> 2856..3121  
<223> /note="Exón constitutivo 2 del plásmido pSPL3b"

<220>

ES 2 470 440 A1

```

<221> misc_feature
<222> 1010..1015
<223> /note="Diana EcoRI de pSPL3b. Corte en posición 1011"

<220>
<221> misc_feature
<222> 1117..1124
<223> /note="Diana NdeI de pSPL3b. Corte en posición 1119"

<220>
<221> misc_feature
<222> 690..704
<223> /note="Sitio donador de splicing del exón constitutivo 1 del
plásmido pSPL3b"

<220>
<221> intron
<222> 697..2855
<223> /note="Intrón del plásmido pSPL3b"

<400> 1
ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt      60
atgcaaagca tgcattctcaa ttagtcagca accaggtgtg gaaagtcccc aggctcccca      120
gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caacatagc cccgcccta      180
actccgcca tcccgcccct aactccgcc agttccgcc attctccgcc ccatggctga      240
ctaatttttt ttatttatgc agaggccgag gccgcctcgg cctctgagct attccagaag      300
tagtgaggag gcttttttgg aggcctaggg ttttgcaaaa agcttgact gtgtttactt      360
gcaatcccc aaacagaca gaatggtgca tctgtccagt gaggagaagt ctgcggtcac      420
tgccctgtgg ggcaaggatg atgtggaaga agttggtggt gaggccctgg gcaggctgct      480
ggttgcttac ccatggacc agaggttctt cgagtccttt ggggacctgt cctctgcaa      540
tgctgttatg aacaatccta aggtgaaggc tcatggcaag aagggtgctg ctgccttcag      600
tgagggctct agtcacctgg acaacctcaa aggcacctt gctaagctga gtgaactgca      660
ctgtgacaag ctgcacgctc tagagtcgac ccagcagtaa gtaatacatg taatgcaacc      720
tatacaata gcaatagtag cattagtagt agcaataata atagcaatag ttgtgtggtc      780
catagtaatc atagaatata ggaaaatatt aagacaaaga aaaatagaca ggttaattga      840
tagactaata gaaagagcag aagacagtgg caatgagagt gaaggagaaa taccagcact      900
tgtggagatg ggggtggaga tggggcacca tgctccttgg gatgttgatg atctgtagt      960
ctacagaaaa attgtgggtc acagtctatt atgggggtac ggatcaccag aattctggag      1020
ctcgagcggc cgctgcagga tcccagatat ctggtgatcc cgtacctgtg tggaaggaag      1080
caaccaccac tctattttgt gcatcagatg ctaaagcata tgatacagag gtacataatg      1140
tttgggccac acatgccggt gtaccacag accccaacc acaagaagta gtattggtaa      1200
atgtgacaga aaattttaac atgtggaaaa atgacatggt agaacagatg catgaggata      1260
taatcagttt atgggatcaa agcctaaagc catgtgtaaa attaaccaca ccctgtccaa      1320
aggtatcctt tgagccaatt cccatacatt attgtgcccc ggctggtttt gcgattctaa      1380
aatgtaataa taagacgttc aatggaacag gaccatgtac aatgtcagc acagtacaat      1440
gtacacatgg aattaggcca gtagtatcaa ctcaactgct gttaaattggc agtctagcag      1500

```



ES 2 470 440 A1

aagaagaggt agtaattaga tctgtcaatt tcacggacaa tgctaaaacc ataatagtac 1560  
agctgaacac atctgtagaa attaattgta caagacccaa caacaatata agaaaaaaaa 1620  
tccgtatcca gaggggacca gggagagcat ttgttacaat aggaaaaata ggaaatatga 1680  
gacaagcaca ttgtaacatt agtagagcaa aatggaatgc cactttaaaa cagatagcta 1740  
gcaaattaag agaacaattt ggaaataata aaacaataat cttaagcaa tcctcaggag 1800  
gggacccaga aattgtaacg cacagtttta attgtggagg ggaatthttc tactgtaatt 1860  
caacacaact gtttaatagt acttggttta atagtacttg gagtactgaa gggtcaaata 1920  
acactgaagg aagtgacaca atcacactcc catgcagaat aaaacaattt ataaacatgt 1980  
ggcaggaagt aggaaaagca atgtatgccc ctcccatcag cggacaaatt agatgttcat 2040  
caaatattac agggctgcta ttaacaagag atggtggtaa taacaacaat ggggccgaga 2100  
tcttcagacc tggaggagga gatatgaggg acaattggag aagtgaatta tataaatata 2160  
aagtagtaaa aattgaacca ttaggagtag cacccaccaa ggcaaagaga agagtgggtc 2220  
agagagaaaa aagagcagtg ggaataggag ctttgttctt tgggttcttg ggagcagcag 2280  
gaagcactat gggcgcagcg tcaatgacgc tgacggtaca ggccagacaa ttattgtctg 2340  
gtatagtgca gcagcagaac aatttgctga gggctattga ggcgcaacag catctgttgc 2400  
aactcacagt ctggggcatc aagcagctcc aggcaagaat cctggctgtg gaaagatacc 2460  
taaaggatca acagctcctg gggatttggg gttgctctgg aaaactactt tgcaccactg 2520  
ctgtgccttg gaatgctagt tggagtaata aatctctgga acagatttgg aatcacacga 2580  
cgtggatgga gtgggacaga gaaattaaca attacacaag cttatacac tccttaattg 2640  
aagaatcgca aaaccagcaa gaaaagaatg aacaagaatt attggaatta gataaatggg 2700  
caagtttgtg gaattggttt aacataacaa attggctgtg gtatataaaa ttattcataa 2760  
tgatagtagg aggcttggtg ggtttaagaa tagtttttgc tgtactttct gtagtgaata 2820  
gagttaggca gggatattca ccattatcgt ttcagacctg gagatctccc gaggggaccc 2880  
gacaggcccg aaggaataga agaagaaggt ggagagagag acagagacag atccatttcg 2940  
accaattcac tcctcaggtg caggctgcct atcagaaggt ggtggctggt gtggccaatg 3000  
ccctggctca caaataccac tgagatccag acatgataag atacattgat gagtttggac 3060  
aaaccacaac tagaatgcag tgaaaaaaaa gctttatttg tgaaatttgt gatgctattg 3120  
ctttatttgt aaccattata agctgcaata aacaagttaa caacaacaat tgcattcatt 3180  
ttatgtttca ggttcagggg gaggtgtggg aggtttttta aagcaagtaa aacctctaca 3240  
aatgtggtat ggctgattat gatccccagg aagctcctct gtgtcctcat aaaccctaac 3300  
ctcctctact tgagaggaca ttccaatcat aggctgcca tccaccctct gtgtcctcct 3360  
gttaattagg tcaactaaca aaaaggaaat tgggtagggg tttttcacag accgctttct 3420  
aagggtaatt ttaaaatatac tgggaagtcc cttccactgc tgtgttccag aagtgttgg 3480  
aaacagccca caaatgtcaa cagcagaaac atacaagctg tcagctttgc acaagggccc 3540  
aacaccctgc tcatcaagaa gcactgtggt tgctgtgtta gtaatgtgca aaacaggagg 3600  
cacattttcc ccacctgtgt aggttccaaa atatctagtg ttttcatttt tacttggatc 3660

ES 2 470 440 A1

aggaacccag cactccactg gataagcatt atccttatcc aaaacagcct tgtggtcagt 3720  
 gttcatctgc tgactgtcaa ctgtagcatt ttttgggggtt acagtttgag caggatattt 3780  
 ggtcctgtag tttgctaaca caccccaggt ggcacttttc ggggaaatgt gcgcggaacc 3840  
 cctatttggt tatttttcta aatacattca aatatgtatc cgctcatgag acaataacc 3900  
 tgataaatgc ttcaataata ttgaaaaagg aagagtatga gtattcaaca tttccgtgtc 3960  
 gcccttattc ccttttttgc ggcactttgc cttcctgttt ttgctcacc agaaacgctg 4020  
 gtgaaagtaa aagatgctga agatcagttg ggtgcacgag tgggttacat cgaactggat 4080  
 ctcaacagcg gtaagatcct tgagagtttt cgccccgaag aacgttttcc aatgatgagc 4140  
 acttttaaag ttctgctatg tggcgcggta ttatcccgtg ttgacgccgg gcaagagcaa 4200  
 ctcggtcgcc gcatacacta ttctcagaat gacttggttg agtactcacc agtcacagaa 4260  
 aagcatctta cggatggcat gacagtaaga gaattatgca gtgctgcat aacctgagt 4320  
 gataacactg cggccaactt acttctgaca acgatcggag gaccgaagga gctaaccgct 4380  
 tttttgcaca acatggggga tcatgtaact cgccttgatc gttgggaacc ggagctgaat 4440  
 gaagccatac caaacgacga gcgtgacacc acgatgcctg tagcaatggc aacaacgttg 4500  
 cgcaaacat taactggcga actacttact ctagcttccc ggcaacaatt aatagactgg 4560  
 atggaggcgg ataaagtgc aggaccactt ctgcgctcgg cccttccggc tggctggttt 4620  
 attgctgata aatctggagc cggtagcgt gggctctcgc gtatcattgc agcactgggg 4680  
 ccagatggta agccctcccg tatcgtagtt atctacacga cggggagtca ggcaactatg 4740  
 gatgaacgaa atagacagat cgctgagata ggtgcctcac tgattaagca ttggtaactg 4800  
 tcagaccaag tttactcata tatactttag attgatttaa aacttcattt ttaatttaa 4860  
 aggatctagg tgaagatcct ttttgataat ctcatgacca aaatccttaa cggtagattt 4920  
 tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg agatcctttt 4980  
 tttctgcgcg taatctgctg cttgcaaaca aaaaaccac cgctaccagc ggtggtttgt 5040  
 ttgccggatc aagagctacc aactctttt ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgcag 5100  
 ataccaaata ctgtccttct agttagcgg tagttaggcc accacttcaa gaactctgta 5160  
 gcaccgccta catacctcgc tctgctaata ctgttaccag tggctgctgc cagtggcgat 5220  
 aagtcgtgtc ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac cggataaggc gcagcggctg 5280  
 ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc agcttgagc gaacgaccta caccgaactg 5340  
 agatacctac agcgcgagca ttgagaaagc gccacgctt ccgaaggag aaaggcggac 5400  
 aggtatccgg taagcggcag ggtcggaaaca ggagagcga cgagggagct tccaggggga 5460  
 aacgcctggt atctttatag tcctgtcggg tttcgccacc tctgacttga gcgtcgattt 5520  
 ttgtgatgct cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc ggccttttta 5580  
 cggttcctgg ccttttgctg gccttttgc cacatgttct ttctgctggt atcccctgat 5640  
 tctgtggata accgtattac cgcctttgag tgagctgata ccgctcggc cagccgaacg 5700  
 accgagcgcga gcgagtcagt gagcggaggaa gcggaagagc gcccaatacg caaacgcct 5760

ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc ag 5792

<210> 2  
 <211> 505  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <221> source  
 <222> 1..505  
 <223> /mol\_type="DNA"  
 /note="Gen lacZ (péptido alfa del gen de la  $\beta$ -Galactosidasa) obtenido a partir del plásmido pBluescript II KS (-) más mutagénesis dirigida de un sitio críptico aceptor de splicing"  
 /organism="Artificial Sequence"

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 370..372  
 <223> /note="Secuencia complementaria del codón de iniciación Met (ATG) de lacZ"

<400> 2  
 taacgcttac aatttccatt cgccattcag gctgcgcaac tgttggaag ggcgatcgg 60  
 gcgggcctct tcgctattac gccagctggc gaaaggggga tgtgctgcaa ggcgattaag 120  
 ttgggtaacg ccagggtttt cccagtcacg acgttgtaaa acgacggcca gtgagcgcgc 180  
 gtaatacgcac tcaactatagg gcgaattgga gctccaccgc ggtggcggcc gctctagaac 240  
 tagtggatcc cccgggctgc aggaattcga tatcaagctt atcgataccg tcgacctcga 300  
 gggggggccc ggtaccacgc ttttgttccc ttttgtgagg gttaattgcg cgcttggcgt 360  
 aatcatggtc atagctgttt cctgtgtgaa attgttatcc gtcacaatt ccacacaaca 420  
 tacgagccgg aagcataaag tgtaaagcct ggggtgccta atgagtgagc taactcacat 480  
 taattgcggt gcgctcactg cccgc 505

<210> 3  
 <211> 4993  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <221> source  
 <222> 1..4993  
 <223> /mol\_type="DNA"  
 /note="Plásmido pSAD v5.0"  
 /organism="Artificial Sequence"

<220>  
 <221> promoter  
 <222> 23..345  
 <223> /note="Promotor SV40"

<220>  
 <221> exon  
 <222> 349..696  
 <223> /note="Exón constitutivo 1"

<220>  
 <221> gene  
 <222> 1015..1519  
 <223> /note="Gen lacZ"

<220>

ES 2 470 440 A1

<221> misc\_feature  
 <222> 1223..1330  
 <223> /note="Sitio de clonación múltiple"

<220>  
 <221> exon  
 <222> 2059..2323  
 <223> /note="Exón constitutivo 2"

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 2038..2078  
 <223> /note="Sitio acceptor de splicing del exón constitutivo 2"

<220>  
 <221> gene  
 <222> 3139..3999  
 <223> /note="Gen de resistencia a ampicilina"

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 690..704  
 <223> /note="Sitio donador de splicing del exón constitutivo 1"

<400> 3  
 ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt 60  
 atgcaaagca tgcattctca ttagtcagca accagggtgtg gaaagtcccc aggcctccca 120  
 gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caacatagc cccgccccta 180  
 actccgcca tcccgcccct aactccgccc agttccgccc attctccgcc ccatggctga 240  
 ctaatttttt ttatttatgc agaggccgag gccgcctcgg cctctgagct attccagaag 300  
 tagtgaggag gcttttttgg aggcctaggc ttttgcaaaa aacttgact gtgtttactt 360  
 gcaatcccc aaaacagaca gaatggtgca tctgtccagt gaggagaagt ctgcggtcac 420  
 tgccctgtgg ggcaagggtga atgtggaaga agttggtggt gaggccctgg gcaggctgct 480  
 ggttgtctac ccatggacc agaggttctt cgagtcctt ggggacctgt cctctgcaaa 540  
 tgctgttatg aacaatccta aggtgaaggc tcatggcaag aagggtgctg ctgccttcag 600  
 tgagggtctg agtcacctg acaacctcaa aggcacctt gctaagctga gtgaactgca 660  
 ctgtgacaag ctgcacgctc tagagtcgac ccagcagtaa gtaatacatg taatgcaacc 720  
 tatacaaata gcaatagtag cattagtagt agcaataata atagcaatag ttgtgtggtc 780  
 catagtaatc atagaatata ggaaaatatt aagacaaaga aaaatagaca ggttaattga 840  
 tagactaata gaaagagcag aagacagtgg caatgagagt gaaggagaaa ttcagcact 900  
 tgtggagatg ggggtggaga tggggcacca tgctccttgg gatgttgatg atctgtagt 960  
 ctacagaaaa attgtgggtc acagtctatt atgggtagg gatcaccaga attgtaacgc 1020  
 ttacaatttc cattcgccat tcaggctgcg caactgttgg gaagggcgat cgggtcgggc 1080  
 ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt 1140  
 aacgccaggg ttttcccagt cacgacgttg taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata 1200  
 cgactcacta tagggcgaat tggagctcca ccgcggtggc ggccgctcta gaactagtgg 1260  
 atccccggg ctgcaggaat tcgatatcaa gcttatcgat accgtcgacc tcgagggggg 1320  
 gcccgtacc cagcttttgt tcccttttgt gagggttaat tgcgcgcttg gcgtaatcat 1380

ES 2 470 440 A1

ggtcatagct	gtttcctgtg	tgaaattggt	atccgctcac	aattccacac	aacatacgag	1440
ccggaagcat	aaagtgtaaa	gcctgggggtg	cctaattgagt	gagctaactc	acattaattg	1500
cgttgcgctc	actgcccgcc	atatgatata	gaggtacata	atgtttgggc	cacacatgcc	1560
ggtgtaccca	cagaccccaa	cccacaagaa	gtagtattgg	taaatgtgac	agaaaatfff	1620
aacatgtgga	aaaatgacat	ggtagaacag	atgcatgagg	atataatcag	tttatgggat	1680
caaagcctaa	agccatgtgt	aggaaaacta	ctttgcacca	ctgctgtgcc	ttggaatgct	1740
agttggagta	ataaatctct	ggaacagatt	tggaatcaca	cgacctggat	ggagtgggac	1800
agagaaatta	acaattacac	aaacttaata	cactccttaa	ttgaagaatc	gcaaaaccag	1860
caagaaaaga	atgaacaaga	attattggaa	ttagataaat	gggcaagttt	gtggaattgg	1920
tttaacataa	caaattggct	gtggtatata	aaattattca	taatgatagt	aggaggcttg	1980
gtaggtttaa	gaatagtttt	tgctgtactt	tctgtagtga	atagagttag	gcagggatat	2040
tcaccatfff	cttttcaggc	ctggagatct	cccgagggga	cccgacaggc	ccgaaggaat	2100
agaagaagaa	ggtggagaga	gagacagaga	cagatccatt	cgaccaattc	actcctcagg	2160
tgcaggctgc	ctatcagaag	gtggtggctg	gtgtggccaa	tgccctggct	cacaaatacc	2220
actgagatcc	agacatgata	agatacattg	atgagtttgg	acaaccaca	actagaatgc	2280
agtgaaaaaa	atgctttatt	tgtgaaatff	gtgatgctat	tgctttatff	gtaaccatta	2340
taagctgcaa	taaacaagtt	aacaacaaca	attgcattca	ttttatgtff	caggttcagg	2400
gggaggtgtg	ggaggtttff	taaagcaagt	aaaacctcta	caaatgtggt	atggctgatt	2460
atgatcccca	ggaagctcct	ctgtgtcctc	ataaacctta	acctcctcta	cttgagagga	2520
cattccaatc	ataggctgcc	catccacctc	ctgtgtcctc	ctgttaatta	ggtcacttaa	2580
caaaaaggaa	attgggtagg	ggtttttcac	agaccgctff	ctaagggtaa	ttttaaaata	2640
tctgggaagt	cccttccact	gctgtgttcc	agaagtgttg	gtaaacagcc	cacaaatgtc	2700
aacagcagaa	acatacaagc	tgtcagctff	gcacaagggc	ccaacacctc	gctcatcaag	2760
aagcactgtg	gttgctgtgt	tagtaatgtg	caaaacagga	ggcacatfff	cccacctgt	2820
gtaggttcca	aaatatctag	tgttttcatt	tttacttggga	tcaggaacct	agcactccac	2880
tggataagca	ttatccttat	ccaaaacagc	cttgtggtca	gtgttcatct	gctgactgtc	2940
aactgtagca	ttttttgggg	ttacagtttg	agcaggatat	ttggtcctgt	agtttgctaa	3000
cacaccccag	gtggcactff	tcggggaaat	gtgcgcgga	cccctatffg	tttattfftc	3060
taaatacatt	caaatatgta	tccgctcatg	agacaataac	cctgataaat	gcttcaataa	3120
tattgaaaaa	ggaagagtat	gagtattcaa	catttccgtg	tcgcccttat	tccctttfff	3180
gcggcattff	gccttcctgt	ttttgctcac	ccagaaacgc	tggtgaaagt	aaaagatgct	3240
gaagatcagt	tgggtgcacg	agtgggttac	atcgaactgg	atctcaacag	cggtaagatc	3300
cttgagagtt	ttcgccccga	agaacgtfff	ccaatgatga	gcactfftaa	agttctgcta	3360
tgtggcgcgg	tattatcccc	tattgacgcc	gggcaagagc	aactcggctc	ccgcatacac	3420
tattctcaga	atgacttggf	tgagtactca	ccagtcacag	aaaagcatct	tacggatggc	3480
atgacagtaa	gagaattatg	cagtgtctgc	ataaccatga	gtgataaac	tgcggccaac	3540

ES 2 470 440 A1

ttactttctga caacgatcgg aggaccgaat gagctaaccg cttttttgca caacatgggg 3600  
 gatcatgtaa ctcgccttga tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat accaaacgac 3660  
 gagcgtgaca ccacgatgcc tgtagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaact attaactggc 3720  
 gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt 3780  
 gcaggaccac ttctgcgctc ggcccttccg gctggctggg ttattgctga taaatctgga 3840  
 gccggtgagc gtgggtctcg cggtatcatt gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc 3900  
 cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt caggcaacta tggatgaacg aatagacag 3960  
 atcgctgaga taggtgcctc actgattaag cattggtaac tgtcagacca agtttactca 4020  
 tatatacttt agattgattt aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc 4080  
 ctttttgata atctcatgac caaaatcctt aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag 4140  
 accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt ttttctgctg gtaatctgct 4200  
 gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag cggtggtttg tttgccggat caagagctac 4260  
 caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgcg gataccaaat actgttcttc 4320  
 tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg 4380  
 ctctgcta at cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt 4440  
 tggactcaag acgatagtta ccggataagg cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt 4500  
 gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc 4560  
 tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcggg caggtatccg gtaagcggca 4620  
 gggctcggaa aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata 4680  
 gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg 4740  
 ggcgagcct atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttcctg gccttttgct 4800  
 ggctttttgc tcacatgttc tttcctgctg tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta 4860  
 ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag 4920  
 tgagcgagga agcggaaagag cgccaatac gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga 4980  
 ttcattaatg cag 4993

<210> 4  
 <211> 4993  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <221> source  
 <222> 1..4993  
 <223> /mol\_type="DNA"  
 /note="Plásmido pSAD v6.0"  
 /organism="Artificial Sequence"

<220>  
 <221> promoter  
 <222> 23..345  
 <223> /note="Promotor SV40"

<220>  
 <221> exon

ES 2 470 440 A1

<222> 349..696  
 <223> /note="Exón constitutivo 1"

<220>  
 <221> gene  
 <222> 1015..1519  
 <223> /note="Gen lacZ"

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 1223..1330  
 <223> /note="Sitio de clonación múltiple"

<220>  
 <221> exon  
 <222> 2059..2323  
 <223> /note="Exón constitutivo 2"

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 2038..2078  
 <223> /note="Sitio aceptor de splicing del exón constitutivo 2"

<220>  
 <221> gene  
 <222> 3139..3999  
 <223> /note="Gen de resistencia a ampicilina"

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 690..704  
 <223> /note="Sitio donador de splicing del exón constitutivo 1"

<400> 4  
 ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt 60  
 atgcaaagca tgcattctcaa ttagtcagca accagggtgtg gaaagtcccc aggctcccca 120  
 gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caaccatagt cccgccccta 180  
 actccgcca tcccgccct aactccgcc agttccgcc attctccgcc ccatggctga 240  
 ctaatttttt ttatttatgc agaggccgag gccgcctcgg cctctgagct attccagaag 300  
 tagtgaggag gcttttttgg aggcctaggc ttttgcaaaa aacttgact gtgtttactt 360  
 gcaatcccc aaaacagaca gaatggtgca tctgtccagt gaggagaagt ctgcggtcac 420  
 tgccctgtgg ggcaagggtga atgtggaaga agttggtggt gaggccctgg gcaggctgct 480  
 ggttgtctac ccatggacc agaggttctt cgagtcctt ggggacctgt cctctgcaaa 540  
 tgctgttatg aacaatccta aggtgaaggc tcatggcaag aagggtgctg ctgccttcag 600  
 tgagggtctg agtcacctgg acaacctcaa aggcacctt gctaagctga gtgaactgca 660  
 ctgtgacaag ctgcacgccc tagaatcgac ccagcagtaa gtaatacatg taatgcaacc 720  
 tatacaaata gcaatagtag cattagtagt agcaataata atagcaatag ttgtgtggtc 780  
 catagtaatc atagaatata ggaaaatatt aagacaaaga aaaatagaca ggtaattga 840  
 tagactaata gaaagagcag aagacagtgg caatgagagt gaaggagaaa taccagcact 900  
 tgtggagatg ggggtggaga tggggcacca tgctccttgg gatgttgatg atctgtagtg 960  
 ctacagaaaa attgtgggtc acagtctatt atggggtagg gatcaccaga attgtaacgc 1020  
 ttacaatttc cattcgccat tcaggctgcg caactgttgg gaaggcgat cgggtcgggc 1080  
 ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt 1140

ES 2 470 440 A1

aacgccaggg ttttcccagt cacgacgttg taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata 1200  
cgactcacta tagggcgaat tggagctcca ccgcggtggc ggccgctcta gaactagtgg 1260  
atccccggg ctgcaggaat tcgatatcaa gcttatcgat accgtcgacc tcgagggggg 1320  
gcccggtagc cagcttttgt tcccttttgt gagggttaat tgcgcgcttg gcgtaatcat 1380  
ggcatagct gtttcctgtg tgaaattggt atccgctcac aattccacac aacatacgag 1440  
ccggaagcat aaagtgtaaa gcctgggggtg cctaatgagt gagctaactc acattaattg 1500  
cgttgcgctc actgcccgcc atatgataca gaggtacata atgtttgggc cacacatgcc 1560  
gggtgaccca cagaccccaa cccacaagaa gtagtattgg taaatgtgac agaaaatfff 1620  
aacatgtgga aaaatgacat ggtagaacag atgcatgagg atataatcag tttatgggat 1680  
caaagcctaa agccatgtgt aggaaaacta ctttgcacca ctgctgtgcc ttggaatgct 1740  
agttggagta ataaatctct ggaacagatt tggaatcaca cgacctggat ggagtgggac 1800  
agagaaatta acaattacac aaacttaata cactccttaa ttgaagaatc gcaaaaccag 1860  
caagaaaaga atgaacaaga attattggaa ttagataaat gggcaagttt gtggaattgg 1920  
ttaacataa caaattggct gtggtatata aaattattca taatgatagt aggaggcttg 1980  
gtaggtttaa gaatagtttt tgctgtactt tctgtagtga atagagttag gcagggatat 2040  
tcaccatfff cttttcaggc ctggagatct cccgagggga cccgacaggc ccgaaggaat 2100  
agaagaagaa ggtggagaga gagacagaga cagatccatt cgaccaattc actcctcagg 2160  
tgcaggctgc ctatcagaag gtggtggctg gtgtggccaa tgccctggct cacaaatacc 2220  
actgagatcc agacatgata agatacattg atgagtttgg acaaaccaca actagaatgc 2280  
agtgaaaaaa atgctttatt tgtgaaatff gtgatgctat tgctttatff gtaaccatta 2340  
taagctgcaa taaacaagt tacaacaaca attgcattca ttttatgtff caggttcagg 2400  
gggagggtg gagggtttff taaagcaagt aaaacctta caaatgtgg atggctgatt 2460  
atgatcccca ggaagctcct ctgtgtcctc ataaacctta acctcctta cttgagagga 2520  
cattccaatc ataggctgcc catccacct ctgtgtcctc ctgttaatta ggtcacttaa 2580  
caaaaaggaa attgggtagg ggtttttcac agaccgctff ctaagggtaa ttttaaaata 2640  
tctgggaagt cccttcact gctgtgttcc agaagtgtt gtaaacagcc cacaaatgfc 2700  
aacagcagaa acatacaagc tgtcagctff gcacaagggc ccaacacct gctcatcaag 2760  
aagcactgtg gttgctgtgt tagtaatgtg caaaacagga ggcacatfff cccacctgt 2820  
gtaggttcca aaatatctag tgttttcatt tttacttgg tcaggaacct agcactccac 2880  
tgataagca ttatccttat ccaaaacagc cttgtgggtca gtgttcatct gctgactgtc 2940  
aactgtagca ttttttgggg ttacagtttg agcaggatat ttggctcctgt agtttgctaa 3000  
cacaccccag gtggcactff tcggggaaat gtgcgcgga cccctatffg tttatffttc 3060  
taaatacatt caaatatgta tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa 3120  
tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa catttccgtg tcgcccttat tccctttfff 3180  
gcggcattff gccttcctgt ttttgctcac ccagaaacgc tggtgaaagt aaaagatgct 3240



ES 2 470 440 A1

gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg atctcaacag cggtaaagatc 3300  
 cttgagagtt ttcgccccga agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta 3360  
 tgtggcgcgg tattatccccg tattgacgcc gggcaagagc aactcggctc cgcatacac 3420  
 tattctcaga atgacttggt tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc 3480  
 atgacagtaa gagaattatg cagtgctgcc ataaccatga gtgataacac tgcggccaac 3540  
 ttactttctga caacgatcgg aggaccgaat gagctaaccg cttttttgca caacatgggg 3600  
 gatcatgtaa ctcgccttga tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat accaaacgac 3660  
 gagcgtgaca ccacgatgcc tgtagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaact attaactggc 3720  
 gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt 3780  
 gcaggaccac ttctgcgctc ggcccttccg gctggctggg ttattgctga taaatctgga 3840  
 gccgggtgagc gtgggtctcg cggtatcatt gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc 3900  
 cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt caggcaacta tggatgaacg aaatagacag 3960  
 atcgtctgaga taggtgcctc actgattaag cattggtaac tgtcagacca agtttactca 4020  
 tatatacttt agattgattt aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc 4080  
 ctttttgata atctcatgac caaaatcctt aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag 4140  
 accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt ttttctgcg gtaatctgct 4200  
 gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag cggtgggttg tttgccgat caagagctac 4260  
 caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca gataccaat actgttcttc 4320  
 tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg 4380  
 ctctgcta at cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt 4440  
 tggactcaag acgatagtta ccggataagg cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt 4500  
 gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc 4560  
 tatgagaaaag cgccacgctt cccgaagggg gaaaggcggg caggtatccg gtaagcggca 4620  
 gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata 4680  
 gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg 4740  
 ggcgagacct atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttctg gccttttgct 4800  
 ggctttttgc tcacatgttc tttcctgctg tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta 4860  
 ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag 4920  
 tgagcgagga agcgggaagag cgccaatac gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga 4980  
 ttcattaatg cag 4993

<210> 5  
 <211> 7849  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <221> source  
 <222> 1..7849  
 <223> /mol\_type="DNA"  
 /note="Plásmido pSADv5.0 clonado con exones 19, 20, 21, 22, 23 y

ES 2 470 440 A1

24 y secuencias flanqueantes de los intrones 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 24 del gen BRCA2 de Homo sapiens"  
 /organism="Artificial Sequence"

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> join(1..1315,4181..7849)  
 <223> /note="Plásmido pSAD v5.0"

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 1316..4180  
 <223> /note="Exones 19, 20, 21, 22, 23 y 24 y secuencias flanqueantes de los intrones 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 24 del gen BRCA2"

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 1..7849  
 <223> /note="Minigen MGBR2\_EX19-24"

<400> 5  
 ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt 60  
 atgcaaagca tgcattctcaa ttagtcagca accaggtgtg gaaagtcccc aggctcccca 120  
 gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caacatagc cccgcccta 180  
 actccgcca tcccgcccct aactccgcc agttccgcc attctccgcc ccatggctga 240  
 ctaatttttt ttatttatgc agaggccgag gccgcctcgg cctctgagct attccagaag 300  
 tagtgaggag gcttttttgg aggcctaggg ttttgcaaaa aacttgact gtgtttactt 360  
 gcaatcccc aaaacagaca gaatggtgca tctgtccagt gaggagaagt ctgcggtcac 420  
 tgccctgtgg ggcaaggatga atgtggaaga agttggtggg gaggccctgg gcaggctgct 480  
 ggtgtctac ccatggacc agaggttctt cgagtccttt ggggacctgt cctctgcaa 540  
 tgctgttatg aacaatccta aggtgaaggc tcatggcaag aagggtgctgg ctgccttcag 600  
 tgagggctctg agtcacctgg acaacctcaa aggcacctt gctaagctga gtgaactgca 660  
 ctgtgacaag ctgcacgctc tagagtcgac ccagcagtaa gtaatacatg taatgcaacc 720  
 tatacaaata gcaatagtag cattagtagt agcaataata atagcaatag ttgtgtggtc 780  
 catagtaatc atagaatata ggaaaatatt aagacaaaga aaaatagaca ggttaattga 840  
 tagactaata gaaagagcag aagacagtgg caatgagagt gaaggagaaa taccagcact 900  
 tgtggagatg ggggtggaga tggggcacca tgctccttgg gatgttgatg atctgtagt 960  
 ctacagaaaa attgtgggtc acagtctatt atggggtagg gatcaccaga attgtaacgc 1020  
 ttacaatttc cattcgccat tcaggctgcg caactgttgg gaaggcgat cgggtcgggc 1080  
 ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt 1140  
 aacgccaggg ttttcccagt cacgacgttg taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata 1200  
 cgactcacta tagggcgaat tggagctcca ccgcggtggc ggccgctcta gaactagtgg 1260  
 atccccggg ctgcaggaat tcgatataca gcttatcgat accgtcgacc tcgagcacac 1320  
 atccggaata gcattaagaa cttgtagcag tataaacaat atgtttgaga agtactatat 1380  
 tgtgaaaata ttttcacttt tatacagttt ttacttatt tactgtctta ctaatcttcc 1440  
 taagactttt taaagtgaat atttttaagg cagttctaga agaataaaaa ctcttatgat 1500

ES 2 470 440 A1

atctgtaata gaattgaata catatttaac tactaaatca atatatttat taatttgtcc 1560  
 agatttctgc taacagtact cggcctgctc gctggatac caaacttggg ttctttcctg 1620  
 accctagacc ttttcctctg cccttatcat cgcttttcag tgatggagga aatgttgggt 1680  
 gtgttgatgt aattattcaa agagcatacc ctatacaggt atgatgtatt cttgaaactt 1740  
 accatataatt tctttctttt gatacaatta atttgtttgt ttgtttgaga tggagtttctg 1800  
 gtctcttgcc caggctggag tgcaatggcg tgatcttggg tcaactgcagc ctccacctcc 1860  
 cgggttcaag tgattctcct gcctcagcct ctcaagtagc tgagccacca cacctggcta 1920  
 attttgtatt tttggtagag aaggggtttc atcatgttgg tcaggctgat ctcgaactcc 1980  
 tgacctcagg tgatccacta atctcagcct ccaaagttc tgggattaca gatgtgagcc 2040  
 actgtgcctg gcctgataca attaacttga atgttatata tgtgactttt ttgggtgtgtg 2100  
 taacacatta ttacagtgga tggagaagac atcatctgga ttatacatat ttcgcaatga 2160  
 aagagaggaa gaaaaggaag cagcaaaaata tgtggaggcc caacaaaaga gactagaagc 2220  
 cttattcact aaaattcagg aggaatttga agaacatgaa ggtaaaatta gttatatggt 2280  
 acacattggt attttctaata tgagaacaaa gtcttagaga ctttgaattt aacattttta 2340  
 atgagtaaat tgtttttatt ttgagtagta aattgacttt attttttagt atctagggta 2400  
 ttcttttttg gtgttagaca aagaatagca acaagggaca gaaatatcag gtctaagcca 2460  
 tttgtaatcc ttctttgggt gttttatgct tggttcttta gtttttagttg cttttgaatt 2520  
 tacagtttag tgaattaata atccttttgt tttcttagaa aacacaaca aacctatatt 2580  
 accatcacgt gcaactaaca gacagcaagt tcgtgctttg caagatggtg cagagcttta 2640  
 tgaagcagtg aagaatgcag cagaccagc ttaccttgag gtgagagagt aagaggacat 2700  
 ataatgaggc ttgatgatta ttcaaggatga gaagctgttt tagactctct ggccatcaca 2760  
 ggaaggagta tgttgaaatg ctgcatttct caaaagggat gtgtacattt ctgggatttt 2820  
 cagtgatgtg ccagacgagt gtggtggtat gttttcaact atataccgag tagaggatgg 2880  
 gagggttcta gaattttata tattaattaa atttggttta aaatgcaggc aaaacttggt 2940  
 tttagccatc tgtaatgtag ttggtgatga ttatgattat tagagtacat ttataattgg 3000  
 aggatcattt ttgccgtagg gaaatagaat tattaatagt ttgaggcacc tgagaatatt 3060  
 atgtgagaaa ctgattacat taaccacacc ctaagatga gctctaattt tgttgtattt 3120  
 gtcctgttta aagccatcta gttacaatag atggaacttt tttgttctga ttgcttttta 3180  
 ttccaatatc ttaaattggtc acagggttat ttcagtgaag agcagttaag agccttgaat 3240  
 aatcacaggc aaatgttgaa tgataagaaa caagctcaga tccagttgga aattaggaag 3300  
 gccatggaat ctgctgaaca aaaggaacaa ggtttatcaa gggatgtcac aaccgtgtgg 3360  
 aagttgcgta ttgtaagcta ttcaaaaaaa gaaaaagatt caggtaagta tgtaaatgct 3420  
 ttgtttttat cagttttatt aacttaaaaa atgaccttac taacaaaatg attataaatc 3480  
 cagataaagt ataaagttag tttatatcag agaagcaaaa tccactacta atgcccacaa 3540  
 agagataata taaaagagga tctgtattta ttttgaaca aacatttaa tgataatcac 3600  
 ttcttccatt gcacttttct catcttttct caaacagtta tactgagtat ttggcgtcca 3660

ES 2 470 440 A1

tcacagatt	tatattctct	gttaacagaa	ggaaagagat	acagaattta	tcaccttgca	3720
acttcaaaat	ctaaaagtaa	atctgaaaga	gctaacatac	agttagcagc	gacaaaaaaa	3780
actcagtatc	aacaactacc	ggtacaaacc	tttcattgta	atTTTTcagt	tttgataagt	3840
gcttgtagt	ttatggaatc	tccatatggt	gaatTTTTgt	tttgTTTTct	gtaggTTTTca	3900
gatgaaatTT	tatttcagat	ttaccagcca	cgggagcccc	ttcacttcag	caaatTTTTa	3960
gatccagact	ttcagccatc	ttgttctgag	gtggacctaa	taggatttgt	cgTTTTctggt	4020
gtgaaaaaaa	caggtaatgc	acaatatagt	taatTTTTtt	tattgattct	tttaaaaaac	4080
attgtctttt	aaaatctctt	atgattagtt	ggagctacca	gttggcaaat	ttgctagcta	4140
actagtgatc	tgaaagtaag	cctctttgaa	cctctgattt	ggtaccagc	TTTTgttccc	4200
TTTTgtgagg	gttaattgcg	cgcttggcgt	aatcatggtc	atagctgttt	cctgtgtgaa	4260
attgttatcc	gctcacaatt	ccacacaaca	tacgagccgg	aagcataaag	tgtaaagcct	4320
ggggtgccta	atgagtgagc	taactcacat	taattgctgt	gcgctcactg	cccgccatat	4380
gatacagagg	tacataatgt	ttgggccaca	catgccggtg	taccacaga	ccccaaccca	4440
caagaagtag	tattggtaaa	tgtgacagaa	aattttaaca	tgtggaaaa	tgacatggta	4500
gaacagatgc	atgaggatat	aatcagttta	tgggatcaaa	gcctaaagcc	atgtgtagga	4560
aaactacttt	gcaccactgc	tgtgccttgg	aatgctagtt	ggagtaataa	atctctggaa	4620
cagatttggg	atcacacgac	ctggatggag	tgggacagag	aaattaacaa	ttacacaaac	4680
ttaatacact	ccttaattga	agaatcgcaa	aaccagcaag	aaaagaatga	acaagaatta	4740
ttggaattag	ataaatgggc	aagtttgtgg	aattggttta	acataacaaa	ttggctgtgg	4800
tatataaaat	tattcataat	gatagtagga	ggcttggtag	gtttaagaat	agTTTTtgc	4860
gtactttctg	tagtgaatag	agttaggcag	ggatattcac	cattttcttt	tcaggcctgg	4920
agatctcccg	aggggacccg	acaggccccg	aggaatagaa	gaagaagggtg	gagagagaga	4980
cagagacaga	tccattcgac	caattcactc	ctcaggtgca	ggctgcctat	cagaagggtg	5040
tggctggtgt	ggccaatgcc	ctggctcaca	aataccactg	agatccagac	atgataagat	5100
acattgatga	gtttggacaa	accacaacta	gaatgcagtg	aaaaaatgc	tttatttgtg	5160
aaatttgtga	tgctattgct	ttatttgtaa	ccattataag	ctgcaataaa	caagttaaca	5220
acaacaattg	cattcatttt	atgtttcagg	ttcaggggga	ggtgtgggag	gttttttaa	5280
gcaagtaaaa	cctctacaaa	tgtggtatgg	ctgattatga	tcccaggaa	gctcctctgt	5340
gtcctcataa	accctaacct	cctctacttg	agaggacatt	ccaatcatag	gctgccccatc	5400
caccctctgt	gtcctcctgt	taattaggtc	acttaacaaa	aaggaaattg	ggtagggggt	5460
tttcacagac	cgctttctaa	gggtaatTTT	aaaatatctg	ggaagtccct	tccactgctg	5520
tgttccagaa	gtgttggtaa	acagcccaca	aatgtcaaca	gcagaaacat	acaagctgtc	5580
agctttgcac	aagggcccaa	caccctgctc	atcaagaagc	actgtgggtg	ctgtgttagt	5640
aatgtgcaaa	acaggaggca	cattttcccc	acctgtgtag	gttccaaaat	atctagtgtt	5700
ttcattttta	cttggatcag	gaaccagca	ctccactgga	taagcattat	ccttatccaa	5760

ES 2 470 440 A1

aacagccttg tggtcagtgt tcatctgctg actgtcaact gtagcatttt ttggggttac 5820  
agtttgagca ggatatttgg tcctgtagtt tgctaacaca cccaggtgg cacttttcgg 5880  
ggaaatgtgc gcggaacccc tatttgttta tttttctaaa tacattcaa tatgtatccg 5940  
ctcatgagac aataaccctg ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt 6000  
attcaacatt tccgtgtcgc cttattccc tttttgctg cattttgcct tcctgttttt 6060  
gctcaccag aaacgctggt gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcacgagtg 6120  
ggttacatcg aactggatct caacagcggg aagatccttg agagttttcg ccccgaagaa 6180  
cgttttccaa tgatgagcac ttttaaagtt ctgctatgtg gcgctgtatt atcccgtatt 6240  
gacgccgggc aagagcaact cggctcggc atacactatt ctcagaatga cttggttgag 6300  
tactcaccag tcacagaaaa gcatcttacg gatggcatga cagtaagaga attatgcagt 6360  
gctgccataa ccatgagtga taacactgcg gccaaacttac ttctgacaac gatcggagga 6420  
ccgaatgagc taaccgcttt ttgacacaac atgggggatc atgtaactcg cttgatcgt 6480  
tgggaaccgg agctgaatga agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgta 6540  
gcaatggcaa caacgttgcg caaactatta actggcgaac tacttactct agcttcccgg 6600  
caacaattaa tagactggat ggaggcggat aaagtgcag gaccacttct gcgctcggcc 6660  
cttccggctg gctggtttat tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcggt 6720  
atcattgcag cactggggcc agatggtaag ccctcccgtg tcgtagttat ctacacgacg 6780  
gggagtcagg caactatgga tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg 6840  
attaagcatt ggtaactgtc agaccaagtt tactcatata tactttagat tgatttaaaa 6900  
cttcattttt aatttaaaag gatctaggtg aagatccttt ttgataatct catgacaaa 6960  
atccttaacg tgagttttcg ttccactgag cgtcagacc cgtagaaaag atcaaaggat 7020  
cttcttgaga tccttttttt ctgctgctaa tctgctgctt gcaaacaaaa aaaccaccgc 7080  
taccagcggg ggtttgtttg ccggatcaag agctaccaac tctttttccg aaggtaactg 7140  
gcttcagcag agcgcagata ccaaatactg ttcttctagt gtagccgtag ttaggccacc 7200  
acttcaagaa ctctgtagca ccgcctacat acctcgtct gctaactctg ttaccagtgg 7260  
ctgctgccag tggcgataag tcgtgtctta ccgggttggg ctcaagacga tagttaccgg 7320  
ataaggcgcg gcggtcgggc tgaacggggg gttcgtgcac acagcccagc ttggagcgaa 7380  
cgacctacac cgaactgaga tacctacagc gtgagctatg agaaagcgc acgcttcccg 7440  
aaggagaaaa ggcggacagg tatccggtaa gcggcagggg cggaacagga gagcgcacga 7500  
gggagcttcc agggggaaac gcctggtatc tttatagtcc tgtcgggttt cgccacctct 7560  
gacttgagcg tcgatttttg tgatgctcgt caggggggcg gagcctatgg aaaaacgcca 7620  
gcaacgcggc ctttttacgg ttcttggcct tttgctggcc ttttgctcac atgttctttc 7680  
ctgcgttatc ccctgattct gtggataacc gtattaccgc ctttgagtga gctgataccg 7740  
ctcgcgcag ccgaacgacc gagcgcagcg agtcagtgag cgaggaagcg gaagagcgc 7800  
caatacga accgcctct cccgcgcgtt ggccgattca ttaatgcag 7849

ES 2 470 440 A1

```

<210> 6
<211> 8796
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..8796
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Plásmido pSAD v5.0 clonado con exones 19, 20, 21, 22, 23,
      24 y 25 y secuencias flanqueantes de los intrones 18, 19, 20, 21,
      22, 23, 24 y 25 del gen BRCA2 de Homo sapiens"
      /organism="Artificial Sequence"

<220>
<221> misc_feature
<222> 1316..5127
<223> /note="Exones 19, 20, 21, 22, 23, 24 y 25 y secuencias
      flanqueantes de los intrones 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 y 25 del
      gen BRCA2"

<220>
<221> misc_feature
<222> join(1..1315,5128..8796)
<223> /note="Plásmido pSAD v5.0"

<220>
<221> misc_feature
<222> 1..8796
<223> /note="Minigen MGBR2_EX19-25"

<400> 6
ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt      60
atgcaaagca tgcattctcaa ttagtcagca accaggtgtg gaaagtcccc aggctcccca      120
gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caacatagc cccgcccta      180
actccgcca tcccgcccct aactccgcc agttccgcc attctccgcc ccatggctga      240
ctaatttttt ttatttatgc agaggccgag gccgcctcgg cctctgagct attccagaag      300
tagtgaggag gcttttttgg aggcctaggg ttttgcaaaa aacttggact gtgtttactt      360
gcaatcccc aaaacagaca gaatggtgca tctgtccagt gaggagaagt ctgcggtcac      420
tgccctgtgg ggcaaggatg atgtggaaga agttggtggt gaggccctgg gcaggctgct      480
ggttgtctac ccatggacc agaggttctt cgagtccttt ggggacctgt cctctgcaa      540
tgctgttatg aacaatccta aggtgaaggc tcatggcaag aagggtgctgg ctgccttcag      600
tgagggctct agtcacctgg acaacctcaa aggcacctt gctaagctga gtgaactgca      660
ctgtgacaag ctgcacgctc tagagtcgac ccagcagtaa gtaatacatg taatgcaacc      720
tatacaata gcaatagtag cattagtagt agcaataata atagcaatag ttgtgtggtc      780
catagtaatc atagaatata ggaaaatatt aagacaaaga aaaatagaca ggttaattga      840
tagactaata gaaagagcag aagacagtgg caatgagagt gaaggagaaa taccagcact      900
tgtggagatg ggggtggaga tggggcacca tgctccttgg gatgttgatg atctgtagt      960
ctacagaaaa attgtgggtc acagtctatt atggggtagg gatcaccaga attgtaacgc      1020
ttacaatttc cattcgccat tcaggctgcg caactgttgg gaagggcgat cgggtcgggc      1080
ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt      1140
aacgccaggg ttttcccagt cacgacgttg taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata      1200

```

ES 2 470 440 A1

cgactcacta tagggcgaat tggagctcca ccgcggtggc ggccgctcta gaactagtgg 1260  
 atccccggg ctgcaggaat tcgatatcaa gcttatcgat accgtcgacc tcgagcacac 1320  
 atccggaata gcattaagaa cttgtagcag tataaacaat atgtttgaga agtactatat 1380  
 tgtgaaaata ttttcacttt tatacagttt tttacttatt tactgtctta ctaatcttcc 1440  
 taagactttt taaagtgaat atttttaagg cagttctaga agaatgaaa ctcttatgat 1500  
 atctgtaata gaattgaata catatttaac tactaaatca atatatttat taatttgtcc 1560  
 agatttctgc taacagtact cggcctgctc gctggatac caaacttga ttctttcctg 1620  
 accctagacc ttttcctctg cccttatcat cgcttttcag tgatggagga aatgttggtt 1680  
 gtgttgatgt aattattcaa agagcatacc ctatacaggt atgatgtatt cttgaaactt 1740  
 accatatatt tctttctttt gatacaatta atttgtttgt ttgtttgaga tggagtttctg 1800  
 gtctcttgcc caggctggag tgcaatggcg tgatcttggg tcaactgcagc ctccacctcc 1860  
 cgggttcaag tgattctcct gcctcagcct ctcaagtagc tgagccacca cacctggcta 1920  
 attttgtatt tttggtagag aaggggtttc atcatgttgg tcaggctgat ctcgaactcc 1980  
 tgacctcagg tgatccacta atctcagcct ccaaagttc tgggattaca gatgtgagcc 2040  
 actgtgcctg gcctgataca attaacttga atgttatata tgtgactttt ttggtgtgtg 2100  
 taacacatta ttacagtgga tggagaagac atcatctgga ttatacatat ttcgcaatga 2160  
 aagagaggaa gaaaaggaag cagcaaaaata tgtggaggcc caacaaaaga gactagaagc 2220  
 cttattcact aaaattcagg aggaatttga agaacatgaa ggtaaaatta gttatatggt 2280  
 acacattggt attttctaata tgagaacaaa gtcttagaga ctttgaattt aacattttta 2340  
 atgagtaa at tgtttttatt ttgagtagta aattgacttt attttttagt atctagggta 2400  
 ttcttttttg gtgttagaca aagaatagca acaagggaca gaaatatcag gtctaagcca 2460  
 tttgtaatcc ttctttgggt gttttatgct tggttcttta gtttttagttg cttttgaatt 2520  
 tacagtttag tgaattaata atccttttgt tttcttagaa aacacaaca aacctatatt 2580  
 accatcacgt gcaactaaca gacagcaagt tcgtgctttg caagatggtg cagagcttta 2640  
 tgaagcagtg aagaatgcag cagaccagc ttaccttgag gtgagagagt aagaggacat 2700  
 ataatgaggc ttgatgatta ttcaaggtga gaagctgttt tagactctct ggccatcaca 2760  
 ggaaggagta tgttgaaatg ctgcatttct caaaagggat gtgtacattt ctgggatttt 2820  
 cagtgatgtg ccagacgagt gtggtggtat gtttcaact atataccgag tagaggatgg 2880  
 gagggttcta gaattttata tattaattaa atttggttta aatgcaggc aaaacttggt 2940  
 tttagccatc tgtaatgtag ttggtgatga ttatgattat tagagtacat ttataattgg 3000  
 aggatcattt ttgccgtagg gaaatagaat tattaatagt ttgaggcacc tgagaatatt 3060  
 atgtgagaaa ctgattacat taaccacacc cttaatagta gctctaattt tgttgtattt 3120  
 gtcctgttta aagccatcta gttacaatag atggaacttt tttgttctga ttgcttttta 3180  
 ttccaatatc ttaa atggtc acagggttat ttcagtgaag agcagttaag agccttgaat 3240  
 aatcacaggc aaatgttgaa tgataagaaa caagctcaga tccagttgga aattaggaag 3300

ES 2 470 440 A1

gccatggaat ctgctgaaca aaaggaacaa ggtttatcaa gggatgtcac aaccgtgtgg 3360  
aagttgcgta ttgtaagcta ttcaaaaaaa gaaaaagatt caggtaagta tgtaaatgct 3420  
ttgtttttat cagttttatt aacttaaaaa atgaccttac taacaaaatg attataaatc 3480  
cagataaagt ataaagttag tttatatcag agaagcaaaa tccactacta atgccacaaa 3540  
agagataata taaaagagga tctgtattta ttttgaaaca aacatttaa tgataatcac 3600  
ttcttccatt gcatctttct catctttctc caaacagtta tactgagtat ttggcgcca 3660  
tcatcagatt tatattctct gttaacagaa ggaaagagat acagaattta tcatcttgca 3720  
acttcaaaat ctaaaagtaa atctgaaaga gctaacatac agttagcagc gacaaaaaaa 3780  
actcagtatc aacaactacc ggtacaaacc tttcattgta atttttcagt tttgataagt 3840  
gcttgttagt ttatggaatc tccatatgtt gaatttttgt tttgttttct gtaggtttca 3900  
gatgaaatth tatttcagat ttaccagcca cgggagcccc ttcacttcag caaattttta 3960  
gatccagact ttcagccatc ttgttctgag gtggacctaa taggatttgt cgtttctggt 4020  
gtgaaaaaaaa caggtaatgc acaatatagt taattttttt tattgattct tttaaaaaac 4080  
attgtctttt aaaatctctt atgattagtt ggagctacca gttggcaaat ttgctagcta 4140  
actagtgatc tgaaagtaag cctctttgaa cctctgattt aatctgtact cctgttagca 4200  
atgtgtgctg atacctgctt ccacatgacc tcagtaaaag aatgtgttgt catattggta 4260  
ttgaaattht agcactgtaa gcaacaggtc attttgaaa acctgagctt tcgccaatt 4320  
cagctattht gatttgcttt tattattagc atataccaaa ataaataggc atattagagt 4380  
ttccttttct gcatcttaaa attcatctaa cacatctata ataacattct tttctttttt 4440  
ttcatttcta ggacttgccc ctttctgcta tttgtcagac gaatgttaca atttactggc 4500  
aataaagtht tggatagacc ttaatgagga cattattaag cctcatatgt taattgctgc 4560  
aagcaacctc cagtggcgac cagaatccaa atcaggcctt cttactttat ttgctggaga 4620  
tttttctgtg ttttctgcta gtccaaaaga gggccacttt caagagacat tcaacaaaat 4680  
gaaaaatact gttgaggtaa ggttactttt cagcatcacc acacattttg gtatttttct 4740  
atthtgacag tccagtatca aggaaatagc ttttatacaa attggatagt tgaggtagta 4800  
tgtgaggtaa agtttaataca tatattaatt gccatgaac ctcaggagat gggggaatgg 4860  
ggaaatgaca gcaactagaa agagaagaat gacttgaagg gaaatgagtt aggagaaatt 4920  
gtgagaagga tgttcagaaa tgcagacttt gtaagcaaac tggaaattgg ttacaagaat 4980  
aatatgagtt atctgtggtt tgcagcagtc agcagtgtga ttagttaata atatagagac 5040  
tacaggthta catttaaaact ccatatctag tgttttatac agattatatt tctttgactt 5100  
gatttaatcc cagataagag aactgaggtt accagctttt tgttcccttt tgtgagggtt 5160  
aattgcgcgc ttggcgtaat catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgct 5220  
cacaattcca cacacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaattg 5280  
agtgagctaa ctcacattaa ttgcgttgcg ctactgccc gccatatgat acagaggtag 5340  
ataatgthtg ggccacacat gccggtgtac ccacagacc caaccacaa gaagtagtat 5400  
tggtaaatgt gacagaaaat ttaacatgt ggaaaaatga catggtagaa cagatgcatg 5460



ES 2 470 440 A1

aggatataat cagtttatgg gatcaaagcc taaagccatg tgtaggaaaa ctactttgca 5520  
 cactgctgt gccttggaat gctagttgga gtaataaatc tctggaacag atttggaatc 5580  
 acacgacctg gatggagtgg gacagagaaa ttaacaatta cacaaactta atacactcct 5640  
 taattgaaga atcgcaaaac cagcaagaaa agaataaaca agaattattg gaattagata 5700  
 aatgggcaag tttgtggaat tggtttaaca taacaaattg gctgtggtat ataaaattat 5760  
 tcataatgat agtaggaggc ttggtaggtt taagaatagt ttttgctgta ctttctgtag 5820  
 tgaatagagt taggcagggg tattcaccat tttctttca ggcttgaga tctcccagg 5880  
 ggacccgaca ggcccgaagg aatagaagaa gaaggtggag agagagacag agacagatcc 5940  
 attcgaccaa ttcactcctc aggtgcaggc tgcctatcag aaggtggtgg ctggtgtggc 6000  
 caatgccctg gctcaciaat accactgaga tccagacatg ataagataca ttgatgagtt 6060  
 tggacaaacc acaactagaa tgcagtgaaa aaaatgcttt atttgtgaaa tttgtgatgc 6120  
 tattgcttta tttgtaacca ttataagctg caataaaca gttaacaaca acaattgcat 6180  
 tcattttatg tttcaggttc agggggagggt gtgggagggt ttttaaagca agtaaacct 6240  
 ctacaaatgt ggtatggctg attatgatcc ccaggaagct cctctgtgtc ctacaaacc 6300  
 ctaacctcct ctacttgaga ggacattcca atcataggct gcccatccac cctctgtgtc 6360  
 ctctgttaa ttaggtcact taacaaaaag gaaattgggt aggggttttt cacagaccgc 6420  
 tttctaaggg taattttaaa atatctggga agtcccttc actgctgtgt tccagaagtg 6480  
 ttggtaaaca gccacaaat gtcaacagca gaaacataca agctgtcagc tttgcacaag 6540  
 ggcccaacac cctgctcatc aagaagcact gtggttgctg tgttagtaat gtgcaaaaca 6600  
 ggaggcacat tttccccacc tgtgtaggtt ccaaaatc tagtgtttc attttactt 6660  
 ggatcaggaa cccagcactc cactggataa gcattatcct tatccaaaac agccttgtgg 6720  
 tcagtgttca tctgctgact gtcaactgta gcattttttg gggttacagt ttgagcagga 6780  
 tatttggctc ttagtattgc taacacaccc caggtggcac ttttcgggga aatgtgctgcg 6840  
 gaaccctat ttgtttattt ttctaaatac attcaaatac gtatccgctc atgagacaat 6900  
 aaccctgata aatgcttcaa taatattgaa aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc 6960  
 gtgtcgcctt tattcccttt tttgcggcat tttgccttc tgtttttgct caccagaaa 7020  
 cgctggtgaa agtaaaaagat gctgaagatc agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaac 7080  
 tggatctcaa cagcggtaag atccttgaga gtttcgccc cgaagaacgt tttccaatga 7140  
 tgagcacttt taaagtctg ctatgtggcg cggattatc ccgtattgac gccgggcaag 7200  
 agcaactcgg tcgccgata cactattctc agaatgactt ggttgagtac tcaccagtca 7260  
 cagaaaagca tcttacggat ggcatgacag taagagaatt atgcagtgct gccataacca 7320  
 tgagtgataa cactgcggcc aacttacttc tgacaacgat cggaggaccg aatgagctaa 7380  
 ccgctttttt gcacaacatg ggggatcatg taactcgcct tgatcgttgg gaaccggagc 7440  
 tgaatgaagc cataccaaac gacgagcgtg acaccacgat gcctgtagca atggcaaca 7500  
 cgttgcgcaa actattaact ggcgaactac ttactctagc ttcccggcaa caattaatag 7560

ES 2 470 440 A1

actggatgga ggcggataaa gttgcaggac cacttctgcg ctcggccctt cgggctggct 7620  
 ggtttattgc tgataaatct ggagccggtg agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac 7680  
 tggggccaga tggtaaagccc tcccgtatcg tagttatcta cacgacgggg agtcaggcaa 7740  
 ctatggatga acgaaataga cagatcgctg agataggtgc ctactgatt aagcattggt 7800  
 aactgtcaga ccaagtttac tcatatatac tttagattga tttaaaactt catttttaat 7860  
 ttaaaaggat ctaggtgaag atcctttttg ataatctcat gaccaaatac cttaacgtga 7920  
 gttttcgttc cactgagcgt cagacccccgt agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc 7980  
 tttttttctg cgcgtaaatct gctgcttgca aacaaaaaaaa ccaccgctac cagcggtggt 8040  
 ttgtttgccg gatcaagagc taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc 8100  
 gcagatacca aatactgttc ttctagtgtg gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc 8160  
 tgtagcaccg cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg 8220  
 cgataagtcg tgtcttaccg ggttggtactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg 8280  
 gtcgggctga acgggggggtt cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga cctacaccga 8340  
 actgagatac ctacagcgtg agctatgaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc 8400  
 ggacaggtat ccggtaaagc gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttcagg 8460  
 gggaaacgcc tggatcttt atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg 8520  
 atttttgtga tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcccctt 8580  
 tttacggttc ctggcctttt gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg cgttatcccc 8640  
 tgattctgtg gataaccgta ttaccgcctt tgagttagct gataccgctc gccgcagccg 8700  
 aacgaccgag cgcagcgagt cagttagcga ggaagcgga gagcgccaa tacgcaaacc 8760  
 gcctctcccc gcgcgttggc cgattcatta atgcag 8796

<210> 7  
 <211> 9628  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <221> source  
 <222> 1..9628  
 <223> /mol\_type="DNA"  
 /note="Plásmido pSAD v5.0 clonado con exones 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 y 26 y secuencias flanqueantes de los intrones 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 y 26 del gen BRCA2 de Homo sapiens"  
 /organism="Artificial Sequence"

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 1316..5959  
 <223> /note="Exones 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 y 26 y secuencias flanqueantes de los intrones 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 y 26 del gen BRCA2"

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> join(1..1315,5960..9628)  
 <223> /note="Plásmido pSAD v5.0"

<220>  
 <221> misc\_feature

ES 2 470 440 A1

<222> 1..9628

<223> /note="Minigen MGBR2\_EX19-26"

<400> 7

ctgtggaatg	tgtgtcagtt	agggtgtgga	aagtccccag	gctccccagc	aggcagaagt	60
atgcaaagca	tgcatctcaa	ttagtcagca	accagggtgtg	gaaagtcccc	aggctccccca	120
gcaggcagaa	gtatgcaaag	catgcatctc	aattagtcag	caaccatagt	cccgccccta	180
actccgcca	tcccgcccct	aactccgccc	agttccgccc	attctccgcc	ccatggctga	240
ctaatttttt	ttatttatgc	agaggccgag	gccgcctcgg	cctctgagct	attccagaag	300
tagtgaggag	gcttttttgg	aggcctaggg	ttttgcaaaa	aacttgact	gtgtttactt	360
gcaatcccc	aaaacagaca	gaatggtgca	tctgtccagt	gaggagaagt	ctgcggtcac	420
tgccctgtgg	ggcaagggtga	atgtggaaga	agttggtggt	gaggccctgg	gcaggctgct	480
ggttgtctac	ccatggacc	agaggttctt	cgagtccttt	ggggacctgt	cctctgcaaa	540
tgctgttatg	aacaatccta	agggtgaaggc	tcatggcaag	aagggtctgg	ctgccttcag	600
tgagggctctg	agtcacctgg	acaacctcaa	aggcaccttt	gctaagctga	gtgaactgca	660
ctgtgacaag	ctgcacgctc	tagagtcgac	ccagcagtaa	gtaatacatg	taatgcaacc	720
tatacaaata	gcaatagtag	cattagtagt	agcaataata	atagcaatag	ttgtgtggtc	780
catagtaatc	atagaatata	ggaaaatatt	aagacaaaga	aaaatagaca	ggttaattga	840
tagactaata	gaaagagcag	aagacagtgg	caatgagagt	gaaggagaaa	tatcagcact	900
tgtggagatg	ggggtggaga	tggggcacca	tgctccttgg	gatgttgatg	atctgtagtg	960
ctacagaaaa	attgtgggtc	acagtctatt	atggggtagg	gatcaccaga	attgtaacgc	1020
ttacaatttc	cattcgccat	tcaggctgcg	caactgttgg	gaaggcgat	cggtgcgggc	1080
ctcttcgcta	ttacgccagc	tggcgaaagg	gggatgtgct	gcaaggcgat	taagttgggt	1140
aacgccaggg	ttttcccagt	cacgacgttg	taaaacgacg	gccagtgagc	gcgcgtaata	1200
cgactcacta	tagggcgaat	tggagctcca	ccgcggtggc	ggccgctcta	gaactagtg	1260
atccccggg	ctgcaggaat	tcgatatcaa	gcttatcgat	accgtcgacc	tcgagcacac	1320
atccggaata	gcattaagaa	cttgtagcag	tataaacaat	atgtttgaga	agtactatat	1380
tgtgaaaata	ttttcacttt	tatacagttt	tttacttatt	tactgtctta	ctaactttcc	1440
taagactttt	taaagtgaat	atttttaagg	cagttctaga	agaatgaaa	ctcttatgat	1500
atctgtaata	gaattgaata	catatttaac	tactaaatca	atatatttat	taatttgtcc	1560
agatttctgc	taacagtact	cggcctgctc	gctggtatac	caaacttgg	ttctttcctg	1620
accctagacc	ttttcctctg	cccttatcat	cgcttttcag	tgatggagga	aatgttgggt	1680
gtgttgatgt	aattattcaa	agagcatacc	ctatacaggt	atgatgtatt	cttgaactt	1740
accatatatt	tctttctttt	gatacaatta	atgtgttgg	ttgtttgaga	tggagtttcg	1800
gtctcttgcc	caggctggag	tgcaatggcg	tgatcttgg	tactgcagc	ctccacctcc	1860
cgggttcaag	tgattctcct	gcctcagcct	ctcaagtagc	tgagccacca	cacctggcta	1920
attttgtatt	tttggtagag	aaggggtttc	atcatgttgg	tcaggctgat	ctcgaactcc	1980
tgacctcagg	tgatccacta	atctcagcct	cccaaagttc	tgggattaca	gatgtgagcc	2040

ES 2 470 440 A1

actgtgcctg gcctgataca attaacttga atgttatata tgtgactttt ttggtgtgtg 2100  
 taacacatta ttacagtgga tggagaagac atcatctgga ttatacatat ttcgcaatga 2160  
 aagagaggaa gaaaaggaag cagcaaaata tgtggaggcc caacaaaaga gactagaagc 2220  
 cttattcact aaaattcagg aggaatttga agaacatgaa ggtaaaatta gttatatggt 2280  
 acacattggt attttctaata tgagaacaaa gtcttagaga ctttgaattt aacattttta 2340  
 atgagtaaat tgtttttatt ttgagtagta aattgacttt attttttagt atctagggta 2400  
 ttcttttttg gtgtagaca aagaatagca acaagggaca gaaatatcag gtctaagcca 2460  
 tttgtaatcc ttctttgggt gttttatgct tggttcttta gtttttagttg cttttgaatt 2520  
 tacagtttag tgaattaata atccttttgt tttcttagaa aacacaaca aacctatatt 2580  
 accatcacgt gcaactaaca gacagcaagt tcgtgctttg caagatggtg cagagcttta 2640  
 tgaagcagtg aagaatgcag cagaccagc ttaccttgag gtgagagagt aagaggacat 2700  
 ataatgaggc ttgatgatta ttcaaggatga gaagctgttt tagactctct ggccatcaca 2760  
 ggaaggagta tgttgaaatg ctgcatttct caaaagggat gtgtacattt ctgggatttt 2820  
 cagtgatgtg ccagacgagt gtggtggtat gttttcaact atataccgag tagaggatgg 2880  
 gagggttcta gaattttata tattaattaa atttggttta aaatgcaggc aaaacttggt 2940  
 tttagccatc tgtaatgtag ttggtgatga ttatgattat tagagtacat ttataattgg 3000  
 aggatcattt ttgccgtagg gaaatagaat tattaatagt ttgaggcacc tgagaatatt 3060  
 atgtgagaaa ctgattacat taaccacacc ctaagatga gctctaattt tgttgtattt 3120  
 gtctgttta aagccatcta gttacaatag atggaacttt tttgttctga ttgcttttta 3180  
 ttccaatatc ttaaagtgtc acagggttat ttcagtgaag agcagttaag agccttgaat 3240  
 aatcacaggc aaatgttgaa tgataagaaa caagctcaga tccagttgga aattaggaag 3300  
 gccatggaat ctgctgaaca aaaggaacaa ggtttatcaa gggatgtcac aaccgtgtgg 3360  
 aagttgcgta ttgtaagcta ttcaaaaaaa gaaaagatt caggtaagta tgtaaatgct 3420  
 ttgtttttat cagttttatt aacttaaaaa atgaccttac taacaaaatg attataaatc 3480  
 cagataaagt ataaagttag tttatatcag agaagcaaaa tccactacta atgccacaaa 3540  
 agagataata taaaagagga tctgtattta ttttgaaaca aacatttaa tgataatcac 3600  
 ttcttccatt gcatctttct catctttctc caaacagtta tactgagtat ttggcgtcca 3660  
 tcatcagatt tatattctct gttaacagaa ggaaagagat acagaattta tcatcttgca 3720  
 acttcaaaat ctaaaagtaa atctgaaaga gctaacatac agttagcagc gacaaaaaa 3780  
 actcagtatc aacaactacc ggtacaaacc tttcattgta atttttcagt tttgataagt 3840  
 gcttgttagt ttatggaatc tccatatggt gaatttttgt tttgttttct gtaggtttca 3900  
 gatgaaattt tatttcagat ttaccagcca cgggagcccc ttcacttcag caaattttta 3960  
 gatccagact ttcagccatc ttgttctgag gtggacctaa taggatttgt cgtttctggt 4020  
 gtgaaaaaaa caggtaatgc acaatatagt taattttttt tattgattct tttaaaaaac 4080  
 attgtctttt aaaatctctt atgattagtt ggagctacca gttggcaaat ttgctagcta 4140

ES 2 470 440 A1

actagtgatc tgaaagtaag cctctttgaa cctctgattt aatctgtact cctgttagca 4200  
 atgtgtgCGT atacctgctt ccacatgacc tcagtaaaag aatgtgttGT catattggta 4260  
 ttgaaatTTT agcactgtaa gcaacaggtc atTTTggaaa acctgagctt tcgCCaaatt 4320  
 cagctatTTT gatttgcttt tattattagc atataccaaa ataaataggc atattagagt 4380  
 TTCctttctt gcatcttaaa attcatctaa cacatctata ataacattct tttctTTTT 4440  
 ttccattcta ggacttgccc ctttcgtcta tttgtcagac gaatgttaca atttactggc 4500  
 aataaagTTT tggatagacc ttaatgagga cattattaag cctcatatgt taattgctgc 4560  
 aagcaacctc cagtggcgac cagaatccaa atcaggcctt cttactttat ttgctggaga 4620  
 tttttctgtg ttttctgcta gtccaaaaga gggccacttt caagagacat tcaacaaaat 4680  
 gaaaaaact gttgaggtaa ggttactttt cagcatcacc acacattttg gtatttttct 4740  
 atTTTgacag tccagtatca aggaaatagc ttttatacaa attggatagt tgaggtagta 4800  
 tgtgaggtaa agtttaataca tatattaatt gcccatgaac ctcaggagat gggggaatgg 4860  
 ggaaatgaca gcaactagaa agagaagaat gacttgaagg gaaatgagtt aggagaaatt 4920  
 gtgagaagga tgttcagaaa tgcagacttt gtaagcaaac tggaaattgg ttacaagaat 4980  
 aatatgagtt atctgtggtt tgcagcagtc agcagtgTga ttagttaata atatagagac 5040  
 tacaggTTta catttaaact ccatatctag tgttttatac agattatatt tctttgactt 5100  
 gatttaatcc cagataagag aactgaggt accagtaaat agagctagga cttgagcccc 5160  
 aatcttccag cttcaatcca gatcatatga cagcttgctg attaaactag atgacagaga 5220  
 agatctcttt ccttcagata cacatacttt ttctctgttc ccctctccct atcagctaga 5280  
 tccccctaaa tcaactgatac tggTTTTgta atTTTgcatc ggcatgTTTg acaattggta 5340  
 tcacatttag ggtTTTTcat tctTTTTtg tccaaacttt tcatttctgc ttttaaagga 5400  
 aatactTTTg gaaacataaaa tatgtggggtt tgcaatttat aaagcagctt ttccacttat 5460  
 tttcttagaa tattgacata ctttgcaatg aagcagaaaa caagcttatg catatactgc 5520  
 atgcaaatga tccaagtgg tccaccccaa ctaaagactg tacttcaggg ccgtacactg 5580  
 ctcaaatcat tcctggtaca ggaaacaagc ttctggtaag ttaatgtaa ctcaaggaat 5640  
 attataagaa gtatatatgg aggccatcgt atattctgtt gtatacctag taaacatggt 5700  
 aaaatgtaat taaacttaat tagaaaatgt ggttgttatg tggctcctgt aagtatagtt 5760  
 atttagaaat tttatttatt gaagcaagat atgaaactct gggTgcacac tttccaaaca 5820  
 ggtgctttca tttacatgtg attgaaaagt gttttttgtc atttatttca ctgttccata 5880  
 caattagggT tgtttctaag ctgtttgtaa gctgtttcta agctatttaa gtggTTaaat 5940  
 cacagtagat gcaaatcaag gtaccagct tttgttcctt tttgtgaggg ttaattgCGc 6000  
 gcttggCGta atcatggtca tagctgtttc ctgtgtgaaa ttgttatccg ctcaaatc 6060  
 cacacaacat acgagccgga agcataaagt gtaaagcctg gggTgcctaa tgagtGagct 6120  
 aactcacatt aattgCGttg cgctcactgc ccgccatatg atacagaggt acataatgTT 6180  
 tgggCCacac atgCCggtgt acccacagac cccaaccac aagaagtagt attggTaaat 6240  
 gtgacagaaa atTTTaaacat gtggaaaaat gacatggtag aacagatgca tgaggatata 6300

ES 2 470 440 A1

atcagtttat gggatcaaag cctaaagcca tgtgtaggaa aactactttg caccactgct 6360  
 gtgccttgga atgctagttg gagtaataaa tctctggaac agatttgga tcacacgacc 6420  
 tggatggagt gggacagaga aattaacaat tacacaaact taatacactc cttaattgaa 6480  
 gaatcgcaaa accagcaaga aaagaatgaa caagaattat tggaattaga taaatgggca 6540  
 agtttggtga attggtttaa cataacaaat tggctgtggt atataaaatt attcataatg 6600  
 atagtaggag gcttggtagg ttaagaata gtttttgctg tactttctgt agtgaataga 6660  
 gttaggcagg gatattcacc attttctttt caggcctgga gatctcccga ggggaccgca 6720  
 caggcccgaa ggaatagaag aagaaggtgg agagagagac agagacagat ccattcgacc 6780  
 aattcactcc tcagggtgcag gctgcctatc agaaggtggt ggctggtgtg gccaatgccc 6840  
 tggctcacia ataccactga gatccagaca tgataagata cattgatgag tttggacaaa 6900  
 ccacaactag aatgcagtga aaaaaatgct ttatttgatga aatttgatg gctattgctt 6960  
 tatttgtaac cattataagc tgcaataaac aagttaaca caacaattgc attcatttta 7020  
 tgtttcaggt tcagggggag gtgtgggagg ttttttaaag caagtaaac ctctacaaat 7080  
 gtggtatggc tgattatgat ccccaggaag ctctctgtg tcctcataaa ccctaacctc 7140  
 ctctacttga gaggacattc caatcatagg ctgcccattc accctctgtg tcctcctggt 7200  
 aattaggtca cttaacaaaa aggaaattgg gtagggggtt ttacacagacc gctttctaag 7260  
 ggtaatttta aaatatctgg gaagtccctt cactgctgt gttccagaag tgttggtaaa 7320  
 cagcccacia atgtcaacag cagaaacata caagctgtca gctttgcaca agggcccaac 7380  
 acctgctca tcaagaagca ctgtggttgc tgtgttagta atgtgcaaaa caggaggcac 7440  
 attttcccca cctgtgtagg ttccaaaata tctagtgtt tcatttttac ttggatcagg 7500  
 aaccagcac tccactggat aagcattatc cttatcaaaa acagccttgt ggtcagtgtt 7560  
 catctgctga ctgtcaactg tagcattttt tggggttaca gtttgagcag gatatttggt 7620  
 cctgtagttt gctaacacac cccagggtggc acttttcggg gaaatgtgcg cggaaccctt 7680  
 atttgtttat ttttctaaat acattcaaat atgtatccgc tcatgagaca ataaccctga 7740  
 taaatgcttc aataatattg aaaaaggaag agtatgagta ttcaacattt ccgtgtcgcc 7800  
 cttattccct tttttgcggc attttgctt cctgtttttg ctcaccaga aacgctggtg 7860  
 aaagtaaaag atgctgaaga tcagttgggt gcacgagtgg gttacatcga actggatctc 7920  
 aacagcggta agatccttga gagttttcgc cccgaagaac gttttccaat gatgagcact 7980  
 tttaaagttc tgctatgtgg cgcggtatta tcccgtattg acgccgggca agagcaactc 8040  
 ggtcgccgca tacactattc tcagaatgac ttgggttagt actcaccagt cacagaaaag 8100  
 catcttacgg atggcatgac agtaagagaa ttatgcagtg ctgccataac catgagtgat 8160  
 aactgctgg ccaacttact tctgacaacg atcggaggac cgaatgagct aaccgctttt 8220  
 ttgcacaaca tgggggatca tgtaactcgc cttgatcgtt ggaaccgga gctgaatgaa 8280  
 gccataccaa acgacgagcg tgacaccacg atgcctgtag caatggcaac aacgttgctc 8340  
 aaactattaa ctggcgaact acttactcta gcttcccggc aacaattaat agactggatg 8400

ES 2 470 440 A1

gaggcggata aagttgcagg accacttctg cgctcggccc ttccggctgg ctggtttatt 8460  
gctgataaat ctggagccgg tgagcgtggg tctcgcggta tcattgcagc actggggcca 8520  
gatggaagc cctcccgtat cgtagttatc tacacgacgg ggagtcaggc aactatggat 8580  
gaacgaaata gacagatcgc tgagataggt gcctcactga ttaagcattg gtaactgtca 8640  
gaccaagttt actcatatat acttttagatt gatttaaaac ttcatTTTTA atttaaaagg 8700  
atctaggTga agatcctttt tgataatctc atgaccaaaa tccttaacgt gagttttcgt 8760  
tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat ctttttttc 8820  
tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgct accagcggTg gtttgtttgc 8880  
cggatcaaga gctaccaact ctttttccga aggtaactgg cttcagcaga gcgagatac 8940  
caaatactgt tcttctagt tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac 9000  
cgctacata cctcgctctg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt 9060  
cgtgtcttac cgggttgac tcaagacgat agttaccgga taaggcgag cggtcgggct 9120  
gaacgggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat 9180  
acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaag gcgacaggt 9240  
atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca gggggaaacg 9300  
cctggatctt ttatagtcct gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt 9360  
gatgctcgtc agggggggcg agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc tttttacggt 9420  
tcctggcctt ttgctggcct tttgctcaca tgttctttcc tgcgttatcc cctgattctg 9480  
tggataaccg tattaccgcc tttgagtgag ctgataccgc tcgccgcagc cgaacgaccg 9540  
agcgcagcga gtcagtgagc gaggaagcgg aagagcggc aatacgcaaa ccgcctctcc 9600  
ccgcgcgTtg gccgattcat taatgcag 9628

<210> 8  
<211> 9820  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<221> source  
<222> 1..9820  
<223> /mol\_type="DNA"  
/note="Plásmido pSAD v5.0 clonado con exones 19,20,21,22,23,24,  
25,26 y 27 y secuencias flanqueantes de los intrones 18,19,20,21,  
22,23,24,25 y 26 del gen BRCA2 de Homo sapiens"  
/organism="Artificial Sequence"

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> 1316..6935  
<223> /note="Exones 19,20,21,22,23,24,25,26 y 27 y secuencias  
flanqueantes de los intrones 18,19,20,21,22,23,24,25 y 26 del gen  
BRCA2"

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> join(1..1315,6936..9820)  
<223> /note="Plásmido pSAD v5.0"

<220>  
<221> misc\_feature

ES 2 470 440 A1

<222> 1..9793

<223> /note="Minigen MGBR2\_EX19-27"

<400> 8

ctgtggaatg	tgtgtcagtt	agggtgtgga	aagtccccag	gctccccagc	aggcagaagt	60
atgcaaagca	tgcatctcaa	ttagtcagca	accagggtgtg	gaaagtcccc	aggctccccca	120
gcaggcagaa	gtatgcaaag	catgcatctc	aattagtcag	caaccatagt	cccgcccccta	180
actccgccca	tcccgcccct	aactccgccc	agttccgccc	attctccgcc	ccatggctga	240
ctaatttttt	ttatttatgc	agaggccgag	gccgcctcgg	cctctgagct	attccagaag	300
tagtgaggag	gcttttttgg	aggcctaggg	ttttgcaaaa	aacttggact	gtgtttactt	360
gcaatcccc	aaaacagaca	gaatggtgca	tctgtccagt	gaggagaagt	ctgcggtcac	420
tgccctgtgg	ggcaagggtga	atgtggaaga	agttggtggt	gaggccctgg	gcaggctgct	480
ggttgtctac	ccatggacc	agaggttctt	cgagtccttt	ggggacctgt	cctctgcaaa	540
tgctgttatg	aacaatccta	agggtgaaggc	tcatggcaag	aagggtgctgg	ctgccttcag	600
tgagggctctg	agtcacctgg	acaacctcaa	aggcaccttt	gctaagctga	gtgaactgca	660
ctgtgacaag	ctgcacgctc	tagagtcgac	ccagcagtaa	gtaatacatg	taatgcaacc	720
tatacaaata	gcaatagtag	cattagtagt	agcaataata	atagcaatag	ttgtgtggtc	780
catagtaatc	atagaatata	ggaaaatatt	aagacaaaga	aaaatagaca	ggttaattga	840
tagactaata	gaaagagcag	aagacagtgg	caatgagagt	gaaggagaaa	tatcagcact	900
tgtggagatg	ggggtggaga	tggggcacca	tgctccttgg	gatgttgatg	atctgtagtg	960
ctacagaaaa	attgtgggtc	acagtctatt	atggggtagg	gatcaccaga	attgtaacgc	1020
ttacaatttc	cattcgccat	tcaggctgcg	caactgttgg	gaaggcgat	cgggtcgggc	1080
ctcttcgcta	ttacgccagc	tggcgaaagg	gggatgtgct	gcaaggcgat	taagttgggt	1140
aacgccaggg	ttttcccagt	cacgacgttg	taaaacgacg	gccagtgagc	gcgcgtaata	1200
cgactcacta	tagggcgaaat	tggagctcca	ccgcggtggc	ggccgctcta	gaactagtg	1260
atccccggg	ctgcaggaat	tcgatatcaa	gcttatcgat	accgtcgacc	tcgagcacac	1320
atccggaata	gcattaagaa	cttgtagcag	tataaacaat	atgtttgaga	agtactatat	1380
tgtgaaaata	ttttcacttt	tatacagttt	tttacttatt	tactgtctta	ctaactttcc	1440
taagactttt	taaagtgaat	atttttaagg	cagttctaga	agaatgaaa	ctcttatgat	1500
atctgtaata	gaattgaata	catatttaac	tactaaatca	atatatttat	taatttgtcc	1560
agatttctgc	taacagtact	cggcctgctc	gctggtatac	caaacttgg	ttctttcctg	1620
accctagacc	ttttcctctg	cccttatcat	cgcttttcag	tgatggagga	aatgttgggt	1680
gtgttgatgt	aattattcaa	agagcatacc	ctatacaggt	atgatgtatt	cttgaactt	1740
accatatatt	tctttctttt	gatacaatta	atgtgttgt	ttgtttgaga	tggagtttcg	1800
gtctcttgcc	caggctggag	tgcaatggcg	tgatcttgg	tactgcagc	ctccacctcc	1860
cgggttcaag	tgattctcct	gcctcagcct	ctcaagtagc	tgagccacca	cacctggcta	1920
attttgtatt	tttggtagag	aaggggtttc	atcatgttgg	tcaggctgat	ctcgaactcc	1980
tgacctcagg	tgatccacta	atctcagcct	cccaaagttc	tgggattaca	gatgtgagcc	2040



ES 2 470 440 A1

actgtgcctg gcctgataca attaacttga atgttatata tgtgactttt ttggtgtgtg 2100  
 taacacatta ttacagtgga tggagaagac atcatctgga ttatacatat ttcgcaatga 2160  
 aagagaggaa gaaaaggaag cagcaaaata tgtggaggcc caacaaaaga gactagaagc 2220  
 cttattcact aaaattcagg aggaatttga agaacatgaa ggtaaaatta gttatatggt 2280  
 acacattggt attttctaata tgagaacaaa gtcttagaga ctttgaattt aacattttta 2340  
 atgagtaaat tgtttttatt ttgagtagta aattgacttt attttttagt atctagggta 2400  
 ttcttttttg gtgtagaca aagaatagca acaagggaca gaaatatcag gtctaagcca 2460  
 tttgtaatcc ttctttgggt gttttatgct tggttcttta gtttttagttg cttttgaatt 2520  
 tacagtttag tgaattaata atccttttgt tttcttagaa aacacaaca aacctatatt 2580  
 accatcacgt gcaactaaca gacagcaagt tcgtgctttg caagatggtg cagagcttta 2640  
 tgaagcagtg aagaatgcag cagaccagc ttaccttgag gtgagagagt aagaggacat 2700  
 ataatgaggc ttgatgatta ttcaagggtga gaagctgttt tagactctct ggccatcaca 2760  
 ggaaggagta tgttgaaatg ctgcatttct caaaagggat gtgtacattt ctgggatttt 2820  
 cagtgatgtg ccagacgagt gtggtggtat gttttcaact atataccgag tagaggatgg 2880  
 gagggttcta gaattttata tattaattaa atttggttta aaatgcaggc aaaacttggt 2940  
 tttagccatc tgtaatgtag ttggtgatga ttatgattat tagagtacat ttataattgg 3000  
 aggatcattt ttgccgtagg gaaatagaat tattaatagt ttgaggcacc tgagaatatt 3060  
 atgtgagaaa ctgattacat taaccacacc cttaagatga gctctaattt tgttgtattt 3120  
 gtctgttta aagccatcta gttacaatag atggaacttt tttgttctga ttgcttttta 3180  
 ttccaatatc ttaaattggtc acagggttat ttcagtgaag agcagttaag agccttgaat 3240  
 aatcacaggc aaatgttgaa tgataagaaa caagctcaga tccagttgga aattaggaag 3300  
 gccatggaat ctgctgaaca aaaggaacaa ggtttatcaa gggatgtcac aaccgtgtgg 3360  
 aagttgcgta ttgtaagcta ttcaaaaaaa gaaaaagatt caggtaagta tgtaaatgct 3420  
 ttgtttttat cagttttatt aacttaaaaa atgaccttac taacaaaatg attataaatc 3480  
 cagataaagt ataaagttag tttatatcag agaagcaaaa tccactacta atgccacaaa 3540  
 agagataata taaaagagga tctgtattta ttttgaaaca aacatttaa tgataatcac 3600  
 ttcttccatt gcatctttct catctttctc caaacagtta tactgagtat ttggcgtcca 3660  
 tcatcagatt tatattctct gttaacagaa ggaaagagat acagaattta tcatcttgca 3720  
 acttcaaaat ctaaaagtaa atctgaaaga gctaacatac agttagcagc gacaaaaaa 3780  
 actcagtatc aacaactacc ggtacaaacc tttcattgta atttttcagt tttgataagt 3840  
 gcttgttagt ttatggaatc tccatatggt gaatttttgt tttgttttct gtaggtttca 3900  
 gatgaaattt tatttcagat ttaccagcca cgggagcccc ttcacttcag caaattttta 3960  
 gatccagact ttcagccatc ttgttctgag gtggacctaa taggatttgt cgtttctggt 4020  
 gtgaaaaaaa caggtaatgc acaatatagt taattttttt tattgattct tttaaaaaac 4080  
 attgtctttt aaaatctctt atgattagtt ggagctacca gttggcaaat ttgctagcta 4140

ES 2 470 440 A1

actagtgatc tgaaagtaag cctctttgaa cctctgattt aatctgtact cctgttagca 4200  
 atgtgtgCGT atacctgctt ccacatgacc tcagtaaaag aatgtgttgt catattggta 4260  
 ttgaaatTTT agcactgtaa gcaacaggtc atTTTggaaa acctgagctt tcgccaaatt 4320  
 cagctatTTT gatttgcttt tattattagc atataccaaa ataaataggc atattagagt 4380  
 TTCCTTtctt gcatcttaaa attcatctaa cacatctata ataacattct tttctTTTT 4440  
 ttccattcta ggacttgccc ctttcgtcta tttgtcagac gaatgttaca atttactggc 4500  
 aataaagTTT tggatagacc ttaatgagga cattattaag cctcatatgt taattgctgc 4560  
 aagcaacctc cagtggcgac cagaatccaa atcaggcctt cttactttat ttgctggaga 4620  
 tttttctgtg ttttctgcta gtccaaaaga gggccacttt caagagacat tcaacaaaat 4680  
 gaaaaaact gttgaggtaa ggttactttt cagcatcacc acacattttg gtatttttct 4740  
 atTTTgacag tccagtatca aggaaatagc ttttatacaa attggatagt tgaggtagta 4800  
 tgtgaggtaa agtttaataca tatattaatt gcccatgaac ctcaggagat gggggaatgg 4860  
 ggaaatgaca gcaactagaa agagaagaat gacttgaagg gaaatgagtt aggagaaatt 4920  
 gtgagaagga tgttcagaaa tgcagacttt gtaagcaaac tggaaattgg ttacaagaat 4980  
 aatatgagtt atctgtggtt tgcagcagtc agcagtgtga ttagttaata atatagagac 5040  
 tacaggTTta catttaaact ccatatctag tgttttatac agattatatt tctttgactt 5100  
 gatttaatcc cagataagag aactgaggt accagtaa atagactagga cttgagcccc 5160  
 aatcttccag cttcaatcca gatcatatga cagcttgctg attaaactag atgacagaga 5220  
 agatctcttt ccttcagata cacatacttt ttctctgttc ccctctccct atcagctaga 5280  
 tccccTaaa tcaactgatac tggTTTTgta atTTTgcatc ggcatgTTTg acaattggta 5340  
 tcacatttag ggtTTTTcat tctTTTTtg tccaaacttt tcatttctgc ttttaaagga 5400  
 aatactTTTg gaaacataaaa tatgtgggTT tgcAatttat aaagcagctt ttccacttat 5460  
 tttcttagaa tattgacata ctttgcaatg aagcagaaaa caagcttatg catatactgc 5520  
 atgcaaatga tccaagtgg tccaccccaa ctaaagactg tacttcaggg ccgtacactg 5580  
 ctcaaatcat tcctggTaca ggaaacaagc ttctggTaa ttaatgTaaa ctcaaggaat 5640  
 attataagaa gtatatatgg aggccatcgt atattctgtt gtatacctag taaacatggt 5700  
 aaaatgtaat taaacttaat tagaaaatgt ggttgttatg tggctcctgt aagtatagtt 5760  
 atttagaaat tttatttatt gaagcaagat atgaaactct gggTgcacac tttccaaaca 5820  
 ggtgctttca tttacatgtg attgaaaagt gttttttgtc atttatttca ctgttccata 5880  
 caattagggT tgtttctaag ctgtttgTaa gctgtttcta agctatttaa gtggTtaaT 5940  
 cacagtagat gcaaatcaag gtaccagct tttgttcctt tttgtgaggg tcttccttcc 6000  
 ttttcatgtc attttatatg ttcttatgta aaattacttt catctagaat aggaataatg 6060  
 tgaactgaaa tcacctaacc tattaggagt taggggaggg agactgtgtg taatatttgc 6120  
 gtgctTaaat attttcaatg aaaagttact ttgatttagt tttttatgTT actacataat 6180  
 tatgataggc tacgttttca tttttttatc agatgtcttc tcctaattgt gagatatatt 6240  
 atcaagTcc tttatcactt tgtatggcca aaaggaagtc tgtttccaca cctgtctcag 6300

ES 2 470 440 A1

cccagatgac ttcaaagtct tgtaaagggg agaaagagat tgatgaccaa aagaactgca 6360  
 aaaagagaag agccttggat ttcttgagta gactgccttt acctccacct gttagtccca 6420  
 tttgtacatt tgtttctccg gctgacacaga aggcatttca gccaccaagg agttgtggca 6480  
 ccaaatacga aacaccata aagaaaaaag aactgaattc tcctcagatg actccattta 6540  
 aaaaattcaa tgaaatttct cttttggaaa gtaattcaat agctgacgaa gaacttgcatt 6600  
 tgataaatac ccaagctctt ttgtctgggt caacaggaga aaaacaattt atatctgtca 6660  
 gtgaatccac taggactgct cccaccagtt cagaagatta tctcagactg aaacgacgtt 6720  
 gtactacatc tctgatcaaa gaacaggaga gttcccaggc cagtacggaa gaatgtgaga 6780  
 aaaataagca ggacacaatt acaactaaaa aatataatct agcatttgca aaggcgacaa 6840  
 taaattattg acgcttaacc tttccagttt ataagactgg aatataattt caaacacac 6900  
 attagtactt atgttgacaca atgagaaaag aaattaaggt ggagagagag acagagacag 6960  
 atccattcga ccaattcact cctcaggtgc aggctgccta tcagaagggtg gtggctgggtg 7020  
 tggccaatgc cctggctcac aaataccact gagatccaga catgataaga tacattgatg 7080  
 agtttggaca aaccacaact agaatgcagt gaaaaaatg ctttatttgt gaaatttgtg 7140  
 atgctattgc tttatttcta accattataa gctgcaataa acaagttaac aacaacaatt 7200  
 gcattcattt tatgtttcag gttcagggggg aggtgtggga ggttttttta agcaagtaaa 7260  
 acctctacaa atgtgggtatg gctgattatg atccccagga agctcctctg tgcctcata 7320  
 aaccctaacc tcctctactt gagaggacat tccaatcata ggctgcccac ccaccctctg 7380  
 tgcctcctg ttaattaggt cacttaacaa aaaggaaatt gggtaggggt ttttcacaga 7440  
 ccgctttcta agggtaattt taaaatatct gggaaagtccc ttccactgct gtgttccaga 7500  
 agtgttggta aacagcccac aaatgtcaac agcagaaaca tacaagctgt cagctttgca 7560  
 caagggccca acaccctgct catcaagaag cactgtgggt gctgtgtagg taatgtgcaa 7620  
 aacaggaggc acattttccc cacctgtgta ggttccaaaa tatctagtgt tttcattttt 7680  
 acttggatca ggaaccacagc actccactgg ataagcatta tccttatcca aaacagcctt 7740  
 gtggtcagtg ttcatctgct gactgtcaac tgtagcattt tttggggta cagtttgagc 7800  
 aggatatttg gtcctgtagt ttgctaacac accccagggtg gcacttttcg gggaaatgtg 7860  
 cgcggaacct ctatttgttt atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga 7920  
 caataaccct gataaatgct tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat 7980  
 ttccgtgtcg cccttattcc cttttttgcg gcattttgcc ttctgtttt tgctcacca 8040  
 gaaacgctgg tgaaagtaaa agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc 8100  
 gaactggatc tcaacagcgg taagatcctt gagagttttc gccccgaaga acgttttcca 8160  
 atgatgagca cttttaaagt tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgtat tgacgccggg 8220  
 caagagcaac tcggctgccg catacactat tctcagaatg acttgggtga gtactcacca 8280  
 gtcacagaaa agcatcttac ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata 8340  
 accatgagtg ataacactgc ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaatgag 8400

ES 2 470 440 A1

ctaaccgctt ttttgcacaa catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg 8460  
gagctgaatg aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca 8520  
acaacgttgc gcaaaactatt aactggcgaa ctacttactc tagcttcccc gcaacaatta 8580  
atagactgga tggaggcgga taaagtgtca ggaccacttc tgcgctcggc cttccggct 8640  
ggctggttta ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcgcgg tatcattgca 8700  
gcactggggc cagatggtaa gccctcccgt atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag 8760  
gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat 8820  
tggttaactgt cagaccaagt ttactcatat atactttaga ttgatttaaa acttcatttt 8880  
taatttaaaa ggatctaggt gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatcctaac 8940  
gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag 9000  
atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaaaaaaa aaaaccaccg ctaccagcgg 9060  
tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca 9120  
gagcgcagat accaaatact gttcttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga 9180  
actctgtagc accgcctaca tacctcgtct tgctaatect gttaccagtg gctgctgcca 9240  
gtggcgataa gtcgtgtctt accggggttg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc 9300  
agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca 9360  
ccgaactgag atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaaa 9420  
aggcggacag gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc 9480  
cagggggaaa cgcctggat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc 9540  
gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg 9600  
cctttttacg gttcctggcc ttttgctggc cttttgctca catgttcttt cctgcgttat 9660  
cccctgattc tgtggataac cgtattaccg cctttgagtg agctgatacc gctcgcgca 9720  
gccgaacgac cgagcgcagc gagtcagtga gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatacgca 9780  
aaccgcctct ccccgcgctg tggccgattc attaatgacg 9820

<210> 9  
<211> 7675  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<221> source  
<222> 1..7675  
<223> /mol\_type="DNA"  
/note="Plásmido pSAD v5.0 clonado con exones 25 y 26 y secuencias  
flanqueantes de los intrones 24, 25 y 26 del gen BRCA2 de Homo  
sapiens"  
/organism="Artificial Sequence"

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> 1265..3991  
<223> /note="Exones 25 y 26 y secuencias flanqueantes de los intrones  
24, 25 y 26 del gen BRCA2"

<220>  
<221> misc\_feature

ES 2 470 440 A1

<222> join(1..1264,3992..7675)  
 <223> /note="Plásmido pSAD v5.0"

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 1..7675  
 <223> /note="Minigen MGBR2\_EX25-26"

```

<400> 9
ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt      60
atgcaaagca tgcattctcaa ttagtcagca accagggtgtg gaaagtcccc aggctcccca      120
gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caaccatagt cccgcccccta      180
actccgccca tcccgcccct aactccgccc agttccgccc attctccgcc ccatggctga      240
ctaatttttt ttattttatgc agaggccgag gccgcctcgg cctctgagct attccagaag      300
tagtgaggag gcttttttgg aggcctaggc ttttgcaaaa aacttgact gtgtttactt      360
gcaatcccc aaacagaca gaatggtgca tctgtccagt gaggagaagt ctgcggtcac      420
tgccctgtgg ggcaaggatga atgtggaaga agttggtggt gaggccctgg gcaggctgct      480
ggttgtctac ccatggacc cagaggttctt cgagtccttt ggggacctgt cctctgcaaa      540
tgctgttatg aacaatccta aggtgaaggc tcatggcaag aagggtgctg ctgccttcag      600
tgagggctct agtcacctgg acaacctcaa aggcaccttt gctaagctga gtgaactgca      660
ctgtgacaag ctgcacgctc tagagtcgac ccagcagtaa gtaatacatg taatgcaacc      720
tatacaaata gcaatagtag cattagtagt agcaataata atagcaatag ttgtgtggtc      780
catagtaatc atagaatata ggaaaatatt aagacaaaga aaaatagaca ggttaattga      840
tagactaata gaaagagcag aagacagtgg caatgagagt gaaggagaaa tadcagcact      900
tgtggagatg ggggtggaga tggggcacca tgctccttgg gatgttgatg atctgtagtg      960
ctacagaaaa attgtgggtc acagtctatt atggggtagg gatcaccaga attgtaacgc     1020
ttacaatttc cattcgccat tcaggctgcg caactgttgg gaagggcgat cgggtcggggc     1080
ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt     1140
aacgccaggg ttttcccagt cacgacgttg taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata     1200
cgactcacta tagggcgaat tggagctcca ccgcggtggc ggccgctcta gaactagtgg     1260
atcctatacc tgcttcacac tgacctcagt aaaagaatgt gttgtcatat tggattgaa     1320
attttagcac tgtaagcaac aggtcatttt ggaaaacctg agctttcgcc aaattcagct     1380
attttgattt gcttttatta ttagcatata ccaaaataaa taggcatatt agagtttcct     1440
ttcttgcatc ttaaaattca tctaacacat ctataataac attcttttct tttttttcca     1500
ttctaggact tgcccctttc gtctatttgt cagacgaatg ttacaattta ctggcaataa     1560
agttttggat agaccttaat gaggacatta ttaagcctca tatgttaatt gctgcaagca     1620
acctccagtg gcgaccagaa tccaaatcag gccttcttac tttatttgct ggagattttt     1680
ctgtgttttc tgctagtcca aaagagggcc actttcaaga gacattcaac aaaatgaaaa     1740
atactgttga ggtaaggatg cttttcagca tcaccacaca ttttggattt tttctatttt     1800
gacagtccag tatcaaggaa atagctttta tacaatttgg atagttgagg tagtatgtga     1860
  
```

ES 2 470 440 A1

ggtaaagttt aatcatatat taattgccca tgaacctcag gagatggggg aatggggaaa 1920  
 tgacagcaac tagaaagaga agaatgactt gaagggaaat gagttaggag aaattgtgag 1980  
 aaggatgttc agaaatgcag actttgtaag caaactggaa attgggttaca agaataatat 2040  
 gagttatctg tggtttgcaag cagtcagcag tgtgattagt taataatata gagactacag 2100  
 gtttacattt aaactccata tctagtgttt tatacagatt atatttcttt gacttgattt 2160  
 aatcccagat aagagacact gatattatth tccctagatc atgtatgcat tttctgctta 2220  
 aatctatata tacattatat aatattagct ggtgtttatt gagtgtttac tatgtgtcag 2280  
 acctgttct aagcttctca ttttaattctc ccacaacctt atgaggtagg gaactgtttt 2340  
 tctattttat cagtgcagaaa caggttaaat ggcttgctt aggtcaaag ccaagttagt 2400  
 aaaactagga ttcatactta ggccatcgaa tgcagaacct agactaggaa ctgctatgca 2460  
 atgtgtcttc ccagtaaaaat ttgagatttc atgagttggg aactagttaa gaatacacia 2520  
 aaaataagcc tcttaattct gtagtttaat atttgaaatg tgtgttattc agaatttata 2580  
 taaaaatata ttttaaaagc attagagtag ctgtataaag aaagctgtgt tgacatttta 2640  
 cctagagact ctatgcataa tgaataaacac tctgctatat ctagtcttca aattaggggt 2700  
 gggagttgta ttcattattt agttcccata cagcatatct actgtttaca cccacattt 2760  
 tctttttttc tttctttctt tttttttttt tttttttttt ttttttagag acagagtctt 2820  
 gctttgtcac cccaggctg gagtacaata gcacaatctc ggatcactgc agtgtctgcc 2880  
 tcctgggctc aagcgattct cgtgccttag cctcccaagt agctgggact acaggtgcgt 2940  
 gccaccacgc ccagctaatt tttgtatttt tagtagagac atggtttcac catgttgggc 3000  
 agtctgggtct cgaactcttg gcctcaagt atctgccac ctggcctcc ccaagtactg 3060  
 ggtttacagg catgagccac cgagcccga tttctctga gacgtcttca aaggcagttt 3120  
 actaatctg ctgaagagac aactgtcatt tacacagcat tttaaagttt taaaaaac 3180  
 tgtcatgaat taggttaaac catatgaaat tgctgatatt tgaccagttg tgatttctca 3240  
 agcaacagtt tcatgtagt taacctataa atcatttcaa ttaattcttg gaacagacgt 3300  
 gaggtagggt aggcaattct tttttttctc taaccaaaga agtacctta tagatgtgag 3360  
 atgattccca gctattaagt agtaaataga gctaggactt gagcccaat cttccagctt 3420  
 caatccagat catatgacag cttgctgatt aaactagatg acagagaaga tctctttcct 3480  
 tcagatacac atactttttc tctgttcccc tctccctatc agctagattc ccctaaatca 3540  
 ctgatactgg ttttgtaatt ttgcatcggc atgtttgaca attggtatca catttaggggt 3600  
 ttttcattct tttttggtcc aaacttttca tttctgcttt taaaggaaat acttttgaa 3660  
 acataaatat gtgggtttgc aatttataaa gcagcttttc cacttatttt cttagaatat 3720  
 tgacatactt tgcaatgaag cagaaaacaa gcttatgcat atactgcatg caaatgatcc 3780  
 caagtgggtcc accccaacta aagactgtac ttcagggccg tactgtctc aatcattcc 3840  
 tgggtacagga aacaagcttc tggttaagtt atgtaaactc aaggaatatt ataagaagta 3900  
 tatatggagg ccatcgtata ttctgttgta tacctagtaa acatggtaaa atgtaattaa 3960  
 acttaattag aaaatgtggg ttgtatgtgg cctcgagggg gggcccggta cccagctttt 4020

ES 2 470 440 A1

gttccctttt gtgaggggta attgcgcgct tggcgtaatc atgggcatag ctgtttcctg 4080  
 tgtgaaattg ttatccgctc acaattccac acaacatacg agccggaagc ataaagtgtg 4140  
 aagcctgggg tgcctaataga gtgagctaac tcacattaat tgcgttgcbc tactgccccg 4200  
 ccatatgata cagaggtaca taatgtttgg gccacacatg ccggtgtacc cacagacccc 4260  
 aaccacaag aagtagtatt ggtaaatgtg acagaaaatt ttaacatgtg gaaaaatgac 4320  
 atggtagaac agatgcatga ggatataatc agtttatggg atcaaagcct aaagccatgt 4380  
 gtaggaaaac tactttgcac cactgctgtg ccttggatg ctagttggag taataaatct 4440  
 ctggaacaga tttggaatca cacgacctgg atggagtggg acagagaaat taacaattac 4500  
 acaaacttaa tacactcctt aattgaagaa tcgcaaaacc agcaagaaaa gaatgaacaa 4560  
 gaattattgg aattagataa atgggcaagt ttgtggaatt ggtttaacat acaaattgg 4620  
 ctgtggtata taaaattatt cataatgata gtaggaggct tggtaggttt aagaatagtt 4680  
 tttgctgtac tttctgtagt gaatagagtt aggcagggat attcaccatt ttcttttcag 4740  
 gcctggagat ctcccgaggg gacccgacag gcccgaagga atagaagaag aaggtggaga 4800  
 gagagacaga gacagatcca ttcgaccaat tcaactcctca ggtgcaggct gcctatcaga 4860  
 aggtggtggc tgggtgtggc aatgccctgg ctcaaaaata cactgagat ccagacatga 4920  
 taagatacat tgatgagttt ggacaaacca caactagaat gcagtgaaaa aatgcttta 4980  
 tttgtgaaat ttgtgatgct attgctttat ttgtaacat tataagctgc aataaacaag 5040  
 ttaacaacaa caattgcatt cattttatgt ttcaggttca gggggagggtg tgggaggttt 5100  
 tttaaagcaa gtaaaacctc tacaatgtg gtatggctga ttatgatccc caggaagctc 5160  
 ctctgtgtcc tcataaaccc taacctcctc tacttgagag gacattcaa tcataggctg 5220  
 cccatccacc ctctgtgtcc tcctgttaat taggtcactt acaaaaagg aaattgggta 5280  
 ggggtttttc acagaccgct ttctaagggt aattttaaaa tatctgggaa gtcctttcca 5340  
 ctgctgtgtt ccagaagtgt tggtaaacag cccacaaatg tcaacagcag aacatacaa 5400  
 gctgtcagct ttgcacaagg gcccaacacc ctgctcatca agaagcactg tggttgctgt 5460  
 gttagtaatg tgcaaacacag gaggcacatt ttccccacct gtgtaggttc caaaatatct 5520  
 agtgttttca tttttacttg gatcaggaac ccagcactcc actggataag cattatcctt 5580  
 atccaaaaca gccttgtggg cagtgttcat ctgctgactg tcaactgtag cttttttgg 5640  
 ggttacagtt tgagcaggat atttggctct gtagtttgct aacacacccc aggtggcact 5700  
 tttcggggaa atgtgcbcgg aaccctatt tgtttatfff tctaaataca ttcaaatatg 5760  
 tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat aatattgaaa aaggaagagt 5820  
 atgagtattc aacatttccg tgcgcccctt attccccttt ttgcggcatt ttgccttctt 5880  
 gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg ctgaagatca gttgggtgca 5940  
 cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga tccttgagag ttttcgcccc 6000  
 gaagaacggt ttccaatgat gagcactttt aaagtctctg tatgtggcgc ggtattatcc 6060  
 cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggg cgccgatac actatttca gaatgacttg 6120

ES 2 470 440 A1

gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg gcatgacagt aagagaatta 6180  
 tgcagtgctg ccataacccat gagtgataac actgcgcca acttacttct gacaacgatc 6240  
 ggaggaccga atgagctaac cgcttttttg cacaacatgg gggatcatgt aactcgcctt 6300  
 gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaagc acgagcgtga caccacgatg 6360  
 cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaa ctattaactg gcgaactact tactctagct 6420  
 tccccgcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag ttgcaggacc acttctgcgc 6480  
 tcggcccttc cggctggctg gtttattgct gataaatctg gagccggtga gcgtgggtct 6540  
 cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct cccgtatcgt agttatctac 6600  
 acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac agatcgctga gataggtgcc 6660  
 tcaactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact catatatact ttagattgat 6720  
 ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga tcctttttga taatctcatg 6780  
 accaaaatcc ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc agaccccgta gaaaagatca 6840  
 aaggatcttc ttgagatcct tttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac 6900  
 caccgctacc agcggtggtt tgtttgccgg atcaagagct accaactctt tttccgaagg 6960  
 taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgttct tctagtgtag ccgtagttag 7020  
 gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta atcctgttac 7080  
 cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca agacgatagt 7140  
 taccggataa ggcgcagcgg tcgggctgaa cgggggggtc gtgcacacag cccagcttgg 7200  
 agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa agcggccacgc 7260  
 ttcccgaagg gagaaaggcg gacaggtatc cgtaagcgg cagggtcgga acaggagagc 7320  
 gcacgagggg gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta tagtcctgtc gggtttcgcc 7380  
 acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg ggggaggagc ctatggaaaa 7440  
 acgccagcaa cgcgcccttt ttacggttcc tggccttttg ctggcctttt gctcacatgt 7500  
 tctttcctgc gttatcccct gattctgtgg ataaccgtat taccgccttt gagtgagctg 7560  
 ataccgctcg ccgcagccga acgaccgagc gcagcgagtc agtgagcgag gaagcggaag 7620  
 agcgcccaat acgcaaaccg cctctccccg cgcggtggcc gattcattaa tgcag 7675

<210> 10  
 <211> 6920  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <221> source  
 <222> 1..6920  
 <223> /mol\_type="DNA"  
 /note="Plásmido pSAD v5.0 clonado con exon 10 y secuencias  
 flanqueantes de los intrones 9 y 10 del gen BRCA2 de Homo sapiens  
 "  
 /organism="Artificial Sequence"

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 1277..3236  
 <223> /note="Exon 10 y secuencias flanqueantes de los intrones 9 y 10"



ES 2 470 440 A1

de1 gen BRCA2"

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> join(1..1276,3237..6920)  
 <223> /note="Plásmido pSAD v5.0"

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 1..6920  
 <223> /note="Minigen MGBR2\_EX10"

<400> 10  
 ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt 60  
 atgcaaagca tgcattctcaa ttagtcagca accagggtgtg gaaagtcccc aggctcccca 120  
 gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caacatagc cccgccctta 180  
 actccgcccc tcccgcccct aactccgccc agttccgccc attctccgcc ccatggctga 240  
 ctaatttttt ttatttatgc agaggccgag gccgcctcgg cctctgagct attccagaag 300  
 tagtgaggag gcttttttgg aggcctaggc ttttgcaaaa aacttggact gtgtttactt 360  
 gcaatcccc aaacagaca gaatggtgca tctgtccagt gaggagaagt ctgcggtcac 420  
 tgccctgtgg ggcaaggaga atgtggaaga agttggtggt gaggccctgg gcaggctgct 480  
 ggttgtctac ccatggacc agaggttctt cgagtccttt ggggacctgt cctctgcaaa 540  
 tgctgttatg aacaatccta aggtgaaggc tcatggcaag aagggtgctgg ctgccttcag 600  
 tgagggctctg agtcacctgg acaacctcaa aggcaccttt gctaagctga gtgaactgca 660  
 ctgtgacaag ctgcacgctc tagagtcgac ccagcagtaa gtaatacatg taatgcaacc 720  
 tatacaata gcaatagtag cattagtagt agcaataata atagcaatag ttgtgtggtc 780  
 catagtaatc atagaatata ggaaaatatt aagacaaaga aaaatagaca ggttaattga 840  
 tagactaata gaaagagcag aagacagtgg caatgagagt gaaggagaaa taccagcact 900  
 tgtggagatg ggggtggaga tggggcacca tgctccttgg gatgttgatg atctgtatg 960  
 ctacagaaaa attgtgggtc acagtctatt atggggtagg gatcaccaga attgtaacgc 1020  
 ttacaatttc cattcgccat tcaggctgcg caactgttgg gaagggcgat cgggtcgggc 1080  
 ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt 1140  
 aacgccaggg ttttcccagt cacgacgttg taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata 1200  
 cgactcacta tagggcgaat tggagctcca ccgcggtggc ggccgctcta gaactagtg 1260  
 atccccggg ctgcagacac aaaaacaaag cctattgaaa attttcagag acaataagat 1320  
 atataattaa caaatctga gctttttttt ttctaattag aaagtaaagtg tggtttagat 1380  
 ataccatagc ttacctaatc aggtcatgga atattgcatt tttcttagta tgtgtgtatg 1440  
 tctgtataac tgtgtaggat ttgatctctg tttttgtctg tgtggatca tgtacgtatg 1500  
 tatatgcata tgtaaaatca gatttacctt tgttatagg ccacagaatt gatttggac 1560  
 atctgttttg ataggctcta gaatatctaa ttgtatata agtaagatta ggtgagtttt 1620  
 aattgtgtag aactgctaaa gaaaggtttt tagggattgt tgtatgaata aaaggcttta 1680  
 ggttcattgg aatcagggga atcaggcttt actagaagaa caggagaagg ggtgactgac 1740

ES 2 470 440 A1

cgaaaaataa aatgccaagt actcagaata accctttaa tactgatatg taatatttag 1800  
 cacattctac ataaactggt tctatgagaa aggttgtag aataatataa attatatggc 1860  
 ttataaaata ttaatgtgct tctgttttat actttaacag gatttgga aacatcaggg 1920  
 aattcattta aagtaaatag ctgcaaagac cacattggaa agtcaatgcc aatgtccta 1980  
 gaagatgaag tatatgaaac agttgtagat acctctgaag aagatagttt ttcattatgt 2040  
 ttttctaaat gtagaacaaa aatctacaa aaagtaagaa ctagcaagac taggaaaaa 2100  
 attttccatg aagcaaacgc tgatgaatgt gaaaaatcta aaaaccaagt gaaagaaaa 2160  
 tactcatttg tatctgaagt ggaaccaa atgatactgatt cattagattc aatgtagca 2220  
 aatcagaagc ctttgagag tggagtgac aaaatctcca aggaagttgt accgtcttg 2280  
 gcctgtgaat ggtctcaact aacccttca ggtctaaatg gagcccagat ggagaaaata 2340  
 cccctattgc atatttctt atgtgaccaa aatatttcag aaaagacct attagacaca 2400  
 gagaacaaaa gaaagaaaga ttttcttact tcagagaatt ctttgccacg ttttctagc 2460  
 ctacaaaaat cagagaagcc attaaatgag gaaacagtgg taaataagag agatgaagag 2520  
 cagcatcttg aatctcatac agactgcatt cttgcagtaa agcaggcaat atctggaact 2580  
 tctccagtgg cttcttcatt tcagggtatc aaaaagtcta tattcagaat aagagaatca 2640  
 cctaaagaga ctttcaatgc aagttttca ggtcatatga ctgatccaaa ctttaaaaa 2700  
 gaaactgaag cctctgaaag tggactggaa atacatactg tttgctcaca gaaggaggac 2760  
 tccttatgtc caaatttaat tgataatgga agctggccag ccaccaccac acagaattct 2820  
 gtagctttga agaatgcagg ttaatatcc actttgaaaa agaaaacaaa taagtattt 2880  
 tatgctatac atgatgaaac atcttataaa ggaaaaaaa taccgaaaga ccaaaaatca 2940  
 gaactaatta actgttcagc ccagtttgaa gcaaatgctt ttgaagcacc acttacattt 3000  
 gcaaatgctg attcaggtac ctctgtcttt tttttttgt aaatagtaca tatagtttta 3060  
 tagatgacga ttccttctgt gttttttct gctttttaa atcttcatat cttatattta 3120  
 atcttaggca tcatctgtat acatgattgt ttaggtcttt aattaccagt gtttagaatc 3180  
 aggtcactca aacatggtag ataagtttg atagtttgtag tatatccatc actcttctcg 3240  
 agggggggcc cgttaccag cttttgttcc cttttgtgag ggttaattgc gcgcttgccg 3300  
 taatcatggt catagctgtt tcctgtgtga aattgttatc cgctcacaat tccacacaac 3360  
 atacgagccg gaagcataaa gtgtaaagcc tgggggtgct aatgagtgag ctaactcaca 3420  
 ttaattgcgt tgcgctcact gcccgccata tgatacagag gtacataatg tttgggccac 3480  
 acatgccggt gtaccacag accccaacc acaagaagta gtattggtaa atgtgacaga 3540  
 aaattttaac atgtggaaaa atgacatggt agaacagatg catgaggata taatcagttt 3600  
 atgggatcaa agcctaaagc catgtgtagg aaaactactt tgcaccactg ctgtgccttg 3660  
 gaatgctagt tggagtaata aatctctgga acagatttg aatcacacga cctggatgga 3720  
 gtgggacaga gaaattaaca attacacaaa ctttaatac tccttaattg aagaatcgca 3780  
 aaaccagcaa gaaaagaatg aacaagaatt attggaatta gataaatggg caagtttgtag 3840  
 gaattggttt aacataacaa attggctgtg gtatataaaa ttattcataa tgatagtagg 3900

ES 2 470 440 A1

aggcttggtgta ggtttaagaa tagtttttgc tgtactttct gtagtgaata gagttaggca 3960  
 gggatattca ccatttttctt ttcaggcctg gagatctccc gaggggaccc gacaggcccg 4020  
 aaggaataga agaagaaggt ggagagagag acagagacag atccattcga ccaattcact 4080  
 cctcaggtgc aggctgccta tcagaagggtg gtggctgggtg tggccaatgc cctggctcac 4140  
 aaataccact gagatccaga catgataaga tacattgatg agtttggaca aaccacaact 4200  
 agaatgcagt gaaaaaaaaatg ctttattttgt gaaattttgtg atgctattgc tttattttgta 4260  
 accattataa gctgcaataa acaagttaac aacaacaatt gcattcattt tatgtttcag 4320  
 gttcaggggg agggtgtggga ggttttttaa agcaagtaaa acctctacaa atgtgggtatg 4380  
 gctgattatg atccccagga agctcctctg tgtcctcata aaccctaacc tcctctactt 4440  
 gagaggacat tccaatcata ggctgcccac ccaccctctg tgtcctcctg ttaattaggt 4500  
 cacttaacaa aaaggaaatt gggtaggggt ttttcacaga ccgctttcta agggtaattt 4560  
 taaaatatct ggggaagtccc ttccactgct gtgttccaga agtgttggtg aacagcccac 4620  
 aatgtcaac agcagaaaca tacaagctgt cagctttgca caagggccca acaccctgct 4680  
 catcaagaag cactgtgggtt gctgtgttag taatgtgcaa aacaggaggc acattttccc 4740  
 cacctgtgta ggttccaaaa tatctagtgt tttcattttt acttggatca ggaaccagc 4800  
 actccactgg ataagcatta tccttatcca aaacagcctt gtggtcagtg ttcattctgct 4860  
 gactgtcaac tgtagcattt tttgggggta cagtttgagc aggatatttg gtcctgtagt 4920  
 ttgctaacac accccaggtg gcacttttcg gggaaatgtg cgcggaacc ctatttgttt 4980  
 atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct 5040  
 tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc 5100  
 cttttttgcg gcattttgcc ttctgtttt tgctcacca gaaacgctgg tgaaagtaaa 5160  
 agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg 5220  
 taagatcctt gagagttttc gccccgaaga acgttttcca atgatgagca cttttaagt 5280  
 tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgtat tgacgccggg caagagcaac tcggtcgccg 5340  
 catacactat tctcagaatg acttgggtta gtactacca gtcacagaaa agcatcttac 5400  
 ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataactgc 5460  
 ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaatgag ctaaccgctt ttttgacaa 5520  
 catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc 5580  
 aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca acaacgttg gcaaactatt 5640  
 aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcgga 5700  
 taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc cttccggct ggctggttta ttgctgataa 5760  
 atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcgcgg tatcattgca gactggggc cagatggtaa 5820  
 gccctcccgt atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa 5880  
 tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt 5940  
 ttactcatat atactttaga ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt 6000

ES 2 470 440 A1

gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatccttaac gtgagttttc gttccactga 6060  
gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta 6120  
atctgtgct tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa 6180  
gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact 6240  
gttcttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca 6300  
tacctcgtc tgctaactct gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt 6360  
accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg 6420  
ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag 6480  
cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaa aggcggacag gtatccggta 6540  
agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagctt cagggggaaa cgcttggtat 6600  
ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg 6660  
tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cttttttacg gttcctggcc 6720  
ttttgctggc cttttgctca catgttcttt cctgcttatt cccctgattc tgtggataac 6780  
cgtattaccg cttttgagtg agctgatacc gctcgcgca gccgaacgac cgagcgcagc 6840  
gagtcagtga gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatacgca aaccgcctct ccccgcgcgt 6900  
tggccgattc attaatgcag 6920

<210> 11  
<211> 7294  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<221> source  
<222> 1..7294  
<223> /mol\_type="DNA"  
/note="Plásmido pSAD v5.0 clonado con exones 4, 5, 6 y 7 y  
secuencias flanqueantes de los intrones 3, 4, 5, 6 y 7 del gen  
BRCA2 de Homo sapiens"  
/organism="Artificial Sequence"

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> 1283..3610  
<223> /note="Exones 4, 5, 6 y 7 y secuencias flanqueantes de los  
intrones 3, 4, 5, 6 y 7 del gen BRCA2"

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> join(1..1282,3611..7294)  
<223> /note="Plásmido pSAD v5.0"

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> 1..7294  
<223> /note="Minigen MGBR2\_EX4-7"

<400> 11  
ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt 60  
atgcaaagca tgcatctcaa ttagtcagca accaggtgtg gaaagtcccc aggctcccca 120  
gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caacatagc cccgcccta 180  
actccgcca tcccgcccct aactccgccc agttccgccc attctccgcc ccatggctga 240

ES 2 470 440 A1

ctaatTTTTT ttatttatgc agaggccgag gccgcctcgg cctctgagct attccagaag 300  
 tagtgaggag gctTTTTTgg aggcctaggg ttttgcaaaa aacttgact gtgtttactt 360  
 gcaatCCCCC aaaacagaca gaatggtgca tctgtccagt gaggagaagt ctgCGGtcac 420  
 tgccctgtgg ggcaaggTga atgtggaaga agttggtggT gaggccctgg gcaggctgct 480  
 ggTgtctac ccatggaccC agaggTtctt cgagTccttT ggggacctgt cctctgcaaa 540  
 tgctgttatg aacaatccta aggtgaaggc tcatggcaag aaggTgctgg ctgccttcag 600  
 tgagggtctg agtcacctgg acaacctcaa aggcaccttT gctaagctga gtgaactgca 660  
 ctgtgacaag ctgcacgctc tagagTcgac ccagcagtaa gtaatacatg taatgcaacc 720  
 tatacaata gcaatagtag cattagtagt agcaataata atagcaatag ttgtgtggTc 780  
 catagtaatc atagaatata ggaaaatatt aagacaaaga aaaatagaca ggTtaattga 840  
 tagactaata gaaagagcag aagacagtgg caatgagagt gaaggagaaa tatcagcact 900  
 tgtggagatg ggggtggaga tggggcacca tgctcctTgg gatgttgatg atctgtagtg 960  
 ctacagaaaa attgtgggtc acagtctatt atggggtagg gatcaccaga attgtaacgc 1020  
 ttacaatttc cattcgccat tcaggctgcg caactgtTgg gaaggcgat cggtgcgggc 1080  
 ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt 1140  
 aacgccaggg ttttcccagt cacgacgtTg taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata 1200  
 cgactcacta tagggcgaaT tggagctcca ccgcggtggc ggccgctcta gaactagTgg 1260  
 atccccggg ctgcaggaat tctctggtac attggtaggt tttcagtaa tgtcttcct 1320  
 tactcctttt ttctctttcc ttctgctttt gtttaaagcg acaagatgtt gctcttttcc 1380  
 caggctggaa tacagtggca tgatcatagc tcaagctcct gggctcaagt gatcctcccg 1440  
 cctcagcctc tcaagtagct aggactacag gcatatcacc acaccagcgt tttctttgta 1500  
 gaggcagagt ctcaactctgt tgctcaggca ggtgttgaac tcctgcctca agcaatcctc 1560  
 ccacctcagc ctcccagagc cctcaaatta taagccactg tgctcggggc atcctttttg 1620  
 gggggtaatc agcaaaactga aaaacctctt cttacaactc cctatacatt ctattccca 1680  
 gtatagagga gactTTTTgt ttttaaacac ttccaaagaa tgcaaattta taatccagag 1740  
 tatatacatt ctcaactgaat tattgtactg tttcaggaag gaatgttccc aatagtagac 1800  
 ataaaagtct tcgcacagtg aaaactaaaa tggatcaagc agatgatgtt tcctgtccac 1860  
 ttctaaattc ttgtcttagt gaaaggTatg atgaagctat tatattaaaa tatttaaTg 1920  
 aaacattttc ctacatatat ttgttctata aagatgaatc tgatttttat gctaatttt 1980  
 tggctaagag cctggtagaa gatcttacaT ttttaaataa tcttttaggt tgagTccttT 2040  
 aatagaatag tttttacatt agaaacatgt aagttgtTgt tcttgtgatg ttgaattggc 2100  
 tggTTTTctg tatattctgt gatTTTTtaa gtaacaaaaa taacagTggT gaaaagcagT 2160  
 aagTcagTcc ttgaattatc aatttaaaat aaattgtgta cttttcatct ttggagagaa 2220  
 tatgatttac tttacaaatt tttttttTgt tttttttttt tttgagatgg agTctctgTc 2280  
 acccaggtcT tagTgcagTg gtgcgatctc agctcactgc aagctccgcc tcccgggttc 2340

ES 2 470 440 A1

acgccattct cctgcctcag cctcccaagt agctgggact acaggcgccc gccaccatgc 2400  
 ccggctaatt ttttgtatth ttagtagaga cggggtttca ctgtgttagc taggatggtc 2460  
 tcgatttctt gacctcgtga tccgcccgcc tcagcctccc agactgctgg gattacaggc 2520  
 gtgaaccact gtgcccggcc tactttacaa aatthttgag tttaaaatac acggtttcca 2580  
 gcagctgaaa tttgtgagta catatgtgtt ggcatthtaa acatcacttg atgattatth 2640  
 aatgcttcat gagagatthta cthttthaaaa tgtaataata aatatctaaa agtagtattc 2700  
 caacaatthta tatgaatgag aatcttcttht taaaaataag ataaactagt tthtgccagt 2760  
 thttthaaaat aacctaaggg atthtgctthg thttatthta gtcctgttgt tctacaatgt 2820  
 acacatgtaa caccacaaaag agataagtca ggtatgatta aaaacaatgc thtttattct 2880  
 tagaatacta gaaatgttaa taaaaataaa acttaacaat thtcccccttht thttaccccc 2940  
 agtggtatgt gggagthttgt thcatacacc aaagthttgtg aaggtaaata thctacctgg 3000  
 thttatththta tgacttagta atthgagaatt tgacaatagc gttataccttht tggcctgaga 3060  
 thttacaaatc tgtacctagc atthctgcctc atacaggcaa thcagtaaac gthtaagtga 3120  
 ataaagagtg aatgaaaaaa taatathcttht aatgatcagg gcattthctat aaaaaataaa 3180  
 ctatthttcttht thctcccagg gtcgtcagac accaaaacat atthtctgaaa gtctaggagc 3240  
 tgagggtgat cctgatatgt cthgggtcaag thctthtagct acaccacca cccttagtht 3300  
 tactgtgctc ataggtaata atagcaaatg tgtatthtaca agaaagagca gatgaggtht 3360  
 ataattgtca thcttaatac thctgtthaaa aggaaatag aaaagaaat atthagataat 3420  
 gtctthtgata agtgtgttag taactgacaa taatthttatt ctattaagtg tagattggaa 3480  
 taaatacaaaa tacatthtagt ggtagtccag tggtgtcaag cattatgtht tagtacgatg 3540  
 tgattaacgt agaatagcttht acaaatatthc cthttactggc ctatataagc gthttaagagg 3600  
 cagtatthtg ctcgaggggg ggcccggtag ccagctthttg thtccctthttg tgagggtthaa 3660  
 thtgcgcgcttht ggcgtaataca tgggtcatagc tgtthtctgt gtgaaattgt tatccgctca 3720  
 caattccaca caacatacga gccggaagca taaagtgtaa agcctgggggt gcctaatgag 3780  
 tgagctaact cacatthatt gcgttgcgct cactgcccgc catatgatac agaggthcat 3840  
 aatgthttggg ccacacatgc cgggtgtacc acagaccca accacaaga agtagthattg 3900  
 gtaaatgtga cagaaaattht taacatgtgg aaaaatgaca tggtagaaca gatgcatgag 3960  
 gatataatca gthttatggga tcaaagccta aagccatgtg taggaaaact actthtgacc 4020  
 actgctgtgc cthtggaatgc tagthtggagt aataaatctc tggaacagat thtggaatcac 4080  
 acgacctgga tggagthggga cagagaaattht aacaattaca caactthaat aactcctthta 4140  
 atthgaagaat cgcaaaaacca gcaagaaaag aatgaacaag aatthattgga atthagataaa 4200  
 tgggcaagtht tgtggaatthg gthttaacata acaaatthggc tgtggtatatht aaaatthattc 4260  
 ataatgatag taggaggcttht ggtagththta agaatagtht thtctgtact thctgtagtht 4320  
 aatagagthta ggcaggggata thcaccattht thctthtcagg cctggagatc thcccagggg 4380  
 acccgacagg cccgaaggaa tagaagaaga aggtggagag agagacagag acagatccat 4440  
 tcgaccaattht cactcctcag gtgcaggctg cctatcagaa ggtggtggct ggtgtggcca 4500

ES 2 470 440 A1

atgccctggc tcacaaatac cactgagatc cagacatgat aagatacatt gatgagtttg 4560  
gacaaaccac aactagaatg cagtgaaaaa aatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgcta 4620  
ttgctttatt tgtaaccatt ataagctgca ataaacaagt taacaacaac aattgcattc 4680  
atTTTTatgTT tcaggttcag ggggaggtgt gggaggTTTT ttaaagcaag taaaacctct 4740  
acaaatgtgg tatggctgat tatgatcccc aggaagctcc tctgtgtcct cataaacct 4800  
aacctcctct acttgagagg acattccaat cataggctgc ccatccaccc tctgtgtcct 4860  
cctgttaatt aggtcactta acaaaaagga aattgggtag gggTTTTtca cagaccgctt 4920  
tctaagggtta atTTTTaaaat atctgggaag tcccttccac tgctgtgttc cagaagtgtt 4980  
ggtaaacagc ccacaaatgt caacagcaga aacatacaag ctgtcagctt tgcacaaggg 5040  
cccaacaccc tgctcatcaa gaagcactgt ggttgctgtg ttagtaatgt gcaaacaggg 5100  
aggcacattt tccccacctg tgtaggttcc aaaatatcta gtgttttcat ttttacttgg 5160  
atcaggaacc cagcactcca ctggataagc attatcctta tccaaaacag ccttgtggtc 5220  
agtgttcacT tgctgactgt caactgtagc atTTTTtggg gttacagttt gagcaggata 5280  
tttggTcctg tagtttgcta acacacccca ggtggcactt ttcggggaaa tgtgCgCgga 5340  
accctattt gtttattttt ctaaatacat tcaaatatgt atccgctcat gagacaataa 5400  
ccctgataaa tgcttcaata atattgaaaa aggaagagta tgagtattca acatttccgt 5460  
gtcgcCctta tccctTTTT tgcggcattt tgccttCctg tttttgctca cccagaaacg 5520  
ctggtgaaag taaaagatgc tgaagatcag ttgggtgcac gagtgggtta catcgaactg 5580  
gatctcaaca gcggtaaagat ccttgagagt tttcgccccg aagaacgttt tccaatgatg 5640  
agcactttta aagttctgct atgtggcgcg gtattatccc gtattgacgc cgggcaagag 5700  
caactcggtc gccgcataca ctattctcag aatgacttgg ttgagtactc accagtcaca 5760  
gaaaagcatc ttacggatgg catgacagta agagaattat gcagtgtgc cataaccatg 5820  
agtgataaca ctgcggccaa ctTacttctg acaacgatcg gaggaccgaa tgagctaacc 5880  
gctTTTTtgc acaacatggg ggatcatgta actcgccttg atcgttggga accggagctg 5940  
aatgaagcca taccaaacga cgagcgtgac accacgatgc ctgtagcaat ggcaacaacg 6000  
ttgcgcaaac tattaactgg cgaactactt actctagctt cccggcaaca attaatagac 6060  
tggatggagg cggataaaagt tgcaggacca cttctgcgct cggcccttcc ggctggctgg 6120  
tttattgctg ataaatctgg agccggtgag cgtgggtctc gcggtatcat tgcagcactg 6180  
gggccagatg gtaagccctc ccgtatcgta gttatctaca cgacggggag tcaggcaact 6240  
atggatgaac gaaatagaca gatcgctgag ataggtgcct cactgattaa gcattggtaa 6300  
ctgtcagacc aagtttactc atatatactt tagattgatt taaaacttca tttttaattt 6360  
aaaaggatct aggtgaagat cttttttgat aatctcatga ccaaatcct taacgtgagt 6420  
tttcttcca ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt 6480  
tttttctgCg cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc accgctacca gcggtggttt 6540  
gtttgccgga tcaagagcta ccaactctt ttccgaaggT aactggcttc agcagagcgc 6600

ES 2 470 440 A1

```

agataccaaa tactgttctt ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg      6660
tagcaccgcc tacatacctc gctctgctaa tcctgttacc agtggctgct gccagtggcg      6720
ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt accggataag gcgcagcggt      6780
cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc ccagcttggg gccaacgacc tacaccgaac      6840
tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct tcccgaaggg agaaaggcgg      6900
acaggtatcc ggtaagcggc agggtcggaa caggagagcg cacgaggagg cttccagggg      6960
gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat      7020
ttttgtgatg ctcgctcaggg gggcggagcc tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt      7080
tacggttcct ggccttttgc tggccttttg ctcacatggt ctttcctgcg ttatcccctg      7140
attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga taccgctcgc cgcagccgaa      7200
cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga gcgcccaata cgcaaaccgc      7260
ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcag                                     7294

```

```

<210> 12
<211> 8061
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<221> source
<222> 1..8061
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Plásmido pSAD v5.0 clonado con exones 3, 4, 5, 6 y 7 y
      secuencias flanqueantes de los intrones 2, 3, 4, 5, 6 y 7 del
      gen BRCA2 de Homo sapiens"
      /organism="Artificial Sequence"

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> 1283..4377
<223> /note="Exones 3, 4, 5, 6 y 7 y secuencias flanqueantes de los
      intrones 2, 3, 4, 5, 6 y 7 del gen BRCA2"

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> join(1..1282,4378..8061)
<223> /note="Plásmido pSAD v5.0"

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> 1..8061
<223> /note="Minigen MGBR2_EX3-7"

```

```

<400> 12
ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt      60
atgcaaagca tgcattctcaa ttagtcagca accagggtgtg gaaagtcccc aggctcccca      120
gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caacatagtt cccgccccta      180
actccgcca tcccgccctt aactccgccc agttccgccc attctccgcc ccatggctga      240
ctaatttttt ttatttatgc agaggccgag gccgcctcgg cctctgagct attccagaag      300
tagtgaggag gcttttttgg aggcctaggg ttttgcaaaa aacttgact gtgtttactt      360
gcaatcccc aaaacagaca gaatggtgca tctgtccagt gaggagaagt ctgcggtcac      420
tgcctgtgg ggcaaggtga atgtggaaga agttggtggt gaggccctgg gcaggctgct      480

```



ES 2 470 440 A1

ggttgtctac ccatggaccc agaggttctt cgagtccttt ggggacctgt cctctgcaaa 540  
 tgctgttatg aacaatccta aggtgaaggc tcatggcaag aaggtgctgg ctgccttcag 600  
 tgagggctcg agtcacctgg acaacctcaa aggcaccttt gctaagctga gtgaactgca 660  
 ctgtgacaag ctgcacgctc tagagtcgac ccagcagtaa gtaatacatg taatgcaacc 720  
 tatacaata gcaatagtag cattagtagt agcaataata atagcaatag ttgtgtggtc 780  
 catagtaatc atagaatata ggaaaatatt aagacaaaga aaaatagaca ggtaattga 840  
 tagactaata gaaagagcag aagacagtgg caatgagagt gaaggagaaa tadcagcact 900  
 tgtggagatg ggggtggaga tggggcacca tgctccttgg gatgttgatg atctgtagtg 960  
 ctacagaaaa attgtgggtc acagtctatt atggggtagg gatcaccaga attgtaacgc 1020  
 ttacaatttc cattcgccat tcaggctgcg caactgttgg gaagggcgat cgggtcgggc 1080  
 ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaagggat taagttgggt 1140  
 aacgccaggg ttttcccagt cacgacgttg taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata 1200  
 cgactcacta tagggcgaat tggagctcca ccgcggtggc ggccgctcta gaactagtgg 1260  
 atccccggg ctgcaggaat tccacacatc cggacacaca ttcgaagcca tcttgaact 1320  
 tttgtgaact cttgttacac ctttctatag attcgaaga gaatggatta atgatcttgt 1380  
 ttaattaata tgccttaaca aaagtaatcc atagtcaaga tcttaagcat tttttcctt 1440  
 atgatcttta actgttctgg gtcacaaatt tgtctgtcac tggttaaac taaggtggga 1500  
 tttttttttt aaatagattt aggaccaata agtcttaatt ggtttgaaga actttcttca 1560  
 gaagctccac cctataattc tgaacctgca gaagaatctg aacataaaaa caacaattac 1620  
 gaaccaaacc tattttaaacc tccacaaagg aaaccatctt ataatcagct ggcttcaact 1680  
 ccaataatat tcaaagagca agggctgact ctgccgctgt accaatctcc tgtaaaagaa 1740  
 ttagataaat tcaaattaga cttaggtaag taatgcaata tggtagactg gggagaacta 1800  
 caaactagga atttaggcaa acctgtgtta aatcttagc tcattcatta attgtgtcat 1860  
 gctgggcaaa tcagtctctc tggcctcttt ttctcactc gaaaaatgga gacgatgaaa 1920  
 ataatgtctc ataggtttgg attaaattaa ataatgtagg tacttagtaa atgttctctt 1980  
 tcatccctcc tttgataaat ttgccaaactg agatttgctg aattacgtct ttcttatgcc 2040  
 aagaattcct ctggtacatt ggtaggtttt cagtaaagt cttcccttac tccttttttc 2100  
 tctttccttc tgcttttgtt taaagcgaca agatgttgct ctttccag gctggaatac 2160  
 agtggcatga tcatagctca agctcctggg ctcaagtgat cctcccgcct cagcctctca 2220  
 agtagctagg actacaggca tatcaccaca ccagcgtttt cttttagag gcagagtctc 2280  
 actctgttgc tcaggcaggt gttgaactcc tgcctcaagc aatcctcca cctcagcctc 2340  
 ccagagccct caaattataa gccactgtgc tcggggcatc ctttttggg ggtaatcagc 2400  
 aaactgaaaa acctcttctt acaactccct atacattctc attcccagta tagaggagac 2460  
 tttttgtttt taaacacttc caaagaatgc aaatttataa tccagagtat atacattctc 2520  
 actgaattat tgtactgttt caggaaggaa tgttcccaat agtagacata aaagtcttcg 2580

ES 2 470 440 A1

cacagtgaaa actaaaatgg atcaagcaga tgatgtttcc tgtccacttc taaattcctg 2640  
tcttagtgaa aggtatgatg aagctattat attaaaatat ttaaatgaaa cattttccta 2700  
catatatattg ttctataaag atgaatctga tttttatgct aatatttttg ctaagagcct 2760  
ggtagaagat cttacatttt taaataatct tttaggttga gtcctttaat agaatagttt 2820  
ttacattaga aacatgtaag ttgttgttct tgtgatgttg aattggctgg ttttctgtat 2880  
attctgtgat tttttaagta acaaaaaataa cagtggtgaa aagcagtaag tcagtccttg 2940  
aattatcaat ttaaaaataaa ttgtgtactt ttcactcttg gagagaatat gatttacttt 3000  
acaaatTTTT tttttgtttt tttttttttt gagatggagt ctctgtcacc caggctgtag 3060  
tgcagtggtg cgatctcagc tcaactgcaag ctccgcctcc cgggttcacg ccattctcct 3120  
gcctcagcct cccaagtagc tgggactaca ggcgccccgcc accatgcccg gctaattttt 3180  
tgtatTTTTa gttagagcgg ggtttcaactg tgtagctag gatggtctcg atttctgac 3240  
ctcgtgatcc gccccctca gcctcccaga ctgctgggat tacaggcgtg aaccactgtg 3300  
cccgccctac tttacaaaat ttttgagttt aaaatacacg gttccagca gctgaaattt 3360  
gtgagtacat atgtgttggc attttaaaaca tcacttgatg attatttaat gcttcatgag 3420  
agatttactt tttaaaatgt aatataaaat atctaaaagt agtattccaa caatttatat 3480  
gaatgagaat cttcttttaa aaataagata aactagtttt tgccagtttt ttaaaataac 3540  
ctaagggatt tgctttgttt tatttttagtc ctgttgttct acaatgtaca catgtaacac 3600  
cacaagaga taagtcaggt atgattaaaa acaatgcttt ttattcttag aatactagaa 3660  
atgttaataa aaataaaaact taacaatttt cccctttttt taccgccagt ggtatgtggg 3720  
agtttgtttc atacaccaa gtttgtgaag gtaaatttc tacctggttt atttttatga 3780  
cttagtaatt gagaatttga caatagcgtt ataccttgc cctgagattt acaaatctgt 3840  
acctagcatt ctgcctcata caggcaattc agtaaacggt aagtgaaata aagagtgaat 3900  
gaaaaataa tatccttaat gatcagggca tttctataaa aaataaacta ttttctttcc 3960  
tcccagggtc gtcagacacc aaaacatatt tctgaaagtc taggagctga ggtggatcct 4020  
gatatgtctt ggtcaagttc tttagctaca ccaccaccc ttagttctac tgtgctcata 4080  
ggtaataata gcaaatgtgt atttacaaga aagagcagat gaggttgata attgtcatct 4140  
ctaacttctc tgttaaaagg aaatatgaaa agaaaatatt agataatgtc tttgataagt 4200  
gtgtagtaaa ctgacaataa ttttattcta ttaagtgtag attggaataa atacaatac 4260  
athtagtggg agtccagtggt tgtcaagcat tatgttttag tacgatgtga ttaacgtaga 4320  
atagcttaca aatattcctt tactggccta tataagcgtt taagaggcag tatttggtc 4380  
gagggggggc ccggtacca gcttttgttc ccttttgtga gggtaattg cgcgcttggc 4440  
gtaatcatgg tcatagctgt ttcctgtgtg aaattgttat ccgctcaca ttccacaca 4500  
catacgagcc ggaagcataa agtgtaaagc ctggggtgcc taatgagtga gctaactcac 4560  
attaattgcg ttgctgtcac tgcccgcct atgatacaga ggtacataat gtttgggcca 4620  
cacatgccgg tgtaccaca gacccaacc cacaagaagt agtattggtg aatgtgacag 4680  
aaaattttaa catgtggaaa aatgacatgg tagaacagat gcatgaggat ataatcagtt 4740

ES 2 470 440 A1

tatgggatca	aagcctaaag	ccatgtgtag	gaaaactact	ttgcaccact	gctgtgcctt	4800
ggaatgctag	ttggagtaat	aaatctctgg	aacagatttg	gaatcacacg	acctggatgg	4860
agtgggacag	agaaattaac	aattacacaa	acttaataca	ctccttaatt	gaagaatcgc	4920
aaaaccagca	agaaaagaat	gaacaagaat	tattggaatt	agataaatgg	gcaagtttgt	4980
ggaattggtt	taacataaca	aattggctgt	ggtatataaa	attattcata	atgatagtag	5040
gaggcttgg	aggtttaaga	atagtttttg	ctgtactttc	tgtagtgaat	agagttaggc	5100
agggatattc	accattttct	tttcaggcct	ggagatctcc	cgaggggacc	cgacaggccc	5160
gaaggaatag	aagaagaagg	tggagagaga	gacagagaca	gatccattcg	accaattcac	5220
tcctcagggtg	caggctgcct	atcagaaggt	ggtggctggt	gtggccaatg	ccctggctca	5280
caaataccac	tgagatccag	acatgataag	atacattgat	gagtttgac	aaaccacaac	5340
tagaatgcag	tgaaaaaat	gctttatttg	tgaaatttgt	gatgctattg	ctttatttgt	5400
aaccattata	agctgcaata	aacaagttaa	caacaacaat	tgcattcatt	ttatgtttca	5460
ggttcagggg	gaggtgtggg	aggtttttta	aagcaagtaa	aacctctaca	aatgtggtat	5520
ggctgattat	gatccccagg	aagctcctct	gtgtcctcat	aaaccctaac	ctcctctact	5580
tgagaggaca	ttccaatcat	aggctgcca	tccaccctct	gtgtcctcct	gttaattagg	5640
tcacttaaca	aaaaggaaat	tgggtagggg	ttttcacag	accgctttct	aagggttaatt	5700
ttaaaatatac	tgggaagtcc	cttccactgc	tgtgttccag	aagtgttgg	aaacagccca	5760
caaatgtcaa	cagcagaaac	atacaagctg	tcagctttgc	acaagggccc	aacaccctgc	5820
tcataagaa	gcaactgtgt	tgctgtgtta	gtaatgtgca	aaacaggagg	cacattttcc	5880
ccacctgtgt	aggttccaaa	atatctagtg	ttttcatttt	tacttgatc	aggaaccag	5940
cactccactg	gataagcatt	atccttatcc	aaaacagcct	tgtggtcagt	gttcatctgc	6000
tgactgtcaa	ctgtagcatt	ttttgggggt	acagtttgag	caggatattt	ggtcctgtag	6060
tttgctaaca	caccccagg	ggcacttttc	ggggaaatgt	gcgcggaacc	cctatttgtt	6120
tatttttcta	aatacattca	aatatgtatc	cgctcatgag	acaataacc	tgataaatgc	6180
ttcaataata	ttgaaaaagg	aagagtatga	gtattcaaca	tttccgtgtc	gcccttattc	6240
ccttttttgc	ggcattttgc	cttcctgttt	ttgctcacc	agaaacgctg	gtgaaagtaa	6300
aagatgctga	agatcagttg	ggtgcacgag	tgggttacat	cgaactggat	ctcaacagcg	6360
gtaagatcct	tgagagtttt	cgccccgaag	aacgttttcc	aatgatgagc	acttttaaag	6420
ttctgctatg	tggcgcggta	ttatcccgta	ttgacgccgg	gcaagagcaa	ctcggtcgcc	6480
gcatacacta	ttctcagaat	gacttggttg	agtactcacc	agtcacagaa	aagcatctta	6540
cggatggcat	gacagtaaga	gaattatgca	gtgctgcat	aaccatgagt	gataacactg	6600
cggccaactt	acttctgaca	acgatcggag	gaccgaatga	gctaaccgct	tttttgaca	6660
acatggggga	tcatgtaact	cgcttgatc	ggtgggaacc	ggagctgaat	gaagccatac	6720
caaacgacga	gcgtgacacc	acgatgcctg	tagcaatggc	aacaacgttg	cgcaactat	6780
taactggcga	actacttact	ctagcttccc	ggcaacaatt	aatagactgg	atggaggcgg	6840

ES 2 470 440 A1

ataaagttgc aggaccactt ctgctgctcg cccttccggc tggctggttt attgctgata 6900  
aatctggagc cggtgagcgt gggctctcgc gtatcattgc agcactgggg ccagatggta 6960  
agccctcccg tatcgtagtt atctacacga cggggagtcg ggcaactatg gatgaacgaa 7020  
atagacagat cgctgagata ggtgcctcac tgattaagca ttggtaactg tcagaccaag 7080  
tttactcata tatacttttag attgatttaa aacttcattt ttaatttaaa aggatctagg 7140  
tgaagatcct ttttgataat ctcatgacca aaatccttaa cgtgagtttt cgttccactg 7200  
agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgctcgt 7260  
aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttggt tgccggatca 7320  
agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatc 7380  
tgttcttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac 7440  
atacctcgct ctgctaatac tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct 7500  
taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg 7560  
gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac accgaactga gatacctaca 7620  
gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt 7680  
aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta 7740  
tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc 7800  
gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggc 7860  
cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tcctgctgta tcccctgatt ctgtggataa 7920  
ccgtattacc gcctttgagt gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgcag 7980  
cgagtcagtg agcgaggaag cggaagagcg cccaatacgc aaaccgcctc tccccgcgcg 8040  
ttggccgatt cattaatgca g 8061

<210> 13  
<211> 8600  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<221> source  
<222> 1..8600  
<223> /mol\_type="DNA"  
/note="Plásmido pSAD v5.0 clonado con exones 3, 4, 5, 6, 7 y 8 y  
secuencias flanqueantes de los intrones 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 del  
gen BRCA2 de Homo sapiens"  
/organism="Artificial Sequence"

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> join(1..1282,4932..8600)  
<223> /note="Plásmido pSAD v5.0"

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> 1283..4931  
<223> /note="Exones 3, 4, 5, 6, 7 y 8 y secuencias flanqueantes de los  
intrones 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 del gen BRCA2"

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> 1..8600

ES 2 470 440 A1

<223> /note="Minigen MGBR2\_EX3-8"

<400> 13

ctgtggaatg	tgtgtcagtt	aggggtgtgga	aagtccccag	gctccccagc	aggcagaagt	60
atgcaaagca	tgcatctcaa	ttagtcagca	accaggtgtg	gaaagtcccc	aggctcccca	120
gcaggcagaa	gtatgcaaag	catgcatctc	aattagtcag	caacatagct	cccgccccta	180
actccgcca	tcccgcccct	aactccgccc	agttccgccc	attctccgcc	ccatggctga	240
ctaatttttt	ttatttatgc	agaggccgag	gccgcctcgg	cctctgagct	attccagaag	300
tagtgaggag	gcttttttgg	aggcctaggc	ttttgcaaaa	aacttgact	gtgtttactt	360
gcaatcccc	aaaacagaca	gaatggtgca	tctgtccagt	gaggagaagt	ctgcggtcac	420
tgccctgtgg	ggcaagggtga	atgtggaaga	agttggtggt	gaggccctgg	gcaggctgct	480
ggttgtctac	ccatggacct	agaggttctt	cgagtccttt	gggacctgt	cctctgcaaa	540
tgctgttatg	aacaatccta	aggtgaaggc	tcatggcaag	aaggtgctgg	ctgccttcag	600
tgagggctctg	agtcacctgg	acaacctcaa	aggcaccttt	gctaagctga	gtgaactgca	660
ctgtgacaag	ctgcacgctc	tagagtcgac	ccagcagtaa	gtaatacatg	taatgaacc	720
tatacaaata	gcaatagtag	cattagtagt	agcaataata	atagcaatag	ttgtgtggtc	780
catagtaatc	atagaatata	ggaaaatatt	aagacaaaga	aaaatagaca	ggttaattga	840
tagactaata	gaaagagcag	aagacagtgg	caatgagagt	gaaggagaaa	tatcagcact	900
tgtggagatg	gggggtggaga	tggggcacca	tgctccttgg	gatgttgatg	atctgtagtg	960
ctacagaaaa	attgtgggtc	acagtctatt	atggggtagg	gatcaccaga	attgtaacgc	1020
ttacaatttc	cattcgccat	tcaggctgcg	caactgttgg	gaagggcgat	cggtgctggc	1080
ctcttcgcta	ttacgccagc	tggcgaaagg	gggatgtgct	gcaaggcgat	taagttgggt	1140
aacgccaggg	ttttcccagt	cacgacgttg	taaaacgacg	gccagtgagc	gcgcgtaata	1200
cgactcacta	tagggcgaat	tggagctcca	ccgcggtggc	ggccgctcta	gaactagtgg	1260
atccccggg	ctgcaggaat	tccacacatc	cggacacaca	ttcgaagcca	tcttgaact	1320
tttgtgaact	cttgttacac	ctttctatag	attcgcaaga	gaatggatta	atgatcttgt	1380
ttaattaata	tgccttaaca	aaagtaatcc	atagtcaaga	tcttaagcat	tttttctctt	1440
atgatcttta	actgttctgg	gtcacaaatt	tgtctgtcac	tggttaaaac	taaggtggga	1500
tttttttttt	aaatagattt	aggaccaata	agtcttaatt	ggtttgaaga	actttcttca	1560
gaagctccac	cctataattc	tgaacctgca	gaagaatctg	aacataaaaa	caacaattac	1620
gaaccaaacc	tatttaaaac	tccacaaagg	aaaccatctt	ataatcagct	ggcttcaact	1680
ccaataatat	tcaaagagca	agggctgact	ctgccgctgt	accaatctcc	tgtaaaagaa	1740
ttagataaat	tcaaattaga	cttaggtaag	taatgcaata	tggtagactg	gggagaacta	1800
caactagga	athtaggcaa	acctgtgtta	aaatcttagc	tcattcatta	attgtgtcat	1860
gctgggcaaa	tcagtctctc	tggcctcttt	ttcctcactc	gaaaaatgga	gacgatgaaa	1920
ataatgtctc	ataggtttgg	attaaattaa	ataatgtagg	tacttagtaa	atgttctctt	1980
tcatccctcc	tttgataaat	ttgccaaactg	agatttgctg	aattacgtct	ttcttatgcc	2040

ES 2 470 440 A1

aagaattcct ctggtacatt ggtaggtttt cagtaaagt cttcccttac tccttttttc 2100  
tctttccttc tgcttttggt taaagcgaca agatgttgct cttttcccag gctggaatac 2160  
agtggcatga tcatagctca agctcctggg ctcaagtgat cctcccgct cagcctctca 2220  
agtagctagg actacaggca tatcaccaca ccagcgtttt cttttagag gcagagtctc 2280  
actctgttgc tcaggcagggt gttgaaactc tgcctcaagc aatcctcca cctcagcctc 2340  
ccagagccct caaattataa gccactgtgc tcggggcatc ctttttgggg ggtaatcagc 2400  
aaactgaaaa acctcttctt acaactccct atacattctc attcccagta tagaggagac 2460  
tttttgtttt taaacacttc caaagaatgc aaatttataa tccagagtat atacattctc 2520  
actgaattat tgtactgttt caggaaggaa tgttccaat agtagacata aaagtcttcg 2580  
cacagtgaaa actaaaatgg atcaagcaga tgatgtttcc tgtccacttc taaattcttg 2640  
tcttagtgaa aggtatgatg aagctattat attaaaatat ttaaatagaa ctttttctta 2700  
catatatttg ttctataaag atgaatctga tttttatgct aatattttgg ctaagagcct 2760  
ggtagaagat cttacatttt taaataatct tttaggttga gtcctttaat agaatagttt 2820  
ttacattaga aacatgtaag ttgttgttct tgtgatgttg aattggctgg ttttctgtat 2880  
attctgtgat tttttaagta acaaaaataa cagtggtgaa aagcagtaag tcagtccttg 2940  
aattatcaat ttaaaataaa ttgtgtactt ttcacttttg gagagaatat gatttacttt 3000  
acaaattttt tttttgtttt tttttttttt gagatggagt ctctgtcacc caggctgtag 3060  
tgcagtggtg cgatctcagc tcaactgcaag ctccgcctcc cgggttcacg ccattctcct 3120  
gcctcagcct cccaagtagc tgggactaca ggcgcccgcc accatgcccg gctaattttt 3180  
tgtattttta gtagagacgg ggtttcaactg tgtagctag gatggctcg atttctgac 3240  
ctcgtgatcc gcccgcctca gcctcccaga ctgctgggat tacaggcgtg aaccactgtg 3300  
cccggcctac tttacaaaat ttttgagttt aaaatacacg gtttccagca gctgaaattt 3360  
gtgagtacat atgtgttggc attttaaaca tcaactgatg attatttaat gcttcatgag 3420  
agatttactt tttaaaatgt aatataaaat atctaaaagt agtattcaa caatttatat 3480  
gaatgagaat cttcttttaa aaataagata aactagtttt tgccagtttt ttaaaataac 3540  
ctaagggatt tgctttgttt tatttttagtc ctgttgttct acaatgtaca catgtaacac 3600  
caciaagaga taagtcagggt atgattaaaa acaatgcttt ttattcttag aatactagaa 3660  
atgttaataa aaataaaact taacaatttt cccctttttt taccctcaggt ggtatgtggg 3720  
agtttgtttc atacaccaa gtttgtgaag gtaaataatc tacctggttt atttttatga 3780  
cttagtaatt gagaatttga caatagcgtt atacctttgc cctgagattt acaaatctgt 3840  
acctagcatt ctgcctcata caggcaattc agtaaacggt aagtgaata aagagtgaat 3900  
gaaaaaataa tacccttaat gatcagggca tttctataaa aaataaacta ttttctttcc 3960  
tcccagggtc gtcagacacc aaaacatatt tctgaaagtc taggagctga ggtggatcct 4020  
gatatgtctt ggtcaagttc ttttagctaca ccaccacc ttagttctac tgtgctcata 4080  
ggtaataata gcaaatgtgt atttacaaga aagagcagat gaggttgata attgtcatct 4140  
ctaatacttc tgttaaaagg aaatatgaaa agaaaatatt agataatgtc tttgataagt 4200

ES 2 470 440 A1

gtgtagtaa ctgacaataa ttttattcta ttaagtgtag attggaataa atacaaatac 4260  
 atttagtggg agtccagtggt tgtcaagcat tatgttttag tacgatgtga ttaacgtaga 4320  
 atagcttaca aatattcctt tactggccta tataagcggt taagaggcag tatttggtc 4380  
 gaggtcataa cctcacagca tcatctgact ttccaactca ttgtggacag tattaccata 4440  
 aagtaatgat caccaagcca tatcttacca ccttgtgagt agtactaagg aagtaagtat 4500  
 agtttattca ctgtgttgat tgacctttct aattactata ctttaagtact tgaatcaatt 4560  
 cttttgttt caaatgtgtc atgtaatcaa atagtagatg tgctttttga tgtctgacaa 4620  
 aaaataagtt tttgcattct agtgataata tacaatacac ataaatTTTT atcttacagt 4680  
 cagaaatgaa gaagcatctg aaactgtatt tcctcatgat actactgctg taagtaaata 4740  
 tgacattgat tagactgttg aaattgctaa caattttgga atgccttggt aaattattta 4800  
 tcttacattt ttaatttcct aatctgtaat ttatctaagc ctttgagaaa gtctctaaac 4860  
 ctggcctat atgtgatttt aacttcctgt gaaactctgc tgtctctctg ttaaagttga 4920  
 agctttgtgt gggtagccag cttttgttcc cttttgtgag ggttaattgc gcgcttggcg 4980  
 taatcatggt catagctggt tcctgtgtga aattgttatc cgctcacaat tccacacaac 5040  
 atacgagccg gaagcataaa gtgtaaagcc tgggggtgcct aatgagtgag ctaactcaca 5100  
 ttaattgcgt tgcgctcact gcccgccata tgatacagag gtacataatg tttgggccac 5160  
 acatgccggt gtacccacag accccaacc acaagaagta gtattggtaa atgtgacaga 5220  
 aaattttaac atgtggaaaa atgacatggt agaacagatg catgaggata taatcagttt 5280  
 atgggatcaa agcctaaagc catgtgtagg aaaactactt tgcaccactg ctgtgccttg 5340  
 gaatgctagt tggagtaata aatctctgga acagatttg aatcacacga cctggatgga 5400  
 gtgggacaga gaaattaaca attacacaaa cttataacac tccttaattg aagaatcgca 5460  
 aaaccagcaa gaaaagaatg aacaagaatt attggaatta gataaatggg caagtttggtg 5520  
 gaattggttt aacataacaa attggctgtg gtatataaaa ttattcataa tgatagtagg 5580  
 aggcttggtg ggtttaagaa tagtttttgc tgtactttct gtagtgaata gagttaggca 5640  
 gggatattca ccatTTTctt ttcaggcctg gagatctccc gaggggacct gacaggccccg 5700  
 aaggaataga agaagaaggt ggagagagag acagagacag atccattcga ccaattcact 5760  
 cctcaggtgc aggctgccta tcagaagggtg gtggctgggtg tggccaatgc cctggctcac 5820  
 aaataccact gagatccaga catgataaga tacattgatg agtttgaca aaccacaact 5880  
 agaatgcagt gaaaaaatg ctttatttgt gaaatttggt atgctattgc tttatttgta 5940  
 accattataa gctgcaataa acaagttaac aacaacaatt gcattcattt tatgtttcag 6000  
 gttcaggggg aggtgtggga ggttttttaa agcaagtaaa acctctaca atgtgggatg 6060  
 gctgattatg atccccagga agctcctctg tgtcctcata aaccctaacc tcctctactt 6120  
 gagaggacat tccaatcata ggctgcccac ccaccctctg tgtcctcctg ttaattaggt 6180  
 cacttaacaa aaaggaaaatt gggtaggggt ttttcacaga ccgctttcta agggtaattt 6240  
 taaaatatct gggaggtccc ttccactgct gtgttcaga agtgttggtg aacagcccac 6300

ES 2 470 440 A1

aaatgtcaac agcagaaaca tacaagctgt cagctttgca caagggccca acaccctgct 6360  
 catcaagaag cactgtgggt gctgtgtag taatgtgcaa aacaggaggc acattttccc 6420  
 cacctgtgta ggttccaaaa tatctagtgt tttcattttt acttgatca ggaaccagc 6480  
 actccactgg ataagcatta tccttatcca aaacagcctt gtggtcagtg ttcactgct 6540  
 gactgtcaac tgtagcattt tttgggggta cagtttgagc aggatatttg gtcctgtagt 6600  
 ttgctaacac accccagggt gcacttttcg gggaaatgtg cgcggaacc ctatttgttt 6660  
 atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct 6720  
 tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc 6780  
 cttttttgcg gcattttgcc ttctgtttt tgctcacca gaaacgctgg tgaaagtaaa 6840  
 agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg 6900  
 taagatcctt gagagtttt gcccccgaaga acgttttcca atgatgagca cttttaaagt 6960  
 tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgtat tgacgccggg caagagcaac tcggtcgccg 7020  
 catacactat tctcagaatg acttggttga gtactacca gtcacagaaa agcatcttac 7080  
 ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataactgctc 7140  
 ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaatgag ctaaccgctt ttttgacaa 7200  
 catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc 7260  
 aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc gcaaactatt 7320  
 aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcgga 7380  
 taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc cttccggct ggctggttta ttgctgataa 7440  
 atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcgcgg tatcattgca gactggggc cagatggtaa 7500  
 gccctcccgt atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa 7560  
 tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt 7620  
 ttactcatat atactttaga ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt 7680  
 gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatcctaac gtgagtttt gttccactga 7740  
 gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgvcgta 7800  
 atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa 7860  
 gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact 7920  
 gttcttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca 7980  
 tacctcgtc tgctaactct gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt 8040  
 accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg 8100  
 ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag 8160  
 cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaa aggcggacag gtatccggta 8220  
 agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagctt cagggggaaa cgcctggat 8280  
 ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg 8340  
 tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cttttttacg gttcctggcc 8400  
 ttttgctggc cttttgctca catgttcttt cctgcgttat cccctgattc tgtggataac 8460



ES 2 470 440 A1

cgtattaccg cctttgagtg agctgatacc gctcgcgcga gccgaacgac cgagcgcagc 8520  
 gagtcagtga gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatacgca aaccgcctct ccccgcgctg 8580  
 tggccgattc attaatgcag 8600

<210> 14  
 <211> 9219  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <221> source  
 <222> 1..9219  
 <223> /mol\_type="DNA"  
 /note="Plásmido pSAD v5.0 clonado con exones 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9  
 y secuencias flanqueantes de los intrones 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y  
 9 del gen BRCA2 de Homo sapiens"  
 /organism="Artificial Sequence"

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 1283..5550  
 <223> /note="Exones 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 y secuencias flanqueantes de  
 los intrones 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 del gen BRCA2"

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> join(1..1282,5551..9219)  
 <223> /note="Plásmido pSAD v5.0"

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 1..9219  
 <223> /note="Minigen MGBR2\_EX3-9"

<400> 14  
 ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt 60  
 atgcaaagca tgcattctcaa ttagtcagca accaggtgtg gaaagtcccc aggctcccca 120  
 gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caacatagc cccgccccta 180  
 actccgcca tcccgccct aactccgcc agttccgcc attctccgcc ccatggctga 240  
 ctaatttttt ttatttatgc agaggccgag gccgcctcgg cctctgagct attccagaag 300  
 tagtgaggag gcttttttgg aggcctagc ttttgcaaaa aacttgact gtgtttactt 360  
 gcaatcccc aaaacagaca gaatggtgca tctgtccagt gaggagaagt ctgcggtcac 420  
 tgccctgtgg ggcaaggtga atgtggaaga agttggtggt gaggccctgg gcaggctgct 480  
 ggttgtctac ccatggacc agaggttctt cgagtcctt gggacactgt cctctgcaaa 540  
 tgctgttatg aacaatccta aggtgaaggc tcatggcaag aaggtgctgg ctgccttcag 600  
 tgaggtctg agtcacctgg acaacctcaa aggcacctt gctaagctga gtgaactgca 660  
 ctgtgacaag ctgcacgctc tagagtcgac ccagcagtaa gtaatacatg taatgcaacc 720  
 tatacaaata gcaatagtag cattagtagt agcaataata atagcaatag ttgtgtggtc 780  
 catagtaatc atagaatata ggaaaatatt aagacaaaga aaaatagaca ggttaattga 840  
 tagactaata gaaagagcag aagacagtgg caatgagagt gaaggagaaa tadcagcact 900  
 tgtggagatg ggggtggaga tggggcacca tgctccttgg gatgttgatg atctgtagtg 960

ES 2 470 440 A1

ctacagaaaa attgtgggtc acagtctatt atggggtagg gatcaccaga attgtaacgc 1020  
ttacaatttc cattcgccat tcaggctgcg caactgttgg gaagggcgat cgggtcgggc 1080  
ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaagggcat taagttgggt 1140  
aacgccaggg ttttcccagt cacgacgttg taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata 1200  
cgactcacta tagggcgaat tggagctcca ccgcggtggc ggccgctcta gaactagtgg 1260  
atccccggg ctgcaggaat tccacacatc cggacacaca ttcgaagcca tcttgtaact 1320  
tttgtgaact cttgttacac ctttctatag attcgcaga gaatggatta atgatcttgt 1380  
ttaattaata tgccttaaca aaagtaatcc atagtcaaga tcttaagcat tttttcctt 1440  
atgatcttta actgttctgg gtcacaaatt tgtctgtcac tggttaaaac taaggtggga 1500  
ttttttttt aaatagattt aggaccaata agtcttaatt ggtttgaaga actttcttca 1560  
gaagctccac cctataattc tgaacctgca gaagaatctg aacataaaaa caacaattac 1620  
gaaccaaacc tattttaaacc tccacaaagg aaaccatctt ataatcagct ggcttcaact 1680  
ccaataatat tcaaagagca agggctgact ctgccgctgt accaatctcc tgtaaaagaa 1740  
ttagataaat tcaaattaga cttaggttaag taatgcaata tggtagactg gggagaacta 1800  
caactagga atttaggcaa acctgtgtta aatcttagc tcattcatta attgtgtcat 1860  
gctgggcaaa tcagtctctc tggcctcttt ttctcactc gaaaaatgga gacgatgaaa 1920  
ataatgtctc ataggtttgg attaaattaa ataatgtagg tacttagtaa atgttctctt 1980  
tcatccctcc tttgataaat ttgccaactg agatttgctg aattacgtct ttcttatgcc 2040  
aagaattcct ctggtacatt ggtaggtttt cagtaaagt cttcccttac tccttttttc 2100  
tctttccttc tgcttttgtt taaagcgaca agatgttgct cttttcccag gctggaatac 2160  
agtggcatga tcatagctca agctcctggg ctcaagtgat cctcccgcct cagcctctca 2220  
agtagctagg actacaggca tatcaccaca ccagcgtttt ctttgtagag gcagagtctc 2280  
actctgttgc tcaggcaggt gttgaactcc tgcctcaagc aatcctccca cctcagcctc 2340  
ccagagccct caaattataa gccactgtgc tcggggcatc ctttttgggg ggtaatcagc 2400  
aaactgaaaa acctcttctt acaactccct atacattctc attcccagta tagaggagac 2460  
tttttgttt taaacacttc caaagaatgc aaatttataa tccagagtat atacattctc 2520  
actgaattat tgtactgttt caggaaggaa tgttccaat agtagacata aaagtcttcg 2580  
cacagtgaaa actaaaatgg atcaagcaga tgatgtttcc tgtccacttc taaattcttg 2640  
tcttagtgaa aggtatgatg aagctattat attaaaatat ttaaatgaaa cattttccta 2700  
catatatattg ttctataaag atgaatctga tttttatgct aatattttgg ctaagagcct 2760  
ggtagaagat cttacatttt taaataatct tttaggttga gtcctttaat agaatagttt 2820  
ttacattaga aacatgtaag ttgttgttct tgtgatgttg aattggctgg ttttctgtat 2880  
attctgtgat tttttaagta acaaaaataa cagtggtgaa aagcagtaag tcagtccttg 2940  
aattatcaat ttaaaaataa ttgtgtactt ttcatctttg gagagaatat gatttacttt 3000  
acaaattttt tttttgtttt ttttttttt gagatggagt ctctgtcacc caggctgtag 3060  
tgcagtggtg cgatctcagc tcactgcaag ctccgcctcc cgggttcacg ccattctcct 3120

ES 2 470 440 A1

gcctcagcct cccaagtagc tgggactaca ggcgccccgcc accatgcccc gctaattttt 3180  
 tgtattttta gtagagacgg ggtttcaactg tgtagctag gatggtctcg atttcctgac 3240  
 ctctgatcc gcccgctca gcctcccaga ctgctgggat tacaggcgtg aaccactgtg 3300  
 cccggcctac tttacaaaat ttttgagttt aaaatacacg gtttccagca gctgaaattt 3360  
 gtgagtacat atgtgttggc attttaaaca tcacttgatg attatttaat gcttcatgag 3420  
 agatttactt tttaaaatgt aatataaaat atctaaaagt agtattccaa caatttatat 3480  
 gaatgagaat cttcttttaa aaataagata aactagtttt tgccagtttt ttaaataaac 3540  
 ctaagggatt tgctttgttt tatttttagtc ctgtttgttct acaatgtaca catgtaacac 3600  
 cacaaagaga taagtcaagg atgattaaaa acaatgcttt ttattcttag aatactagaa 3660  
 atgttaataa aaataaaact taacaatttt cccctttttt taccaccagt ggtatgtggg 3720  
 agtttgtttc atacaccaa gtttggaag gtaaatttc tacctggttt atttttatga 3780  
 cttagtaatt gagaatttga caatagcgtt atacctttgc cctgagattt acaaactctg 3840  
 acctagcatt ctgcctcata caggcaattc agtaaactgt aagtgaata aagagtgaat 3900  
 gaaaaataa tatccttaat gatcagggca tttctataaa aaataaacta ttttctttcc 3960  
 tcccagggtc gtcagacacc aaaacatatt tctgaaagtc taggagctga ggtggatcct 4020  
 gatatgtctt ggtcaagttc ttagctaca ccaccacc ttagttctac tgtgctcata 4080  
 ggtaataata gcaaatgtgt atttacaaga aagagcagat gaggttgata attgtcatct 4140  
 ctaatacttc tgttaaaagg aaatatgaaa agaaaatatt agataatgtc tttgataagt 4200  
 gtgttagtaa ctgacaataa ttttattcta ttaagtgtag attggaataa atacaaatac 4260  
 atttagtggt agtccagtgg tgtcaagcat tatgttttag tacgatgtga ttaacgtaga 4320  
 atagcttaca aatattcctt tactggccta tataagcgtt taagaggcag tatttggtc 4380  
 gaggtcataa cctcacagca tcatctgact ttccaactca ttgtggacag tattaccata 4440  
 aagtaatgat caccaagcca tatcttacca cttgtgagt agtactaagg aagtaagtat 4500  
 agtttattca ctgtgttgat tgaccttct aattactata ctttaagtact tgaatcaatt 4560  
 cttttgttt caaatgtgtc atgtaatcaa atagtagatg tgctttttga tgtctgacaa 4620  
 aaaataagtt tttgcattct agtgataata tacaatacac ataaattttt atcttacagt 4680  
 cagaaatgaa gaagcatctg aaactgtatt tcctcatgat actactgctg taagtaata 4740  
 tgacattgat tagactgttg aaatgctaa caattttgga atgccttggt aaattattta 4800  
 tcttacattt ttaatttcct aatctgtaat ttatctaagc ctttgagaaa gtctctaac 4860  
 ctggtcctat atgtgatatt aacttctgt gaaactctgc tgtctctctg ttaaagttga 4920  
 agctttccta gtggtgcaag atttcatcac actactcagg atgacacaca atttaaaact 4980  
 tactaattgc ttacttctgg aattttccat taaaattttt tggacctagg ttgattgcag 5040  
 ataactgaaa tcaccaaag tgaaaccatg gataaggggg gactactact atatgtgcat 5100  
 tgagagtttt tatactagtg attttaaact ataatttttg cagaatgtga aaagctattt 5160  
 ttccaatcat gatgaaagtc tgaagaaaaa tgatagattt atcgcttctg tgacagacag 5220

ES 2 470 440 A1

tgaaaacaca aatcaaagag aagctgcaag tcatggtaag tcctctgttt agttgaacta 5280  
 caggtttttt tgttgttggt gttttgattt tttttttttg aggtggagtc ttgctctgtc 5340  
 acccgtgatc tcagtttacc gcaacctctg cctcccgtgc tcaagcgatc ctgcctcagc 5400  
 ttgccaagta gctgagatta caagcatgca ccacatgcc caactattgt atttttagta 5460  
 gagatggcat ttcacatgt tggccaggct ggtctcaaat ggtcgtgagc caccatgccc 5520  
 agcctgaact actcttttta attggcacca ggtaccagc ttttgttccc ttttgtgagg 5580  
 gttaattgcg cgcttggcgt aatcatggtc atagctgttt cctgtgtgaa attgttatcc 5640  
 gctcacaatt ccacacaaca tacgagccgg aagcataaag tgtaaagcct ggggtgccta 5700  
 atgagtgagc taactcacat taattgctt gcgctcactg cccgccatat gatacagagg 5760  
 tacataatgt ttgggccaca catgccggtg taccacaga cccaacca caagaagtag 5820  
 tattggtaaa tgtgacagaa aattttaaca tgtggaaaaa tgacatggta gaacagatgc 5880  
 atgaggatat aatcagttta tgggatcaaa gcctaaagcc atgtgtagga aaactacttt 5940  
 gcaccactgc tgtgccttgg aatgctagtt ggagtaataa atctctggaa cagatttggg 6000  
 atcacacgac ctggatggag tgggacagag aaattaacaa ttacacaaac ttaatacact 6060  
 ccttaattga agaatcgcaa aaccagcaag aaaagaatga acaagaatta ttggaattag 6120  
 ataaatgggc aagtttgtgg aattggttta acataacaaa ttggctgtgg tatataaaat 6180  
 tattcataat gatagtagga ggcttggtag gttaagaat agtttttgct gtactttctg 6240  
 tagtgaatag agttaggcag ggatattcac cttttcttt tcaggcctgg agatctcccg 6300  
 aggggacccg acaggcccga aggaatagaa gaagaagggtg gagagagaga cagagacaga 6360  
 tccattcgac caattcactc ctcagggtga ggctgcctat cagaagggtg tggctggtgt 6420  
 ggccaatgcc ctggctcaca aataccactg agatccagac atgataagat acattgatga 6480  
 gtttggacaa accacaacta gaatgcagtg aaaaaaatgc tttatttgtg aaatttgtga 6540  
 tgctattgct ttatttghta ccattataag ctgcaataaa caagttaaca acaacaattg 6600  
 cattcatttt atgtttcagg ttcaggggga ggtgtgggag gttttttaa gcaagtaaaa 6660  
 cctctacaaa tgtggtatgg ctgattatga tccccaggaa gctcctctgt gtcctcataa 6720  
 accctaacct cctctacttg agaggacatt ccaatcatag gctgcccatac caccctctgt 6780  
 gtcctcctgt taattaggtc acttaacaaa aaggaaattg ggtaggggtt tttcacagac 6840  
 cgctttctaa gggtaatttt aaaatatctg ggaagtcctt tccactgctg tgttccagaa 6900  
 gtgttggtaa acagcccaca aatgtcaaca gcagaaacat acaagctgtc agctttgcac 6960  
 aagggcccaa caccctgctc atcaagaagc actgtggttg ctgtgttagt aatgtgcaaa 7020  
 acaggaggca cattttccc acctgtgtag gttccaaaat atctagtgtt ttcattttta 7080  
 cttggatcag gaaccagca ctccactgga taagcattat cttatccaa aacagccttg 7140  
 tggtcagtgt tcatctgctg actgtcaact gtagcatttt ttggggttac agtttgagca 7200  
 ggatatttgg tcctgtagt tgcatacaca ccccagggtg cacttttcgg ggaaatgtgc 7260  
 gcggaacccc tatttgttta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac 7320  
 aataacctg ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt 7380

ES 2 470 440 A1

tccgtgtcgc ccttattccc ttttttgcgg cattttgcct tcctgttttt gctcaccag 7440  
aaacgctggg gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcacgagtg ggttacatcg 7500  
aactggatct caacagcggg aagatccttg agagttttcg ccccgaagaa cgttttccaa 7560  
tgatgagcac ttttaaagtt ctgctatgtg gcgcggtatt atcccgtatt gacgccgggc 7620  
aagagcaact cggtcgccgc atacactatt ctcagaatga cttggttgag tactcaccag 7680  
tcacagaaaa gcatcttacg gatggcatga cagtaagaga attatgcagt gctgccataa 7740  
ccatgagtga taacactgcg gccaaactac ttctgacaac gatcggagga ccgaatgagc 7800  
taaccgcttt tttgcacaac atgggggatc atgtaactcg cttgatcgt tgggaaccgg 7860  
agctgaatga agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgta gcaatggcaa 7920  
caacgttgcg caaactatta actggcgaac tacttactct agcttcccgg caacaattaa 7980  
tagactggat ggaggcggat aaagttgag gaccacttct gcgctcggcc cttccggctg 8040  
gctggtttat tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcggg atcattgagc 8100  
cactggggcc agatggtaag ccctcccgta tcgtagttat ctacacgacg gggagtcagg 8160  
caactatgga tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg attaagcatt 8220  
ggtaactgtc agaccaagtt tactcatata tactttagat tgatttaaaa cttcattttt 8280  
aatttaaaag gatctaggtg aagatccttt ttgataatct catgaccaa atccttaacg 8340  
tgagttttcg ttccactgag cgtcagacc cgtagaaaag atcaaaggat cttcttgaga 8400  
tccttttttt ctgcgcgtaa tctgctgctt gcaaacaaaa aaaccaccgc taccagcggg 8460  
ggtttgttg ccggatcaag agctaccaac tctttttccg aaggtaactg gcttcagcag 8520  
agcgcagata ccaaatactg ttcttctagt gtagccgtag ttaggccacc acttcaagaa 8580  
ctctgtagca ccgcctacat acctcgtctt gctaactctg ttaccagtgg ctgctgccag 8640  
tggcgataag tcgtgtctta ccgggttggc ctcaagacga tagttaccgg ataaggcgca 8700  
gcggtcgggc tgaacggggg gttcgtgcac acagcccagc ttggagcgaa cgacctacac 8760  
cgaactgaga tacctacagc gtgagctatg agaaagcgcc acgcttcccg aaggagaaaa 8820  
ggcggacagg tatccggtaa gcggcagggt cggaacagga gagcgcacga gggagcttcc 8880  
agggggaaac gcctggtatc tttatagtcc tgtcggggtt cgccacctct gacttgagcg 8940  
tcgatttttg tgatgctcgt cagggggggcg gagcctatgg aaaaacgcca gcaacgcggc 9000  
ctttttacgg ttccctggcct tttgctggcc ttttgctcac atgttctttc ctgcttattc 9060  
ccctgattct gtggataacc gtattaccgc ctttgagtga gctgataccg ctcgccgagc 9120  
ccgaacgacc gagcgcagcg agtcagtgag cgaggaagcg gaagagcgcc caatacgcaa 9180  
accgcctctc cccgcgcggt ggccgattca ttaatgcag 9219

<210> 15  
<211> 9891  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<221> source

ES 2 470 440 A1

<222> 1..9891  
 <223> /mol\_type="DNA"  
 /note="Plásmido pSAD v5.0 clonado con exones 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 y secuencias flanqueantes de los intrones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 del gen BRCA2 de Homo sapiens"  
 /organism="Artificial Sequence"

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 1246..6222  
 <223> /note="Exones 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 y secuencias flanqueantes de los intrones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 del gen BRCA2"

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> join(1..1245,6223..9891)  
 <223> /note="Plásmido pSAD v5.0"

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 1..9891  
 <223> /note="Minigen MGBR2\_EX2-9"

<400> 15  
 ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt 60  
 atgcaaagca tgcattctcaa ttagtcagca accaggtgtg gaaagtcccc aggctcccca 120  
 gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caacatagt cccgccctta 180  
 actccgcccc tcccgcccct aactccgccc agttccgccc attctccgcc ccatggctga 240  
 ctaatttttt ttatttatgc agaggccgag gccgcctcgg cctctgagct attccagaag 300  
 tagtgaggag gcttttttgg aggcctaggc ttttgcaaaa aacttgact gtgtttactt 360  
 gcaatcccc aaacagaca gaatggtgca tctgtccagt gaggagaagt ctgcggtcac 420  
 tgccctgtgg ggcaaggaga atgtggaaga agttggtggt gaggccctgg gcaggctgct 480  
 ggttgcttac ccatggacc agaggttctt cgagtcctt ggggacctgt cctctgcaaa 540  
 tgctgttatg aacaatccta aggtgaaggc tcatggcaag aagggtgctg ctgccttcag 600  
 tgagggctct agtcacctgg acaacctcaa aggcacctt gctaagctga gtgaactgca 660  
 ctgtgacaag ctgcacgctc tagagtcgac ccagcagtaa gtaatacatg taatgcaacc 720  
 tatacaata gcaatagtag cattagtagt agcaataata atagcaatag ttgtgtggtc 780  
 catagtaatc atagaatata ggaaaatatt aagacaaaga aaaatagaca ggttaattga 840  
 tagactaata gaaagagcag aagacagtgg caatgagagt gaaggagaaa taccagcact 900  
 tgtggagatg ggggtggaga tggggcacca tgctccttgg gatgttgatg atctgtagtg 960  
 ctacagaaaa attgtgggtc acagtctatt atggggtagg gatcaccaga attgtaacgc 1020  
 ttacaatttc cattcgccat tcaggctgcg caactgttgg gaaggcgat cgggtcgggc 1080  
 ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt 1140  
 aacgccaggg ttttcccagt cacgacgttg taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata 1200  
 cgactcacta tagggcgaat tggagctcca ccgcggtggc ggccggaaac taaatcgtat 1260  
 gaaaatcctc ttctctagtc gcactagcca cgtttcgagt gcttaatgtg gctagtgcca 1320  
 ccggtttgga cagcacagct gtaaaatgtt cccatcctca cagtaagctg ttaccgttcc 1380  
 aggagatggg actgaattag aattcaaaca aattttccag cgcttctgag ttttacctca 1440

ES 2 470 440 A1

gtcacataat aaggaatgca tccctgtgta agtgcatttt ggtccttctgt tttgcagact 1500  
tatttaccac gatttggagg aatatcgtag gtaaaaatgc ctattggatc caaagagagg 1560  
ccaacatttt ttgaaatttt taagacacgc tgcaacaaag caggtattga caaattttat 1620  
ataactttat aaattacacc gagaaagtgt tttctaaaaa atgcttgcta aaaaccagt 1680  
acgtcacagt gttgcttaga accataaact gttccttatg tgtgtataaa tccagttaac 1740  
aacataatca tcgtttgtag gttaccaca tgataaatat agaacgtcta gtggataaag 1800  
aggaaactgg ccccttgact agcagtagga acaattacta acaaatcaga agcattaatg 1860  
ttactttatg gcagaagttg tccaactttt tggtttcagt actccttata ctcttaaaaa 1920  
tgatctagga cccccggagt gcttttgttt atgtagctta tccggacaca cattcgaagc 1980  
catcttgtaa cttttgtgaa ctcttgttac acctttctat agattcgcaa gagaatggat 2040  
taatgatctt gtttaattaa tatgccttaa caaaagtaat ccatagtcaa gatcttaagc 2100  
atTTTTTcc ttatgatctt taactgttct gggtcacaaa tttgtctgtc actggttaaa 2160  
actaagggtg gatttttttt ttaaatagat ttaggaccaa taagtcttaa ttggtttgaa 2220  
gaactttctt cagaagctcc accctataat tctgaacctg cagaagaatc tgaacataaa 2280  
aacaacaatt acgaacacaa cctatttaaa actccacaaa gaaaccatc ttataatcag 2340  
ctggcttcaa ctccaataat attcaaagag caagggctga ctctgccgct gtaccaatct 2400  
cctgtaaaag aattagataa attcaaatta gacttaggta agtaatgcaa tatggtagac 2460  
tggggagaac tacaactag gaatttaggc aaacctgtgt taaaatctta gctcattcat 2520  
taattgtgtc atgctgggca aatcagctct tctggcctct ttttcctcac tcgaaaaatg 2580  
gagacgatga aaataatgtc tcataggttt ggattaaatt aaataatgta ggtacttagt 2640  
aaatgttctc tttcatccct cctttgataa atttgcaac tgagatttgc tgaattacgt 2700  
ctttcttatg ccaagaattc ctctggtaca ttggtaggtt ttcagtaaat gtcttccctt 2760  
actccttttt tctctttcct tctgcttttg tttaaagcga caagatgttg ctcttttccc 2820  
aggctggaat acagtggcat gatcatagct caagctcctg ggctcaagtg atcctcccgc 2880  
ctcagcctct caagtagcta ggactacagg catatacca caccagcgtt ttctttgtag 2940  
aggcagagtc tcaactctgt gctcaggcag gtgttgaact cctgcctcaa gcaatcctcc 3000  
cacctcagcc tcccagagcc ctcaaattat aagccactgt gctcggggca tcctttttgg 3060  
ggggtaatca gcaaaactgaa aaacctctc ttacaactcc ctataattc tcattcccag 3120  
tatagaggag actttttgtt tttaaacact tccaaagaat gcaaatttat aatccagagt 3180  
atataattc tcaactgaatt attgtactgt ttcaggaagg aatgttccca atagtagaca 3240  
taaaagtctt cgcacagtga aactaaaaat ggatcaagca gatgatgttt cctgtccact 3300  
tctaaattct tgtcttagtg aaaggtaga tgaagctatt atattaaaat atttaaatga 3360  
aacattttcc tacatatatt tgttctataa agatgaatct gatttttatg ctaatatatt 3420  
ggctaagagc ctggtagaag atcttacatt tttaaataat cttttagggt gagtccttta 3480  
atagaatagt ttttacatta gaaacatgta agttgtgttt cttgtgatgt tgaattggct 3540

ES 2 470 440 A1

ggttttctgt atattctgtg attttttaag taacaaaaat aacagtgggtg aaaagcagta 3600  
 agtcagtcct tgaattatca atttaaaata aattgtgtac ttttcatctt tggagagaat 3660  
 atgatttact ttacaaaattt tttttttgtt tttttttttt ttgagatgga gtctctgtca 3720  
 cccaggctgt agtgcagtggtg tgcgatctca gctcactgca agctccgcct cccgggttca 3780  
 cgccattctc ctgcctcagc ctcccaagta gctgggacta caggcgccccg ccaccatgcc 3840  
 cggctaattt tttgtatttt tagtagagac ggggtttcac tgtgttagct aggatggctt 3900  
 cgatttcctg acctcgtgat ccgccccgcct cagcctccca gactgctggg attacaggcg 3960  
 tgaaccactg tgccccggcct actttacaaa atttttgagt ttaaaataca cggtttccag 4020  
 cagctgaaat ttgtgagtac atatgtgttg gcattttaa catcacttga tgattattta 4080  
 atgcttcatg agagatttac tttttaaaat gtaatataaa atatctaaaa gtagtattcc 4140  
 aacaatttat atgaatgaga atcttctttt aaaaataaga taaactagtt tttgccagtt 4200  
 ttttaaaata acctaaagga tttgctttgt tttattttag tcctgttggt ctacaatgta 4260  
 cacatgtaac accacaaaga gataagtcag gtatgattaa aaacaatgct ttttattctt 4320  
 agaatactag aaatgttaat aaaaataaaa cttaacaatt ttcccccttt tttaccccca 4380  
 gtggtatgtg ggagtttggt tcatacacca aagtttgtga aggtaaatat tctacctggt 4440  
 ttatttttat gacttagtaa ttgagaattt gacaatagcg ttataccttt gccctgagat 4500  
 ttacaaatct gtacctagca ttctgcctca tacaggcaat tcagtaaacg ttaagtgaaa 4560  
 taaagagtga atgaaaaaat aatatcctta atgatcaggg catttctata aaaaataaac 4620  
 tattttcttt cctcccaggg tcgtcagaca ccaaacata tttctgaaag tctaggagct 4680  
 gaggtggatc ctgatatgtc ttggccaagt tcttttagcta caccaccac ccttagttct 4740  
 actgtgctca taggtaataa tagcaaatgt gtatttaca gaaagagcag atgaggttga 4800  
 taattgtcat ctctaatact tctgttaaaa ggaaatatga aaagaaaata ttagataatg 4860  
 tctttgataa gtgtgtagt aactgacaat aattttattc tattaagtgt agattggaat 4920  
 aaatacaaat acatttagtg gtagtccagt ggtgtcaagc attatgtttt agtacgatgt 4980  
 gattaacgta gaatagctta caaatattcc tttactggcc tatataagcg ttaagaggc 5040  
 agtatttggc tcgaggtcat aacctcacag catcatctga cttccaact cattgtggac 5100  
 agtattacca taaagtaatg atcaccaagc catatcttac caccttgtga gtagtactaa 5160  
 ggaagtaagt atagtttatt cactgtgttg attgacctt ctaattacta tacttaagta 5220  
 cttgaatcaa ttcattttgt ttcaaatgtg tcatgtaatc aaatagtaga tgtgcttttt 5280  
 gatgtctgac aaaaaataag tttttgcatt ctagtataa tatacaatac acataaattt 5340  
 ttatcttaca gtcagaaatg aagaagcatc tgaaactgta tttcctcatg atactactgc 5400  
 tgtaagtaaa tatgacattg attagactgt tgaaattgct aacaattttg gaatgccttg 5460  
 ttaaattatt tatcttacat ttttaatttc ctaatctgta atttatctaa gcctttgaga 5520  
 aagtctctaa acctggctct atatgtgatt ttaacttctt gtgaaactct gctgtctctc 5580  
 tgttaaagtt gaagctttcc tagtgggtga agatttcatc aactactca ggatgacaca 5640  
 caatttaaaa cttactaatt gcttacttct ggaattttcc attaaaaatt tttggacctt 5700



ES 2 470 440 A1

ggttgattgc agataactga aatcaccaaa agtgaaacca tggataaggg gggactacta 5760  
 ctatatgtgc attgagagtt tttatactag tgattttaaa ctataatfff tgcagaatgt 5820  
 gaaaagctat ttttccaatc atgatgaaag tctgaagaaa aatgatagat ttatcgcttc 5880  
 tgtgacagac agtgaaaaca caaatcaaag agaagctgca agtcatggta agtcctctgt 5940  
 ttagttgaac tacaggtfff tttgttgttg ttgttttgat fttttttfff tgaggtggag 6000  
 tcttgctctg tcacccgtga tctcagttta ccgcaacctc tgcctcccgt gctcaagcga 6060  
 tcctgcctca gcttgccaag tagctgagat tacaagcatg caccaccatg cccaactatt 6120  
 gtatfffntag tagagatggc atttcaccat gttggccagg ctgggtctcaa atggctgtga 6180  
 gccaccatgc ccagcctgaa ctactctfff taattggcac caggtaccca gctfffgttc 6240  
 cctfffgtga gggttaattg cgcgcttggc gtaatcatgg tcatagctgt ttcctgtgtg 6300  
 aaattgttat ccgctcacia ttccacacia catacgagcc ggaagcacia agtgtaaagc 6360  
 ctgggggtgcc taatgagtga gctaactcac attaattgctg ttgcgctcac tgcccgccat 6420  
 atgatacaga ggtacataat gtttgggcca cacatgccgg tgtaccaca gacccaacc 6480  
 cacaagaagt agtattggta aatgtgacag aaaatfftaa catgtgaaa aatgacatgg 6540  
 tagaacagat gcatgaggat ataatcagtt tatgggatca aagcctaaag ccatgtgtag 6600  
 gaaaactact ttgcaccact gctgtgcctt ggaatgctag ttggagtaat aatctctggt 6660  
 aacagatffg gaatcacacg acctggatgg agtgggacag agaaattaac aattacacia 6720  
 acttaataca ctcttaatt gaagaatcgc aaaaccagca agaaaagaat gaacaagaat 6780  
 tattggaatt agataaatgg gcaagttgtt ggaattgggt taacataaca aattggctgt 6840  
 ggtatataaa attattcata atgatagtag gaggcttggg aggtffaaga atagfffffg 6900  
 ctgtactfff tgtagtgaat agagttaggc agggatattc accatfffct tttcaggcct 6960  
 ggagatctcc cgagggggacc cgacaggccc gaaggaatag aagaagaagg tggagagaga 7020  
 gacagagaca gatccattcg accaattcac tcctcaggtg caggctgcct atcagaaggt 7080  
 ggtggctggt gtggccaatg ccctggctca caaataccac tgagatccag acatgataag 7140  
 atacattgat gagtttgac aaaccacaa tagaatgcag tgaaaaaat gctttatffg 7200  
 tgaaatffg gatgctatff ctttatffgt aaccattata agctgcaata aacaagffaa 7260  
 caacaacaat tgcattcatt ttatgtffca ggttcagggg gaggtgtggg aggtfffffa 7320  
 aagcaagtaa aacctctaca aatgtggtat ggctgattat gatccccagg aagctcctct 7380  
 gtgtcctcat aaaccctaac ctctctact tgagaggaca ttccaatcat aggctgccc 7440  
 tccaccctct gtgtcctcct gttattagg tcacttaaca aaaaggaaat tgggtagggg 7500  
 fttffcacag accgctfffct aagggttaatt ttaaaatctc tgggaagtcc cttccactgc 7560  
 tgtgttccag aagtgttggg aaacagccc caaatgtcaa cagcagaaac atacaagctg 7620  
 tcagctffg acaagggccc aacaccctgc tcatcaagaa gcactgtggg tgctgtgffa 7680  
 gtaatgtgca aaacaggagg cacatfffcc ccacctgtgt aggttccaaa atatctagt 7740  
 ftttcatfff tacttggatc aggaaccag cactccactg gataagcatt atccttatcc 7800

ES 2 470 440 A1

aaaacagcct tgtggtcagt gttcatctgc tgactgtcaa ctgtagcatt ttttggggtt 7860  
 acagtttgag caggatattt ggtcctgtag tttgctaaca caccacaggt ggcacttttc 7920  
 ggggaaatgt gcgcggaacc cctatttgtt ttttttcta aatacattca aatatgtatc 7980  
 cgctcatgag acaataaccc tgataaatgc ttcaataata ttgaaaaagg aagagtatga 8040  
 gtattcaaca tttccgtgtc gcccttattc cttttttg cgcattttgc cttcctgttt 8100  
 ttgctcacc agaaacgctg gtgaaagtaa aagatgctga agatcagttg ggtgcacgag 8160  
 tgggttacat cgaactggat ctcaacagcg gtaagatcct tgagagtttt cgccccgaag 8220  
 aacgttttcc aatgatgagc actttttaaag ttctgctatg tggcgcggta ttatcccgta 8280  
 ttgacgcccg gcaagagcaa ctcggtcgcc gcatacacta ttctcagaat gacttggttg 8340  
 agtactcacc agtcacagaa aagcatctta cggatggcat gacagtaaga gaattatgca 8400  
 gtgctgccat aaccatgagt gataaacctg cggccaactt acttctgaca acgatcggag 8460  
 gaccgaatga gctaaccgct tttttgcaca acatggggga tcatgtaact cgccttgatc 8520  
 gttgggaacc ggagctgaat gaagccatac caaacgacga gcgtgacacc acgatgcctg 8580  
 tagcaatggc aacaacgctg cgcaaactat taactggcga actacttact ctacttccc 8640  
 ggcaacaatt aatagactgg atggaggcgg ataaagtgc aggaccactt ctgcgctcgg 8700  
 cccttccggc tggctggttt attgctgata aatctggagc cggtgagcgt gggctctcgcg 8760  
 gtatcattgc agcactgggg ccagatggta agccctcccg tatcgtagtt atctacacga 8820  
 cggggagtca ggcaactatg gatgaacgaa atagacagat cgctgagata ggtgcctcac 8880  
 tgattaagca ttggtaactg tcagaccaag tttactcata tatactttag attgatttaa 8940  
 aacttcattt ttaatttaaagg atctaggtg tgaagatcct ttttgataat ctcatgacca 9000  
 aaatccttaa cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg 9060  
 atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaacia aaaaaccacc 9120  
 gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca agagctacca actctttttc cgaaggtaac 9180  
 tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac tgttcttcta gtgtagccgt agttaggcca 9240  
 ccacttcaag aactctgtag caccgcctac atacctgct ctgctaattc tgttaccagt 9300  
 ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac gatagttacc 9360  
 ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca gcttgagcg 9420  
 aacgacctac accgaactga gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg ccacgcttcc 9480  
 cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac 9540  
 gagggagctt ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct 9600  
 ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc 9660  
 cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggc cttttgctgg ctttttgctc acatgttctt 9720  
 tcctgcgta tccccgtgatt ctgtggataa cctgattacc gcctttgagt gagctgatac 9780  
 cgctcggcgc agccgaacga ccgagcgcag cgagtcagtg agcgaggaag cggaagagcg 9840  
 cccaatacgc aaaccgcctc tccccgcgcg ttggccgatt cattaatgca g 9891

ES 2 470 440 A1

```

<210> 16
<211> 6497
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..6497
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Plásmido pSAD v5.0 clonado con exones 17 y 18 y secuencias
      flanqueantes de los intrones 16, 17 y 18 del gen BRCA2 de Homo
      sapiens"
      /organism="Artificial Sequence"

<220>
<221> misc_feature
<222> 1270..2775
<223> /note="Exones 17 y 18 y secuencias flanqueantes de los intrones
      16, 17 y 18 del gen BRCA2"

<220>
<221> misc_feature
<222> join(1..1269,2776..6497)
<223> /note="Plásmido pSAD v5.0"

<220>
<221> misc_feature
<222> 1..6497
<223> /note="Minigen MGBR2_EX17-18"

<400> 16
ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga aagtcgccag gctccccagc aggcagaagt      60
atgcaaagca tgcattctca ttagtcagca accagggtgtg gaaagtcgcc aggcctccca      120
gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caaccatagt cccgccccta      180
actccgcca tcccgcccct aactccgccc agttccgccc attctccgcc ccatggctga      240
ctaatttttt ttattttatgc agaggccgag gccgcctcgg cctctgagct attccagaag      300
tagtgaggag gcttttttgg aggcctaggc ttttgcaaaa aacttgact gtgtttactt      360
gcaatcccc aaaacagaca gaatggtgca tctgtccagt gaggagaagt ctgcggtcac      420
tgccctgtgg ggcaagggtga atgtggaaga agttggtggt gaggccctgg gcaggctgct      480
ggttgtctac ccatggacc agaggttctt cgagtccttt ggggacctgt cctctgcaaa      540
tgctgttatg aacaatccta aggtgaaggc tcatggcaag aaggtgctgg ctgccttcag      600
tgagggctct agtcacctgg acaacctcaa aggcacctt gctaagctga gtgaactgca      660
ctgtgacaag ctgcacgctc tagagtcgac ccagcagtaa gtaatacatg taatgcaacc      720
tatacaata gcaatagtag cattagtagt agcaataata atagcaatag ttgtgtggtc      780
catagtaatc atagaatata ggaaaatatt aagacaaaga aaaatagaca ggttaattga      840
tagactaata gaaagagcag aagacagtgg caatgagagt gaaggagaaa taccagcact      900
tgtggagatg ggggtggaga tggggcacca tgctccttgg gatgttgatg atctgtagtg      960
ctacagaaaa attgtgggtc acagtctatt atggggtagg gatcaccaga attgtaacgc      1020
ttacaatttc cattcgccat tcaggctgcg caactgttgg gaagggcgat cgggtcgggc      1080
ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt      1140
aacgccaggg ttttcccagt cacgacgttg taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata      1200

```

ES 2 470 440 A1

cgactcacta tagggcgaat tggagctcca ccgcggtggc ggccgctcta gaactagtgg 1260  
 atcccccggt cagtatgata ctttgataca tgtcaaataa ttttctgaaa ttatattgta 1320  
 gatcatatga actcataaaa acttaatgat cttgacaat gtagtttttg tacagagaat 1380  
 agttgtagtt gttgaattca gtatcatcct atgtggtttt tatgataata ttctactttt 1440  
 atttgttcag ggctctgtgt gacactccag gtgtggatcc aaagcttatt tctagaattt 1500  
 gggtttataa tcaactataga tggatcatat ggaaactggc agctatggaa tgtgcctttc 1560  
 ctaaggaatt tgctaataga tgcctaagcc cagaaagggg gcttcttcaa ctaaaataca 1620  
 ggcaagttaa aagcattaca ttacgtaatc atatacggca gtatggtaa ggtttctgtg 1680  
 tagtctgtga cttccatgtc aaaatgttgc acaagccagt tgtcagtgac agttgccatc 1740  
 ccacactgct gttctcctgt catccctagc ccccatthta gagagatcac acattcatgc 1800  
 attgcttgct tccctctttc cccaccccct ccttaacctc ttgatgtatg agaagaatat 1860  
 gagttactaa tttgatccac tatttgggga ttgctaataa agcatttttg cattttattt 1920  
 tttgcttttt aaaaataatt gatattttaa caatatgaaa caatatattc ctagctacaa 1980  
 aatttttaat tctcagtatt tcttagataa attcagtttt tattctcagt tattcagtga 2040  
 cttgtttaaa cagtgggaatt ctagagtcac acttctaaa atatgcattt ttgtttcac 2100  
 ttttagatat gatacggaaa ttgatagaag cagaagatcg gctataaaaa agataatgga 2160  
 aagggatgac acagctgcaa aaacacttgt tctctgtgtt tctgacataa tttcattgag 2220  
 cgcaaatata tctgaaactt ctagcaataa aactagtagt gcagatacc aaaaagtggc 2280  
 cattattgaa cttacagatg ggtggatgct tgtaaggcc cagttagatc ctcccctctt 2340  
 agctgtctta aagaatggca gactgacagt tggtcagaag attattcttc atggagcaga 2400  
 actggtgggc tctcctgatg cctgtacacc tcttgaagcc ccagaatctc ttatgttaaa 2460  
 ggtaaattaa tttgactctt tggtaaaaat cagtcattga ttcagttaaa ttctagaagt 2520  
 tttacattta aatttttaaat gcttactaag gatgctcaat ttcttagatg tactgataat 2580  
 tttagtataa aaagcatatt cttcagacag ttaaagtttt tgtgcagttt ttgggaggtc 2640  
 cagagatctt tcttgagctt aaataatgca tttccaatta aaaagcaaaa taaatttgca 2700  
 ccatttgatt ttggtatctg tagcttgctg ccctcttggt cctatagctt tgctttgatc 2760  
 agatccctat tccactgcag gaattcgata tcaagcttat cgataccgtc gacctcgagg 2820  
 gggggcccgg taccagctt ttgttccctt ttgtgagggt taattgctcg cttggcgtaa 2880  
 tcatggtcat agctgtttcc tgtgtgaaat tgttatccgc tcacaattcc acacaacata 2940  
 cgagccggaa gcataaagtg taaagcctgg ggtgcctaata gagtgagcta actcacatta 3000  
 attgcttgc gctcactgcc cgccatatga tacagaggta cataatgttt gggccacaca 3060  
 tgccggtgta cccacagacc ccaaccaca agaagtagta ttggtaaata tgacagaaaa 3120  
 ttttaacatg tggaaaaatg acatggtaga acagatgcat gaggatataa tcagtttatg 3180  
 ggatcaaagc ctaaagccat gtgtaggaaa actactttgc accactgctg tgccttgtaa 3240  
 tgctagttgg agtaataaat ctctggaaca gatttggaat cacacgacct ggatggagtg 3300  
 ggacagagaa attaacaatt acacaaactt aatacactcc ttaattgaag aatcgcaaaa 3360

ES 2 470 440 A1

ccagcaagaa aagaatgaac aagaattatt ggaattagat aaatgggcaa gtttgtggaa 3420  
 ttggtttaac ataacaaatt ggctgtggta tataaaatta ttcataatga tagtaggagg 3480  
 cttggtaggt ttaagaatag tttttgctgt actttctgta gtgaatagag ttaggcaggg 3540  
 atattcacca ttttcttttc aggcctggag atctcccag gggacccgac aggcccgaag 3600  
 gaatagaaga agaaggtgga gagagagaca gagacagatc cattcgacca attcactcct 3660  
 caggtgcagg ctgcctatca gaaggtgggtg gctgggtgtgg ccaatgccct ggctcacaaa 3720  
 taccactgag atccagacat gataagatac attgatgagt ttggacaaac cacaactaga 3780  
 atgcagtga aaaaatgctt tattttgtgaa atttgtgatg ctattgcttt atttgtaacc 3840  
 attataagct gcaataaaca agttaacaac aacaattgca ttcattttat gtttcagggt 3900  
 cagggggagg tgtgggagggt tttttaagc aagtaaaacc tctacaaatg tggatggct 3960  
 gattatgatc cccaggaagc tcctctgtgt cctcataaac cctaacctcc tctacttgag 4020  
 aggacattcc aatcataggc tgcccatcca ccctctgtgt cctcctgtta attaggtcac 4080  
 ttaacaaaaa ggaaattggg taggggtttt tcacagaccg ctttctaagg gtaattttaa 4140  
 aatatctggg aagtcccttc cactgctgtg ttccagaagt gttggtaaac agcccacaaa 4200  
 tgtcaacagc agaaacatac aagctgtcag ctttgacaaa gggccaaca ccctgctcat 4260  
 caagaagcac tgtggttgct gtgttagtaa tgtgcaaaac aggaggcaca ttttccccac 4320  
 ctgtgtaggt tccaaaatat ctagtgtttt catttttact tggatcagga acccagcact 4380  
 ccactggata agcattatcc ttatccaaaa cagccttggtg gtcagtgttc atctgctgac 4440  
 tgtcaactgt agcatttttt ggggttacag tttgagcagg atatttggtc ctgtagtttg 4500  
 ctaacacacc ccaggtggca cttttcgggg aaatgtgctc ggaacccta tttgtttatt 4560  
 tttctaaata cattcaaata tgtatccgct catgagacaa taaccctgat aaatgcttca 4620  
 ataattattga aaaaggaaga gtatgagtat tcaacatttc cgtgtcgccc ttattccctt 4680  
 ttttgcgga ttttgccctc ctgtttttgc tcaccagaa acgctggtga aagtaaaaga 4740  
 tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggtg ttacatcgaa ctggatctca acagcggtaa 4800  
 gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg ttttccaatg atgagcactt ttaaagttct 4860  
 gctatgtggc gcggtattat cccgtattga cgccgggcaa gagcaactcg gtcgccgcat 4920  
 aactatttct cagaatgact tggttgagta ctcaccagtc acagaaaagc atcttacgga 4980  
 tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc atgagtgata aactgcggc 5040  
 caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaatgagcta accgcttttt tgcacaacat 5100  
 gggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg ggaaccggag ctgaatgaag ccataccaaa 5160  
 cgacgagcgt gacaccacga tgcctgtagc aatggcaaca acgttgcgca aactattaac 5220  
 tggcgaacta cttactctag cttcccggca acaattaata gactggatgg aggcggataa 5280  
 agttgcagga ccacttctgc gctcggccct tccggctggc tggtttattg ctgataaatc 5340  
 tggagccggt gagcgtgggt ctcgcggtat cattgcagca ctggggccag atggtaagcc 5400  
 ctcccgtatc gtagttatct acacgacggg gagttaggca actatggatg aacgaaatag 5460

ES 2 470 440 A1

acagatcgct gagataggtg cctcactgat taagcattgg taactgtcag accaagttta 5520  
ctcatatata ctttagattg atttaaaact tcatttttaa tttaaaagga tctaggtgaa 5580  
gatccttttt gataatctca tgaccaaaat ccttaacgtg agttttcgtt cactgagcg 5640  
tcagaccccc tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc ctttttttct gcgcgtaatc 5700  
tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgggtg tttgtttgcc ggatcaagag 5760  
ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtt 5820  
cttctagtgt agccgtagt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac 5880  
ctcgctctgc taatcctggt accagtggct gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc 5940  
gggttgact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg aacggggggt 6000  
tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcgt 6060  
gagctatgag aaagcggccac gcttcccga gggagaaagg cggacaggta tccggtaagc 6120  
ggcagggctg gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt 6180  
tatagtcctg tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gatttttgtg atgctcgtca 6240  
ggggggcgga gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct ttttacgggt cctggccttt 6300  
tgctggcctt ttgctcacat gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt ggataaccgt 6360  
attaccgcct ttgagtgagc tgataccgct cgccgcagcc gaacgaccga gcgcagcgag 6420  
tcagtgagcg aggaagcgga agagcgccca atacgcaaac cgctctctcc cgcgcgttgg 6480  
ccgattcatt aatgcag 6497

<210> 17  
<211> 7252  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<221> source  
<222> 1..7252  
<223> /mol\_type="DNA"  
/note="Plásmido pSAD v5.0 clonado con exones 16, 17 y 18 y  
secuencias flanqueantes de los intrones 15, 16, 17 y 18 del gen  
BRCA2 de Homo sapiens"  
/organism="Artificial Sequence"

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> 1270..3530  
<223> /note="Exones 16, 17 y 18 y secuencias flanqueantes de los  
intrones 15, 16, 17 y 18 del gen BRCA2"

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> join(1..1269,3531..7252)  
<223> /note="Plásmido pSAD v5.0"

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> 1..7252  
<223> /note="Minigen MGBR2\_EX16-18"

<400> 17  
ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt 60  
atgcaaagca tgcattctca ttagtcagca accaggtgtg gaaagtcccc aggctcccc 120

ES 2 470 440 A1

gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caacatagtc cccgccccta 180  
 actccgccc tcccgcccct aactccgccc agttccgccc attctccgcc ccatggctga 240  
 ctaatttttt ttatttatgc agaggccgag gccgcctcgg cctctgagct attccagaag 300  
 tagtgaggag gcttttttgg aggcctaggc ttttgcaaaa aacttgact gtgtttactt 360  
 gcaatcccc aaaacagaca gaatggtgca tctgtccagt gaggagaagt ctgagggtcac 420  
 tgccctgtgg ggcaagggtga atgtggaaga agttggtggt gaggccctgg gcaggctgct 480  
 ggttgtctac ccatggacc agaggttctt cgagtccttt ggggacctgt cctctgcaaa 540  
 tgctgttatg aacaatccta aggtgaaggc tcatggcaag aaggtgctgg ctgccttcag 600  
 tgagggctctg agtcacctgg acaacctcaa aggcacctt gctaagctga gtgaactgca 660  
 ctgtgacaag ctgcacgctc tagagtcgac ccagcagtaa gtaatacatg taatgcaacc 720  
 tatacaata gcaatagtag cattagtagt agcaataata atagcaatag ttgtgtggtc 780  
 catagtaatc atagaatata ggaaaatatt aagacaaaga aaaatagaca ggttaattga 840  
 tagactaata gaaagagcag aagacagtgg caatgagagt gaaggagaaa tadcagcact 900  
 tgtggagatg ggggtggaga tggggcacca tgctccttgg gatgttgatg atctgtagtg 960  
 ctacagaaaa attgtgggtc acagtctatt atggggtagg gatcaccaga attgtaacgc 1020  
 ttacaatttc cattcgccat tcaggctgcg caactgttgg gaagggcgat cgggtcggggc 1080  
 ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt 1140  
 aacgccaggg ttttcccagt cacgacgttg taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata 1200  
 cgactcacta tagggcgaat tggagctcca ccgcggtggc ggccgctcta gaactagtgg 1260  
 atccccggc ccttttgttt cccatctaag tttttgaact taagagattt tgtaaaacat 1320  
 cacatttttt tatcctcaca gtaccttctt atggcagatt tagcaggagg cgtataaacg 1380  
 ggggtgaaaa ggtacagcag actgtggaat gtatggatca tttatattac attaaaattt 1440  
 ttagtttcta gtaaataact taaatgtttt tgtagtgaag attctagtag ttaatgaaaa 1500  
 tttttggtaa attcagtttt ggtttgttat aattgttttt attgtgtgat acatgtttac 1560  
 tttaaattgt ttttcttttt tgtgtgtggt tattttgtgt agctgtatac gtatggcgtt 1620  
 tctaaacatt gcataaaaat taacagcaaa aatgcagagt cttttcagtt tcacactgaa 1680  
 gattattttg gtaaggaaaag tttatggact ggaaaaggaa tacagttggc tgatggtgga 1740  
 tggctcatac cctccaatga tggaaaggct ggaaaagaag aattttatag gtactctatg 1800  
 caaaaagatt gtgtgttaac ttttatgtat tccctcatcc ctctttcttc tcttaactgt 1860  
 ctctcgaact aaaaagttgg ctagaaatca aatttttatg catttaattg ttttaagtgc 1920  
 attatgggta agcattctgt agaagtcttt tgaaaagtgc tgtttgtcct ggggtttaat 1980  
 gaactggatt ttcttgattt gggacatttt tcttaggcatt ttattcagta tgatactttg 2040  
 atacatgtca aataattttc tgaaattata ttgtagatca tatgaactca taaaaactta 2100  
 atgatcttga acaatgtagt ttttgtacag agaatagttg tagttgttga attcagtatc 2160  
 atcctatgtg gtttttatga taatattcta cttttatttg ttcagggctc tgtgtgacac 2220

ES 2 470 440 A1

tccagggtgtg gatccaaagc ttatttctag aatttggggt tataatcact atagatggat 2280  
 catatggaaa ctggcagcta tggaatgtgc ctttcctaag gaatttgcta atagatgcct 2340  
 aagcccagaa aggggtgctt ttcaactaaa atacaggcaa gtttaaagca ttacattacg 2400  
 taatcatata cggcagtatg gttaagggtt ctgtgtagtc tgtgacttcc atgtcaaaat 2460  
 gttgcacaag ccagttgtca gtgacagtgt ccatcccaca ctgctgttct cctgtcatcc 2520  
 ctagcccca tttaagagag atcacacatt catgcattgc ttgcttcctt ctttccccac 2580  
 cccctcctta acctcttgat gtatgagaag aatatgagtt actaatttga tccactattt 2640  
 ggggattgct aataaagcat ttttgcattt tttttttgc tttttaaaaa taattgatat 2700  
 tttacaata tgaacaata tattcctagc tacaaaattt ttaattctca gtatttctta 2760  
 gataaattca gtttttattc tcagttattc agtgacttgt ttaaacagtg gaattctaga 2820  
 gtcacacttc ctaaaatatg catttttgtt ttcactttta gatatgatac ggaaattgat 2880  
 agaagcagaa gatcggctat aaaaaagata atggaaaggg atgacacagc tgcaaaaaca 2940  
 cttgttctct gtgtttctga cataatttca ttgagcgcaa atatatctga aacttctagc 3000  
 aataaaacta gtagtgcaga tacccaaaaa gtggccatta ttgaacttac agatgggtgg 3060  
 tatgctgtta aggcccagtt agatcctccc ctcttagctg tcttaaagaa tggcagactg 3120  
 acagttggtc agaagattat tcttcatgga gcagaactgg tgggctctcc tgatgcctgt 3180  
 acacctcttg aagcccaga atctcttatg ttaaaggtaa attaatttgc actcttggtta 3240  
 aaaatcagtc attgattcag ttaaattcta gaagttttac atttaaattt taaatgctta 3300  
 ctaaggatgc tcaatttctt agatgtactg ataattttag tataaaaagc atattcttca 3360  
 gacagttaa gtttttgtgc agtttttggg aggtccagag atctttcttg agcttaata 3420  
 atgcatttcc aattaaag caaaataaat ttgcaccatt tgattttggt atctgtagct 3480  
 tgctgccctc ttgttctcat agctttgctt tgatcagatc cctattccac tgcaggaatt 3540  
 cgatatcaag cttatcgata ccgtcgacct cgaggggggg cccggtacc agcttttgtt 3600  
 cccttttgtg agggttaatt gcgcgcttg cgtaatcatg gtcatactg tttcctgtgt 3660  
 gaaattgtta tccgctcaca attccacaca acatacgagc cggaagcata aagtgtaaag 3720  
 cctggggtgc ctaatgagtg agctaactca cattaattgc gttgcgctca ctgcccgcca 3780  
 tatgatacag aggtacataa tgtttgggcc acacatgccg gtgtaccac agacccaac 3840  
 ccacaagaag tagtattggt aatgtgaca gaaaatttta acatgtggaa aatgacatg 3900  
 gtagaacaga tgcattgagga tataatcagt ttatgggatc aaagcctaaa gccatgtgta 3960  
 ggaaaactac tttgcaccac tgctgtgcct tggaatgcta gttggagtaa taaatctctg 4020  
 gaacagattt ggaatcacac gacctggatg gagtgggaca gagaaattaa caattacaca 4080  
 aacttaatac actccttaat tgaagaatcg caaaaccagc aagaaaagaa tgaacaagaa 4140  
 ttattggaat tagataaatg ggcaagtttg tggaaattggt ttaacataac aaattggctg 4200  
 tggatatataa aattattcat aatgatagta ggaggcttgg taggtttaag aatagttttt 4260  
 gctgtacttt ctgtagtgaa tagagttagg cagggatatt caccattttc ttttcaggcc 4320  
 tggagatctc ccgaggggac ccgacaggcc cgaaggaata gaagaagaag gtggagagag 4380



ES 2 470 440 A1

agacagagac agatccattc gaccaattca ctcctcaggt gcaggctgcc tatcagaagg 4440  
 tgggtggctgg tgtggccaat gccctggctc acaaatacca ctgagatcca gacatgataa 4500  
 gatacattga tgagtttggg caaaccacaa ctagaatgca gtgaaaaaaaa tgctttatnt 4560  
 gtgaaatntg tgatgctatt gctttatntg taaccattat aagctgcaat aaacaagtta 4620  
 acaacaacaa ttgcattcat tttatgnttc aggttcaggg ggagggtgtgg gaggntntnt 4680  
 aaagcaagta aaacctctac aaatgtggta tggctgatta tgatccccag gaagctcctc 4740  
 tgtgtcctca taaaccctaa cctcctctac ttgagaggac attccaatca taggctgccc 4800  
 atccaccctc tgtgtcctcc tgttaattag gtcacttaac aaaaaggaaa ttgggtaggg 4860  
 gntntntcaca gaccgctntc taagggtaat tntaaaatat ctgggaagtc ccttccactg 4920  
 ctgtgttcca gaagtgttgg taaacagccc acaaatgtca acagcagaaa catacaagct 4980  
 gtcagctntg cacaagggcc caacaccctg ctcatcaaga agcactgtgg ttgctgtgnt 5040  
 agtaatgtgc aaaacaggag gcacatnttc cccacctgtg taggntcca aatatctagt 5100  
 gntntcattt ttacttggat caggaaccca gcactccact ggataagcat tntccttatc 5160  
 caaacagcc ttgtggctag tnttcatctg ctgactgtca actgtagcat tntntgggnt 5220  
 tacagntntg gcaggatatt tggctcctgta gntntgtaac acaccccagg tggcactntt 5280  
 cggggaaaatg tgcgcggaac ccctatntgt tntntntntc aaatacattc aaatatgtat 5340  
 ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg 5400  
 agtattcaac atntccgtgt cgcccttatt cctntntntg cggcattntg ccttccctgnt 5460  
 tntgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagnt ggggtgcacga 5520  
 gtgggnttaca tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagntt tcgccccgaa 5580  
 gaacgntntc caatgatgag cactntntaa gntctgctat gtggcgcggt attatcccgt 5640  
 attgacgccc ggcaagagca actcggctcg cgcatacact attctcagaa tgacttggnt 5700  
 gagtactcac cagtacagaa aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc 5760  
 agtgctgcca taaccatgag tgataacact gcggccaact tacttctgac aacgatcggaa 5820  
 ggaccgaatg agctaaccgc tntntntgac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat 5880  
 cgntgggaac cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct 5940  
 gtagcaatgg caacaacgnt gcgcaaaact ttaactggcg aactacttac tctagctntc 6000  
 cggcaacaat taatagactg gatggaggcg gataaagntg caggaccact tctgcgctcg 6060  
 gccctntccg ctggctgntt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tggntctcg 6120  
 gntatcattg cagcactggg gccagatgnt aagccctccc gtatcgtagt tatctacag 6180  
 acggggagtc aggcaactat ggatgaacga aatagacagaa tcgctgagat aggtgcctca 6240  
 ctgattaagc attggtaact gtcagaccaa gnttactcat atatactnta gattgattnta 6300  
 aaactntcatt tntaatntaa aaggatctag gtgaagatcc tntntgataa tctcatgacc 6360  
 aaaatcctta acgtgagntt tcgntccact gagcgtcagaa ccccgtagaa aagatcaaa 6420  
 gatctntctg agatcctntt tntctgcgcg taatctgctg cttgcaacaa aaaaaaccac 6480

ES 2 470 440 A1

cgctaccagc ggtggtttgt ttgccggatc aagagctacc aactcttttt ccgaaggtaa 6540  
ctggcttcag cagagcgcag ataccaaata ctgtttctct agtgtagccg tagttaggcc 6600  
accacttcaa gaactctgta gcaccgccta catacctcgc tctgctaate ctgttaccag 6660  
tggctgctgc cagtggcgat aagtcgtgtc ttaccggggt ggactcaaga cgatagttac 6720  
cggataaggc gcagcggtcg ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc agcttgagc 6780  
gaacgacctc caccgaactg agatacctac agcgtgagct atgagaaagc gccacgcttc 6840  
ccgaagggag aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag ggtcggaca ggagagcgca 6900  
cgagggagct tccaggggga aacgcctggt atctttatag tcctgtcggg tttgccacc 6960  
tctgacttga gcgtcgattt ttgtgatgct cgtcagggg gcggagccta tggaaaaacg 7020  
ccagcaacgc ggccttttta cggttcctgg ccttttgctg gccttttgct cacatgttct 7080  
ttctgcggtt atcccctgat tctgtggata accgtattac cgcctttgag tgagctgata 7140  
ccgctcgcg cagccgaacg accgagcgca gcgagtcagt gagcgaggaa gcggaagagc 7200  
gccaatacgc caaacgcct ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc ag 7252

<210> 18  
<211> 8340  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<221> source  
<222> 1..8340  
<223> /mol\_type="DNA"  
/note="Plásmido pSAD v5.0 clonado con exones 16, 17, 18, 19 y 20 y secuencias flanqueantes de los intrones 15, 16, 17, 18, 19 y 20 del gen BRCA2 de Homo sapiens"  
/organism="Artificial Sequence"

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> 1270..4671  
<223> /note="Exones 16, 17, 18, 19 y 20 y secuencias flanqueantes de los intrones 15, 16, 17, 18, 19 y 20 del gen BRCA2"

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> join(1..1269,4672..8340)  
<223> /note="Plásmido pSAD v5.0"

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> 1..8340  
<223> /note="Minigen MGBR2\_EX16-20"

<400> 18  
ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt 60  
atgcaaagca tgcattctca ttagtcagca accaggtgtg gaaagtcccc aggcctccca 120  
gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caacatagc cccgccccta 180  
actccgccc tcccgccct aactccgccc agttccgccc attctccgcc ccatggctga 240  
ctaatttttt ttatttatgc agaggccgag gccgcctcgg cctctgagct attccagaag 300  
tagtgaggag gcttttttgg aggcctaggc ttttgcaaaa aacttgact gtgtttactt 360  
gcaatcccc aaaacagaca gaatggtgca tctgtccagt gaggagaagt ctgcggtcac 420

ES 2 470 440 A1

tgcctgtgg ggcaagggtga atgtggaaga agttggtggt gaggccctgg gcaggctgct 480  
 ggttgtctac ccatggaccc agaggttcct cgagtccttt ggggacctgt cctctgcaaa 540  
 tgctgttatg aacaatccta aggtgaaggc tcatggcaag aagggtgctgg ctgccttcag 600  
 tgagggctcg agtcacctgg acaacctcaa aggcaccttt gctaagctga gtgaactgca 660  
 ctgtgacaag ctgcacgctc tagagtcgac ccagcagtaa gtaatacatg taatgcaacc 720  
 tatacaaata gcaatagtag cattagtagt agcaataata atagcaatag ttgtgtggtc 780  
 catagtaatc atagaatata ggaaaatatt aagacaaaga aaaatagaca ggtaattga 840  
 tagactaata gaaagagcag aagacagtgg caatgagagt gaaggagaaa tadcagcact 900  
 tgtggagatg ggggtggaga tggggcacca tgctccttgg gatgttgatg atctgtagtg 960  
 ctacagaaaa attgtgggtc acagtctatt atggggtagg gatcaccaga attgtaacgc 1020  
 ttacaatttc cattcgccat tcaggctgcg caactgttgg gaagggcgat cgggtcgggc 1080  
 ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt 1140  
 aacgccaggg ttttcccagt cacgacgttg taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata 1200  
 cgactcacta tagggcgaat tggagctcca ccgcggtggc ggccgctcta gaactagtgg 1260  
 atccccggc cttttgttt cccatctaag tttttgaact taagagattt tgtaaaacat 1320  
 cacatttttt tatcctcaca gtaccttctt atggcagatt tagcaggagg cgtataaacg 1380  
 ggggtgaaaa ggtacagcag actgtggaat gtatggatca tttatattac attaaaattt 1440  
 ttagtttcta gtaaataact taaatgtttt tgtagtgaag attctagtag ttaatgaaaa 1500  
 tttttggtaa attcagtttt ggtttgttat aattgttttt attgtgtgat acatgtttac 1560  
 tttaaattgt ttttcttttt tgtgtgtgtt tttttgtgt agctgtatac gtatggcgtt 1620  
 tctaaacatt gcataaaaat taacagcaaa aatgcagagt cttttcagtt tcacactgaa 1680  
 gattattttg gtaaggaaag tttatggact ggaaaaggaa tacagttggc tgatggtgga 1740  
 tggctcatac cctccaatga tggaaaggct ggaaaagaag aattttatag gtactctatg 1800  
 caaaaagatt gtgtgttaac ttttatgtat tccctcatcc ctctttcttc tcttaactgt 1860  
 ctctcgaact aaaaagttgg ctagaaatca aatttttatg catttaattg ttttaagtgc 1920  
 attatgggta agcattctgt agaagtcttt tgaaaagtgc tgtttgcctt ggggtttaat 1980  
 gaactggatt ttcttgattt gggacatttt tcttaggcatt ttattcagta tgatactttg 2040  
 atacatgtca aataattttc tgaaattata ttgtagatca tatgaactca taaaaactta 2100  
 atgatcttga acaatgtagt ttttgtacag agaatagttg tagttgttga attcagtatc 2160  
 atcctatgtg gtttttatga taatattcta cttttatttg ttcagggctc tgtgtgacac 2220  
 tccaggtgtg gatccaaagc ttatttctag aatttgggtt tataatcact atagatggat 2280  
 catatggaaa ctggcagcta tggaatgtgc ctttctaag gaatttgcta atagatgcct 2340  
 aagcccagaa aggggtgctt ttcaactaaa atacaggcaa gtttaaagca ttacattacg 2400  
 taatcatata cggcagtatg gttaaggttt ctgtgtagt cgtgacttcc atgtcaaaat 2460  
 gttgcacaag ccagttgtca gtgacagttg ccatcccaca ctgctgttct cctgtcatcc 2520

ES 2 470 440 A1

ctagcccca ttttaagagag atcacacatt catgcattgc ttgcttccct ctttccccac 2580  
ccccctcta acctcttgat gtatgagaag aatatgagtt actaatttga tccactatnt 2640  
ggggattgct aataaagcat ttttgcatnt tttttttgct tttttaaaaa taattgatnt 2700  
tttaacaata tgaacaata tattcctagc tacaaaatnt ttaattctca gtatttctta 2760  
gataaattca gtttttattc tcagttattc agtgacttgt ttaaacagtg gaattctaga 2820  
gtcacacttc ctaaaatatg catttttgnt ttcactttta gatatgatac ggaaattgat 2880  
agaagcagaa gatcggctat aaaaaagata atggaaaggg atgacacagc tgcaaaaaca 2940  
cttgttctct gtgtttctga cataatntca ttgagcgcaa atatatctga aacttctagc 3000  
aataaaacta gtagtgcaga tacccaaaaa gtggcatta ttgaacttac agatgggtgg 3060  
tatgctgnta aggcccagnt agatcctccc ctcttagctg tcttaaagaa tggcagactg 3120  
acagttgntc agaagattat tcttcatgga gcagaactgg tgggctctcc tgatgcctgt 3180  
acacctcttg aagccccaga atctcttatg ttaaaggnta attaatntgc actcttgnta 3240  
aaaatcagtc attgattcag ttaaattcta gaagttntac atttaaattt taaatgctta 3300  
ctaaggatgc tcaatntctt agatgtactg ataatnttag tataaaaagc atattcttca 3360  
gacagntaaa gtttttgntc agtttttggg aggtccagag atctntcttg agcttaaata 3420  
atgcattntc aattaaagc caaaataaat ttgcaccatt tgattntgnt atctgtagct 3480  
tgctgccctc ttgttctcat agctntgctt tgatcagatc cctattccac atagcattaa 3540  
gaacttgtag cagtataaac aatatgnttg agaagtacta tatttgntaa atattntcac 3600  
ttttatacag ttttttactt atttactgnt ttactaatct tcctaagact ttttaaagtg 3660  
aatatntnta aggcagntct agaagaatga aaactcttat gatatctgnt atagaattga 3720  
atacatatnt aactactaaa tcaatatatt tattaatntg tccagatntc tgctaacagnt 3780  
actcggcctg ctcgctgnta taccaaactt ggattctntc ctgaccctag acctnttctc 3840  
ctgcccttat catcgctntt cagtgatgga ggaaatgntg gntgtgntga tgtaattatt 3900  
caaagagcat accctataca gntatgatgnt attcttgaaa cttaccatat atttctntct 3960  
tttgatacaa ttaatntgnt tgnttgnttg agatggagnt tcggtctctt gccaggntg 4020  
gagtgcaatg gcgntgatctt gnttcaactgc agcctccacc tcccggntc aagntgattct 4080  
cctgcctcag cctctcaagnt agctgagcca ccacactgnt ctaatntntg attnttgnta 4140  
gagaagggnt tntcatcatg ttgntcaggnt gatctcgaac tctgacctc agntgatcca 4200  
ctaactcag cctcccaaag ttctgggatt acagatgntga gccactgntc ctggcctgat 4260  
acaattaact tgaatgntat atatgntgact tntntgntgnt gntgntacaca ttattacagnt 4320  
ggatggagaa gacatcatct ggattataca tntntcgcaa tgaagagag gaagaaaagg 4380  
aagcagcaaa atatgntggag gcccaacaaa agagactaga agcctntntc actaaaatntc 4440  
aggaggaatt tgaagaacat gaaggntaaa ttagnttatat gnttacacatt gnttnttcta 4500  
atatgagaac aaagntcttag agactnttgaa tntaacatnt ttaatgagnt aatntgntnt 4560  
atnttgagnt gntaaatntgac tntatntntt agntatctagg gntntctntt ttgntgnttag 4620  
acaaagaata gntacaagnt acagaaatat caggntctaag cctntntgnta ttgntacctag 4680

ES 2 470 440 A1

cttttgttcc cttttgtgag ggtaattgc gcgcttggcg taatcatggt catagctggt 4740  
 tcctgtgtga aattgttatc cgctcacaat tccacacaac atacgagccg gaagcataaa 4800  
 gtgtaaagcc tggggcgcct aatgagtgag ctaactcaca ttaattgcgt tgcgctcact 4860  
 gcccgccata tgatacagag gtacataatg tttgggccac acatgccggt gtaccacag 4920  
 accccaaccc acaagaagta gtattggtaa atgtgacaga aaattttaac atgtggaaaa 4980  
 atgacatggt agaacagatg catgaggata taatcagttt atgggatcaa agcctaaagc 5040  
 catgtgtagg aaaactactt tgcaccactg ctgtgccttg gaatgctagt tggagtaata 5100  
 aatctctgga acagatttgg aatcacacga cctggatgga gtgggacaga gaaattaaca 5160  
 attacacaaa cttataacac tccttaattg aagaatcgca aaaccagcaa gaaaagaatg 5220  
 aacaagaatt attggaatta gataaatggg caagtttgtg gaattggttt aacataacaa 5280  
 attggctgtg gtatataaaa ttattcataa tgatagtagg aggcttgga ggtttaagaa 5340  
 tagtttttgc tgtactttct gtagtgaata gagttaggca gggatattca ccattttctt 5400  
 ttcaggcctg gagatctccc gaggggaccc gacaggcccg aaggaataga agaagaaggt 5460  
 ggagagagag acagagacag atccattcga ccaattcact cctcaggtgc aggctgccta 5520  
 tcagaagggtg gtggctggtg tggccaatgc cctggctcac aaataccact gagatccaga 5580  
 catgataaga tacattgatg agtttggaca aaccacaact agaatgcagt gaaaaaatg 5640  
 ctttatttgt gaaatttgtg atgctattgc tttatttga accattataa gctgcaataa 5700  
 acaagttaac aacaacaatt gcattcattt tatgtttcag gttcaggggg aggtgtggga 5760  
 ggttttttaa agcaagtaaa acctctacaa atgtgggatg gctgattatg atccccagga 5820  
 agctcctctg tgtcctcata aaccctaacc tcctctactt gagaggacat tccaatcata 5880  
 ggctgccccat ccaccctctg tgtcctcctg ttaattaggt cacttaacaa aaaggaaatt 5940  
 gggtaggggt ttttcacaga ccgctttcta agggtaattt taaaatatct gggaggtccc 6000  
 ttccactgct gtgttccaga agtgttggta aacagcccac aaatgtcaac agcagaaaca 6060  
 tacaagctgt cagctttgca caagggccca acaccctgct catcaagaag cactgtgggt 6120  
 gctgtgttag taatgtgcaa aacaggaggc acattttccc cacctgtgta ggttccaaaa 6180  
 tatctagtgt tttcattttt acttggatca ggaaccagc actccactgg ataagcatta 6240  
 tccttatcca aaacagcctt gtggtcagtg ttcactctgct gactgtcaac tgtagcattt 6300  
 tttgggggta cagtttgagc aggatatttg gtccctgtagt ttgctaacac accccaggtg 6360  
 gcacttttcg gggaaatgtg cgcggaacc ctatttgttt atttttctaa atacattcaa 6420  
 atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct tcaataatat tgaaaaagga 6480  
 agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc cttttttgcg gcattttgcc 6540  
 ttctgtttt tgctcaccca gaaacgctgg tgaaagtaaa agatgctgaa gatcagttgg 6600  
 gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg taagatcctt gagagttttc 6660  
 gccccgaaga acgttttcca atgatgagca cttttaaggt tctgctatgt ggcgcggtat 6720  
 tatcccgtat tgacgccggg caagagcaac tcggtcgcgg catacactat tctcagaatg 6780

ES 2 470 440 A1

acttggttga gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac ggatggcatg acagtaagag 6840  
aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataacactgc ggccaactta cttctgacaa 6900  
cgatcggagg accgaatgag ctaaccgctt ttttgacaaa catgggggat catgtaactc 6960  
gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca 7020  
cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc gcaaactatt aactggcgaa ctacttactc 7080  
tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcgga taaagttgca ggaccacttc 7140  
tgcgctcggc ccttccggct ggctggttta ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg 7200  
ggctctcggg tatcattgca gcaactgggc cagatggtaa gccctccgt atcgtagtta 7260  
tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag 7320  
gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt ttactcatat atactttaga 7380  
ttgatttaaa acttcatttt taatttataa ggatctaggt gaagatcctt tttgataatc 7440  
tcatgaccaa aatccttaac gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa 7500  
gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaaaaa 7560  
aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc 7620  
gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gttcttctag tgtagccgta 7680  
gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgctc tgctaactct 7740  
gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttg actcaagacg 7800  
atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag 7860  
cttgagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc 7920  
cacgcttccc gaagggagaa aggcggacag gtatccgta agcggcaggg tcggaacagg 7980  
agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcctggat ctttatagtc ctgtcggggt 8040  
tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcagggggggc ggagcctatg 8100  
gaaaaacgcc agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc ttttgctggc cttttgctca 8160  
catgttcttt cctgcttat cccctgattc tgtggataac cgtattaccg cttttgagtg 8220  
agctgatacc gctcgccgca gccgaacgac cgagcgcagc gagtcagtga gcgaggaagc 8280  
ggaagagcgc ccaatacgca aaccgcctct ccccgcgctg tggccgattc attaatgcag 8340

<210> 19  
<211> 50  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<221> source  
<222> 1..50  
<223> /mol\_type="DNA"  
/note="Cebador forward para delecionar 1,2 kilobases del intron  
del plásmido pSPL3b"  
/organism="Artificial Sequence"

<400> 19  
ggatcaaagc ctaaagccat gtgtaggaaa actactttgc accactgctg 50

<210> 20

ES 2 470 440 A1

```

<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..50
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador reverse para deletar 1,2 kilobases del intron
      del plásmido pSPL3b"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 20
cagcagtggt gcaaagtagt tttcctacac atggctttag gctttgatcc      50

<210> 21
<211> 2961
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..2961
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Plásmido pBluescript II KS (-)"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 21
ctgacgcgcc ctgtagcggc gcattaagcg cggcgggtgt ggtggttacg cgcagcgtga      60
ccgctacact tgccagcgcc ctagcgcccc ctcttttcgc tttcttcctt tcctttctcg      120
ccacgttcgc cggctttccc cgtcaagctc taaatcgggg gctcccttta gggttccgat      180
ttagtgcttt acggcacctc gaccccaaaa aacttgatta gggtagtggt tcacgtagtg      240
ggccatcgcc ctgatagacg gtttttcgcc ctttgacggt ggagtccacg ttctttaata      300
gtggactctt gttccaaact ggaacaacac tcaaccctat ctcggtctat tcttttgatt      360
tataagggat tttgccgatt tcggcctatt ggttaaaaaa tgagctgatt taacaaaaat      420
ttaacgcgaa ttttaacaaa atattaacgc ttacaatttc cattcgccat tcaggctgcg      480
caactgttgg gaagggcgat cgggtgcgggc ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg      540
gggatgtgct gcaagggcgat taagttgggt aacgccaggg ttttcccagt cacgacgttg      600
taaaacgcag gccagtgagc gcgcgtaata cgactacta tagggcgaat tggagctcca      660
ccgcggtggc ggccgctcta gaactagtgg atccccggg ctgcaggaat tcgatatcaa      720
gcttatcgat accgctgacc tcgagggggg gcccggtacc cagcttttgt tccctttagt      780
gagggttaat tgcgcgcttg gcgtaatcat ggtcatagct gtttcctgtg tgaattggt      840
atccgctcac aattccacac aacatacgag ccggaagcat aaagtgtaaa gcctggggtg      900
cctaatgagt gagctaactc acattaattg cgttgcgctc actgcccgtt ttccagtcgg      960
gaaacctgtc gtgccagctg cattaatgaa tcggccaacg cgcggggaga ggcggtttgc      1020
gtattgggcg ctcttccgct tcctcgtca ctgactcgtc gcgctcggtc gttcggctgc      1080
ggcgagcggg atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa tcaggggata      1140
acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg      1200
cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct      1260

```

ES 2 470 440 A1

caagtcaagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt ccccctggaa 1320  
gctcccctcgt gcgctctcct gttccgacct tgccgcttac cggataacctg tccgcctttc 1380  
tccccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg 1440  
aggctcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg 1500  
ccttatcccg taactatcgt cttgagtcca acccggttaag acacgactta tcgccactgg 1560  
cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggatgt aggcggtgct acagagttct 1620  
tgaagtggtg gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc 1680  
tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaacaccg 1740  
ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc 1800  
aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt 1860  
aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaa 1920  
aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat 1980  
gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcgttcatcc atagttgcct 2040  
gactccccgt cgtgtagata actacgatac gggagggctt accatctggc cccagtgtcg 2100  
caatgatacc gcgagaccca cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata aaccagccag 2160  
ccggaagggc cgagcgcaga agtggctctg caactttatc cgctccatc cagtctatta 2220  
attgttgccg ggaagctaga gtaagtagtt cgccagtaa tagtttgcg aacgttggtg 2280  
ccattgctac aggcacgtg gtgtcacgct cgtcgtttgg tatggcttca ttcagctccg 2340  
gttcccaacg atcaaggcga gttacatgat ccccatggt gtgcaaaaaa gcggttagct 2400  
ccttcggtcc tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc agtgttatca ctcatggtta 2460  
tggcagcact gcataattct cttactgtca tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg 2520  
gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc 2580  
cggcgtcaat acgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaagtg ctcatcattg 2640  
gaaaacgttc ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc gctggtgaga tccagttcga 2700  
tgtaaccac tcgtgcacc aactgatctt cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg 2760  
ggtgagcaaa aacaggaagg caaatgccg caaaaaggg aataaggcg acacggaat 2820  
gttgaatact catactcttc ctttttcaat attattgaag catttatcag ggttattgtc 2880  
tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca 2940  
catttccccg aaaagtgcc a c 2961

<210> 22  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<221> source  
<222> 1..35  
<223> /mol\_type="DNA"  
/note="Cebador forward con sitio de restricción MunI para  
amplificar el casete lacZ de pBluescript KS"  
/organism="Artificial Sequence"



```

<220>
<221> misc_feature
<222> 7..12
<223> /note="Sitio de restricción MunI"

<400> 22
cacacacaat tgtaacgctt acaatttcca ttcg                      35

<210> 23
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..33
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador reverse con sitio de restricción NdeI para
      amplificar el casete lacZ de pBluescript KS"
      /organism="Artificial Sequence"

<220>
<221> misc_feature
<222> 7..12
<223> /note="Sitio de restricción NdeI"

<400> 23
cacacacata tggcgggcag tgagcgcaac gca                        33

<210> 24
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..38
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador forward para eliminar un sitio críptico de
      splicing de lacZ"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 24
cagcttttgt tcccttttgt gagggttaat tgcgcgct                  38

<210> 25
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..38
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador reverse para eliminar un sitio críptico de
      splicing de lacZ"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 25
agcgcgcaat taaccctcac aaaagggaac aaaagctg                  38

<210> 26
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

ES 2 470 440 A1

```

<220>
<221> source
<222> 1..42
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador forward para fortalecer un sitio aceptor de
      splicing del segundo exon constitutivo de pSPL3b"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 26
gggatattca ccattttctt ttcaggcctg gagatctccc ga                42

<210> 27
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..42
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador reverse para fortalecer un sitio aceptor de
      splicing del segundo exon constitutivo de pSPL3b"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 27
tcgggagatc tccaggcctg aaaagaaaat ggtgaatc cc                42

<210> 28
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..35
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador forward para eliminar diana HindIII en posicion
      (340)..(345) de pSPL3b"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 28
ctaggctttt gcaaaaaact tggactgtgt ttact                        35

<210> 29
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..35
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador reverse para eliminar diana HindIII en posicion
      (340)..(345) de pSPL3b"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 29
agtaaacaca gtccaagttt tttgcaaaag cctag                        35

<210> 30
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..42

```

ES 2 470 440 A1

```

<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador forward para eliminar diana HindIII en posicion
      (2618)..(2623) de pSPL3b"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 30
gaaattaaca attacacaaa cttaatacac tccttaattg aa 42

<210> 31
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..42
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador reverse para eliminar diana HindIII en posicion
      (2618)..(2623) de pSPL3b"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 31
ttcaattaag gagtgtatta agtttgtgta attgttaatt tc 42

<210> 32
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..37
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador forward para eliminar una diana XbaI en posicion
      (679)..(684) de pSP3b y una diana SalI en posición (685)..(690)
      de pSPL3b"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 32
tgacaagctg cagccctag aatcgacca gcagtaa 37

<210> 33
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..37
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador reverse para eliminar una diana XbaI en posicion
      (679)..(684) de pSPL3b y una diana SalI en posición (685)..(690)
      de pSPL3b"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 33
ttactgctgg gtcgattcta gggcgtgcag cttgtca 37

<210> 34
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..17
<223> /mol_type="DNA"

```

## ES 2 470 440 A1

```
/note="Secuencia consenso de sitio acceptor de splicing"  
/organism="Artificial Sequence"  
  
<220>  
<221> misc_feature  
<222> 12  
<223> /note="n se selecciona independientemente entre a, c, g o t"  
  
<220>  
<221> misc_feature  
<222> 1  
<223> /note="y se selecciona independientemente entre c o t"  
  
<220>  
<221> misc_feature  
<222> 2  
<223> /note="y se selecciona independientemente entre c o t"  
  
<220>  
<221> misc_feature  
<222> 3  
<223> /note="y se selecciona independientemente entre c o t"  
  
<220>  
<221> misc_feature  
<222> 4  
<223> /note="y se selecciona independientemente entre c o t"  
  
<220>  
<221> misc_feature  
<222> 5  
<223> /note="y se selecciona independientemente entre c o t"  
  
<220>  
<221> misc_feature  
<222> 6  
<223> /note="y se selecciona independientemente entre c o t"  
  
<220>  
<221> misc_feature  
<222> 7  
<223> /note="y se selecciona independientemente entre c o t"  
  
<220>  
<221> misc_feature  
<222> 8  
<223> /note="y se selecciona independientemente entre c o t"  
  
<220>  
<221> misc_feature  
<222> 9  
<223> /note="y se selecciona independientemente entre c o t"  
  
<220>  
<221> misc_feature  
<222> 10  
  
<220>  
<221> misc_feature  
<222> 11  
<223> /note="y se selecciona independientemente entre c o t"  
  
<220>  
<221> misc_feature  
<222> 17  
<223> /note="b se selecciona independientemente entre c, g o t"  
  
<400> 34  
yyyyyyyyyyy yncaggb
```

ES 2 470 440 A1

<210> 35  
 <211> 4589  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <221> source  
 <222> 1..4589  
 <223> /mol\_type="DNA"  
 /note="Plásmido pSAD v1.0"  
 /organism="Artificial Sequence"

<400> 35  
 ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt 60  
 atgcaaagca tgcattctcaa ttagtcagca accagggtgtg gaaagtcccc aggctcccca 120  
 gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caacatagc cccgccctta 180  
 actccgcccc tcccgcccct aactccgccc agttccgccc attctccgcc ccatggctga 240  
 ctaatttttt ttatttatgc agaggccgag gccgcctcgg cctctgagct attccagaag 300  
 tagtgaggag gcttttttgg aggcctaggc ttttgcaaaa agcttggact gtgtttactt 360  
 gcaatcccc aaacagaca gaatggtgca tctgtccagt gaggagaagt ctgcggtcac 420  
 tgccctgtgg ggcaaggaga atgtggaaga agttggtggt gaggccctgg gcaggctgct 480  
 ggttgcttac ccatggacc agaggttctt cgagtccttt ggggacctgt cctctgcaaa 540  
 tgctgttatg aacaatccta aggtgaaggc tcatggcaag aagggtgctgg ctgccttcag 600  
 tgagggctct agtcacctgg acaacctcaa aggcaccttt gctaagctga gtgaactgca 660  
 ctgtgacaag ctgcacgctc tagagtcgac ccagcagtaa gtaatacatg taatgcaacc 720  
 tatacaata gcaatagtag cattagtagt agcaataata atagcaatag ttgtgtggtc 780  
 catagtaatc atagaatata ggaaaatatt aagacaaaga aaaatagaca ggttaattga 840  
 tagactaata gaaagagcag aagacagtgg caatgagagt gaaggagaa taccagcact 900  
 tgtggagatg ggggtggaga tggggcacca tgctccttgg gatgttgatg atctgtagtg 960  
 ctacagaaaa attgtgggtc acagtctatt atggggtagg gatcaccaga attctggagc 1020  
 tcgagcggcc gctgcaggat cccagatata tgggtgatccc gtacctgtgt ggaaggaagc 1080  
 aaccaccact ctattttgtg catcagatgc taaagcatat gatacagagg tacataatgt 1140  
 ttgggccaca catgccggtg taccacaga cccaacca caagaagtag tattggtaaa 1200  
 tgtgacagaa aattttaaca tgtggaaaaa tgacatggta gaacagatgc atgaggatat 1260  
 aatcagttta tgggatcaaa gcctaaagcc atgtgtagga aaactacttt gcaccactgc 1320  
 tgtgccttgg aatgctagtt ggagtaataa atctctggaa cagatttggga atcacacgac 1380  
 ctggatggag tgggacagag aaattaacaa ttacacaagc ttaatacact ccttaattga 1440  
 agaatcgcaa aaccagcaag aaaagaatga acaagaatta ttggaattag ataatgggc 1500  
 aagtttgtgg aattggttta acataacaaa ttggctgtgg tatataaat tattcataat 1560  
 gatagtagga ggcttgtag gttaagaat agtttttctg gtactttctg tagtgaatag 1620  
 agttaggcag ggatattcac cattatcgtt tcagacctgg agatctccc aggggacctg 1680  
 acaggccccg aggaatagaa gaagaagggtg gagagagaga cagagacaga tccattcgac 1740

ES 2 470 440 A1

caattcactc ctcaggtgca ggctgcctat cagaaggtgg tggctggtgt ggccaatgcc 1800  
ctggctcaca aataccactg agatccagac atgataagat acattgatga gtttgacaa 1860  
accacaacta gaatgcagtg aaaaaaatgc tttattttgtg aaattttgtga tgctattgct 1920  
ttattttgtaa ccattataag ctgcaataaa caagttaaca acaacaattg cattcatttt 1980  
atgtttcagg ttcaggggga ggtgtgggag gttttttaa gcaagtaaaa cctctacaaa 2040  
tgtggtatgg ctgattatga tcccaggaa gctcctctgt gtcctcataa accctaact 2100  
cctctacttg agaggacatt ccaatcatag gctgcccac caccctctgt gtcctcctgt 2160  
taattaggtc acttaacaaa aaggaaattg ggtaggggtt tttcacagac cgctttctaa 2220  
gggtaatttt aaaatatctg ggaagtccct tccactgctg tgttccagaa gtgttggtaa 2280  
acagcccaca aatgtcaaca gcagaaacat acaagctgtc agctttgcac aagggcccaa 2340  
caccctgctc atcaagaagc actgtgggtg ctgtgttagt aatgtgcaaa acaggaggca 2400  
cattttcccc acctgtgtag gttccaaaat atctagtgtt ttcattttta cttggatcag 2460  
gaaccagca ctccactgga taagcattat cttatccaa aacagccttg tggtcagtgt 2520  
tcatctgctg actgtcaact gtagcatttt ttggggttac agtttgagca ggatatttg 2580  
tcctgtagtt tgctaacaca ccccaggtgg cacttttcgg ggaaatgtgc gcggaacccc 2640  
tatttgttta tttttctaaa tacattcaa tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg 2700  
ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt tccgtgtcgc 2760  
ccttattccc ttttttgcg cttttgcct tcctgttttt gtcacccag aaacgctggt 2820  
gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcacgagtg gttacatcg aactggatct 2880  
caacagcggg aagatccttg agagttttcg ccccgaagaa cgttttcaa tgatgagcac 2940  
ttttaagtt ctgctatgtg gcgcggtatt atcccgtatt gacgccggg aagagcaact 3000  
cggctgcccgc atacactatt ctcagaatga cttggttgag tactcaccag tcacagaaaa 3060  
gcatcttacg gatggcatga cagtaagaga attatgcagt gctgccataa ccatgagtga 3120  
taacactgcg gccaaacttac ttctgacaac gatcggagga ccgaatgagc taaccgcttt 3180  
tttgacacaac atgggggatc atgtaactcg cttgatcgt tgggaaccgg agctgaatga 3240  
agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgta gcaatggcaa caacgttgcg 3300  
caactatta actggcgaac tacttactct agcttcccgg caacaattaa tagactggat 3360  
ggaggcggat aaagttgag gaccacttct gcgctcggcc cttccggctg gctggttttat 3420  
tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcggg atcattgcag cactggggcc 3480  
agatggtaag ccctcccgtg tcgtagttat ctacacgagc gggagtcagg caactatgga 3540  
tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg attaagcatt ggtaactgtc 3600  
agaccaagtt tactcatata tacttttagat tgatttaaaa cttcattttt aatttaaaag 3660  
gatctaggtg aagatccttt ttgataatct catgaccaa atccttaacg tgagttttcg 3720  
ttccactgag cgtcagaccc cgtagaaaag atcaaaggat cttcttgaga tccttttttt 3780  
ctgctgctaa tctgctgctt gcaaacaaaa aaaccaccgc taccagcggg ggtttgtttg 3840  
ccggatcaag agctaccaac tctttttccg aaggtaactg gcttcagcag agcgcagata 3900

ES 2 470 440 A1

ccaaatactg ttcttctagt gtagccgtag ttaggccacc acttcaagaa ctctgtagca 3960  
 ccgcctacat acctcgtctt gctaatcctg ttaccagtgg ctgctgccag tggcgataag 4020  
 tcgtgtctta ccgggttggg ctcaagacga tagttaccgg ataaggcgca gcggtcgggc 4080  
 tgaacggggg gttcgtgcac acagcccagc ttggagcgaa cgacctacac cgaactgaga 4140  
 tacctacagc gtgagctatg agaaagcgcc acgcttcccg aaggagagaaa ggcggacagg 4200  
 tatccggtaa gcggcagggg cggaacagga gagcgcacga gggagcttcc agggggaaac 4260  
 gcctggtatc tttatagtcc tgtcgggttt cgccacctct gacttgagcg tcgatttttg 4320  
 tgatgctcgt caggggggcg gagcctatgg aaaaacgcca gcaacgaggc ctttttacgg 4380  
 ttcctggcct tttgctggcc ttttgctcac atgttctttc ctgcttattc ccctgattct 4440  
 gtggataacc gtattaccgc ctttgagtga gctgataccg ctcgccgag ccgaacgacc 4500  
 gagcgcagcg agtcagtgag cgaggaagcg gaagagcgcc caatacgcaa accgcctctc 4560  
 cccgcgcggt ggccgattca ttaatgcag 4589

<210> 36  
 <211> 4993  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <221> source  
 <222> 1..4993  
 <223> /mol\_type="DNA"  
 /note="Plasmid pSAD v2.0"  
 /organism="Artificial Sequence"

<400> 36  
 ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt 60  
 atgcaaagca tgcattctca ttagtcagca accaggtgtg gaaagtcccc aggctcccca 120  
 gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caaccatagt cccgccccta 180  
 actccgcca tcccggccct aactccgccc agttccgccc attctccgcc ccatggctga 240  
 ctaatttttt ttatttatgc agaggccgag gccgcctcgg cctctgagct attccagaag 300  
 tagtgaggag gcttttttgg aggcctaggc ttttgcaaaa agcttgact gtgtttactt 360  
 gcaatcccc aaaacagaca gaatggtgca tctgtccagt gaggagaagt ctgaggtcac 420  
 tgccctgtgg ggcaaggtga atgtggaaga agttggtggt gaggccctgg gcaggctgct 480  
 ggttgtctac ccatggacc agaggttctt cgagtccttt gggacactgt cctctgcaaa 540  
 tgctgttatg aacaatccta aggtgaaggc tcatggcaag aagggtgctg ctgccttcag 600  
 tgagggtctg agtcacctgg acaacctcaa aggcaccttt gctaagctga gtgaactgca 660  
 ctgtgacaag ctgcacgctc tagagtcgac ccagcagtaa gtaatacatg taatgcaacc 720  
 tatacaaata gcaatagtag cattagtagt agcaataata atagcaatag ttgtgtggtc 780  
 catagtaatc atagaatata ggaaaatatt aagacaaaga aaaatagaca ggttaattga 840  
 tagactaata gaaagagcag aagacagtgg caatgagagt gaaggagaaa tadcagcact 900  
 tgtggagatg ggggtggaga tggggcacca tgctccttgg gatgttgatg atctgtagtg 960

ES 2 470 440 A1

ctacagaaaa attgtgggtc acagtctatt atggggtagg gatcaccaga attgtaacgc 1020  
ttacaatttc cattcgccat tcaggctgcg caactgttgg gaagggcgat cgggtcgggc 1080  
ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaagggcat taagttgggt 1140  
aacgccaggg ttttcccagt cacgacgttg taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata 1200  
cgactcacta tagggcgaat tggagctcca ccgcggtggc ggccgctcta gaactagtgg 1260  
atccccggg ctgcaggaat tcgatataca gcttatcgat accgtcgacc tcgagggggg 1320  
gcccggtagc cagcttttgt tccctttagt gagggttaat tgcgcgcttg gcgtaatcat 1380  
ggcatagct gtttcctgtg tgaattgtt atccgctcac aattccacac aacatacgag 1440  
ccggaagcat aaagtgtaaa gcctgggggtg cctaatgagt gagctaactc acattaattg 1500  
cgttgcgctc actgcccgcc atatgataca gaggtacata atgtttgggc cacacatgcc 1560  
gggtgaccca cagaccccaa cccacaagaa gtagtattgg taaatgtgac agaaaatfff 1620  
aacatgtgga aaaatgacat ggtagaacag atgcatgagg atataatcag tttatgggat 1680  
caaagcctaa agccatgtgt aggaaaacta ctttgcacca ctgctgtgcc ttggaatgct 1740  
agttggagta ataaatctct ggaacagatt tggaatcaca cgacctggat ggagtgggac 1800  
agagaaatta acaattacac aagcttaata cactccttaa ttgaagaatc gcaaaaccag 1860  
caagaaaaga atgaacaaga attattggaa ttagataaat gggcaagttt gtggaattgg 1920  
tttaacataa caaattggct gtggtatata aaattattca taatgatagt aggaggcttg 1980  
gtaggtttaa gaatagtttt tgctgtactt tctgtagtga atagagttag gcagggatat 2040  
tcaccattat cgtttcagac ctggagatct cccgagggga cccgacaggc ccgaaggaat 2100  
agaagaagaa ggtggagaga gagacagaga cagatccatt cgaccaattc actcctcagg 2160  
tgcaggctgc ctatcagaag gtggtggctg gtgtggccaa tgccctggct cacaaatacc 2220  
actgagatcc agacatgata agatacattg atgagtttgg acaaaccaca actagaatgc 2280  
agtgaaaaaa atgcttttatt tgtgaaatff gtgatgctat tgctttatff gtaaccatta 2340  
taagctgcaa taaacaagt aacaacaaca attgcattca ttttatgtff caggttcagg 2400  
gggaggtgtg ggaggttfff taaagcaagt aaaacctta caaatgtgg atggctgatt 2460  
atgatcccca ggaagctcct ctgtgtcctc ataaacctta acctcctta cttgagagga 2520  
cattccaatc ataggctgcc catccacct ctgtgtcctc ctgttaatta ggtcacttaa 2580  
caaaaaggaa attgggtagg ggtttttcac agaccgctff ctaagggtaa ttttaaaata 2640  
tctgggaagt cccttccact gctgtgttcc agaagtgttg gtaaacagcc cacaaatgfc 2700  
aacagcagaa acatacaagc tgtcagctff gcacaagggc ccaacacct gctcatcaag 2760  
aagcactgtg gttgctgtgt tagtaatgtg caaacagga ggcacattff cccacctgt 2820  
gtaggttcca aaatatctag tgttttcatt tttacttgg taaggaacc agcactccac 2880  
tggataagca ttatccttat ccaaaacagc cttgtgggtca gtgttcatct gctgactgtc 2940  
aactgtagca ttttttgggg ttacagtttg agcaggatat ttggctcctgt agtttgctaa 3000  
cacaccccag gtggcactff tcggggaaat gtgcgaggaa cccctatttg tttatffttc 3060  
taaatacatt caaatatgta tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa 3120



ES 2 470 440 A1

tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa catttccgtg tcgcccttat tccctttttt 3180  
gcggcatttt gccttcctgt ttttgctcac ccagaaacgc tggtgaaagt aaaagatgct 3240  
gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg atctcaacag cggttaagatc 3300  
cttgagagtt ttcgccccga agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta 3360  
tgtggcgcgg tattatccccg tattgacgcc gggcaagagc aactcggtcg ccgcatacac 3420  
tattctcaga atgacttggg tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc 3480  
atgacagtaa gagaattatg cagtgtgcc ataaccatga gtgataacac tgcggccaac 3540  
ttacttctga caacgatcgg aggaccgaat gagctaaccg cttttttgca caacatgggg 3600  
gatcatgtaa ctcgccttga tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat accaaacgac 3660  
gagcgtgaca ccacgatgcc tgtagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaact attaactggc 3720  
gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt 3780  
gcaggaccac ttctgcgctc ggcccttccg gctggctggg ttattgctga taaatctgga 3840  
gccggtgagc gtgggtctcg cggatcatt gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc 3900  
cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt caggcaacta tggatgaacg aaatagacag 3960  
atcgtgaga taggtgcctc actgattaag cattggtaac tgtcagacca agtttactca 4020  
tatatacttt agattgattt aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc 4080  
ctttttgata atctcatgac caaaatcctt aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag 4140  
accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt ttttctgcg gtaatctgct 4200  
gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag cgggtggttt tttgccggat caagagctac 4260  
caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca gataccaaat actgttcttc 4320  
tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg 4380  
ctctgcta at cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt 4440  
tggactcaag acgatagtta ccggataagg cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt 4500  
gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc 4560  
tatgagaaaag cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca 4620  
gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata 4680  
gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg 4740  
ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttctg gccttttgct 4800  
ggccttttgc tcacatgttc tttcctgctg tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta 4860  
ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag 4920  
tgagcgagga agcggaaagag cgccaatac gcaaaccgcc tctccccg cgttggccga 4980  
ttcattaatg cag 4993

<210> 37  
<211> 4993  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

ES 2 470 440 A1

<220>  
 <221> source  
 <222> 1..4993  
 <223> /mol\_type="DNA"  
 /note="Plasmid pSAD v3.0"  
 /organism="Artificial Sequence"

<400> 37  
 ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt 60  
 atgcaaagca tgcattctca ttagtcagca accagggtgtg gaaagtcccc aggctcccca 120  
 gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caacatagc cccgccccta 180  
 actccgcccc tcccccccct aactccgccc agttccgccc attctccgcc ccatggctga 240  
 ctaatttttt ttatttatgc agaggccgag gccgcctcgg cctctgagct attccagaag 300  
 tagtgaggag gcttttttgg aggcctaggc ttttgcaaaa agcttgact gtgtttactt 360  
 gcaatcccc aaacagaca gaatggtgca tctgtccagt gaggagaagt ctgcggtcac 420  
 tgccctgtgg ggcaagggtga atgtggaaga agttggtggt gaggccctgg gcaggctgct 480  
 ggttgcttac ccatggacc agaggttctt cgagtcctt ggggacctgt cctctgcaaa 540  
 tgctgttatg aacaatccta aggtgaaggc tcatggcaag aagggtgctg ctgccttcag 600  
 tgagggctct agtcacctg acaacctcaa aggcacctt gctaagctga gtgaactgca 660  
 ctgtgacaag ctgcacgctc tagagtcgac ccagcagtaa gtaatacatg taatgcaacc 720  
 tatacaata gcaatagtag cattagtagt agcaataata atagcaatag ttgtgtggtc 780  
 catagtaatc atagaatata ggaaaatatt aagacaaaga aaaatagaca ggttaattga 840  
 tagactaata gaaagagcag aagacagtgg caatgagagt gaaggagaaa taccagcact 900  
 tgtggagatg ggggtggaga tggggcacca tgctccttgg gatgttgatg atctgtagtg 960  
 ctacagaaaa attgtgggtc acagtctatt atggggtagg gatcaccaga attgtaacgc 1020  
 ttacaatttc cattcgccat tcaggctgcg caactgttgg gaagggcgat cgggtcgggc 1080  
 ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt 1140  
 aacgccaggg ttttcccagt cacgacgttg taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata 1200  
 cgactcacta tagggcgaat tggagctcca ccgcggtggc ggccgctcta gaactagtgg 1260  
 atccccggg ctgcaggaat tcgatatcaa gcttatcgat accgtcgacc tcgagggggg 1320  
 gcccgtacc cagcttttgt tcccttttgt gagggtaat tgcgcgcttg gcgtaatcat 1380  
 ggtcatagct gtttcctgtg tgaaattgtt atccgctcac aattccacac aacatacgag 1440  
 ccggaagcat aaagtgtaaa gcctggggtg cctaattgag gagctaactc acattaattg 1500  
 cgttgcgctc actgcccgcc atatgataca gaggtacata atgtttgggc cacacatgcc 1560  
 ggtgtacca cagaccccaa cccacaagaa gtagtattgg taaatgtgac agaaaatttt 1620  
 aacatgtgga aaaatgacat ggtagaacag atgcatgagg atataatcag tttatgggat 1680  
 caaagcctaa agccatgtgt aggaaaacta ctttgacca ctgctgtgct ttggaatgct 1740  
 agttggagta ataaatctct ggaacagatt tggaatcaca cgacctggat ggagtgggac 1800  
 agagaaatta acaattacac aagcttaata cactccttaa ttgaagaatc gaaaaccag 1860  
 caagaaaaga atgaacaaga attattggaa ttagataaat gggcaagttt gtggaattgg 1920

ES 2 470 440 A1

tttaacataa caaattggct gtggtatata aaattattca taatgatagt aggaggcttg 1980  
 gtaggtttaa gaatagtttt tgctgtactt tctgtagtga atagagttag gcagggatat 2040  
 tcaccattat cgtttcagac ctggagatct cccgagggga cccgacaggc ccgaaggaat 2100  
 agaagaagaa ggtggagaga gagacagaga cagatccatt cgaccaattc actcctcagg 2160  
 tgcaggctgc ctatcagaag gtggtggctg gtgtggccaa tgccctggct cacaaatacc 2220  
 actgagatcc agacatgata agatacattg atgagtttg acaaaccaca actagaatgc 2280  
 agtgaaaaaa atgctttatt tgtgaaattt gtgatgctat tgctttattt gtaaccatta 2340  
 taagctgcaa taaacaagt taaacaaca attgcattca ttttatgttt caggttcagg 2400  
 gggagggtg ggaggtttt taaagcaagt aaaacctcta caaatgtggt atggctgatt 2460  
 atgatcccca ggaagctcct ctgtgtcctc ataaacccta acctcctcta cttgagagga 2520  
 cattccaatc ataggctgcc catccaccct ctgtgtcctc ctgttaatta ggtcacttaa 2580  
 caaaaaggaa attgggtagg ggtttttcac agaccgcttt ctaagggtaa ttttaaaata 2640  
 tctgggaagt cccttccact gctgtgttcc agaagtgttg gtaaacagcc cacaaatgct 2700  
 aacagcagaa acatacaagc tgtcagcttt gcacaagggc ccaacaccct gctcatcaag 2760  
 aagcactgtg gttgctgtg tagtaatgtg caaaacagga ggcacatttt cccacactgt 2820  
 gtaggttcca aaatatctag tgttttcatt tttacttggga tcaggaacc agcactccac 2880  
 tggataagca ttatccttat ccaaaacagc cttgtgggtca gtgttcatct gctgactgtc 2940  
 aactgtagca ttttttgggg ttacagtttg agcaggatat ttggcctgt agtttgctaa 3000  
 cacaccccag gtggcacttt tcggggaaat gtgcgcgga cccctatttg tttatttttc 3060  
 taaatacatt caaatatgta tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa 3120  
 tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa catttccgtg tcgcccttat tccctttttt 3180  
 gcggcatttt gccttctgt ttttgctcac ccagaaacgc tggtgaaagt aaaagatgct 3240  
 gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg atctcaacag cggtaaagatc 3300  
 cttgagagtt ttcgccccga agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta 3360  
 tgtggcgcgg tattatcccg tattgacgcc gggcaagagc aactcggtcg ccgcatacac 3420  
 tattctcaga atgacttggg tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc 3480  
 atgacagtaa gagaattatg cagtgtctgc ataaccatga gtgataacac tgcggccaac 3540  
 ttacttctga caacgatcgg aggaccgaat gagctaaccg cttttttgca caacatgggg 3600  
 gatcatgtaa ctgccttga tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat accaaacgac 3660  
 gagcgtgaca ccacgatgcc tgtagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaact attaactggc 3720  
 gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt 3780  
 gcaggaccac ttctgcgctc ggcccttccg gctggctggt ttattgctga taaatctgga 3840  
 gccggtgagc gtgggtctcg cggtatcatt gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc 3900  
 cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt caggcaacta tggatgaacg aaatagacag 3960  
 atcgctgaga taggtgcctc actgattaag cattggtaac tgtcagacca agtttactca 4020

ES 2 470 440 A1

tatatacttt agattgattt aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc 4080  
ctttttgata atctcatgac caaaatcctt aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag 4140  
accccgtaga aaagatcaaaa ggatcttctt gagatccttt ttttctgctg gtaatctgct 4200  
gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag cggtggtttg tttgccggat caagagctac 4260  
caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgc gataccaaat actgttcttc 4320  
tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg 4380  
ctctgcta at cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt 4440  
tggactcaag acgatagtta ccggataagg cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt 4500  
gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc 4560  
tatgagaaaag cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcggga caggtatccg gtaagcggca 4620  
gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata 4680  
gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg 4740  
ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttcctg gccttttgct 4800  
ggccttttgc tcacatgttc tttcctgctg tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta 4860  
ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag 4920  
tgagcgagga agcggaaagag cgccaatac gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga 4980  
ttcattaatg cag 4993

<210> 38  
<211> 4993  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<221> source  
<222> 1..4993  
<223> /mol\_type="DNA"  
/note="Plasmid pSAD v4.0"  
/organism="Artificial Sequence"

<400> 38  
ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt 60  
atgcaaagca tgcattctcaa ttagtcagca accaggtgtg gaaagtcccc aggctcccca 120  
gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caaccatagt cccgccccta 180  
actccgcca tcccgcccct aactccgcc agttccgcc attctccgcc ccatggctga 240  
ctaatttttt ttatttatgc agaggccgag gccgcctcgg cctctgagct attccagaag 300  
tagtgaggag gcttttttgg aggcctaggc ttttgcaaaa aacttgact gtgtttactt 360  
gcaatcccc aaaacagaca gaatggtgca tctgtccagt gaggagaagt ctgcggtcac 420  
tgccctgtgg ggcaaggatga atgtggaaga agttggtggt gaggccctgg gcaggctgct 480  
ggttgcttac ccatggacc agaggttctt cgagtccttt ggggacctgt cctctgcaaa 540  
tgctgttatg aacaatccta aggtgaaggc tcatggcaag aaggtgctgg ctgccttcag 600  
tgagggtctg agtcacctg acaacctcaa aggcaccttt gctaagctga gtgaactgca 660  
ctgtgacaag ctgcacgctc tagagtcgac ccagcagtaa gtaatacatg taatgcaacc 720

ES 2 470 440 A1

tatacaaata	gcaatagtag	cattagtagt	agcaataata	atagcaatag	ttgtgtggtc	780
catagtaatc	atagaatata	ggaaaatatt	aagacaaaga	aaaatagaca	ggttaattga	840
tagactaata	gaaagagcag	aagacagtgg	caatgagagt	gaaggagaaa	tatcagcact	900
tgtggagatg	ggggtggaga	tggggcacca	tgctccttgg	gatgttgatg	atctgtagtg	960
ctacagaaaa	attgtgggtc	acagtctatt	atggggtagg	gatcaccaga	attgtaacgc	1020
ttacaatttc	cattcgccat	tcaggctgcg	caactgttgg	gaagggcgat	cggtgcgggc	1080
ctcttcgcta	ttacgccagc	tggcgaaagg	gggatgtgct	gcaaggggat	taagttgggt	1140
aacgccaggg	ttttcccagt	cacgacgttg	taaaacgacg	gccagtgagc	gcgcgtaata	1200
cgactcacta	tagggcgaat	tggagctcca	ccgcggtggc	ggccgctcta	gaactagtgg	1260
atcccccggg	ctgcaggaat	tcgatatcaa	gcttatcgat	accgtcgacc	tcgagggggg	1320
gccccgtacc	cagcttttgt	tcccttttgt	gagggttaat	tgcgcgcttg	gcgtaatcat	1380
ggtcatagct	gtttcctgtg	tgaaattggt	atccgctcac	aattccacac	aacatacgag	1440
ccggaagcat	aaagtgtaaa	gcctgggggtg	cctaatgagt	gagctaactc	acattaattg	1500
cgttgcgctc	actgcccgcc	atatgataca	gaggtacata	atgtttgggc	cacacatgcc	1560
gggtgtacca	cagaccccaa	cccacaagaa	gtagtattgg	taaatgtgac	agaaaatfff	1620
aacatgtgga	aaaatgacat	ggtagaacag	atgcatgagg	atataatcag	tttatgggat	1680
caaagcctaa	agccatgtgt	aggaaaacta	ctttgcacca	ctgctgtgcc	ttggaatgct	1740
agttggagta	ataaatctct	ggaacagatt	tggaatcaca	cgacctggat	ggagtgggac	1800
agagaaatta	acaattacac	aaacttaata	cactccttaa	ttgaagaatc	gcaaaaccag	1860
caagaaaaga	atgaacaaga	attattggaa	ttagataaat	gggcaagttt	gtggaattgg	1920
tttaacataa	caaattggct	gtggtatata	aaattattca	taatgatagt	aggaggcttg	1980
gtaggtttta	gaatagtttt	tgctgtactt	tctgtagtga	atagagttag	gcagggatat	2040
tcaccattat	cgtttcagac	ctggagatct	cccgagggga	cccgacaggc	ccgaaggaat	2100
agaagaagaa	ggtggagaga	gagacagaga	cagatccatt	cgaccaattc	actcctcagg	2160
tgcaggctgc	ctatcagaag	gtggtggctg	gtgtggccaa	tgccctggct	cacaaatacc	2220
actgagatcc	agacatgata	agatacattg	atgagtttgg	acaaccaca	actagaatgc	2280
agtgaaaaaa	atgcttttatt	tgtgaaatff	gtgatgctat	tgctttatff	gtaaccatta	2340
taagctgcaa	taaacaagtt	aacaacaaca	attgcattca	ttttatgtff	caggttcagg	2400
gggaggtgtg	ggaggtttff	taaagcaagt	aaaacctcta	caaatgtggf	atggctgatt	2460
atgatcccca	ggaagctcct	ctgtgtcctc	ataaacctta	acctcctcta	cttgagagga	2520
cattccaatc	ataggctgcc	catccaccct	ctgtgtcctc	ctgttaatta	ggtcacttaa	2580
caaaaaggaa	attgggtagg	ggtttttcac	agaccgctff	ctaagggtaa	ttttaaaata	2640
tctgggaagt	cccttcact	gctgtgttcc	agaagtgttg	gtaaacagcc	cacaaatgtc	2700
aacagcagaa	acatacaagc	tgtcagctff	gcacaagggc	ccaacaccct	gctcatcaag	2760
aagcactgtg	gttgctgtgt	tagtaatgtg	caaaacagga	ggcacatfff	ccccacctgt	2820

ES 2 470 440 A1

gtaggtcca aaatatctag tgttttcatt tttacttga tcaggaaccc agcactccac 2880  
 tggataagca ttatccttat ccaaaacagc cttgtggca gtgttcatct gctgactgtc 2940  
 aactgtagca ttttttgggg ttacagtttg agcaggatat ttggtcctgt agtttgctaa 3000  
 cacaccccag gtggcacttt tcggggaaat gtgcgcggaa ccctatttg tttatttttc 3060  
 taaatacatt caaatatgta tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa 3120  
 tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa catttccgtg tcgcccttat tccctttttt 3180  
 gcggcatttt gccttcctgt ttttgctcac ccagaaacgc tggtgaaagt aaaagatgct 3240  
 gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg atctcaacag cggtaagatc 3300  
 cttgagagtt ttcgccccga agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta 3360  
 tgtggcgcgg tattatcccg tattgacgcc gggcaagagc aactcggtcg ccgcatacac 3420  
 tattctcaga atgacttggg tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc 3480  
 atgacagtaa gagaattatg cagtgtgctc ataaccatga gtgataaacac tgcggccaac 3540  
 ttacttctga caacgatcgg aggaccgaat gagctaaccg cttttttgca caacatgggg 3600  
 gatcatgtaa ctcgccttga tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat accaaacgac 3660  
 gagcgtgaca ccacgatgcc tgtagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaact attaactggc 3720  
 gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt 3780  
 gcaggaccac ttctgcgctc ggcccttccg gctggctggg ttattgctga taaatctgga 3840  
 gccggtgagc gtgggtctcg cggtatcatt gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc 3900  
 cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt caggcaacta tggatgaacg aaatagacag 3960  
 atcgctgaga taggtgcctc actgattaag cattggtaac tgtcagacca agtttactca 4020  
 tatatacttt agattgattt aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc 4080  
 ctttttgata atctcatgac caaaatcctt aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag 4140  
 accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt ttttctgctc gtaatctgct 4200  
 gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag cggtggtttg tttgccgat caagagctac 4260  
 caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca gataccaaat actgttcttc 4320  
 tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg 4380  
 ctctgcta atctgttacca gtggctgctg ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt 4440  
 tggactcaag acgatagtta ccggataagg cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt 4500  
 gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc 4560  
 tatgagaaaag cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcggga caggatccg gtaagcggca 4620  
 gggctcggaa aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata 4680  
 gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg 4740  
 ggcggagcct atggaaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttctctg gccttttgct 4800  
 ggccttttgc tcacatgttc tttcctgctg tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta 4860  
 ccgcctttga gtgagctgat accgctcgc gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag 4920  
 tgagcgagga agcggaaagag cgcccaatac gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga 4980

ttcattaatg cag 4993

<210> 39  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <221> source  
 <222> 1..34  
 <223> /mol\_type="DNA"  
 /note="Cebador forward para amplificar los exones 21, 22, 23 y 24  
 y secuencias intrónicas del gen BRCA2"  
 /organism="Artificial Sequence"

<400> 39  
 cacacactcg agccttcttt ggggtgttta tgct 34

<210> 40  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <221> source  
 <222> 1..34  
 <223> /mol\_type="DNA"  
 /note="Cebador reverse para amplificar los exones 21, 22, 23 y 24  
 y secuencias intrónicas del gen BRCA2"  
 /organism="Artificial Sequence"

<400> 40  
 cacacaggat ccaaatcaga ggttcaaaga ggct 34

<210> 41  
 <211> 50  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <221> source  
 <222> 1..50  
 <223> /mol\_type="DNA"  
 /note="Cebador forward para deleción de 2.000 pb del intrón 21  
 del gen BRCA2"  
 /organism="Artificial Sequence"

<400> 41  
 ttaaaatgca ggcaaaactt gtttttagcc atctgtaatg tagttggtga 50

<210> 42  
 <211> 50  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <221> source  
 <222> 1..50  
 <223> /mol\_type="DNA"  
 /note="Cebador reverse para deleción de 2.000 pb del intrón 21  
 del gen BRCA2"  
 /organism="Artificial Sequence"

<400> 42  
 tcaccaacta cattacagat ggctaaaaac aagttttgcc tgcattttaa 50

ES 2 470 440 A1

<210> 43  
 <211> 47  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <221> source  
 <222> 1..47  
 <223> /mol\_type="DNA"  
 /note="Cebador forward para amplificar los exones 19 y 20 y  
 secuencias intrónicas del gen BRCA2"  
 /organism="Artificial Sequence"  
  
 <400> 43  
 tctggagctc gagcacacat ccggaatagc attaagaact tgtagca 47  
  
 <210> 44  
 <211> 47  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <221> source  
 <222> 1..47  
 <223> /mol\_type="DNA"  
 /note="Cebador reverse para amplificar los exones 19 y 20 y  
 secuencias intrónicas del gen BRCA2"  
 /organism="Artificial Sequence"  
  
 <400> 44  
 ccaagcataa aacacccaaa gaaggattac aaatggctta gacctga 47  
  
 <210> 45  
 <211> 46  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <221> source  
 <222> 1..46  
 <223> /mol\_type="DNA"  
 /note="Cebador forward para amplificar el inserto de  
 MGBR2\_EX19-24-pSPL3b"  
 /organism="Artificial Sequence"  
  
 <400> 45  
 cacacactcg agcacacatc cggaatagca ttaagaactt gtagca 46  
  
 <210> 46  
 <211> 46  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <221> source  
 <222> 1..46  
 <223> /mol\_type="DNA"  
 /note="Cebador reverse para amplificar el inserto de  
 MGBR2\_EX19-24-pSPL3b"  
 /organism="Artificial Sequence"  
  
 <400> 46  
 cacacaggat cccacacagg taccaaatca gaggttcaaa gaggct 46  
  
 <210> 47  
 <211> 47



ES 2 470 440 A1

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <221> source  
 <222> 1..47  
 <223> /mol\_type="DNA"  
 /note="Cebador forward para amplificar el exón 25 del gen BRCA2"  
 /organism="Artificial Sequence"

<400> 47  
 gtaagcctct ttgaacctct gatttaatct gtactcctgt tagcaat 47

<210> 48  
 <211> 47  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <221> source  
 <222> 1..47  
 <223> /mol\_type="DNA"  
 /note="Cebador reverse para amplificar el exón 25 del gen BRCA2"  
 /organism="Artificial Sequence"

<400> 48  
 caaaagggaa caaaagctgg gtacctcagt gtctcttattc tgggatt 47

<210> 49  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <221> source  
 <222> 1..34  
 <223> /mol\_type="DNA"  
 /note="Cebador forward para amplificar el exón 26 del gen BRCA2"  
 /organism="Artificial Sequence"

<400> 49  
 cacacaggta ccagtaaata gagctaggac ttga 34

<210> 50  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <221> source  
 <222> 1..34  
 <223> /mol\_type="DNA"  
 /note="Cebador reverse para amplificar el exón 26 del gen BRCA2"  
 /organism="Artificial Sequence"

<400> 50  
 cacacaggta ccttgatttg catctactgt gatt 34

<210> 51  
 <211> 50  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <221> source  
 <222> 1..50  
 <223> /mol\_type="DNA"

ES 2 470 440 A1

```

    /note="Cebador forward para amplificar el exón 27 del gen BRCA2"
    /organism="Artificial Sequence"

<400> 51
ccagcttttg ttcccttttg tgagggtctt ccttcctttt catgtcattt          50

<210> 52
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..50
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador reverse para amplificar el exón 27 del gen BRCA2"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 52
atctgtctct gtctctctct ccaccttaat ttcttttctc attgtgcaac          50

<210> 53
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..34
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador forward para amplificar los exones 25 y 26 del gen
      BRCA2"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 53
cacacaggat cctatacctg cttccacatg acct          34

<210> 54
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..34
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador reverse para amplificar los exones 25 y 26 del gen
      BRCA2"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 54
cacacactcg aggccacata acaaccacat tttc          34

<210> 55
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..34
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador forward para amplificar el exon 10 del gen BRCA2"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 55
cacacactgc agacacaaaa acaaagccta ttga          34

```

ES 2 470 440 A1

<210> 56  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <221> source  
 <222> 1..34  
 <223> /mol\_type="DNA"  
       /note="Cebador reverse para amplificar el exon 10 del gen BRCA2"  
       /organism="Artificial Sequence"  
  
 <400> 56  
 cacacactcg agaagagtga tggatataca caaa 34  
  
 <210> 57  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <221> source  
 <222> 1..35  
 <223> /mol\_type="DNA"  
       /note="Cebador forward para amplificar los exones 4, 5, 6 y 7 del  
       gen BRCA2"  
       /organism="Artificial Sequence"  
  
 <400> 57  
 cacacagaat tctctggtac attggtaggt tttca 35  
  
 <210> 58  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <221> source  
 <222> 1..34  
 <223> /mol\_type="DNA"  
       /note="Cebador reverse para amplificar los exones 4, 5, 6 y 7 del  
       gen BRCA2"  
       /organism="Artificial Sequence"  
  
 <400> 58  
 cacacactcg agccaaatac tgcctcttaa acgc 34  
  
 <210> 59  
 <211> 58  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <221> source  
 <222> 1..58  
 <223> /mol\_type="DNA"  
       /note="Cebador forward para amplificar el exon 3 del gen BRCA2"  
       /organism="Artificial Sequence"  
  
 <400> 59  
 cacacagaat tccacacatc cggacacaca ttcgaagcca tcttgtaact tttgtgaa 58  
  
 <210> 60  
 <211> 34  
 <212> DNA

ES 2 470 440 A1

<213> Artificial Sequence

<220>  
 <221> source  
 <222> 1..34  
 <223> /mol\_type="DNA"  
 /note="Cebador reverse para amplificar el exon 3 del gen BRCA2"  
 /organism="Artificial Sequence"

<400> 60  
 cacacagaat tcttggcata agaaagacgt aatt 34

<210> 61  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <221> source  
 <222> 1..35  
 <223> /mol\_type="DNA"  
 /note="Cebador forward para amplificar el exon 8 del gen BRCA2"  
 /organism="Artificial Sequence"

<400> 61  
 cacacactcg aggtcataac ctcacagcat catct 35

<210> 62  
 <211> 46  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <221> source  
 <222> 1..46  
 <223> /mol\_type="DNA"  
 /note="Cebador reverse para amplificar el exon 8 del gen BRCA2"  
 /organism="Artificial Sequence"

<400> 62  
 cacacaggta cccacacaaa gcttcaactt taacagagag acagca 46

<210> 63  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <221> source  
 <222> 1..34  
 <223> /mol\_type="DNA"  
 /note="Cebador forward para amplificar el exon 9 del gen BRCA2"  
 /organism="Artificial Sequence"

<400> 63  
 cacacaaagc tttcctagtg gtgcaagatt tcat 34

<210> 64  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <221> source  
 <222> 1..34  
 <223> /mol\_type="DNA"  
 /note="Cebador reverse para amplificar el exon 9 del gen BRCA2"

ES 2 470 440 A1

```

    /organism="Artificial Sequence"
<400> 64
cacacaggta cctggtgccca attaaaaaga gtag
34

<210> 65
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..36
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador forward para amplificar el exon 2 del gen BRCA2"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 65
cacacacggc cggaaactaa atcgtatgaa aatcct
36

<210> 66
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..34
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador reverse para amplificar el exon 2 del gen BRCA2"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 66
cacacatccg gataagctac ataaacaaaa gcac
34

<210> 67
<211> 49
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..49
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador forward para amplificar los exones 17 y 18 del gen
      BRCA2"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 67
gctctagaac tagtggatcc cccggtcagt atgatacttt gatacatgt
49

<210> 68
<211> 46
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..46
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador reverse para amplificar los exones 17 y 18 del gen
      BRCA2"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 68
ataagcttga tatcgaattc ctgcagtgga atagggatct gatcaa
46

```

ES 2 470 440 A1

<210> 69  
 <211> 47  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <221> source  
 <222> 1..47  
 <223> /mol\_type="DNA"  
 /note="Cebador forward para amplificar el exon 16 del gen BRCA2"  
 /organism="Artificial Sequence"  
  
 <400> 69  
 gctctagaac tagtggatcc cccggccctt ttgtttccca tctaagt 47  
  
 <210> 70  
 <211> 46  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <221> source  
 <222> 1..46  
 <223> /mol\_type="DNA"  
 /note="Cebador reverse para amplificar el exon 16 del gen BRCA2"  
 /organism="Artificial Sequence"  
  
 <400> 70  
 gacatgtatc aaagtatcat actgaataaa tgcctaagaa aaatgt 46  
  
 <210> 71  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <221> source  
 <222> 1..34  
 <223> /mol\_type="DNA"  
 /note="Cebador forward para amplificar los exones 19 y 20 del gen  
 BRCA2"  
 /organism="Artificial Sequence"  
  
 <400> 71  
 cacacactcg agatagcatt aagaacttgt agca 34  
  
 <210> 72  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <221> source  
 <222> 1..34  
 <223> /mol\_type="DNA"  
 /note="Cebador reverse para amplificar los exones 19 y 20 del gen  
 BRCA2"  
 /organism="Artificial Sequence"  
  
 <400> 72  
 cacacaggta ccattacaaa tggcttagac ctga 34  
  
 <210> 73  
 <211> 50  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

ES 2 470 440 A1

```

<220>
<221> source
<222> 1..50
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador forward para deleción de la secuencia del MCS de
      pSAD v5.0 entre los insertos de los exones 18 y 19 del gen BRCA2"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 73
tgctttgatc agatccctat tccacatagc attaagaact tgtagcagta          50

<210> 74
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..50
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador reverse para deleción de la secuencia del MCS de
      pSAD v5.0 entre los insertos de los exones 18 y 19 del gen BRCA2"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 74
tactgctaca agttcttaat gctatgtgga atagggatct gatcaaagca          50

<210> 75
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..20
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador forward del exon constitutivo 1 del vector pSAD"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 75
tcacctggac aacctcaaag          20

<210> 76
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..20
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador reverse del exon constitutivo 2 del vector pSAD"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 76
tgaggagtga attggtcgaa          20

<210> 77
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..20
<223> /mol_type="DNA"

```

ES 2 470 440 A1

```

    /note="Cebador RT_SD6-FW"
    /organism="Artificial Sequence"

<400> 77
tctgagtcac ctggacaacc                                     20

<210> 78
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..21
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador RT_SA2-RV"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 78
atctcagtggt tatttgtgag c                                 21

<210> 79
<211> 4993
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..4993
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Secuencia general de los plásmidos pSAD v5.0 y pSAD v6.0"
      /organism="Artificial Sequence"

<220>
<221> misc_feature
<222> 679
<223> /note="n se selecciona independientemente entre t o c"

<220>
<221> misc_feature
<222> 685
<223> /note="n se selecciona independientemente entre g o a"

<400> 79
ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt      60
atgcaaagca tgcattctca ttagtcagca accagggtgtg gaaagtcccc aggctcccca      120
gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caacatagc cccgccccta      180
actccgcccc tcccgcccct aactccgccc agttccgccc attctccgcc ccatggctga      240
ctaatttttt ttatttatgc agaggccgag gccgcctcgg cctctgagct attccagaag      300
tagtgaggag gcttttttgg aggcctaggc ttttgcaaaa aacttgact gtgtttactt      360
gcaatcccc aaacagaca gaatggtgca tctgtccagt gaggagaagt ctgcggtcac      420
tgccctgtgg ggcaagggtga atgtggaaga agttggtggt gaggccctgg gcaggctgct      480
ggttgcttac ccatggacc agaggttctt cgagtccttt ggggacctgt cctctgcaaa      540
tgctgttatg aacaatccta aggtgaaggc tcatggcaag aagggtgctgg ctgccttcag      600
tgagggtctg agtcacctgg acaacctcaa aggcaccttt gctaagctga gtgaactgca      660
ctgtgacaag ctgcacgnc tagantcgac ccagcagtaa gtaatacatg taatgcaacc      720
tatacaata gcaatagtag cattagtagt agcaataata atagcaatag ttgtgtggtc      780

```



ES 2 470 440 A1

catagtaatc atagaatata ggaaaatatt aagacaaaga aaaatagaca ggttaattga 840  
 tagactaata gaaagagcag aagacagtgg caatgagagt gaaggagaaa tadcagcact 900  
 tgtggagatg ggggtggaga tggggcacca tgctccttgg gatgttgatg atctgtagtg 960  
 ctacagaaaa attgtgggtc acagtctatt atggggtagg gatcaccaga attgtaacgc 1020  
 ttacaatttc cattcgccat tcaggctgcg caactgttgg gaagggcgat cgggtcggggc 1080  
 ctcttcgcta ttacgccagc tggcgaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt 1140  
 aacgccaggg ttttcccagt cacgacgttg taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata 1200  
 cgactcacta tagggcgaat tggagctcca ccgcggtggc ggccgctcta gaactagtgg 1260  
 atccccggg ctgcaggaat tcgatatcaa gcttatcgat accgtcgacc tcgagggggg 1320  
 gcccgggtacc cagcttttgt tcccttttgt gagggttaat tgcgcgcttg gcgtaatcat 1380  
 ggtcatagct gtttcctgtg tgaaattgtt atccgctcac aattccacac aacatacgag 1440  
 ccggaagcat aaagtgtaaa gcctgggggtg cctaattgagt gagctaactc acattaattg 1500  
 cgttgcgctc actgcccgcc atatgatata gaggtacata atgtttgggc cacacatgcc 1560  
 ggtgtacca cagaccccaa cccacaagaa gtagtattgg taaatgtgac agaaaatfff 1620  
 aacatgtgga aaaatgacat ggtagaacag atgcatgagg atataatcag tttatgggat 1680  
 caaagcctaa agccatgtgt aggaaaaacta ctttgcacca ctgctgtgcc ttggaatgct 1740  
 agttggagta ataaatctct ggaacagatt tggaaatcaca cgacctggat ggagtgggac 1800  
 agagaaatta acaattacac aaacttaata cactccttaa ttgaagaatc gcaaaaccag 1860  
 caagaaaaga atgaacaaga attattggaa ttagataaat gggcaagttt gtggaattgg 1920  
 tttaacataa caaattggct gtggtatata aaattattca taatgatagt aggaggcttg 1980  
 gtaggtttaa gaatagtttt tgctgtactt tctgtagtga atagagttag gcagggatat 2040  
 tcaccatfff cttttcaggc ctggagatct cccgagggga cccgacaggc ccgaaggaat 2100  
 agaagaagaa ggtggagaga gagacagaga cagatccatt cgaccaattc actcctcagg 2160  
 tgcaggctgc ctatcagaag gtggtggctg gtgtggccaa tgccctggct cacaaatacc 2220  
 actgagatcc agacatgata agatacattg atgagtttgg acaaacaca actagaatgc 2280  
 agtgaaaaaa atgctttatt tgtgaaatff gtgatgctat tgctttatff gtaaccatta 2340  
 taagctgcaa taaacaagtt aacaacaaca attgcattca ttttatgtff caggttcagg 2400  
 gggaggtgtg ggaggtttff taaagcaagt aaaacctta caaatgtggt atggctgatt 2460  
 atgatcccca ggaagctcct ctgtgtcctc ataaacctta acctcctta cttgagagga 2520  
 cattccaatc ataggctgcc catccaccct ctgtgtcctc ctgttaatta ggtcacttaa 2580  
 caaaaaggaa attgggtagg ggtttttcac agaccgctff ctaagggtaa ttttaaaata 2640  
 tctgggaagt cccttccact gctgtgttcc agaagtgttg gtaaacagcc cacaaatgct 2700  
 aacagcagaa acatacaagc tgtcagctff gcacaagggc ccaacaccct gctcatcaag 2760  
 aagcactgtg gttgctgtgt tagtaatgtg caaacagga ggcacatfff cccacctgt 2820  
 gtaggttcca aaatatctag tgttttcatt tttacttggg tcaggaacct agcactccac 2880

ES 2 470 440 A1

tggataagca ttatccttat ccaaaacagc cttgtgggtca gtgttcatct gctgactgtc 2940  
 aactgtagca ttttttgggg ttacagtttg agcaggatat ttggcctgt agtttgctaa 3000  
 cacaccccag gtggcacttt tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc 3060  
 taaatacatt caaatatgta tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa 3120  
 tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa catttccgtg tcgcccttat tccctttttt 3180  
 gcggcatttt gccttcctgt ttttgctcac ccagaaacgc tggtgaaagt aaaagatgct 3240  
 gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg atctcaacag cggtaaagatc 3300  
 cttgagagtt ttcgccccga agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta 3360  
 tgtggcgcgg tattatcccg tattgacgcc gggcaagagc aactcggtcg ccgcatacac 3420  
 tattctcaga atgacttggg tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc 3480  
 atgacagtaa gagaattatg cagtgtctgc ataaccatga gtgataacac tgcggccaac 3540  
 ttacttctga caacgatcgg aggaccgaat gagctaaccg cttttttgca caacatgggg 3600  
 gatcatgtaa ctgccttga tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat accaaacgac 3660  
 gagcgtgaca ccacgatgcc tgtagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaact attaactggc 3720  
 gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt 3780  
 gcaggaccac ttctgcgctc ggcccttccg gctggctggg ttattgctga taaatctgga 3840  
 gccggtgagc gtgggtctcg cggtatcatt gcagactgg gccagatgg taagccctcc 3900  
 cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt caggcaacta tggatgaacg aaatagacag 3960  
 atcgctgaga taggtgcctc actgattaag cattggtaac tgtcagacca agtttactca 4020  
 tatatacttt agattgattt aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc 4080  
 ctttttgata atctcatgac caaaatcctt aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag 4140  
 accccgtaga aaagatcaaaa ggatcttctt gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct 4200  
 gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag cggtgggttg tttgccgat caagagctac 4260  
 caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca gataccaaat actgttcttc 4320  
 tagttagacc gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg 4380  
 ctctgcta at cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt 4440  
 tggactcaag acgatagtta ccggataagg cgagcggtc gggctgaacg gggggttcgt 4500  
 gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc 4560  
 tatgagaaaag cgccacgctt cccgaagggg gaaaggcggg caggtatccg gtaagcggca 4620  
 gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata 4680  
 gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg 4740  
 ggcgagcct atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttctg gccttttgct 4800  
 ggctttttgc tcacatgttc tttcctgcgt tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta 4860  
 ccgcctttga gtgagctgat accgctcgc gcagccgaac gaccgagcgc agcagatcag 4920  
 tgagcgagga agcgggaagag cgccaatac gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga 4980  
 ttcattaatg cag 4993

ES 2 470 440 A1

```

<210> 80
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..19
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador forward 2 del exon constitutivo 1 del vector pSAD"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 80
tgctaagctg agtgaactg                                     19

<210> 81
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..19
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador reverse 2 del exon constitutivo 2 del vector pSAD"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 81
ggagtgaatt ggtcgaatg                                     19

<210> 82
<211> 9493
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..9493
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Plásmido pSPL3b clonado con exones 21, 22, 23 y 24 y
      secuencias flanqueantes de los intrones 20, 21, 22, 23 y 24 del
      gen BRCA2 de Homo sapiens"
      /organism="Artificial Sequence"

<220>
<221> misc_feature
<222> 1..9493
<223> /note="Minigen pSPL3b-MGBR2_EX21-24"

<220>
<221> misc_feature
<222> join(1..1026,4739..9493)
<223> /note="Plásmido pSPL3b"

<220>
<221> misc_feature
<222> 1027..4738
<223> /note="Exones 21, 22, 23 y 24 y secuencias flanqueantes de los
      intrones 20, 21, 22, 23 y 24 del gen BRCA2"

<400> 82
ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt      60
atgcaaagca tgcattctcaa ttagtcagca accaggtgtg gaaagtcccc aggctcccca      120
gcaggcagaa gtagtcaaag catgcatctc aattagtcag caacatagtc cccgccctca      180

```

ES 2 470 440 A1

actccgcca tcccgccct aactccgcc agttccgcc attctccgcc ccatggctga 240  
 ctaatTTTTT ttatttatgc agaggccgag gccgcctcgg cctctgagct attccagaag 300  
 tagtgaggag gctTTTTTgg aggcctaggc ttttgcaaaa agcttggact gtgtttactt 360  
 gcaatcccc aaaacagaca gaatggtgca tctgtccagt gaggagaagt ctgcggtcac 420  
 tgcctgtgg ggcaaggta atgtggaaga agttggtggt gaggccctgg gcaggctgct 480  
 ggttgcttac ccatggacc agaggttctt cgagtccttt ggggacctgt cctctgcaaa 540  
 tgctgttatg aacaatccta aggtgaaggc tcatggcaag aagggtgctgg ctgccttcag 600  
 tgagggtctg agtcacctgg acaacctcaa aggcaccttt gctaagctga gtgaactgca 660  
 ctgtgacaag ctgcacgctc tagagtcgac ccagcagtaa gtaatacatg taatgcaacc 720  
 tatacaaata gcaatagtag cattagtagt agcaataata atagcaatag ttgtgtggtc 780  
 catagtaatc atagaatata ggaaaatatt aagacaaaga aaaatagaca ggttaattga 840  
 tagactaata gaaagagcag aagacagtgg caatgagagt gaaggagaaa tadcagcact 900  
 tgtggagatg ggggtggaga tggggcacca tgctccttgg gatgttgatg atctgtagtg 960  
 ctacagaaaa attgtgggtc acagtctatt atggggtagc ggatcaccag aattctggag 1020  
 ctcgagcctt ctttgggtgt tttatgcttg gttctttagt tttagttgct tttgaattta 1080  
 cagtttagtg aattaataat cttttgttt tcttagaaaa cacaacaaaa ccatatttac 1140  
 catcacgtgc actaacaaga cagcaagttc gtgctttgca agatggtgca gagctttatg 1200  
 aagcagtgaa gaatgcagca gaccagctt acctgaggt gagagagtaa gaggacatat 1260  
 aatgaggctt gatgattatt caagggtgaga agctgtttta gactctctgg ccatcacagg 1320  
 aaggagtatg ttgaaatgct gcatttctca aaagggatgt gtacatttct gggattttca 1380  
 gtgatgtgcc agacgagtgt ggtggtatgt tttcaactat ataccgagta gaggatggga 1440  
 gggttctaga attttatata ttaattaaat ttggtttaaa atgcaggcaa aacttgtttt 1500  
 atttttgtcc ctctgtact ctgaagcaaa aaaacttttt ttttttaag ataaaacaaa 1560  
 tatcttcaaa gtaatggctt agtttccatg ttcttagctg tttctcaagt ccttctgga 1620  
 gtgtacttga taatcctcta ccctaagggg acttgggtag aaatgtttcc gaagcactaa 1680  
 actgttagaa gtagcatagg ctttagaatc gtggcactct cattttatta gcaaagtaaa 1740  
 tgacaataaa atagctggcc aggcgcggtg gtcacgcct ataatcccag cactttggga 1800  
 gaccgaggca gaaggatcac ctgaggtcgg gagttcgtga ccagcctggc caacgtggtg 1860  
 aaaccccgtc cctattaaaaa atacaaaatt agccaggcgt ggtgcacatg cctgtaatcc 1920  
 cagctgttcg ggaggctcag gcaggagaat cgcttgaatc caggaggcag aggttgagct 1980  
 gagccaaggt catgccattg cactccagcc taggcaaaa gagcaaaact cgtctcaaa 2040  
 aaaaaaaaaa aaagctatta aatgggcgta aaatgttgtt ttaggatcaa ataaataatc 2100  
 tatataaaag ttccatataa atgttagtta ctattattag aacataatTTT tatatattaa 2160  
 actacctcct aaatTTTTtag acaggtagat agctaaaaaa aaattcaaat tctaagatta 2220  
 gtttgttagg gaggaaggag caaatTTTTT accaaaacta cttgttttta attgattaat 2280  
 ttcattcact tgatgactta gtaaactctg tgaatatagc cttaaatttc ttaaatagtg 2340

ES 2 470 440 A1

ggactacaaa ataaacaata tttcatcagt aatgtaagca gtgctatact gagtagaatt 2400  
 ccctcctggt ccgaaatggt acaatttggg ttctccctgt gagaagtgag tccggtttta 2460  
 aaacctgtga gtatacttgc tgcaggctctg aaaatgaagg ctttatgatt ctttcttgaa 2520  
 aaattatttg cctctatcct ttataatatt atttgttgaa gcttgtgcat tctatgaatc 2580  
 atcatgaaga tagctttaat ttcatccaca aaatttaaca atatTTTTTT gtctggacat 2640  
 aagggggcag aataagagtt ggagtagggc cttgcccagc cactctgtaa ctggacaagt 2700  
 gatgtattta tttcttagga cctcatttcc accttctatc aagggaaaac ctaagagtag 2760  
 gttatcttta gggttctaag tgcctatgag tctatgagat ttgactttat taaagttatc 2820  
 tttgtaattc tttgaggaga acgtaggcat ccatttttaa aacagtcctg ttagaatttg 2880  
 ttttcagtaa caatgttgaa tgatggcctt ttgaaatcag gttttacaac aaaattgttt 2940  
 aaactgccc tgcataattta gaatctctat acctatatta agatacagag attggatagt 3000  
 ctcccttttc agtatagata atctcccttc ccggtagaga ttaggatatt aagatgtata 3060  
 atatcctaaa gtgtagcagc agtctgggat gttacatgtc taaattccat ttcctatttt 3120  
 atttgtttat tgatttatct gtttatTTTT gttacactgg gtaagattcc caagaggtag 3180  
 aagtagaaat ttgctaaagt gagtaggaca gaagtgtaga ggcaaacata aaagtatggt 3240  
 tagtacatat ctgtttttaa ttgtatctac ttttcaaag ttaatggaat tatactcctg 3300  
 gggctaagaa tgaggggttct agggccaacc tctactacct atgtggcttg tgcaaattag 3360  
 ttgtcccctt tgtgcctcag ttttacctac aacacagaaa caatgatatt acctaccca 3420  
 tggactgttg tgaagattaa atgaattagt acatttacta cacatagatc ttttctcaa 3480  
 aataatgagc attcagatat tagccatctg taatgtagtt ggtgatgatt atgattatta 3540  
 gagtacattt ataattggag gatcattttt gccgtaggga aatagaatta ttaatagttt 3600  
 gaggcacctg agaatattat gtgagaaact gattacatta accacacct taagatgagc 3660  
 tctaattttg ttgtatttgt cctgttttaa gccatctagt tacaatagat ggaacttttt 3720  
 tgttctgatt gctttttatt ccaatatcct aaatggtcac agggttattt cagtgaagag 3780  
 cagttaagag ccttgaataa tcacaggcaa atgttgaatg ataagaaaca agctcagatc 3840  
 cagttggaaa ttaggaaggc catggaatct gctgaacaaa aggaacaagg tttatcaagg 3900  
 gatgtcaciaa ccgtgtggaa gttgctgatt gtaagctatt caaaaaaaga aaaagattca 3960  
 ggtaagtatg taaatgcttt gtttttatca gttttattaa cttaaaaaat gaccttacta 4020  
 acaaaatgat tataaatcca gataaagtat aaagttagtt tatatcagag aagcaaaatc 4080  
 cactactaat gccacaaaag agataatata aaagaggatc tgtattttatt ttgaaacaaa 4140  
 catttaaatg ataatcactt cttccattgc atctttctca tctttctcca aacagttata 4200  
 ctgagtattt ggcgtccatc atcagattta tattctctgt taacagaagg aaagagatac 4260  
 agaatttatc atcttgcaac ttcaaaatct aaaagtaa atctgaaagagc taacatacag 4320  
 ttagcagcga caaaaaaac tcagtatcaa caactaccgg tacaacctt tcattgtaat 4380  
 ttttcagttt tgataagtgc ttgttagttt atggaatctc catatgttga atttttgttt 4440

ES 2 470 440 A1

tgttttctgt aggtttcaga tgaaatttta tttcagattt accagccacg ggagcccctt 4500  
 cacttcagca aatttttaga tccagacttt cagccatctt gttctgaggt ggacctaata 4560  
 ggatttgctg tttctgttgt gaaaaaaaca ggtaatgcac aatatagtta atttttttta 4620  
 ttgattcttt taaaaaacat tgtcttttaa aatctcttat gattagttgg agctaccagt 4680  
 tggcaaattt gctagctaac tagtgatctg aaagtaagcc tctttgaacc tctgatttgg 4740  
 atcccagata tctggtgatc ccgtacctgt gtggaaggaa gcaaccacca ctctattttg 4800  
 tgcatacagat gctaaagcat atgatacaga ggtacataat gtttgggcca cacatgccgg 4860  
 tgtacccaca gaccccaacc cacaagaagt agtattggta aatgtgacag aaaattttta 4920  
 catgtggaaa aatgacatgg tagaacagat gcatgaggat ataatcagtt tatgggatca 4980  
 aagcctaaag ccatgtgtaa aattaacccc accctgtcca aaggatcct ttgagccaat 5040  
 tcccatacat tattgtgccc cggctgggtt tgcgattcta aaatgtaata ataagacgtt 5100  
 caatggaaca ggaccatgta caaatgtcag cacagtacaa tgtacacatg gaattaggcc 5160  
 agtagtatca actcaactgc tgttaaattg cagtctagca gaagaagagg tagtaattag 5220  
 atctgtcaat ttcacggaca atgctaaaac cataatagta cagctgaaca catctgtaga 5280  
 aattaattgt acaagaccca acaacaatac aagaaaaaaaa atccgtatcc agaggggacc 5340  
 agggagagca tttgttacia taggaaaaat aggaaatatg agacaagcac attgtaacat 5400  
 tagtagagca aaatggaatg ccactttaa acagatagct agcaaattaa gagaacaatt 5460  
 tggaaataat aaaacaataa tctttaagca atcctcagga ggggaccag aaattgtaac 5520  
 gcacagtttt aattgtggag ggaattttt ctactgtaat tcaacacaac tgtttaatag 5580  
 tacttggttt aatagtactt ggagtactga agggtaaat aacactgaag gaagtgacac 5640  
 aatcacactc ccatgcagaa taaaacaatt tataaacatg tggcaggaag taggaaaagc 5700  
 aatgtatgcc cctcccatca gcggacaaat tagatgttca tcaaatatta cagggctgct 5760  
 attaacaaga gatggtggta ataacaaca tgggtccgag atcttcagac ctggaggagg 5820  
 agatatgagg gacaattgga gaagtgaatt atataaatat aaagtagtaa aaattgaacc 5880  
 attaggagta gcaccacca aggcaaagag aagagtgggtg cagagagaaa aaagagcagt 5940  
 gggaaatagga gctttgttcc ttgggttctt gggagcagca ggaagcacta tgggcgagc 6000  
 gtcaatgacg ctgacggtac aggccagaca attattgtct ggtatagtgc agcagcagaa 6060  
 caatttgctg agggctattg aggcgcaaca gcatctgttg caactcacag tctggggcat 6120  
 caagcagctc caggcaagaa tcctggctgt ggaaagatac ctaaaggatc aacagctcct 6180  
 ggggatttgg ggttgctctg gaaaactact ttgcaccact gctgtgcctt ggaatgctag 6240  
 ttggagtaat aaatctctgg aacagatttg gaatcacacg acgtggatgg agtgggacag 6300  
 agaaattaac aattacacaa gcttaataca ctcttaatt gaagaatcg aaaaccagca 6360  
 agaaaagaat gaacaagaat tattggaatt agataaatgg gcaagtttgt ggaattgggt 6420  
 taacataaca aattggctgt ggtatataaa attattcata atgatagtag gaggcttgggt 6480  
 aggtttaaga atagtttttg ctgtactttc tgtagtgaat agagttaggc agggatattc 6540  
 accattatcg tttcagacct ggagatctcc cgaggggacc cgacaggccc gaaggaatag 6600

ES 2 470 440 A1

aagaagaagg tggagagaga gacagagaca gatccatttc gaccaattca ctcctcaggt 6660  
gcaggctgcc tatcagaagg tgggtggctgg tgtggccaat gccctggctc acaaatacca 6720  
ctgagatcca gacatgataa gatacattga tgagtttggg caaaccacaa ctagaatgca 6780  
gtgaaaaaaaa tgctttattt gtgaaatttg tgatgctatt gctttatttg taaccattat 6840  
aagctgcaat aaacaagtta acaacaacaa ttgcattcat tttatgtttc aggttcaggg 6900  
ggaggtgtgg gaggtttttt aaagcaagta aaacctctac aaatgtggta tggctgatta 6960  
tgatccccag gaagctcctc tgtgtcctca taaaccctaa cctcctctac ttgagaggac 7020  
attccaatca taggctgcc atccaccctc tgtgtcctcc tgtaattag gtcacttaac 7080  
aaaaaggaaa ttgggtaggg gtttttcaca gaccgctttc taagggtaat tttaaaatat 7140  
ctgggaagtc ctttccactg ctgtgttcca gaagtgttg taaacagccc acaaatgtca 7200  
acagcagaaa catacaagct gtcagcttg cacaagggcc caacaccctg ctcataaga 7260  
agcactgtgg ttgctgtgtt agtaatgtgc aaaacaggag gcacattttc cccacctgtg 7320  
taggttccaa aatatctagt gttttcattt ttacttggat caggaacca gcactccact 7380  
ggataagcat tatccttatc caaacagcc ttgtggtcag tgttcatctg ctgactgtca 7440  
actgtagcat tttttggggg tacagtttga gcaggatatt tggctctgta gtttgctaac 7500  
acaccccagg tggcactttt cggggaaatg tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct 7560  
aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg cttcaataat 7620  
attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt cgcccttatt cccttttttg 7680  
cggcattttg ccttcctgtt tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg 7740  
aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc 7800  
ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag cacttttaaa gttctgctat 7860  
gtggcgcggg attatcccgt attgacgccg ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact 7920  
attctcagaa tgacttggtt gagtactcac cagtcacaga aaagcatctt acggatggca 7980  
tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca taacatgag tgataacact gcggccaact 8040  
tacttctgac aacgatcggg ggaccgaagg agctaaccgc ttttttgac aacatggggg 8100  
atcatgtaac tcgccttgat cgttggggaa cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg 8160  
agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg caacaacggt gcgcaacta ttaactggcg 8220  
aactacttac tctagcttcc cggcaacaat taatagactg gatggaggcg gataaagttg 8280  
caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg ctggctgggt tattgctgat aaatctggag 8340  
ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg cagcactggg gccagatggt aagccctccc 8400  
gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc aggcaactat ggatgaacga aatagacaga 8460  
tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc attggttaact gtcagaccaa gtttactcat 8520  
atatacttta gattgattta aaacttcatt ttttaattta aaggatctag gtgaagatcc 8580  
tttttgataa tctcatgacc aaaatcctta acggtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag 8640  
accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct 8700

ES 2 470 440 A1

gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag cggtggtttg tttgccgat caagagctac 8760  
 caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca gataccaaat actgtccttc 8820  
 tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg 8880  
 ctctgcta at cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt 8940  
 tggactcaag acgatagtta ccggataagg cgcagcggc gggctgaacg gggggttcgt 9000  
 gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgcgagc 9060  
 attgagaaag cgccacgctt cccgaagga gaaaggcga caggtatccg gtaagcggca 9120  
 gggctcggaa aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata 9180  
 gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg 9240  
 ggcgagcct atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttctg gccttttgct 9300  
 ggctttttgc tcacatgttc tttcctgcgt tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta 9360  
 ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag 9420  
 tgagcgagga agcggaaagag cgccaatac gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga 9480  
 ttcattaatg cag 9493

<210> 83  
 <211> 7493  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <221> source  
 <222> 1..7493  
 <223> /mol\_type="DNA"  
 /note="Minigen pSPL3b-MGBR2\_EX21-24 con delección de 2000 pb en la  
 secuencia flanqueante del intrón 20 del gen BRCA2"  
 /organism="Artificial Sequence"

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 1..7493  
 <223> /note="Minigen pSPL3b-MGBR2\_EX21-24de12000"

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> join(1..1026,2739..7493)  
 <223> /note="Plásmido pSPL3b"

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 1027..2738  
 <223> /note="Exones 21, 22, 23 y 24 y secuencias flanqueantes de los  
 intrones 20, 21, 22, 23 y 24 del gen BRCA2"

<400> 83  
 ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt 60  
 atgcaaagca tgcattctcaa ttagtcagca accaggtgtg gaaagtcccc aggctcccca 120  
 gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caacatagc cccgcccta 180  
 actccgcca tcccgccct aactccgcc agttccgcc attctccgcc ccatggctga 240  
 ctaatTTTTT ttatttatgc agaggccgag gccgcctcgg cctctgagct attccagaag 300  
 tagtgaggag gctTTTTTgg aggcctaggc ttttgcaaaa agcttgact gtgtttactt 360



ES 2 470 440 A1

gcaatccccc aaaacagaca gaatggtgca tctgtccagt gaggagaagt ctgcggtcac 420  
tgccctgtgg ggcaaggatga atgtggaaga agttggtggt gaggccctgg gcaggctgct 480  
ggttgctctac ccatggaccc agaggttcctt cgagtccttt ggggacctgt cctctgcaaa 540  
tgctgttatg aacaatccta aggtgaaggc tcatggcaag aagggtgctgg ctgccttcag 600  
tgagggctctg agtcacctgg acaacctcaa aggcaccttt gctaagctga gtgaactgca 660  
ctgtgacaag ctgcacgctc tagagtcgac ccagcagtaa gtaatacatg taatgcaacc 720  
tatacaaata gcaatagtag cattagtagt agcaataata atagcaatag ttgtgtggtc 780  
catagtaatc atagaatata ggaaaatatt aagacaaaga aaaatagaca ggttaattga 840  
tagactaata gaaagagcag aagacagtgg caatgagagt gaaggagaaa tatcagcact 900  
tgtggagatg ggggtggaga tggggcacca tgctccttgg gatgttgatg atctgtagtg 960  
ctacagaaaa attgtgggtc acagtctatt atggggtagc ggatcaccag aattctggag 1020  
ctcagacctt ctttgggtgt tttatgcttg gttctttagt tttagttgct tttgaattta 1080  
cagtttagtg aattaataat cttttgttt tcttagaaaa cacaacaaaa ccatatttac 1140  
catcacgtgc actaacaaga cagcaagttc gtgctttgca agatggtgca gagctttatg 1200  
aagcagtgaa gaatgcagca gaccagctt accttgaggt gagagagtaa gaggacatat 1260  
aatgaggctt gatgattatt caagggtgaga agctgtttta gactctctgg ccatcacagg 1320  
aaggagtatg ttgaaatgct gcatttctca aaagggatgt gtacatttct gggattttca 1380  
gtgatgtgcc agacgagtgt ggtggtatgt tttcaactat ataccgagta gaggatggga 1440  
gggttctaga attttatata ttaattaaat ttggtttaaa atgcaggcaa aacttgtttt 1500  
tagccatctg taatgtagtt ggtgatgatt atgattatta gagtacattt ataattggag 1560  
gatcattttt gccgtaggga aatagaatta ttaatagttt gaggcacctg agaatattat 1620  
gtgagaaaact gattacatta accacaccct taagatgagc tctaattttg ttgtatttgt 1680  
cctgtttaaa gccatctagt tacaatagat ggaacttttt tgttctgatt gctttttatt 1740  
ccaatatctt aaatggtcac agggttattt cagtgaagag cagttaagag cttgaataa 1800  
tcacaggcaa atgttgaatg ataagaaaca agctcagatc cagttggaaa ttaggaaggc 1860  
catggaatct gctgaacaaa aggaacaagg tttatcaagg gatgtcacia ccgtgtggaa 1920  
gttgcgatatt gtaagctatt caaaaaaaga aaaagattca ggtaagtatg taaatgcttt 1980  
gtttttatca gttttattaa cttaaaaaat gaccttacta acaaaatgat tataaatcca 2040  
gataaagtat aaagttagtt tatatcagag aagcaaaatc cactactaat gccacaaaag 2100  
agataatata aaagaggatc tgtatttatt ttgaaacaaa catttaaagtg ataatcactt 2160  
cttccattgc atctttctca tctttctcca aacagttata ctgagtattt ggcgtccatc 2220  
atcagattta tattctctgt taacagaagg aaagagatac agaatttatc atcttgcaac 2280  
ttcaaaatct aaaagtaaat ctgaaagagc taacatacag ttagcagcga caaaaaaac 2340  
tcagtatcaa caactaccgg tacaaacctt tcattgtaat ttttcagttt tgataagtgc 2400  
ttgttagttt atggaatctc catatgttga atttttgttt tgttttctgt aggtttcaga 2460  
tgaaatttta tttcagattt accagccacg ggagccccctt cacttcagca aattttttaga 2520

ES 2 470 440 A1

tccagacttt cagccatcct gttctgaggt ggacctaata ggatttgtcg tttctgttgt 2580  
gaaaaaaca ggtaatgcac aatatagtta attttttta ttgattcttt taaaaaacat 2640  
tgtcttttaa aatctcttat gattagttgg agctaccagt tggcaaattt gctagctaac 2700  
tagtgatctg aaagtaagcc tctttgaacc tctgatttgg atcccagata tctgggtgatc 2760  
ccgtacctgt gtggaaggaa gcaaccacca ctctattttg tgcatacagat gctaaagcat 2820  
atgatacaga ggtacataat gtttgggcca cacatgccgg tgtaccaca gacccaacc 2880  
cacaagaagt agtattggta aatgtgacag aaaatttta catgtggaaa aatgacatgg 2940  
tagaacagat gcatgaggat ataatcagtt tatgggatca aagcctaaag ccatgtgtaa 3000  
aattaacccc accctgtcca aaggatcct ttgagccaat tcccatacat tattgtgcc 3060  
cggctggttt tgcgattcta aatgtaata ataagacgtt caatggaaca ggaccatgta 3120  
caaatgtcag cacagtacaa tgtacacatg gaattaggcc agtagtatca actcaactgc 3180  
tgtaaagtgg cagtctagca gaagaagagg tagtaattag atctgtcaat ttcacggaca 3240  
atgctaaaac cataatagta cagctgaaca catctgtaga aattaattgt acaagacca 3300  
acaacaatac aagaaaaaaa atccgtatcc agaggggacc aggagagca tttgttaca 3360  
taggaaaaat aggaaatatg agacaagcac attgtaacat tagtagagca aatggaatg 3420  
ccactttaa acagatagct agcaaattaa gagaacaatt tggaaataat aaaacaata 3480  
tctttaagca atcctcagga ggggaccag aattgtaac gcacagtttt aattgtggag 3540  
gggaattttt ctactgtaat tcaacacaac tgtttaatag tacttggttt aatagtactt 3600  
ggagtactga agggatcaat aacactgaag gaagtgacac aatcacactc ccatgcagaa 3660  
taaaacaatt tataaacatg tggcaggaag taggaaaagc aatgtatgcc cctcccatca 3720  
gcggaacaat tagatgttca tcaaatatta cagggtgct attaacaaga gatggtggta 3780  
ataacaaca tgggtccgag atcttcagac ctggaggagg agatatgagg gacaattgga 3840  
gaagtgaatt atataaatat aaagtagtaa aattgtaacc attaggagta gcaccacca 3900  
aggcaaagag aagagtgggtg cagagagaaa aaagagcagt gggaaatagga gctttgttcc 3960  
ttgggttctt gggagcagca ggaagcacta tgggagcagc gtcaatgacg ctgacggtac 4020  
aggccagaca attattgtct ggtatagtgc agcagcagaa caatttgctg agggctattg 4080  
aggcgcaaca gcatctgttg caactcacag tctggggcat caagcagctc caggcaagaa 4140  
tcctggctgt ggaaagatac ctaaaggatc aacagctcct ggggatttgg ggttgctctg 4200  
gaaaactact ttgcaccact gctgtgcctt ggaatgctag ttggagtaat aatctctgg 4260  
aacagatttg gaatcacacg acgtggatgg agtgggacag agaaattaac aattacaca 4320  
gcttaataca ctccttaatt gaagaatcgc aaaaccagca agaaaagaat gaacaagaat 4380  
tattggaatt agataaatgg gcaagtttgt ggaattggtt taacataaca aattggctgt 4440  
ggtatataaa attattcata atgatagtag gaggcttggg aggtttaaga atagtttttg 4500  
ctgtactttc tgtagtgaat agagttaggc agggatattc accattatcg tttcagacct 4560  
ggagatctcc cgaggggacc cgacaggccc gaaggaatag aagaagaagg tggagagaga 4620

ES 2 470 440 A1

gacagagaca gatccatttc gaccaattca ctctcaggt gcaggctgcc tatcagaagg 4680  
tggtggctgg tgtggccaat gccctggctc acaaatacca ctgagatcca gacatgataa 4740  
gatacattga tgagtttggg caaaccacaa ctagaatgca gtgaaaaaaa tgctttatnt 4800  
gtgaaatttg tgatgctatt gctttatntg taaccattat aagctgcaat aaacaagtta 4860  
acaacaacaa ttgcattcat tttatgtttc aggttcaggg ggaggtgtgg gaggtttttt 4920  
aaagcaagta aaacctctac aaatgtggta tggctgatta tgatccccag gaagctcctc 4980  
tgtgtcctca taaaccctaa cctcctctac ttgagaggac attccaatca taggctgccc 5040  
atccaccctc tgtgtcctcc tgtaattag gtcacttaac aaaaaggaaa ttgggtaggg 5100  
gtttttcaca gaccgctttc taagggtaat tttaaaatat ctgggaagtc ccttccactg 5160  
ctgtgttcca gaagtgttg taaacagccc acaaatgtca acagcagaaa catacaagct 5220  
gtcagctttg cacaagggcc caacaccctg ctcatcaaga agcactgtgg ttgctgtggt 5280  
agtaatgtgc aaaacaggag gcacattttc cccacctgtg taggttcaa aatatctagt 5340  
gttttcattt ttacttggat caggaacca gcactccact ggataagcat ttccttatc 5400  
caaaacagcc ttgtggtcag tgttcatctg ctgactgtca actgtagcat tttttggggt 5460  
tacagtttga gcaggatatt tggcctgta gtttgctaac acaccccagg tggcactttt 5520  
cggggaaatg tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct aaatacattc aaatatgtat 5580  
ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg 5640  
agtattcaac atttccgtgt cgcccttatt cccttttttg cggcattttg ccttctgtt 5700  
tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga 5760  
gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa 5820  
gaacgttttc caatgatgag cacttttaaa gttctgctat gtggcgcggt attatcccgt 5880  
attgacgccg ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttggtt 5940  
gagtactcac cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc 6000  
agtgctgcca taaccatgag tgataacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga 6060  
ggaccgaagg agctaaccgc ttttttgcac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat 6120  
cgttgggaac cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct 6180  
gtagcaatgg caacaacgtt gcgcaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc 6240  
cggcaacaat taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg 6300  
gcccttccgg ctggctggtt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc 6360  
ggtatcattg cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg 6420  
acggggagtc aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca 6480  
ctgattaagc attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta 6540  
aaacttcatt tttaatntaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc 6600  
aaaatcctta acggtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa 6660  
ggatcttctt gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca 6720  
ccgctaccag cggtggtttg tttgccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta 6780

ES 2 470 440 A1

actggcttca gcagagcgca gataccaaat actgtccttc tagtgtagcc gtagttaggc 6840  
caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaata cctgtttacca 6900  
gtggctgctg ccagtggcga taagtctgtt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta 6960  
ccggataagg cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttggag 7020  
cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgcgagc attgagaaag cgccacgctt 7080  
cccgaagggg gaaagggcga caggatatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc 7140  
acgaggggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtctgtcgg gtttcgccac 7200  
ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac 7260  
gccagcaacg cggccttttt acggttcctg gccttttgct ggccttttgc tcacatgttc 7320  
tttcctgcgt tatccccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat 7380  
accgctcgcc gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga agcgggaagag 7440  
cgccaatac gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga ttcattaatg cag 7493

<210> 84  
<211> 8646  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<221> source  
<222> 1..8646  
<223> /mol\_type="DNA"  
/note="Plásmido pSPL3b clonado con exones 19, 20, 21, 22, 23 y 24  
y secuencias flanqueantes de los intrones 18, 19, 20, 21, 22, 23  
y 24 del gen BRCA2 de Homo sapiens"  
/organism="Artificial Sequence"

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> 1..8646  
<223> /note="Minigen pSPL3b-MGBR2\_EX19-24"

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> join(1..1026,3892..8646)  
<223> /note="Plásmido pSPL3b"

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> 1026..3891  
<223> /note="Exones 19, 20, 21, 22, 23 y 24 y secuencias flanqueantes  
de los intrones 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 24 del gen BRCA2"

<400> 84  
ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt 60  
atgcaaagca tgcattctca ttagtcagca accaggtgtg gaaagtcccc aggctcccca 120  
gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caacatagt cccgccctta 180  
actccgcccc tcccgcccct aactccgcc agttccgcc attctccgcc ccatggctga 240  
ctaatttttt ttatttatgc agaggccgag gccgcctcgg cctctgagct attccagaag 300  
tagtgaggag gcttttttgg aggcctaggc ttttgcaaaa agcttggact gtgtttactt 360  
gcaatcccc aaacagaca gaatggtgca tctgtccagt gaggagaagt ctgcggtcac 420

ES 2 470 440 A1

tgccctgtgg ggcaagggtga atgtggaaga agttgggtgg gaggccctgg gcaggctgct 480  
 ggttgtctac ccatggaccc agaggttcct cgagtccttt ggggacctgt cctctgcaaa 540  
 tgctgttatg aacaatccta aggtgaaggc tcatggcaag aagggtgctgg ctgccttcag 600  
 tgaggggtctg agtcacctgg acaacctcaa aggcaccttt gctaagctga gtgaactgca 660  
 ctgtgacaag ctgcacgctc tagagtcgac ccagcagtaa gtaatacatg taatgcaacc 720  
 tatacaaata gcaatagtag cattagtagt agcaataata atagcaatag ttgtgtggtc 780  
 catagtaatc atagaatata ggaaaatatt aagacaaaga aaaatagaca ggttaattga 840  
 tagactaata gaaagagcag aagacagtgg caatgagagt gaaggagaaa tadcagcact 900  
 tgtggagatg ggggtggaga tggggcacca tgctccttgg gatgttgatg atctgtagtg 960  
 ctacagaaaa attgtgggtc acagtctatt atggggtacg ggatcaccag aattctggag 1020  
 ctcgagcaca catccggaat agcattaaga acttgtagca gtataaaca tatgtttgag 1080  
 aagtactata ttgtgaaaat attttcactt ttatacagtt ttttacttat ttactgtcct 1140  
 actaatcttc ctaagacttt ttaaagtga tatttttaag gcagttctag aagaatgaaa 1200  
 actcttatga tatctgtaat agaattgaat acatatttaa ctactaaatc aatatattta 1260  
 ttaatttgtc cagatttctg ctaacagtac tcggcctgct cgctgggtata ccaaacttgg 1320  
 attctttcct gaccctagac cttttcctct gcccttatca tcgcttttca gtgatggagg 1380  
 aatgtttggg tgtgttgatg taattattca aagagcatac cctatacagg tatgatgat 1440  
 tcttgaaact taccatata tttttcttt tgatacaatt aatttgtttg tttgtttgag 1500  
 atggagtttc ggtctcttgc ccaggctgga gtgcaatggc gtgatcttgg ttcactgcag 1560  
 cctccacctc ccgggttcaa gtgattctcc tgcctcagcc tctcaagtag ctgagccacc 1620  
 acacctggct aattttgtat ttttggtaga gaaggggttt catcatgttg gtcaggctga 1680  
 tctcgaactc ctgacctcag gtgatccact aatctcagcc tcccaaagtt ctgggattac 1740  
 agatgtgagc cactgtgcct ggctgatac aattaacttg aatgttatat atgtgacttt 1800  
 tttggtgtgt gtaacacatt attacagtgg atggagaaga catcatctgg attatacata 1860  
 tttcgcaatg aaagagagga agaaaaggaa gcagcaaaat atgtggaggc ccaacaaaag 1920  
 agactagaag ccttattcac taaaattcag gaggaatttg aagaacatga aggtaaaatt 1980  
 agttatatgg tacacattgt tatttcta atgagaaca agtcttagag actttgaatt 2040  
 taacattttt aatgagtaaa ttgtttttat tttgagtagt aaattgactt tattttttag 2100  
 tatctagggt attctttttt ggtgttagac aaagaatagc aacaaggac agaaatatca 2160  
 ggtctaagcc atttgtaatc cttctttggg tgttttatgc ttggttcttt agtttttagtt 2220  
 gcttttgaat ttacagttta gtgaattaat aatccttttg ttttcttaga aacacaaca 2280  
 aaaccatatt taccatcacg tgcactaaca agacagcaag ttcgtgcttt gcaagatggt 2340  
 gcagagcttt atgaagcagt gaagaatgca gcagaccag cttaccttga ggtgagagag 2400  
 taagaggaca tataatgagg cttgatgatt attcaagggt agaagctggt ttagactctc 2460  
 tggccatcac aggaaggagt atgttgaaat gctgcatttc tcaaaaggga tgtgtacatt 2520  
 tctgggattt tcagtgatgt gccagacgag tgtgggtgta tgttttcaac tatataccga 2580

ES 2 470 440 A1

gtagaggatg ggagggttct agaattttat atattaatta aatttggttt aaaatgcagg 2640  
 caaaacttgt ttttagccat ctgtaatgta gttggtgatg attatgatta ttagagtaca 2700  
 tttataattg gaggatcatt tttgccgtag ggaaatagaa ttattaatag tttgaggcac 2760  
 ctgagaatat tatgtgagaa actgattaca ttaaccacac ccttaagatg agctctaatt 2820  
 ttgttgattt tgtcctgttt aaagccatct agttacaata gatggaactt ttttgttctg 2880  
 attgcttttt attccaatat cttaaattggc cacagggtta tttcagttaa gagcagttaa 2940  
 gagccttgaa taatcacagg caaatgttga atgataagaa acaagctcag atccagttgg 3000  
 aaattaggaa ggccatggaa tctgctgaac aaaaggaaca aggtttatca agggatgtca 3060  
 caaccgtgtg gaagttgcgt attgtaagct attcaaaaaa agaaaaagat tcaggtaagt 3120  
 atgtaaatgc tttgttttta tcagttttat taacttaaaa aatgacctta ctaacaaaat 3180  
 gattataaat ccagataaag tataaagtta gtttatatca gagaagcaaa atccactact 3240  
 aatgcccaca aagagataat ataaaagagg atctgtatth attttgaaac aacatttaa 3300  
 atgataatca cttcttccat tgcatctttc tcatctttct ccaaacagtt atactgagta 3360  
 tttggcgtcc atcatcagat ttatattctc tgtaacaga aggaaagaga tacagaatth 3420  
 atcatcttgc aacttcaaaa tctaaaagta aatctgaaag agctaacata cagttagcag 3480  
 cgacaaaaaa aactcagtat caacaactac cggtaacaaac ctttcattgt aatthttcag 3540  
 ttttgataag tgcttgtag tttatggaat ctccatattg tgaatthttg tttgtthttc 3600  
 tgtaggthttc agatgaaatt ttatthcaga tttaccagcc acgggagccc cttcacttca 3660  
 gcaaatthtt agatccagac tttcagccat cttgttctga ggtggacctt ataggatthg 3720  
 tcgthttctgt tgtgaaaaaa acaggtaatg cacaatatag ttaatthttt ttattgattc 3780  
 tthtaaaaaa cattgtctth taaaatctct tatgattagt tggagctacc agttggcaaa 3840  
 tttgctagct aactagtgat ctgaaagtaa gcctctthga acctctgatt tggatcccag 3900  
 atatctggtg atcccgtacc tgtgtggaag gaagcaacca cactctatt ttgtgcatca 3960  
 gatgctaaag catatgatac agaggtacat aatgthttggg ccacacatgc cgggtgacct 4020  
 acagaccca acccaaga agtagtattg gtaaattgta cagaaaatth taacatgtgg 4080  
 aaaaatgaca tggtagaaca gatgcatgag gatataatca gthttatggga tcaaagccta 4140  
 aagccatgtg taaaattaac cccaccctgt ccaaaggtat cthttgagcc aatthccata 4200  
 cattattgtg ccccggtgg tthtgcgatt ctaaaatgta ataataagac gthcaatgga 4260  
 acaggacctt gtacaaatgt cagcacagta caatgtacac atggaattag gccagtagta 4320  
 tcaactcaac tgctgtthaa tggcagctta gcagaagaag aggtagtaat tagatctgtc 4380  
 aatthcacgg acaatgctaa aaccataata gtacagctga acacatctgt agaaatthaa 4440  
 tgtacaagac ccaacaacaa tacaagaaaa aaaatccgta tccagagggg accagggaga 4500  
 gcatttgtht caataggaaa aataggaaat atgagacaag cacattgtht cattagtaga 4560  
 gcaaaatgga atgccactth aaaacagata gctagcaaat taagagaaca atthggaaat 4620  
 aataaaacaa taatctthaa gcaatcttca ggaggggacc cagaaattht aacgcacagt 4680

ES 2 470 440 A1

ttttaattgtg gaggggaatt tttctactgt aattcaacac aactgtttaa tagtacttgg 4740  
 ttttaatagta cttggagtac tgaagggta aataaactg aaggaagtga cacaatcaca 4800  
 ctcccatgca gaataaaaca atttataaac atgtggcagg aagtaggaaa agcaatgtat 4860  
 gccctccca tcagcggaca aattagatgt tcatcaaata ttacagggct gctattaaca 4920  
 agagatggtg gtaataacaa caatgggtcc gagatcttca gacctggagg aggagatatg 4980  
 agggacaatt ggagaagtga attatataaa tataaagtag taaaaattga accattagga 5040  
 gtagcaccca ccaaggcaaa gagaagagtg gtgcagagag aaaaagagc agtgggaata 5100  
 ggagctttgt tccttgggtt cttgggagca gcaggaagca ctatgggcgc agcgtcaatg 5160  
 acgctgacgg tacaggccag acaattattg tctggtatag tgcagcagca gaacaatttg 5220  
 ctgagggcta ttgagggcga acagcatctg ttgcaactca cagtctgggg catcaagcag 5280  
 ctccaggcaa gaatcctggc tgtggaaaga tacctaaagg atcaacagct cctggggatt 5340  
 tggggttgct ctggaaaact actttgcacc actgctgtgc cttggaatgc tagttggagt 5400  
 aataaatctc tggaacagat ttggaatcac acgacgtgga tggagtggga cagagaaatt 5460  
 aacaattaca caagcttaat aactcctta attgaagaat cgcaaaacca gcaagaaaag 5520  
 aatgaacaag aattattgga attagataaa tgggcaagtt tgtggaattg gtttaacata 5580  
 acaaattggc tgtggtatat aaaattattc ataatgatag taggaggctt ggtaggttta 5640  
 agaatagttt ttgctgtact ttctgtagt aatagagtta ggcagggata ttcaccatta 5700  
 tcgtttcaga cctggagatc tcccgagggg acccgacagg cccgaaggaa tagaagaaga 5760  
 aggtggagag agagacagag acagatccat ttcgaccaat tctctctca ggtgcaggct 5820  
 gcctatcaga aggtgggtggc tgggtgtggc aatgccctgg ctcaaaata cactgagat 5880  
 ccagacatga taagatacat tgatgagttt ggacaaacca caactagaat gcagtgaaaa 5940  
 aatgcttta tttgtgaaat ttgtgatgct attgctttat ttgtaacat tataagctgc 6000  
 aataacaag ttaacaacaa caattgcatt cattttatgt ttcaggttca gggggagggtg 6060  
 tgggaggttt tttaaagcaa gtaaaacctc tacaatgtg gtatggctga ttatgatccc 6120  
 caggaagctc ctctgtgtcc tcataaaccc taacctctc tacttgagag gacattccaa 6180  
 tcataggctg cccatccacc ctctgtgtcc tcctgttaat taggtcactt aacaaaaagg 6240  
 aaattgggta ggggtttttc acagaccgct ttctaagggt aattttaaa tatctgggaa 6300  
 gtccctcca ctgctgtgtt ccagaagtgt tggtaaacag cccacaaatg tcaacagcag 6360  
 aaacatacaa gctgtcagct ttgcacaagg gcccaacacc ctgctcatca agaagcactg 6420  
 tggttgctgt gttagtaatg tgcaaaacag gaggcacatt ttccccacct gtgtaggttc 6480  
 caaaatatct agtgttttca tttttacttg gatcaggaac ccagcactcc actggataag 6540  
 cattatcctt atccaaaaca gccttgtggt cagtgttcat ctgctgactg tcaactgtag 6600  
 cattttttgg ggttacagtt tgagcaggat atttggctct gtagtttgct aacacacccc 6660  
 aggtggcact tttcggggaa atgtgctcgg aaccctatt tgtttatfff tctaaataca 6720  
 ttcaaataatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat aatattgaaa 6780  
 aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgtcgcctt attccctttt ttgctggcatt 6840

ES 2 470 440 A1

ttgccttcct	gtttttgctc	accagaaaac	gctggtgaaa	gtaaaagatg	ctgaagatca	6900
gttgggtgca	cgagtgggtt	acatcgaact	ggatctcaac	agcggtaaga	tccttgagag	6960
ttttcgcccc	gaagaacggt	ttccaatgat	gagcactttt	aaagttctgc	tatgtggcgc	7020
ggtattatcc	cgtattgacg	ccgggcaaga	gcaactcggg	cgccgcatac	actattctca	7080
gaatgacttg	gttgagtact	caccagtcac	agaaaagcat	cttacggatg	gcatgacagt	7140
aagagaatta	tgcagtgctg	ccataacccat	gagtgataac	actgaggcca	acttacttct	7200
gacaacgatc	ggaggaccga	aggagctaac	cgcttttttg	cacaacatgg	gggatcatgt	7260
aactgcctt	gatcgttggg	aaccggagct	gaatgaagcc	ataccaaacg	acgagcgtga	7320
caccacgatg	cctgtagcaa	tggcaacaac	gttgcgcaaa	ctattaactg	gcgaactact	7380
tactctagct	tcccggcaac	aattaataga	ctggatggag	gcggataaag	ttgcaggacc	7440
acttctgcgc	tcggcccttc	cggctggctg	gtttattgct	gataaatctg	gagccgggta	7500
gcgtgggtct	cgcggtatca	ttgcagcact	ggggccagat	ggtaagccct	cccgtatcgt	7560
agttatctac	acgacgggga	gtcaggcaac	tatggatgaa	cgaaatagac	agatcgctga	7620
gataggtgcc	tactgatta	agcattggta	actgtcagac	caagtttact	catatatact	7680
ttagattgat	ttaaaacttc	atttttaatt	taaaaggatc	taggtgaaga	tcctttttga	7740
taatctcatg	accaaaaatcc	ttaacgggta	gttttcgttc	actgagcgt	cagaccccgt	7800
agaaaagatc	aaaggatcct	cttgagatcc	ttttttctg	cgcgtaatct	gctgcttgca	7860
aacaaaaaaaa	ccaccgctac	cagcgggtgt	ttgtttgccg	gatcaagagc	taccaactct	7920
ttttccgaag	gtaactggct	tcagcagagc	gcagatacca	aatactgtcc	ttctagtgtg	7980
gccgtagtta	ggccaccact	tcaagaactc	tgtagcaccg	cctacatacc	tcgctctgct	8040
aatcctgtta	ccagtggctg	ctgccagtgg	cgataagtcg	tgtcttaccg	ggttgactc	8100
aagacgatag	ttaccggata	aggcgcagcg	gtcgggctga	acgggggggt	cgtgcacaca	8160
gcccagcttg	gagcgaacga	cctacaccga	actgagatac	ctacagcgcg	agcattgaga	8220
aagcgccacg	cttcccgaag	ggagaaaggc	ggacaggtat	ccggtaagcg	gcagggtcgg	8280
aacaggagag	cgcacgaggg	agcttccagg	gggaaacgcc	tggtatcttt	atagtcctgt	8340
cgggtttcgc	cacctctgac	ttgagcgtcg	atttttgtga	tgctcgtcag	gggggcggag	8400
cctatgghaaa	aacgccagca	acgcggcctt	tttacggttc	ctggcctttt	gctggccttt	8460
tgctcacatg	ttctttcctg	cgttatcccc	tgattctgtg	gataaccgta	ttaccgcctt	8520
tgagtgagct	gataccgctc	gccgcagccg	aacgaccgag	cgcagcgagt	cagtgagcga	8580
ggaagcggaa	gagcgcccaa	tacgcaaacc	gcctctcccc	gcgcgttggc	cgattcatta	8640
atgcag						8646

<210> 85  
 <211> 12  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <221> source



ES 2 470 440 A1

```

<222> 1..12
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Secuencia del extremo 5' del cebador de amplificación del
      casete lacZ que comprende un sitio de restricción MuiI"
      /organism="Artificial Sequence"

<220>
<221> misc_feature
<222> 7..12
<223> /note="Sitio de restricción MuiI"

<400> 85
cacacacaat tg                                     12

<210> 86
<211> 12
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..12
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Secuencia del extremo 5' del cebador de amplificación del
      casete lacZ que comprende un sitio de restricción NdeI"
      /organism="Artificial Sequence"

<220>
<221> misc_feature
<222> 7..12
<223> /note="Sitio de restricción NdeI"

<400> 86
cacacacata tg                                     12

<210> 87
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..38
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador forward para eliminar un sitio críptico aceptor de
      splicing de lacZ"
      /organism="Artificial Sequence"

<220>
<221> misc_feature
<222> 18
<223> /note="b se selecciona entre c, t o g, y preferentemente es t"

<400> 87
cagcttttgt tccctttbgt gagggttaat tgcgcgct      38

<210> 88
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..38
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Cebador reverse para eliminar un sitio críptico de splicin
      g de lacZ"
      /organism="Artificial Sequence"

```

ES 2 470 440 A1

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> 21  
<223> /note="v se selecciona entre a, c o g, y preferentemente es a"  
  
<400> 88  
agcgcgcaat taaccctcac vaaaggaac aaaagctg

38



②① N.º solicitud: 201231427

②② Fecha de presentación de la solicitud: 14.09.2012

③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N15/85** (2006.01)  
**C12Q1/68** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y		DESVIAT, L.R. et al., 'Minigenes to confirm exon skipping mutations', METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Abr 2012, Vol. 867, Páginas 37-47, ISSN: 1940-6029 (Electronic), doi: 10.1007/978-1-61779-767-5_3,: Materiales; Métodos, Figuras 1 y 2.	1-29
Y		BURN, T.C. et al., 'Increased exon-trapping efficiency through modifications to the pSPL3 splicing vector', GENE, 1995, Vol.161, No. 2, Páginas 183-187, ISSN: 0378-1119, Experimental y Discusión, Figuras 1 y 2.	1-29
Y		DATSON, N.A. et al., 'Specific isolation of 3'-terminal exons of human genes by exon trapping', NUCLEIC ACIDS RESEARCH, 1994, Vol. 22, No. 20, Páginas 4148-4153, ISSN: 0305-1048, Materiales y Métodos, Figura 1.	1-29
Y		DUYK, G.M. et al., 'Exon trapping: a genetic screen to identify candidate transcribed sequences in cloned mammalian genomic DNA', PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE U S A., 1990, Vol. 87, No. 22, Páginas 8995-8999, ISSN: 0027-8424 (Print), Materiales y Métodos, Resultados, Figura 1 y 2.	1-29
A		ACEDO, A. et al., 'Comprehensive splicing functional analysis of DNA variants of the BRCA2 gene by hybrid minigenes', BREAST CANCER RESEARCH, 2012 Mayo, Vol. 14, No. 3, Página R87, ISSN: 1465-5411 (print), ISSN: 1465-542X (electronic), todo el documento.	1-29
A		SANZ, D.J. et al., 'A high proportion of DNA variants of BRCA1 and BRCA2 is associated with aberrant splicing in breast/ovarian cancer patients', CLINICAL CANCER RESEARCH, 2010 Mar, Vol. 16, No. 6, Páginas 1957-1967, ISSN: 1078-0432 (print), todo el documento.	1-29
A		BONNET, C. et al., 'Screening BRCA1 and BRCA2 unclassified variants for splicing mutations using reverse transcription PCR on patient RNA and an ex vivo assay based on a splicing reporter minigene', JOURNAL OF MEDICAL GENETICS, 2008, Vol. 45, No. 7, Páginas 438-446, ISSN: 0022-2593 (print), ISSN: 1468-6244 (electronic), doi: 10.1136/jmg.2007.056895, todo el documento.	1-29
A		GAILDRAT, P. et al., 'Use of splicing reporter minigene assay to evaluate the effect on splicing of unclassified genetic variants', METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, 2010, Vol. 653, Páginas 249-257, ISSN: 1940-6029 (Electronic), doi: 10.1007/978-1-60761-759-4_15, todo el documento.	1-29

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
10.06.2014

Examinador  
J. L. Vizán Arroyo

Página  
1/6



- ②① N.º solicitud: 201231427  
②② Fecha de presentación de la solicitud: 14.09.2012  
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N15/85** (2006.01)  
**C12Q1/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 2008095712 A1 (KUROYANAGI, H. et al.) 24.04.2008, todo el documento.	1-29
A	GURSKAYA, N.G. et al, 'Analysis of alternative splicing of cassette exons at single-cell level using two fluorescent proteins', NUCLEIC ACIDS RES., 2012 Abr, Vol. 40, No. 8, Página e57, ISSN: 0305-1048 (print), ISSN: 1362-4962 (electronic), doi: 10.1093/nar/gkr1314, todo el documento.	1-29

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia  
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría  
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita  
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud  
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
10.06.2014

Examinador  
J. L. Vizán Arroyo

Página  
2/6

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

C12N, C12Q

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EMBL-EBI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 10.06.2014

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-29	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-29	<b>NO</b>

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

**Base de la Opinión.-**

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

**1. Documentos considerados.-**

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	DESVIAT, L.R. et al., <i>Methods Mol. Biol.</i> , (2012 Abr), <u>867</u> : 37-47.	2012 Abr
D02	BURN, T.C. et al., <i>Gene</i> , (1995), <u>161</u> (2): 183-7.	1995
D03	DATSON, N.A. et al., <i>Nucleic Acids Res.</i> , (1994), <u>22</u> (20): 4148-4153.	1994
D04	DUYK, G.M. et al., <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.</i> , (1990), <u>87</u> (22): 8995-9.	1990
D05	ACEDO, A. et al., <i>Breast Cancer Res.</i> , (2012 Mayo), <u>14</u> (3):R87.	2012 Mayo
D06	SANZ, D.J. et al., <i>Clin. Cancer Res.</i> , (2010 Mar), <u>16</u> (6): 1957-67.	2010
D07	BONNET, C. et al., <i>J. Med. Genet.</i> , (2008), <u>45</u> (7): 438-46.	2008
D08	GAILDRAT, P. et al., <i>Methods Mol. Biol.</i> , (2010), <u>653</u> :249-57.	2010
D09	US 2008095712 A1 (KUROYANAGI, H. et al.)	24.04.2008
D10	GURSKAYA, N.G. et al, <i>Nucleic Acids Res.</i> , (2012 Abr), <u>40</u> (8): e57.	2012 Abr

En D1-D10 se divulgan diferentes plásmidos o vectores útiles para la identificación de exones potenciales ('exon trapping vector').

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración****1. NOVEDAD (Art. 4.1. y Art. 6.1. de la Ley de Patentes).****1.1 Reivindicaciones independientes 1, 24 y 29.**

1.1.1. El objeto de la reivindicación 1 consiste en un vector génico, derivado del plásmido pSPL3b (SEQ ID No:1), útil para ensayos funcionales del procesamiento del pre-ARNm ('splicing') caracterizado porque comprende las siguientes modificaciones en la secuencia de pSPL3b: (a) una delección de al menos 1,2 Kb en el intrón de pSPL3b, (b) la sustitución del sitio de clonación múltiple (MCS) de pSPL3b por un casete *lacZ* que comprende una mutación de eliminación de un primer sitio crítico aceptor de 'splicing', (c) una mutación de fortalecimiento de un segundo sitio aceptor de 'splicing' y (d) al menos una mutación de inhabilitación de un sitio de restricción. Las reivindicaciones 24 y 29 tratan de un procedimiento de obtención del vector génico de la reivindicación 1 y de un procedimiento para el ensayo funcional de 'splicing' basado en el uso del vector de la reivindicación 1.

En el estado de la técnica se ha divulgado el uso de vectores génicos para ensayos funcionales de 'splicing' (cf: D01-D10). Sin embargo, ninguno de tales vectores comparte las características técnicas del reivindicado en la solicitud de patente.

Por consiguiente, el objeto de protección de las reivindicaciones independientes 1, 24 y 29, y el de las dependientes 2-23, 25-28 se considera que es nuevo sobre la base de los documentos D01-D10.

1.2. La presente solicitud satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes, pues el objeto de las reivindicaciones 1-29 es nuevo de acuerdo con el Art. 6.1. de la Ley de Patentes.

**2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).****2.1. Reivindicaciones independientes 1, 24 y 29.**

2.1.1. Los documentos D01-D04 constituyen el estado de la técnica más próximo. En D01-D02 se divulga el uso de minigenes (vector pSPL3) en ensayos funcionales de 'splicing' y el plásmido pSPL3b derivado de pSPL3. En D03-D04 se describe un vector para la clonación e identificación de exones que comprende el exón 1 de  $\beta$ -globina humana, el gen *lacZ $\alpha$*  y un sitio de clonación múltiple (MSC) (cf. D01: Materiales; Métodos, Figuras 1 y 2. D02: Experimental y Discusión, Figuras 1 y 2. D03: Materiales y Métodos, Figura 1. D04: Materiales y Métodos, Resultados, Figura 1 y 2).

2.1.2. El problema técnico a resolver por el objeto de la reivindicación 1 puede ser considerado, por consiguiente, como la provisión de nuevos vectores útiles para ensayos funcionales de 'splicing' que permitan clonar fragmentos de ADN de mayor tamaño, minimizar los productos de 'splicing' inespecíficos e identificar más fácilmente los clones que contienen un inserto de ADN (cf. Página 3, líneas 18-22).

2.1.3. La solución propuesta en la reivindicación 1 consiste en un vector derivado del plásmido pSPL3b (cf. D02) caracterizado básicamente por sustituir el MSC original del intrón de pSPL3b por un casete *lacZ* constituido por el gen *LacZ $\alpha$*  (SEQ ID No: 2) o por *LacZ $\alpha$*  y un MSC (SEQ ID No: 21), y por reducir el tamaño del intrón de pSPL3b mediante una deleción de al menos 1,2 Kb. Además, se introducen cambios puntuales en la secuencia del intrón que conllevan la inhabilitación de sitios de restricción, así como, la eliminación o el fortalecimiento de sitios aceptores de 'splicing'. Según la descripción, la introducción del casete *LacZ* en los vectores reivindicados mejora la capacidad de selección de los clones recombinantes portadores de un vector con un fragmento de ADN insertado en el casete *LacZ*, pues estos clones son de color blanco en presencia de X-Gal e IPTG frente al color azul de los clones no recombinantes. Por otro lado, la deleción de al menos 1,2 Kb de pSPL3b permite la clonación de insertos de mayor tamaño y los cambios puntuales que afectan a sitios de restricción y a sitios aceptores de 'splicing' generan sitios únicos de clonación y minimizan la aparición de los productos de 'splicing' inespecíficos (cf. Página 8, líneas 15-30).

En D02 se describe el plásmido pSPL3b derivado de pSPL3 que comprende unas modificaciones en su secuencia que minimizan los productos de 'splicing' inespecíficos del primero (cf D02: 'Experimental and Discussion', Figuras 1 y 2). En los documentos D03-D04 se divulga un vector génico para la clonación de exones que comprende un único sitio donador de 'splicing', seguido del gen *lacZ $\alpha$*  y de un MSC. Este vector permite identificar exones internos y/o externos insertados en el MSC, mediante la selección de colonias blancas en presencia de X-Gal e IPTG (cf. D03: Materiales y Métodos, Figura 1. D04: Materiales y Métodos, Resultados, Figuras 1 y 2). En cuanto a la reducción del tamaño de un vector mediante la deleción de un fragmento del mismo para favorecer la clonación de fragmentos de mayor tamaño es una técnica ampliamente descrita y utilizada en el estado de la técnica.

Por consiguiente, ante el problema técnico planteado, el experto en la materia combinaría los conocimientos divulgados en D01-D02 y D03-D04 que, junto a los de D05-D10, le llevarían a la solución propuesta en la reivindicación 1 o a una equivalente. Por todo ello, se considera que la reivindicación 1 y las reivindicaciones dependiente 2-23, 27 y 28 no son inventivas. Análogamente, las reivindicaciones independientes 24 y 29 que tratan del procedimiento de obtención del vector de la invención y de un procedimiento para el ensayo funcional de 'splicing' basado en el uso del mismo y sus reivindicaciones dependientes 25-26, se consideran no inventivas sobre la base de los documentos D01-D10.

2.2. La presente invención no satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes porque el objeto de la invención, definido en las reivindicaciones 1-29 no implica actividad inventiva de acuerdo con el Art. 8.1. de la Ley de Patentes.