

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 542 740**

(51) Int. Cl.:

**C12N 15/866**

(2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.08.2010 E 10743083 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2015 EP 2467489**

---

(54) Título: **Producción de productos biofarmacéuticos a base de baculovirus sin viriones baculovíricos contaminantes**

(30) Prioridad:

**17.08.2009 EP 09305761**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**11.08.2015**

(73) Titular/es:

**GENETHON (100.0%)  
1 bis, rue de l'Internationale  
91000 Evry, FR**

(72) Inventor/es:

**MERTEN, OTTO-WILHELM;  
MAREK, MARTIN y  
VAN OERS, MONIQUE**

(74) Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 542 740 T3**

---

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

## DESCRIPCIÓN

Producción de productos biofarmacéuticos a base de baculovirus sin viriones baculovíricos contaminantes

La presente invención se refiere a los procedimientos para la producción de productos biofarmacéuticos por aplicación de un sistema basado en baculovirus. Estos procedimientos permiten ventajosamente la producción de productos biofarmacéuticos con poca o ninguna contaminación de viriones baculovíricos.

Durante las últimos veinte años, la tecnología de células de insecto y baculovirus se ha convertido en un sistema de expresión eucariota utilizado con mucha frecuencia para la producción de proteínas recombinantes, no sólo con propósitos científicos, sino que cada vez más para la medicina humana y veterinaria (Condreay y Kost, 2007, van Oers, 2006). En concreto, los baculovirus recombinantes procedentes del virus de la nucleopolihedrosis múltiple de

10 *Autographa californica* (AcMNPV, por su nombre en inglés) se emplean ampliamente para la producción a gran escala de proteínas heterólogas en cultivos de células de insecto. Las principales razones para la frecuente aplicación de este sistema son: (1) un nivel de expresión elevado de las proteínas foráneas, (2) las células de insecto son capaces de crecer en un cultivo de suspensión y, por lo tanto, se escalan con facilidad, (3) las proteínas sintetizadas en las células de insecto se procesan y se modifican posttraduccionalmente, (4) las técnicas de manipulación están bien desarrolladas para los vectores víricos, lo que da lugar a un sistema de expresión flexible, y (5) no es patógeno para los humanos, ya que el abanico de hospedadores de los baculovirus se limita a insectos e invertebrados. Los vectores baculovíricos recombinantes se están utilizando para la producción de proteínas individuales, por ejemplo, con el objetivo de hacer vacunas con subunidades, pero también para estructuras de orden superior que contienen una o más proteínas, tales como complejos enzimáticos, virus o partículas similivíricas.

20 Las partículas similivíricas (VLP, por su nombre en inglés) son estructuras muy organizadas que se autoensamblan a partir de proteínas estructurales procedentes de virus. Estas nanopartículas versátiles y estables poseen unas excelentes propiedades adyuvantes capaces de inducir las respuestas inmunitarias adquirida e innata (Ludwig y Wagner, 2007). Durante los últimos años, las VLP se han empleado en otras ramas de la biotecnología para sacarle partido a su estabilidad estructural y a que tolera la manipulación para portar y visualizar moléculas heterólogas, o servir de bloques fundamentales para nanomateriales nuevos. Para las aplicaciones immunoterapéuticas y preventivas, se han producido exitosamente muchos tipos de partículas similivíricas (VLP) en las células de insecto infectadas con baculovirus (Noad y Roy, 2003, van Oers et al., 2006, Ramqvist et al., 2007). El primer logro comercial de la tecnología de las VLP de baculovirus para su uso en los humanos es la vacuna del virus del papiloma humano (HPV, por su nombre en inglés) recientemente comercializada por GlaxoSmithKline, que protege de las cepas de HPV 16 y 18. La proteína L1 de cada uno de estos tipos de HPV se expresó mediante un vector baculovírico recombinante y las VLP resultantes se combinaron para producir la vacuna Cervarix™ (Harper et al., 2006).

35 Hoy en día se están dedicando muchos recursos al desarrollo de partículas similivíricas de la gripe derivadas de baculovirus, así como vacunas con subunidades de la gripe, lo que constituiría una nueva generación de posibles vacunas basadas en cultivos de células que no sean de mamíferos y que no sean huevos. Las partículas similivíricas de la gripe incapaces de replicarse son eficaces a la hora de desencadenar una respuesta inmunitaria protectora, amplia, y que sirva en varios clados contra las proteínas de aislados emergentes de la gripe H5N1, lo que da lugar a un posible candidato de vacuna de la gripe pandémica para los humanos que se puede almacenar para ser usada en el caso de un brote de la gripe H5N1 (Bright et al., 2008). Una vacuna con subunidades de la gripe producida en las células de insecto está muy cerca de la autorización de la FDA (Cox y Hollister, 2009). En principio, se podrían aplicar estrategias parecidas para las vacunas contra la gripe pandémica, tal como el brote reciente de gripe porcina.

45 Con propósitos genotérapicos, la tecnología de células de insecto y baculovirus también se aplica a la producción de vectores de dependovirus (AAV, por su nombre en inglés) infecciosos (p. ej., Urabe et al., 2002) y vectores lentivíricos (Lesch et al., 2008). Para la producción de vectores de AAV, se coinfectan las células de insecto con tres baculovirus recombinantes: uno que produce proteínas de la replicasa (REP) de los AAV, uno que lleva las funciones CAP para producir las proteínas estructurales víricas de los AAV (VP1, VP2, VP3), y un tercer baculovirus que comprende un vector de AAV-ITR con la capacidad de portar y transferir transgenes. Recientemente se había publicado una versión mejorada para esta producción que se basa en el uso único de baculovirus recombinantes, en donde uno de ellos lleva las funciones REP y CAP de los AAV (Smith et al., 2009). El vector de AAV que se forma es indistinguible del producido en las células de mamífero basándose en sus propiedades físicas y biológicas. El rendimiento de las partículas de vector de AAV-ITR se acercó a  $5 \times 10^4$  por célula de insecto Sf9, lo que demuestra que el sistema es capaz de producir grandes cantidades de vectores de AAV de una manera sencilla. En la actualidad están en marcha ensayos clínicos con vectores de AAV procedentes de baculovirus, por ejemplo, para la deficiencia de la lipoproteína lipasa (Amsterdam Molecular Therapeutics B. V.). Como alternativa, una estrategia escalable para producir vectores lentivíricos (Lesch et al., 2008), en la que las células 293T de mamífero se transdijeron simultáneamente con cuatro baculovirus recombinantes producidos en las células de insecto para expresar todos los elementos que se necesitaban para la generación de un vector lentivírico seguro. El título de

lentivirus sin concentrar en el medio de cultivo de las células de mamífero era de promedio  $2,5 \times 10^6$  UT ml<sup>-1</sup>, comparable al título de los lentivirus producidos mediante los procedimientos convencionales de transfección con cuatro plásmidos. Además, se está invirtiendo en general para convertir los procedimientos de producción de vectores lentivíricos en tecnologías basadas en células de insecto que se puedan escalar mejor.

5 Tjia et al., 1983, descubrieron que los BV se pueden internalizar en las células de mamíferos y que algunos de los ADN víricos incluso alcanzaron el núcleo de las células. Otros estudios demostraron que los baculovirus consiguen entrar en las células de mamífero y se ponen a expresar la cloranfenicol acetiltransferasa de *Escherichia coli* controlada por el promotor del virus del sarcoma de Rous (Carbonell et al., 1985). Estos hallazgos condujeron al desarrollo de nuevos vehículos baculovíricos para introducir genes en las células de mamífero (Boyce y Bucher, 1996, Hofmann et al., 1995, Condraay y Kost, 2007, Kaikkonen et al., 2008). Hoy en día, existen pruebas firmes de que los vectores baculovíricos para la introducción de genes son capaces de conseguir la expresión transitoria y estable de los genes foráneos en las células de mamífero después de la selección con antibióticos (Lackner et al., 2008).

10 Hay todavía se sabe poco de la actividad transcripcional de los promotores de baculovirus en las células de mamíferos. Se ha demostrado que la proteína transactivadora IE1 del AcMNPV es funcional en las células de mamíferos (Murges et al., 1997), así como el promotor de temprano a tardío (ETL, por su nombre en inglés) (Liu et al., 2006a,b). Entre las otras áreas poco exploradas se encuentra la interacción de los baculovirus con los componentes del sistema inmunitario de los mamíferos. El AcMNPV es capaz de inducir la producción de citocinas antivíricas, lo que protege a las células de la infección por el virus de la estomatitis vesicular y por el virus de la gripe (Abe et al., 2003, Gronowski et al., 1999). El AcMNPV también es reconocido por el receptor 9 de tipo Toll en las células dendríticas y en los macrófagos, y el AcMNPV induce inmunidad adquirida antitumoral (Kitajima y Takaku, 2008). Estos resultados sugieren que el AcMNPV tiene el potencial de ser un virus eficaz o un agente terapéutico antitumoral que induce las inmunidades innata y adquirida. A pesar de los efectos universalmente positivos del AcMNPV sobre los componentes de la inmunidad humoral y la adaptativa mediada por células en los ratones, la interacción de los baculovirus con el sistema inmunitario humano puede ser ligeramente diferente. Adicionalmente, las propiedades inmunoadyuvantes del AcMNPV se deberían separar completamente de la respuesta inmunitaria contra las deseadas vacuna/sustancias biofarmacéuticas que se producen en las células de insecto.

15 Estas peculiaridades de los baculovirus son muy desventajosas en los casos donde los baculovirus se utilizan para la producción de vacunas o vectores víricos con fines terapéuticos (p. ej., AAV, lentivirus). La contaminación de los productos biofarmacéuticos producidos con ambos tipos de viriones baculovíricos —viriones de gemación (BV, por su nombre en inglés) y viriones derivados por oclusión (ODV, por su nombre en inglés)— debe, por lo tanto, evitarse. En general, las proteínas recombinantes se pueden producir en las células de insecto como proteínas citosólicas, unidas a la membrana o secretadas al exterior celular. Estas últimas proteínas secretadas están muy «contaminadas» con los BV baculovíricos presentes en el medio de cultivo. Puede ser muy difícil separar los viriones baculovíricos indeseables de los productos biofarmacéuticos recombinantes producidos en algunas configuraciones de producción y purificación. Por ejemplo, se ha demostrado que estos BV pueden causar problemas durante el procedimiento de purificación de los vectores de AAV con la tecnología de células de insecto y baculovirus (comunicación personal de O. Merten, Genethon). Por otra parte, están también los ODV, que se forman siempre en el interior del núcleo de las células infectadas, en todos los sistemas convencionales de expresión en células de insecto con baculovirus, incluso si no se forman los cuerpos de oclusión debido a la sustitución del marco abierto de lectura de la polihedrina por un gen deseado. De forma análoga, estos viriones se pueden copurificar con proteínas recombinantes producidas dentro de la célula o las VLP durante el procedimiento de purificación.

20 En resumen, la separación de las proteínas recombinantes y, en concreto, las VLP, de las partículas baculovíricas requiere un gran esfuerzo y se produce con elevados costes. Además, reduce la eficacia de la producción de proteínas recombinantes. Por lo tanto, es muy deseable que se desarrolle una tecnología mejorada de células de insecto y baculovirus que permita que se expresen en gran cantidad las proteínas heterólogas al mismo tiempo que se elimina la producción de baculovirus BV y ODV, y es el tema de esta solicitud de patente. Tal sistema de producción sin viriones baculovíricos representaría una mejora significativa sobre los sistemas actuales para la producción de toda clase de productos biofarmacéuticos en las células de insecto.

25 50 La presente invención se basa en la identificación de los procedimientos que usan las células de insecto y baculovirus para producir productos biofarmacéuticos con poca o ninguna cantidad de viriones baculovíricos.

Así pues, un objeto de la presente invención da a conocer un procedimiento para la producción de una sustancia biofarmacéutica, que comprende:

- 55 (a) infectar una célula de insecto productora de la sustancia biofarmacéutica con al menos un baculovirus, en donde dicho al menos un baculovirus comprende un genoma que codifica dicha sustancia biofarmacéutica, y
- (b) mantener la célula de insecto productora de la sustancia biofarmacéutica en condiciones tales que se produce la sustancia biofarmacéutica,

en donde cada genoma de dicho al menos un baculovirus es deficiente para vp80 o en donde dicha célula de insecto productora de la sustancia biofarmacéutica comprende un sistema de control de expresión que permite la inactivación de vp80.

5 En una realización, la invención se refiere al procedimiento anterior, en donde vp80 se hace deficiente en dicho genoma por mutación, por ejemplo, por medio de la sustitución, inserción o delección de nucleótidos.

En otra realización, la invención se refiere al procedimiento de más arriba, en donde la célula de insecto productora de la sustancia biofarmacéutica es una célula de insecto recombinante que comprende una construcción que expresa un ARN bicatenario (dsRNA, por su nombre en inglés) específico de vp80, en donde el dsRNA se expresa opcionalmente bajo el control de un promotor inducible.

10 En otra realización, la invención se refiere al procedimiento de más arriba, en donde el al menos un baculovirus se produce antes de la etapa (a) en una célula productora de baculovirus que expresa una copia que complementa a vp80.

15 En otra realización, la invención se refiere al procedimiento de más arriba, en donde la deficiencia o la inactivación de vp80 no afecta a la expresión génica muy tardía de dicho baculovirus en comparación con la expresión génica muy tardía del vector baculovírico de tipo silvestre.

Aún en otra realización, la invención se refiere al procedimiento de más arriba, en donde el al menos un baculovirus procede preferiblemente del AcMNPV o del NPV de *Bombyx mori* (Bm).

20 En otra realización más, la invención se refiere al procedimiento de más arriba, en donde el producto biofarmacéutico es una proteína recombinante, un virus recombinante, un vector procedente de virus o una partícula similivírica.

25 En otra realización, la invención se refiere al procedimiento de más arriba, en donde el producto biofarmacéutico es un vector recombinante de AAV. Además, la invención se refiere al procedimiento de más arriba, en donde el producto biofarmacéutico es una vacuna. Ejemplos representativos de vacunas que se pueden producir con el procedimiento de la presente invención incluyen, pero sin limitarse a ellas, vacunas con partículas similivíricas de la gripe o subunidades de la gripe, y vacunas contra el virus del papiloma humano.

En otra realización, la invención se refiere al procedimiento de más arriba, en donde el producto biofarmacéutico está codificado por al menos un gen introducido en el genoma del baculovirus recombinante bajo el control de un promotor del baculovirus, preferiblemente el promotor de p10 o de la polihedrina.

30 Otro objeto de la invención da a conocer el uso de un sistema de células de insecto y baculovirus para la producción de un producto biofarmacéutico, en donde el sistema de células de insecto y baculovirus comprende una célula de insecto productora de un producto biofarmacéutico con al menos un baculovirus recombinante, en donde:

cada uno, o todos, los baculovirus recombinantes comprenden un genoma de baculovirus recombinante que codifica el producto biofarmacéutico o al menos un componente del producto biofarmacéutico, y

35 el genoma de baculovirus recombinante carece de vp80 o la célula de insecto productora del producto biofarmacéutico comprende un sistema de control de la expresión que permite la inactivación de vp80.

Aún otro objeto descrito en la presente memoria se refiere a un bácmido que comprende un genoma de baculovirus, en donde dicho genoma carece de un gen esencial para el correcto ensamblaje de los viriones baculovíricos, preferiblemente en donde el genoma de dicho baculovirus carece de vp80, vp39, p6.9 o vp1054. En un aspecto particular, dicho bácmido procede del AcMNPV y carece del ORF de vp80.

40 Otro objeto más descrito en la presente memoria se refiere a un vector baculovírico recombinante de AcMNPV, en donde el genoma de dicho baculovirus carece de un gen esencial para el ensamblaje correcto de viriones baculovíricos, preferiblemente en donde el genoma de dicho baculovirus carece de vp80, vp39, vp1054 o p6.9. En un aspecto particular, la invención se refiere a un baculovirus recombinante de AcMNPV que carece del ORF de vp80.

45 También se describe en la presente memoria una célula de insecto infectada con el baculovirus recombinante de AcMNPV mencionado más arriba.

Otro objeto descrito se refiere a una célula de insecto, que comprende una construcción que expresa un dsRNA específico de un gen esencial para el ensamblaje correcto de viriones baculovíricos, preferiblemente dirigida contra vp80, vp39, vp1054 y/o p6.9, en donde dicha construcción está preferiblemente integrada en el genoma de la célula de insecto.

Otro objeto más descrito en la presente memoria se refiere a una célula de insecto que comprende un casete de expresión que codifica un gen esencial para el ensamblaje correcto de viriones baculovíricos. En particular, la invención se refiere a dicha célula de insecto en la que el gen codificado por el casete de expresión es *vp80*, *vp39*, *vp1054* y/o *p6.9*.

5 Otro objeto descrito en la presente memoria se refiere a un procedimiento para la producción de un baculovirus que carece de al menos un gen esencial para el ensamblaje correcto de viriones baculovíricos, que comprende la etapa de transfectar una célula de insecto que comprende un casete de expresión que codifica un gen esencial para el ensamblaje correcto de viriones baculovíricos, con un bácmido que comprende un genoma baculovírico, en donde dicho genoma carece de un gen esencial para el ensamblaje correcto de viriones baculovíricos, preferiblemente en donde el genoma de dicho baculovirus carece de *vp80*, *vp39*, *p6.9* y/o *vp1054*, en donde el gen esencial para el ensamblaje correcto de viriones baculovíricos en dicho bácmido es el gen codificado mediante el casete de expresión comprendido en dicha célula de insecto.

10 La presente invención se refiere a la producción de productos biofarmacéuticos en las células de insecto mediante la aplicación de un sistema baculovírico, pero sin la coproducción de viriones baculovíricos contaminantes. Los procedimientos de la invención simplifican en gran medida el procesamiento posterior de los productos biofarmacéuticos producidos en las células de insecto.

15 Así pues, la invención se refiere a los procedimientos para la producción de un producto biofarmacéutico mediante la aplicación de un sistema baculovírico diseñado para evitar la producción de viriones baculovíricos contaminantes. El procedimiento de la presente invención comprende la infección de células de insecto que producen productos biofarmacéuticos con al menos un baculovirus que codifica dicha sustancia biofarmacéutica.

20 Los baculovirus son virus ADN y envueltos de los artrópodos, de los que dos miembros son vectores de expresión bien conocidos por producir proteínas recombinantes en los cultivos de células. Los baculovirus tienen genomas bícatenarios circulares (de 80 a 200 kpb) que se pueden manipular genéticamente para permitir la introducción de un gran contenido genómico en células concretas. Los virus utilizados como vector son por lo general el virus de la nucleopolihedrosis múltiple de *Autographa californica* (AcMNPV) o el NPV de *Bombyx mori* (BmNPV) (Kato et al., 2010).

25 Los baculovirus se utilizan con frecuencia para infectar células de insecto y que expresen proteínas recombinantes. En particular, la expresión de genes heterólogos en los insectos se puede llevar a cabo como se describe en, por ejemplo, la patente de los EE. UU. 4.745.051; Friesen et al. (1986); patente europea EP 127.839; patente europea EP 155.476; Vlak et al. (1988); Miller et al. (1988); Carbonell et al. (1988); Maeda et al. (1985); Lebacq-Verheyden et al. (1988); Smith et al. (1985); Miyajima et al. (1987); y Martin et al. (1988). En Lockow et al. (1988), Miller et al. (1986); Maeda et al. (1985) y McKenna (1989) se describen numerosas cepas y variantes de baculovirus y las correspondientes células hospedadoras de insecto permisivas que se pueden utilizar para la producción de proteínas.

30 35 De acuerdo con la presente invención, se puede utilizar cualquier genoma procedente de un baculovirus utilizado corrientemente para la expresión recombinante de proteínas y sustancias biofarmacéuticas. Por ejemplo, el genoma del baculovirus puede proceder de, pongamos por caso, AcMNPV, BmNPV, el NPV de *Helicoverpa armigera* (HearNPV) o el MNPV de *Spodoptera exigua*, preferiblemente de AcMNPV o BmNPV. En particular, el genoma del baculovirus puede proceder del clon C6 de AcMNPV (secuencia genómica: n.º de acceso de GenBank NC\_001623.1, SEQ ID n.º 1).

40 45 La terminología «sustancia biofarmacéutica» y «producto biofarmacéutico» pretenden definir fármacos médicos producidos por biotecnología. Como tal, los productos biofarmacéuticos pueden corresponder a fármacos producidos por técnicas recombinantes, tales como proteínas recombinantes, especialmente hormonas recombinantes o proteínas recombinantes para ser usadas como vacunas, virus, por ejemplo AAV recombinante terapéutico u otros vectores víricos para ser usados en la genoterapia, así como partículas similivíricas (VLP). Tales productos biofarmacéuticos se pretende que se administren a un sujeto que los necesita para el tratamiento preventivo o el tratamiento curativo de una afección o enfermedad en dicho sujeto que puede ser de origen humano o animal.

50 55 Un producto biofarmacéutico puede corresponder a una proteína o péptido monocatenario, por ejemplo, en el caso de una proteína recombinante terapéutica, o puede ser una estructura compleja, tal como un virus o una partícula similivírica. En los últimos dos casos, los componentes del complejo se pueden expresar a partir de varios baculovirus recombinantes, en donde cada uno lleva al menos un componente de la estructura compleja o a partir de un solo baculovirus cuyo genoma se ha modificado genéticamente mediante la inserción de secuencias que codifican todos los componentes del complejo. Por ejemplo, para la producción de un AAV recombinante, se puede utilizar un sistema que comprende tres baculovirus: un baculovirus que codifica la proteína REP de AAV, un baculovirus que codifica la proteína CAP de AAV, y un baculovirus que codifica el genoma de AAV-ITR que comprende un gen terapéutico entre las dos ITR del AAV. Ahora también está disponible un sistema que comprende dos baculovirus, para lo cual las secuencias de ADN que codifican la proteína REP de AAV y la proteína CAP de

AAV se producen desde un único baculovirus.

En una realización preferida de la invención, el gen o genes heterólogos que codifican los productos biofarmacéuticos están colocados bajo el control de un promotor baculovírico. Por ejemplo, el gen o genes heterólogos se colocan bajo el control del promotor de la polihedrina o de p10, o de cualquier otro promotor baculovírico utilizado corrientemente para la expresión en una célula de insecto (p. ej., el promotor ie-1, p6.9, gp64 o el ie-2 del MNPV de *Orchya pseudotsugata* (Op)). En una realización preferida de la invención, el promotor baculovírico se selecciona de promotores de expresión muy tardía, por ejemplo, los promotores de p10 y de la polihedrina, preferiblemente bajo el control del promotor de la polihedrina.

En el procedimiento descrito en la presente memoria, al menos un gen esencial para el ensamblaje correcto de viriones baculovíricos está ausente del genoma del o de los baculovirus construidos en el procedimiento descrito más arriba, o bien se impide su expresión. Los inventores han demostrado que la delección o la inactivación de tales genes da lugar a la reducción, o incluso a la ausencia completa, de viriones de gemación y/o viriones derivados por oclusión, las dos formas de un baculovirus.

Un «gen esencial para el ensamblaje correcto de viriones baculovíricos» es un gen cuya deficiencia o inactivación en una célula que produce baculovirus afecta negativamente al número de BV y ODV producidos por dicha célula. Tal gen se puede identificar como se da a conocer en los ejemplos que vienen a continuación en la presente memoria. En particular, se pueden utilizar ARN bicatenarios (dsRNA) específicos de un gen baculovírico concreto para valorar el impacto de la ausencia de dicho gen concreto sobre la producción de BV y ODV, por ejemplo, mediante la detección de la expresión de un gen indicador presente en el genoma baculovírico en el cultivo celular y, así pues, determinar la diseminación o la ausencia la diseminación del baculovirus (fenotipo de una única infección). Otra alternativa es que se pueden detectar los viriones baculovíricos por la presencia de proteínas estructurales baculovíricas o de secuencias del genoma baculovírico en el medio de cultivo cuando se toman muestras para la producción de BV. Ambos tipos de viriones se pueden detectar por microscopía electrónica.

Dentro de la presente memoria se describe un procedimiento en el que el gen esencial para el ensamblaje correcto de viriones baculovíricos se selecciona de *vp80*, *vp39*, *vp1054* y *p6.9*. Más preferiblemente, el gen se selecciona de *vp80* y *vp39*, en donde dicho gen es preferiblemente *vp80*. En el procedimiento de la invención, el gen esencial para el ensamblaje correcto de viriones baculovíricos es *vp80*.

La presente descripción da a conocer la inactivación de genes esencial para el ensamblaje correcto de viriones baculovíricos. Se pueden implantar varias estrategias con este propósito y en particular: la mutación, por ejemplo mediante delección, del gen o genes seleccionados del genoma baculovírico recombinante; o la reducción de la expresión del gen seleccionado mediante un sistema de control de la expresión proporcionado en la célula de insecto productora de la sustancia biofarmacéutica que se pretende infectar con el baculovirus. Preferiblemente, el sistema de control de la expresión mediante la interferencia por ARN conlleva la represión de la expresión de la proteína o proteínas codificadas por el gen o genes seleccionados.

En una realización de la presente descripción, el genoma de al menos un baculovirus construido en el procedimiento de la invención carece de al menos un gen esencial para el ensamblaje correcto de viriones baculovíricos, en particular, de un gen que codifica *vp80*, *vp39*, *vp1054* y/o *p6.9*, preferiblemente *vp80* y/o *vp39*, e incluso más preferiblemente *vp80*. Más en concreto, dicho genoma procede del AcMNPV, más en concreto de la secuencia genómica del clon C6 del AcMNPV (n.º de acceso de GenBank NC\_001623.1, SEQ ID n.º 1). Por consiguiente, en un aspecto la presente descripción se da a conocer el procedimiento que se define más arriba, en donde el genoma baculovírico es un genoma de AcMNPV, en particular un genoma del clon C6 del AcMNPV, que carece del gen que codifica *vp80*, *vp39*, *vp1054* y/o *p6.9*, preferiblemente *vp80* y/o *vp39*, e incluso más preferiblemente *vp80*. Tal y como se conoce bien en la técnica y se especifica en el acceso de GenBank n.º NC\_001623.1, estos genes se colocan como sigue en el genoma del clon C6 del AcMNPV (a saber, en la SEQ ID n.º 1): posiciones 89564-91639 para *vp80*; posiciones 75534-76577 para *vp39* (secuencia complementaria); posiciones 45222-46319 para *vp1054*; posiciones 86712-86879 para *p6.9* (secuencia complementaria).

Se debe observar que, en el caso de que el producto biofarmacéutico sea un producto complejo que comprende diferentes subunidades, cada una codificada por diferentes baculovirus, los genomas de todos los baculovirus recombinantes implicados carecen del gen esencial seleccionado para evitar que un genoma complemento a otro. Es decir, cuando se utilizan varios baculovirus para infectar la misma célula de insecto productora de la sustancia biofarmacéutica, a cada uno de estos baculovirus le falta el mismo gen o genes esenciales para el ensamblaje correcto de los viriones baculovíricos.

De acuerdo con la presente invención, un gen puede hacerse defectuoso al mutar dicho gen. Una mutación de un gen esencial para el ensamblaje correcto de viriones baculovíricos es una modificación de dicho gen que da lugar a la total ausencia de un producto génico esencial y funcional. Por consiguiente, dicha mutación puede dar lugar a la introducción de uno o varios codones de parada en el marco abierto de lectura del ARNm transcrita desde el gen esencial para el ensamblaje correcto de los viriones baculovíricos, o puede corresponder a la delección, total o

5 parcial, del gen esencial para el ensamblaje correcto de los viriones baculovíricos. Un gen esencial para el ensamblaje correcto de los viriones baculovíricos se puede mutar por medio de la sustitución, inserción o delección de nucleótidos en la secuencia de todo o parte del gen de tipo silvestre (por ejemplo, en la secuencia dada a conocer por el n.º de acceso de GenBank NC\_001623.1, para un genoma procedente de AcMNPV). La mutación puede corresponder a la delección completa del gen o a solo una parte de dicho gen. Por ejemplo, se puede eliminar al menos el 50%, más preferiblemente al menos el 60%, más preferiblemente al menos el 70%, más preferiblemente al menos el 80%, e incluso más preferiblemente al menos el 90% del gen esencial para el ensamblaje correcto de los viriones baculovíricos.

10 El genoma baculovírico mutante se puede producir mediante los procedimientos estándares bien conocidos en la técnica, tales como la mutagénesis específica de sitio (véase, p. ej., Sambrook et al., (1989)) y la recombinación con Lambda RED (Datsenko y Wanner, 2000). El gen esencial para el ensamblaje correcto de viriones baculovíricos se puede, en particular, eliminar como se da a conocer en los ejemplos que vienen a continuación. En resumen, se pueden utilizar los sitios loxP mutantes descritos por Suzuki et al. (2005), reemplazando bien totalmente o en parte el gen esencial para el ensamblaje correcto de viriones baculovíricos por un gen indicador flanqueado por los sitios LoxP mutantes por recombinación. El gen indicador (por ejemplo, el gen que codifica la cloranfenicol acetiltransferasa (*cat*)) luego se escinde con la aplicación de una recombinación con la recombinasa Cre.

15 Esta realización se ilustra en los ejemplos que vienen a continuación y se detalla para los baculovirus cuyo genoma se ha modificado por delección de un fragmento de 2074 pb del ORF de *vp80* en el genoma de AcMNPV. Este genoma concreto es parte de la presente invención, pero se ofrece a modo de ejemplo no limitante de lo que es un genoma baculovírico mutante de acuerdo con la invención.

20 Se debe observar que la construcción recombinante del genoma de baculovirus puede dar lugar a la inserción de varias secuencias como sitios de clonación o sitios de recombinación (por ejemplo, queda un sitio LoxP después de la recombinación con la recombinasa Cre). Esto es irrelevante en la medida en que el genoma resultante carezca del gen seleccionado como esencial para el ensamblaje correcto de los viriones baculovíricos.

25 En esta realización, en donde el genoma de al menos un baculovirus carece de al menos un gen esencial para el ensamblaje correcto del virión baculovírico, la producción de partículas recombinantes de baculovirus de gemación necesarias para la infección inicial de las células que producen las sustancias biofarmacéuticas requiere la aplicación de células especiales que rescatan el gen defectuoso, a saber, estas células que producen el baculovirus expresan el gen seleccionado. En otras palabras, la célula que produce el baculovirus expresa una copia que

30 complementa el al menos un gen esencial para el ensamblaje correcto de los viriones baculovíricos que falta en el genoma del baculovirus. Por ejemplo, se podría plantear una línea celular procedente de Sf9 que produzca constitutivamente el producto del gen esencial para el ensamblaje correcto del virión de baculovirus. Esta línea de células recombinantes se utiliza para la producción de reservas de siembra de baculovirus, mientras que las líneas de células de insecto convencionales como Sf9, Sf21 o High-five, se pueden infectar con el baculovirus producido por la expresión heteróloga del producto biofarmacéutico. Por consiguiente, la presente descripción también se

35 refiere a una célula de insecto modificada para que exprese un gen esencial para el ensamblaje correcto de baculovirus, en donde dicho gen mutado en un baculovirus se utiliza para la producción de productos biofarmacéuticos, tal y como se define más arriba. Tal línea celular utilizada para la producción del vector baculovírico mutante construido en el procedimiento de la presente invención se denomina una «célula productora de baculovirus». Cuando el genoma del baculovirus carece de un gen esencial para el ensamblaje correcto de viriones baculovíricos, la célula de insecto productora de baculovirus debe proporcionar y expresar dicho gen para complementar la deficiencia y producir un baculovirus infeccioso. En una realización concreta, la célula de insecto utilizada para la producción de baculovirus se modifica mediante la transfección con un casete de expresión que

40 codifica al menos un gen esencial para el ensamblaje correcto de viriones baculovíricos. En una realización, dicho casete de expresión se integra en el genoma de dicha célula. También se pueden utilizar células de insecto infectadas transitoriamente con al menos un plásmido que comprende el casete de expresión. La terminología «casete de expresión» se refiere a una construcción que comprende la secuencia codificante de un gen de interés unido funcionalmente a secuencias de control de la expresión. Tal casete de expresión puede ser un plásmido que

45 comprende el ORF de un gen esencial para el ensamblaje correcto de los viriones baculovíricos bajo el control de un promotor funcional en la célula de insecto seleccionada, y no contiene secuencias del genoma baculovírico que no sean el gen esencial para que se complemente el ensamblaje correcto de viriones baculovíricos y opcionalmente se permita que la secuencia del promotor exprese dicho gen (en particular, un casete de expresión no es un bárcmido ni cualquier otro genoma entero baculovírico). Las secuencias de control de expresión de ejemplo se pueden elegir entre promotores, potenciadores, aisladores, etc. En una realización, el gen para la complementación procede del

50 genoma del baculovirus en el cual se ha inactivado el gen esencial para el ensamblaje correcto de los viriones baculovíricos. En otra realización, el gen para la complementación procede del genoma de una especie de baculovirus diferente a la del genoma del baculovirus utilizado para la producción de productos biofarmacéuticos. Por ejemplo, el baculovirus utilizado para la producción de productos biofarmacéuticos puede proceder del genoma de AcMNPV y el gen para la complementación introducido en la célula productora de baculovirus procede de

55 BmNPV o SemNPV. Más específicamente, el genoma del baculovirus se puede hacer que carezca de *vp80*, *vp39*, *vp37* y *vp35*. En otra realización, el gen para la complementación procede del genoma de una especie de baculovirus diferente a la del genoma del baculovirus utilizado para la producción de productos biofarmacéuticos. Por ejemplo, el baculovirus utilizado para la producción de productos biofarmacéuticos puede proceder del genoma de AcMNPV y el gen para la complementación introducido en la célula productora de baculovirus procede de BmNPV o SemNPV. Más específicamente, el genoma del baculovirus se puede hacer que carezca de *vp80*, *vp39*, *vp37* y *vp35*.

*vp1054 y/o p6.9*, y la célula productora de baculovirus puede comprender una copia de un gen de BmNPV o SeMNPV capaz de complementar estos genes (p. ej., como se da a conocer en los ejemplos, se elimina *p6.9* en el genoma de AcMNPV y la célula productora de baculovirus proporciona una copia de rescate del gen *p6.9* de SeMNPV).

5 Así pues, la presente descripción también da a conocer un procedimiento para la producción de un baculovirus que carece de al menos un gen esencial para el ensamblaje correcto de viriones baculovíricos, que comprende la etapa de transfectar una célula de insecto que comprende un casete de expresión que codifica un gen esencial para el ensamblaje correcto de los viriones baculovíricos, con un bácmido que comprende un genoma baculovírico, en donde dicho genoma carece de un gen esencial para el ensamblaje correcto de los viriones baculovíricos, preferiblemente en donde el genoma de dicho baculovirus carece de *vp80* o *vp39*, *p6.9* y/o *vp1054*, en donde el gen esencial para el ensamblaje correcto de los viriones baculovíricos en dicho bácmido es el gen codificado por el casete de expresión comprendido en dicha célula de insecto. De acuerdo con este procedimiento, el gen que falta en el genoma baculovírico se complementa con el gen que se expresa en la célula de insecto. Las células transfectadas con el bácmido se mantienen en condiciones tales que se producen los viriones baculovíricos. Estos viriones baculovíricos producidos, que comprenden un genoma en el que falta al menos un gen esencial para el ensamblaje correcto de los viriones baculovíricos, luego se recogen para su uso posterior para infectar células de insecto productoras de sustancias biofarmacéuticas para la producción de los productos biofarmacéuticos.

20 En la realización donde el genoma de baculovirus carece de al menos un gen esencial para el ensamblaje de los viriones baculovíricos, la célula de insecto productora de la sustancia biofarmacéutica debe ser incapaz de complementar la carencia de dicho gen. Por lo demás, la carencia sería rescatada por la célula productora de la sustancia biofarmacéutica y se podrían producir los BV y los ODV. La presencia o ausencia de un gen esencial para el ensamblaje correcto de baculovirus se puede monitorizar, por ejemplo, mediante la comprobación de dicha célula por una PCR específica de dicho gen o por la detección del producto de la proteína de este gen (por ejemplo, mediante transferencia Western con un anticuerpo específico de dicho producto genético). Hay que descartar como 25 células productoras de productos biofarmacéuticos las células que expresan un producto funcional del gen esencial para el ensamblaje correcto de los viriones baculovíricos que se han hecho deficientes en el genoma del baculovirus construido con que se pretendía infectar dicha célula.

30 En otra realización de la invención, la expresión del gen esencial para el ensamblaje correcto de los viriones baculovíricos se controla mediante un sistema de control de la expresión. La terminología «sistema de control de la expresión» define una modificación del sistema de células de insecto productoras del baculovirus/sistema de células productoras de los productos biofarmacéuticos y/o aún otra adaptación del genoma vírico, lo que da lugar a la regulación específica del gen esencial para el ensamblaje correcto de viriones baculovíricos. Este sistema puede ser 35 un sistema de expresión inducible (por ejemplo, Tet-On, Tet-Off, sistemas basados en ecdisona (Dai et al., 2005) o elementos que contienen la región homóloga (*hr*) del baculovirus, tal como el sistema *hr2* descrito por Aslanidi et al., (2009), lo que permite la inducción o la represión a voluntad del gen esencial, una construcción que expresa un ARN interferente o una combinación de estos.

40 En una realización concreta, la expresión del gen esencial para el ensamblaje correcto de baculovirus está inactivado por el silenciamiento mediado por ARN o la interferencia por ARN (Salem y Maruniak, 2007, Kanginakudru et al., 2007). Preferiblemente, se establece una línea celular procedente de células de insecto, en particular una línea celular procedente de Sf9, mediante la transformación estable de tal célula con una construcción que codifica un ARN bicatenario (dsRNA) específico del gen para silenciar la expresión del gen esencial para el ensamblaje correcto del virión de baculovirus. Esta línea celular que expresa el dsRNA se utiliza para la expresión del producto biofarmacéutico después de la infección con el o los baculovirus recombinantes que llevan el gen que codifica dicho producto biofarmacéutico. En esta realización, se pueden generar uno o varios baculovirus recombinantes de reserva para siembra con las líneas celulares convencionales Sf9, Sf21 o High-Five (a saber, sin necesidad de una copia que complemente el gen de la célula), ya que, en este caso, el genoma del baculovirus comprende el gen de tipo silvestre esencial para el ensamblaje correcto del virión del baculovirus.

45 Aún en otra realización de la invención, el gen esencial para el ensamblaje correcto del virión de baculovirus se coloca bajo el control de un promotor inducible, lo que permite la expresión o bien la represión de dicho gen en condiciones controladas.

50 En una realización preferida, el número de viriones baculovíricos producidos con el procedimiento de la presente invención se reduce en al menos el 50% en comparación con el número de baculovirus que de otro modo produciría la célula productora de la sustancia biofarmacéutica mediante el uso de un genoma de baculovirus que comprende todos los genes esenciales para el ensamblaje correcto de los viriones baculovíricos. Más preferiblemente, el número de viriones baculovíricos se reduce al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90% y lo más preferiblemente al menos un 95% en comparación con un genoma de baculovirus de tipo silvestre.

Tal y como se explicó más arriba, el uso de sistemas de células de insecto y baculovirus para producir los productos

biofarmacéuticos en la técnica anterior se caracteriza por la coproducción de enormes cantidades de baculovirus recombinantes (y puede ser de más de  $10^8$  ufp/ml) en paralelo al producto biofarmacéutico, y que necesita desarrollar y optimizar cuidadosamente protocolos de procesamiento posteriores para inactivar y eliminar esta contaminación de baculovirus. La inactivación se puede realizar mediante la adición de una etapa de detergente que conduce a la desintegración de la capa lipídica del baculovirus contaminante, tal y como se utiliza para la purificación de las partículas simivíricas con el propósito de hacer vacunas (parvovirus porcino-VLP (Maranga et al. (2002)) o rotavirus-VLP (Mellado et al. (2008)) o la purificación de diferentes serotipos de AAV (Smith et al. 2009).

Se han utilizado más etapas de separación eficientes: centrifugación (Wang et al. (2000); Maranga et al. (2002); Mellado et al. (2008)), microfiltración (Tellez. (2005)), eliminación negativa de proteínas de baculovirus (p. ej., Mellado et al. (2008)) o cromatografía de afinidad positiva (retención/captura de una sustancia biofarmacéutica – por la que fluyen las proteínas contaminantes, tal como la captura de la proteína vp7 de rotavirus mediante la cromatografía con concanavalina A (Mellado et al. (2008)), captura de las partículas víricas químéricas e inmunógenas rVP2H de la bursitis infecciosa mediante cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados (Wang et al. (2000)) o la captura de diferentes serotipos de AAV mediante cromatografía de inmunoafinidad con anticuerpos camélidos (Smith et al., 2009). En particular, debido al uso de inmunoligandos muy específicos, el uso de la inmunoafinidad permite separar completamente la sustancia biofarmacéutica a purificar (p. ej., AAV específico) de cualquier contaminante y, en el caso del sistema de baculovirus, de la enorme contaminación con baculovirus debido a la producción concomitante de baculovirus en paralelo a la sustancia biofarmacéutica.

Estas referencias presentan con mucha claridad la necesidad de estas diferentes etapas de procesamiento para inactivar y eliminar los contaminantes residuales de baculovirus, ya que sin estas etapas, el producto biofarmacéutico todavía está considerablemente contaminado con diferentes proteínas de baculovirus y no se puede utilizar con fines clínicos.

El procedimiento de la presente invención permite una reducción significativa del número de viriones baculovíricos contaminantes o incluso su total ausencia. Como consecuencia, será necesario un pequeño número de etapas de purificación para conseguir una sustancia biofarmacéutica para propósitos clínicos (o incluso sin etapas de purificación si no se produce ningún virión baculovírico). Así pues, la producción biofarmacéutica y el protocolo de purificación se simplifican con el uso del procedimiento de la presente invención, y la necesidad de eliminar el virión de baculovirus residual se reduce enormemente. En caso de que aún haya que aplicar un protocolo de purificación simplificado, el experto en la técnica puede seleccionar al menos uno de los procedimientos y los protocolos identificados más arriba para obtener un producto biofarmacéutico purificado.

Preferiblemente, el gen esencial seleccionado es un gen cuya inactivación no afecta a la expresión génica muy tardía del baculovirus, en comparación con el vector baculovírico original. En el genoma del AcMNPV (y otros  $\alpha$ -baculovirus), los promotores de p10 y de la polihedrina son los promotores que se expresan más tarde y se debe observar que, en los sistemas de producción de células de insecto y baculovirus, el gen heterólogo se inserta con más frecuencia bajo el control de estos promotores muy fuertes, lo que permite la expresión de proteínas recombinantes en grandes cantidades. Así pues, se prefiere la inactivación de un gen esencial para el ensamblaje correcto del virión de baculovirus, que no afecta a la expresión génica muy tardía. La terminología «no afecta la expresión génica muy tardía» se refiere al hecho de que el nivel de expresión de la proteína recombinante a partir del promotor baculovírico muy tardío comprendido en el genoma de un baculovirus modificado de acuerdo con la invención es al menos del 70% en comparación con los niveles obtenidos de un genoma sin modificar, más preferiblemente de más del 80%, más preferiblemente de más del 90%. Se debe mencionar que el nivel de expresión de un producto biofarmacéutico a partir de un promotor baculovírico muy tardío podría incluso ser mayor del 100% del nivel obtenido con el vector no modificado en el procedimiento de la presente invención.

Entre los genes analizados por los inventores, el gen vp80 se utiliza en la presente invención ya que su deleción no afecta a la expresión muy tardía, mientras que impide por completo la producción de BV y da lugar a una reducción significativa del número de nucleocápsidas intracelulares, los precursores de los ODV.

La expresión muy tardía se puede evaluar al colocar un gen indicador, por ejemplo, un gen que codifica una GFP, en particular *egfp* o un gen de la luciferasa, bajo el control del promotor de la polihedrina o de p10 en un vector de AcMNPV de tipo silvestre y en un genoma mutante de AcMNPV en el cual se ha inactivado el gen esencial, y la comparación de la expresión del producto del gen indicador en ambos genomas. Preferiblemente, la expresión muy tardía del vector con un esqueleto de baculovirus mutado es al menos del 60% del nivel de expresión obtenido con el vector de AcMNPV de tipo silvestre y preferiblemente de más del 80%, más preferiblemente de más del 90%, según se mide a partir de un gen indicador bajo el control del promotor del gen de p10 o bien del gen de la polihedrina.

55 La presente descripción también se refiere a un procedimiento para cribar genes baculovíricos, cuya inactivación podría ser útil para producir productos biofarmacéuticos sin viriones baculovíricos contaminantes en un sistema de célula de insecto y baculovirus según se define más arriba, que comprende:

- a) proporcionar un cultivo de células, o células, que contienen un genoma baculovírico;
- b) poner en contacto dicho cultivo de células con medios para inactivar al menos un gen baculovírico problema de dicho genoma baculovírico, por ejemplo, con ARN interferentes; y
- 5 c) analizar la formación de viriones de dicho cultivo de células en comparación con la formación de viriones a partir de un cultivo de células que no ha estado en contacto con dichos medios;
- en donde se selecciona un gen problema como potencialmente útil para producir productos biofarmacéuticos si su inactivación reduce la formación de viriones baculovíricos.
- 10 En una realización concreta, el procedimiento de cribado comprende además la etapa d) de análisis de la expresión génica muy tardía en el cultivo de células puesto en contacto con dichos medios en comparación con la expresión génica muy tardía a partir de un cultivo de células que no se ha puesto en contacto con dichos medios,
- en donde un gen problema se selecciona como potencialmente útil para la producción de sustancias biofarmacéuticas si su inactivación reduce la formación de viriones baculovíricos y si no afecta a la expresión génica muy tardía de dicho genoma baculovírico.
- 15 La presente descripción también se refiere a un procedimiento para cribar genes baculovíricos, cuya inactivación podría ser útil para producir productos biofarmacéuticos sin viriones baculovíricos contaminantes en un sistema de células de insecto y baculovirus tal y como se define más arriba, que comprende:
- inactivar al menos un gen problema de un genoma baculovírico (por ejemplo, mediante la delección de dicho gen problema en dicho genoma);
- evaluar la expresión génica baculovírica muy tardía de dicho genoma baculovírico tal y como se define más arriba;
- 20 determinar la producción de viriones baculovíricos a partir de las células que contienen dicho genoma baculovírico;
- en donde un gen se selecciona como potencialmente útil para la producción de productos biofarmacéuticos si su inactivación
- reduce la producción de viriones baculovíricos, y
- no afecta a la expresión génica muy tardía de dicho genoma baculovírico, tal y como se define más arriba.
- 25 En una realización concreta del procedimiento para cribar un gen baculovírico, cuya inactivación podría ser útil para producir sustancias biofarmacéuticas, la inactivación del gen problema se lleva a cabo con un dsRNA específico de dicho gen problema. En particular, el gen baculovírico candidato se puede identificar al silenciar su expresión mediante interferencia por ARN para analizar su función en la formación del virión.
- 30 La invención se ilustrará ahora con los siguientes ejemplos, que se proporcionan como realizaciones de ejemplo no limitantes de la invención.
- Leyenda de las figuras**
- Figura 1. Cribado por silenciamiento génico mediado por dsRNA. Las células de insecto Sf9 se inocularon en placas de cultivo de tejidos de 24 pocillos ( $2 \times 10^5$  células/pocillo) en 1 ml de medio de cultivo Sf-900 II SFM a 28 °C. Al cabo de dos horas, se retiró el medio de cultivo y las células se infectaron con baculovirus recombinantes que llevan el gen *egfp* bajo el control del promotor de la polihedrina (AcMNPV-EGFP) en condiciones estándares. (A) Determinación del nivel de expresión génica muy tardía mediante microscopía fluorescente. Las células se infectaron a una MDI = 10 unidades de TCID<sub>50</sub>/célula y la transfección con el dsRNA específico de gen para *vp1054*, *vp39*, *vp80*, *dbp* y *ec-27* se realizó 1 h después de la infección (p.i.). El nivel de la expresión génica muy tardía se comprobó por fluorescencia específica de EGFP a 48 h p.i. Los dsRNA específicos de las secuencias de *egfp* y *cat* se utilizaron como controles de RNAi. (B) Medición del nivel de expresión génica muy tardía mediante un ensayo de inmunotransferencia. Las células se infectaron con AcMNPV-EGFP a una MDI = 1 y la transfección con el dsRNA específico de gen se realizó también 1 h p.i. El nivel de la expresión génica muy tardía se analizó con un antisero polyclonal anti-EGFP de conejo a las 48 h p.i. Se utilizaron anticuerpos anti-*vp39* y anti- $\alpha$ -tubulina como controles internos. (C) Titulación y detección de los viriones de gemación que se producen en las células tratadas con dsRNA. 35 Se recogieron los viriones de gemación a las 36 horas p.i. y se utilizaron para ensayos de dilución hasta el límite para medir los títulos de los viriones infecciosos, o bien para la detección por PCR para comprobar la presencia de las partículas víricas. (D) Presencia de viriones derivados por oclusión y estructuras con forma de bastoncillo en la células con represión de *vp39* y *vp80*. Las células se recogieron 36 horas p.i., se lisaron y los lisados celulares se ultracentrifugaron a través de un colchón de solución de sacarosa al 40% (45.000 rpm durante 1 hora, Beckman 40
- 40 SW55). Los sedimentos se resuspendieron en agua desmineralizada y se analizaron por microscopía electrónica con
- 45
- 50

tinción negativa. Las barras representan 100 nm.

Figura 2. Construcción del bácmido de AcMNPV con *vp80* anulado (*vp80-null*). (A) Estrategia para la construcción de un bácmido *vp80-null* que contiene una delección completa del marco abierto de lectura de *vp80* de AcMNPV por recombinación homóloga en *E. coli*. En la primera etapa, se delecionó un fragmento de 2.074 pb que abarca el ORF de *vp80* y se reemplazó por un casete de secuencia que contiene el gen de resistencia al cloranfenicol (*cat*) flanqueado por los sitios *loxP* modificados (LE y RE). Posteriormente se eliminó el gen de resistencia al antibiótico (*cat*) de la secuencia del bácmido mediante el sistema de recombinación *Cre/loxP*. La secuencia del promotor del gen *p48* y la señal de poliadenilación del gen *he65* permanecieron intactas. En el análisis por PCR se utilizaron parejas de oligonucleótidos del locus de tipo silvestre y dos genotipos con *vp80* anulado para confirmar la delección del ORF de *vp80* y la correcta inserción/delección del casete del gen de resistencia al cloranfenicol, como se indica mediante las flechas unilaterales. Sus nombres se asignan de acuerdo con las coordenadas de la secuencia de nucleótidos. Los cebadores para la amplificación del casete del gen *cat* se denominan cat-F y cat-R. (B). Detección por PCR de la presencia o ausencia de modificaciones de secuencia en el locus de *vp80* en los bácmidos de AcMNPV original (Ac-wt), Ac-*vp80*-null(+cat) y Ac-*vp80*-null(-cat). La figura superior confirma la delección del gen *vp80* y la inserción del casete de *cat* en el locus de *vp80* con las parejas de cebadores 90292/90889 y cat-F/cat-R. La figura inferior muestra la verificación por PCR de que la recombinación ocurrió correctamente en el locus de *vp80* mediante la pareja de cebadores 89507/91713.

Figura 3. Capacidad de replicación vírica de las construcciones de bácmidos de AcMNPV con el *vp80* anulado y reparado mediante los ensayos de transfección-infección. (A). Representación esquemática de los cassetes de expresión transpuestos en el locus de la polihedrina. Se hicieron cuatro construcciones de reparación (*vp80* impulsado por su promotor nativo, *vp80* impulsado por el promotor de la polihedrina, *vp80* etiquetado con FLAG en el extremo amino y *vp80* etiquetado con FLAG en el extremo carboxilo, ambos expresados desde su promotor nativo). Los esqueletos del genoma del bácmido utilizados para los ensayos de transfección se indican a la izquierda. Como control positivo de la replicación vírica, se utilizó el bácmido de AcMNPV de tipo silvestre (bMON14272). El bácmido Ac-*gp64*null se utilizó como control negativo que representa un bácmido prototípico con un fenotipo de «infección de una sola célula». (B). Microscopía de fluorescencia con el transcurso del tiempo que muestra la propagación de la infección por las células Sf9 transfectadas con las construcciones de bácmidos indicadas. El progreso de la infección vírica se comprobó mediante la detección de EGFP a los tiempos indicados después de la transfección. A las 120 horas p.t. se recogieron los sobrenadantes de los cultivos de células para iniciar una infección secundaria. (C) Ensayo de infección secundaria. La EGFP se detectó a las 72 horas p.i. para señalar el progreso de la infección.

Figura 4. Curvas de crecimiento de las construcciones generadas de bácmidos reparados de AcMNPV-*vp80*null en unos ensayos a lo largo del tiempo desde la transfección. Las células Sf9 se transfectaron con 5,0 µg de ADN de cada bácmido reparado. (a) *vp80* impulsado por su promotor nativo, (b) *vp80* impulsado por el promotor de la polihedrina, (c) *vp80* etiquetado con FLAG en el extremo amino y (d) *vp80* etiquetado con FLAG en el extremo carboxilo, ambos expresados desde el promotor de *vp80*. Los sobrenadantes de los cultivos de células se recogieron en los puntos de tiempo indicados después de la transfección y se les analizó la producción de virus de gemación infecciosos mediante un ensayo de dilución hasta el límite de la TCID<sub>50</sub>. La infectividad se determinó mediante la monitorización de la expresión de la EGFP. Los puntos indican el promedio de los títulos procedentes de tres transfecciones independientes y las barras de error representan la desviación estándar.

Figura 5. El mutante AcMNPV-*vp80*null es incapaz de producir ningún virión de gemación infeccioso o no infeccioso. Las células Sf9 se transfecaron independientemente con 20 µg del ADN de bácmido de Ac- $\Delta$ *vp80* (a), Ac-wt (b), Ac- $\Delta$ *vp80*-*vp80* (c), Ac- $\Delta$ *vp80*-pH-*vp80* (d), Ac- $\Delta$ *vp80*-FLAG-*vp80* (e) o Ac- $\Delta$ *vp80*-*vp80*-FLAG (f). Cinco días p.t., los sobrenadantes del cultivo de células enriquecidos en virus de gemación se ultracentrífugaron y los virus de gemación se observaron al microscopio electrónico con tinción negativa (A). Las barras representan 200 nm. En paralelo, los viriones de gemación recogidos también se separaron también en SDS-PAGE, se transfirieron, y se inmunodetectaron con anticuerpos anti-VP39 o se utilizaron para la detección por PCR de la presencia de las partículas víricas (B).

Figura 6. El bácmido mutante con el gen *vp80* anulado forma un número pequeño de nucleocápsidas y no produce viriones derivados por oclusión. Las células Sf9 transfectadas con Ac- $\Delta$ *vp80* (A a D), o bien con Ac- $\Delta$ *vp80*-*vp80* (E, F) o bien con Ac-wt (G, H) se fijaron, se tiñeron, se incluyeron y se obtuvieron cortes finos tal y como se describe en Materiales y Métodos. (A). Visión general representativa de la célula Sf9 transfectada con el bácmido mutante Ac-*vp80*null. (B) El mutante Ac-*vp80*null forma un número menor de nucleocápsidas en el estroma vírgeno (C), y tampoco ningún virión derivado por oclusión en la zona anular de las células transfectadas (D). Por otra parte, la construcción del bácmido de reparación Ac- $\Delta$ *vp80*-*vp80* regenera totalmente la formación de numerosas nucleocápsidas en el estroma vírgeno (E), así como viriones derivados por oclusión que parecen normales en la zona anular de las células transfectadas (F). Imágenes representativas del estroma vírgeno (G) y la zona anular (H) de las células transfectadas con el bácmido Ac-wt. Las barras representan 500 nm. Abreviaturas: Nc, nucleocápsida; MN, membrana nuclear; Nu, núcleo; RZ, zona anular; Mi, mitocondria; ODV, viriones derivados por oclusión; VS,

estroma virógeno.

Figura 7. Complementación funcional del bácmido mutante Ac-*vp80*null con el gen *vp80* actuando en *trans*. Las células Sf9 se transfecaron con el vector pLZ-flag-*vp80* (A) o bien pLZ (B) y se sometieron a la selección mediante Zeocin™. Tres semanas después de la transfección, las poblaciones policlonales de células resistentes a Zeocin™ se inocularon en placas nuevas de 6 pocillos y se transfecaron con el bácmido mutante Ac-*vp80*null para comprobar la actividad de complementación. La propagación del virus se monitorizó mediante la fluorescencia específica de la EGFP a las 72 h y las 96 h p.t. A las 120 horas p.t. se recogió el sobrenadante de los cultivos de células para iniciar una infección secundaria en las células Sf9 sin tratar (tipo silvestre) (panel derecho). La EGFP se detectó a las 72 horas p.i. para señalar el progreso de la infección. La EGFP se detectó a las 120 horas p.i. para señalar el progreso de la infección.

Figura 8. Construcción de un bácmido de AcMNPV con *vp39* anulado (*vp39*-null). (A) Estrategia para la construcción del bácmido *vp39*-null que contiene una delección parcial del marco abierto de lectura del *vp39* de AcMNPV mediante recombinación homóloga en *E. coli*. En la primera etapa se eliminó un fragmento interno de 498 pb del ORF de *vp39* y reemplazó por un casete cuya secuencia contiene el gen de resistencia al cloranfenicol (*cat*) flanqueado por los sitios *loxP* modificados (LE y RE). Posteriormente, el gen *cat* se eliminó de la secuencia del bácmido mediante el sistema de recombinación Cre/*loxP*. La secuencia de los promotores de los genes *lef-4* y *cg-30* no se vio afectada. Las flechas indican las posiciones de las parejas de oligonucleótidos utilizadas para el análisis por PCR del locus de tipo silvestre y dos genotipos con el *vp39* anulado para confirmar la delección parcial del ORF de *vp39* y la correcta inserción/delección del casete del gen *cat*. Los nombres de los cebadores se designan de acuerdo con las coordenadas de la secuencia de nucleótidos. (B) Detección por PCR de la presencia o ausencia de las modificaciones de secuencia en el locus de *vp39* de los bácmidos Ac-wt, Ac-*vp39*null(+*cat*) y Ac-*vp39*null(-*cat*). La figura muestra la verificación por PCR de que la recombinación ocurrió correctamente en el locus de *vp39* mediante la pareja de cebadores 75834/76420.

Figura 9. Determinación de la capacidad de replicación vírica de las construcciones de los bácmidos de AcMNPV con *vp39* anulado y reparado mediante los ensayos de transfección-infección. (A) Representación esquemática de los cassetes de expresión, transpuestos mediante *Tn7* en el locus de la polihedrina. (1) *vp39* expresado por el promotor de la polihedrina, (2) un doble gen *vp39* y *lef-4*, ambos impulsados por sus promotores nativos, (3) un doble gen *vp39* y *cg-30*, ambos impulsados por el promotor de la polihedrina y, finalmente, (4) una construcción génica doble de *vp39* etiquetado con FLAG en el extremo amino impulsado por el promotor de la polihedrina, y el ORF de *cg-30* impulsado por su promotor nativo y también por el promotor de la polihedrina más arriba en la secuencia. Los esqueletos del genoma del bácmido parental utilizados para los ensayos de transfección se indican a la izquierda. El bácmido de AcMNPV de tipo silvestre (bMON14272) se utilizó como control positivo de la replicación vírica. (B) Microscopía de la fluorescencia a lo largo del tiempo que muestra la propagación de la infección en las células Sf9 transfecadas con las construcciones de los bácmidos indicadas. La progresión de los virus se comprobó mediante la detección de la EGFP en los tiempos indicados después de la transfección. A las 168 horas p.t. se recogió el sobrenadante de los cultivos celulares para iniciar una infección secundaria. (C) Ensayo de infección secundaria. La detección de la EGFP se realizó a las 72 h p.i. para medir el progreso de la infección.

Figura 10. Construcción de un bácmido de AcMNPV con el *vp1054* anulado (*vp1054*-null). (A) Estrategia para la construcción de un bácmido *vp1054*-null que contiene una delección del marco abierto de lectura de *vp1054* de AcMNPV por recombinación homóloga en *E. coli*. Se eliminó una secuencia de 955 pb desde el extremo 3' del ORF de *vp1054* y se reemplazó por un casete con la secuencia de *cat* flanqueada por los sitios *loxP* modificados (LE y RE). Al mismo tiempo se introdujo una sola mutación puntual para cambiar el primer codón de traducción ATG→Met por ACG→Thr, para impedir que se tradujera una proteína VP1054 con el extremo carboxilo truncado. Esto también significa que el codón AAT interno n.º 32 de *lef-10* se mutó a AAC, y que ambos codifican una Asn. Posteriormente, el gen *cat* se eliminó con el sistema de recombinación Cre/*loxP*. La secuencia del promotor de *vp1054/lef-10* no se vio afectada en la construcción del bácmido. Ya que se eliminó la señal de poliadenilación del gen *lef-10*, una nueva señal poli-A sintética combinada con el codón de parada (TAATAAA) se le introdujo en el extremo 3' del ORF de *lef-10*. Las flechas representan la posición de las parejas de oligonucleótidos utilizadas para el análisis por PCR del locus de tipo silvestre y dos genotipos con *vp1054* anulado para confirmar la delección del ORF de *vp1054* y la correcta inserción/delección del casete de *cat*. (B) Detección por PCR de la presencia o ausencia de las modificaciones de secuencia en el locus de *vp1054* de los bácmidos Ac-wt, Ac-*vp1054*null(+*cat*) y Ac-*vp1054*null(-*cat*). La figura superior muestra la confirmación de la delección del gen *vp1054* y la inserción del casete de *cat* en el locus de *vp1054* mediante las parejas de cebadores 90292/90889 y cat-F/cat-R. La figura inferior muestra la verificación por PCR de que la recombinación ocurrió correctamente en el locus de *vp1054* mediante la pareja de cebadores 89507/91713.

Figura 11. Capacidad de replicación vírica de las construcciones de los bácmidos de AcMNPV con *vp1054* anulado y reparado mediante los ensayos de transfección-infección. (A) Representación esquemática de los cassetes de expresión transpuestos en el locus de la polihedrina. Los esqueletos del genoma de los bácmidos utilizados para los ensayos de transfección se indican a la izquierda. Se fabricaron dos construcciones procedentes de Ac-*vp1054*null:

la primera construcción lleva solo el gen marcador *egfp* bajo el control del promotor de p10, y la segunda construcción lleva el marcador *egfp* y el locus de *lef-10/vp1054* solapante impulsados por sus secuencias promotoras naturales (d). Como control positivo de la replicación vírica se utilizó el bácmido de AcMNPV de tipo silvestre (bMON14272) (a). El bácmido Ac-*gp64*null se utilizó como control negativo al representar un bácmido prototípico con un fenotipo de «infección de una sola célula» (b). (B) Microscopía de fluorescencia a lo largo del tiempo que muestra la propagación de la infección en las células Sf9 transfectadas con las construcciones de bácmidos indicadas. El progreso de la infección vírica se comprobó mediante la detección de la EGFP en los tiempos indicados después de la transfección. A las 120 horas p.t., el sobrenadante de los cultivos de células se recogió para iniciar una infección secundaria. (C) Ensayo de infección secundaria. Se detectó la EGFP a las 72 horas p.i. para señalar el progreso de la infección.

Figura 12. Construcción de un bácmido de AcMNPV con *p6.9* anulado (*p6.9*-null). (A) Estrategia para la construcción de un bácmido *p6.9*-null que contiene una delección completa del marco abierto de lectura de *p6.9* de AcMNPV por recombinación homóloga en *E. coli*. Se eliminó un fragmento de 164 pb del ORF de *p6.9* y se reemplazó por un gen de resistencia *cat* flanqueado por los sitios *loxP* modificados (LE y RE). Posteriormente, el gen *cat* se eliminó de la secuencia del bácmido por recombinación con *Cre/loxP*. La secuencia del promotor del gen *p6.9* no se vio afectada, ya que su secuencia se solapa con el ORF de *p40*. Las flechas representan las posiciones de las parejas de cebadores utilizadas en el análisis por PCR del locus de tipo silvestre y dos genotipos con el *p6.9* anulado. (B) Detección por PCR de la presencia o ausencia de las modificaciones de secuencia en el locus *p6.9* de los bácmidos Ac-wt, Ac-*vp6.9*null(+cat) y Ac-*vp6.9*null(-cat). La figura superior muestra la inserción del casete de *cat* en el locus de *p6.9* mediante las parejas de cebadores cat-F/cat-R. La figura inferior muestra la verificación por PCR de que la recombinación ocurrió correctamente en el locus de *p6.9* mediante la pareja de cebadores 86596/86995.

Figura 13. Capacidad de replicación vírica de las construcciones de los bácmidos de AcMNPV con *p6.9* anulado y reparado mediante ensayos de transfección-infección. (A) Representación esquemática de los casetes de expresión transpuestos en el locus de la polihedrina. Se fabricaron dos construcciones de reparación (los genes *p6.9* de AcMNPV y *p6.9* de SeMNPV, ambos impulsados por el promotor del *p6.9* de AcMNPV). Los esqueletos de los genomas de bácmido utilizados para los ensayos de transfección se indican a la izquierda. Como control positivo de la replicación vírica se utilizó el bácmido de AcMNPV de tipo silvestre (bMON14272). El bácmido Ac-*gp64*null se utilizó como control negativo al representar un bácmido prototípico con un fenotipo de «infección de una sola célula». (B) Microscopía de fluorescencia a lo largo del tiempo que muestra la propagación de la infección en las células Sf9 transfectadas con las construcciones de bácmido indicadas. El progreso de la infección vírica se comprobó mediante la detección de la EGFP en los tiempos indicados después de la transfección. A las 120 horas p.t. se recogieron los sobrenadantes de los cultivos celulares para iniciar una infección secundaria. (C) Ensayo de infección secundaria. La EGFP se detectó a las 72 horas p.i. para señalar el progreso de la infección. (D) Comparación de las curvas de crecimiento de las construcciones AcMNPV-*p6.9*null (a), AcMNPV-*p6.9*null rescatado con *p6.9* de AcMNPV (b) y AcMNPV-*p6.9*null rescatado con *p6.9* de SeMNPV (c) con el bácmido de tipo silvestre (Ac-wt). Las células Sf9 se transfectaron con 5,0 µg de ADN de cada bácmido, los sobrenadantes de los cultivos celulares se recogieron en los momentos de tiempo indicados después de la transfección y se les analizó la producción de virus de gemación infecciosos mediante un ensayo de dilución hasta el límite de la TCID<sub>50</sub>. Se determinó la infectividad mediante la monitorización de la expresión de EGFP. Los puntos indican el promedio de los títulos procedentes de tres transfecciones independientes y las barras de error representan la desviación estándar.

Figura 14. Análisis por transferencia Western de Flag:vp80 en las células, de los BV y de los ODV

(A) Evolución temporal de la expresión de vp80 en las células de insecto infectadas. Las células Sf9 se infectaron con el virus de reparación Ac- $\Delta$ vp80-Flag·vp80, y se recogieron en los momentos de tiempo indicados. La Flag·VP80 se detectó mediante análisis por transferencia Western desde las 12 h a las 72 h p.i. como una banda de aproximadamente 95 kDa. Además, una segunda banda específica de Flag·VP80 de aproximadamente 80 kDa se acumuló desde las 48 h hasta las 72 h p.i. Se utilizó la tubulina como control de carga interna. (B) La VP80 se asocia a la fracción de la nucleocápsida de los BV. Dos días p.i., los BV se purificaron por ultracentrifugación isocinética en un gradiente de sacarosa y se separaron en fracciones de nucleocápsida (Nc) y envoltura (Env) mediante la extracción con Nonidet-P40. La Flag·VP80 se detectó en la fracción Nc como una doble banda con masas moleculares detectadas entre las dos variantes (80 kDa y 95 kDa) en las células Sf9 infectadas (panel superior). La separación correcta en las fracciones Nc y Env se comprobó mediante los anticuerpos anti-VP39 y anti-GP64 (paneles inferiores). (C) La VP80 también es un componente estructural de las nucleocápsidas de los ODV. Las células Sf9 se coinfectaron con los virus de la cepa E2 de AcMNPV (MDI = 5) y Ac- $\Delta$ vp80-Flag·vp80 (MDI = 25). Cinco días p.i., los ODV se liberaron de los cuerpos de oclusión y posteriormente se separaron en las fracciones de nucleocápsida (Nc) y envoltura (Env). El análisis por transferencia Western mostró que la VP80 está presente en la fracción Nc de DV como una sola banda de aproximadamente 80 kDa. El fraccionamiento adecuado en las fracciones Nc y Env se comprobó mediante el antisero anti-PIF-1 (panel inferior).

Figura 15. Complementación funcional mediante complementación en *trans* del bácmido Ac-*vp80*null incapaz de producir BV. (A) Detección de FLAG:VP80 en una línea de células procedentes de Sf9 transgénicas (Sf9-*vp80*)

mediante análisis por transferencia Western. Se utilizó la tubulina como control de carga interno. (B) Microscopia de fluorescencia (de EGFP) a lo largo del tiempo para seguir la infección de las células Sf9-vp80 transfectadas (i) o infectadas (ii) con el bárcmido Ac- $\Delta$ vp80 (a, b). A las 120 h p.t., los sobrenadantes de los cultivos celulares se recogieron para iniciar una infección secundaria en las células Sf9-vp80 (a) o en las Sf9 (b) (paneles de la derecha). 5 Se propagó un control negativo Ac- $\Delta$ vp80 en las células Sf9 (c), y el Ac-wt propagado en las células Sf9 (d) se utilizó como control positivo. (C) Comparación de la liberación de viriones infecciosos de BV. Las células Sf9-vp80 se transfectaron con el bárcmido Ac- $\Delta$ vp80 y las células Sf9 con el bárcmido Ac- $\Delta$ vp80 (control negativo) o bien con el Ac-wt (control positivo). Los BV se cuantificaron en los sobrenadantes de los cultivos celulares a los 6 días p.t. mediante dilución hasta el límite. Se muestran los resultados representativos de tres análisis independientes con 10 barras de error que muestran la DE.

Figura 16. Análisis de la expresión del gen foráneo mediante inoculación de baculovirus incapaces de replicarse, complementados en *trans*. Las células Sf9 se infectaron con inóculo del virus Ac-wt, Ac- $\Delta$ vp80-Flag:vp80 o Ac- $\Delta$ vp80 (MDI = 10, unidades de TCID<sub>50</sub> por célula), en donde todos expresan *egfp* desde el promotor muy tardío de p10. (A) A las 48 h p.i., la presencia de EGFP, Flag:VP80 y GP64 se analizó por transferencia Western. Se utilizó la actina como control de carga interno. (B) Microfotografías de células que expresan la EGFP a las 72 h p.i. (superior) y la cantidad relativa de EGFP se midió por ELISA a las 48 y 72 h p.i. (inferior). (C) Microfotografías de células que expresan la EGFP a las 72 h p.i. (superior) y el análisis de la liberación de BV para comprobar los genotipos revertentes mediante la titulación de TCID<sub>50</sub> (inferior). Los resultados de tres análisis independientes se muestran con barras de error (DE) (B y C).

Figura 17. La nueva estrategia de la tecnología de células de insecto y baculovirus diseñada para producir 20 sustancias biofarmacéuticas sin viriones baculovíricos contaminantes. (A) Manipulación genética de las células de insecto para que expresen un factor vírico esencial (vp80) que complementa una mutación de *vp80* en el virus. Las células Sf9 transgénicas codifican el ORF de *vp80* y un gen de resistencia que permite la selección con antibióticos de las células transgénicas. (B) Generación de un bárcmido Ac- $\Delta$ vp80 incapaz de producir viriones de BV y ODV. El 25 bárcmido carece de todo el ORF de *vp80*. (C) Producción de una reserva para inoculación de baculovirus mediante complementación en *trans* en las células Sf-vp80 manipuladas genéticamente. Las células Sf9-vp80 se transfectan con el bárcmido Ac- $\Delta$ vp80 para producir la progenie del virus por complementación en *trans*. Después de la propagación del virus de gemación, se producen reservas del virus de elevado título en las células para empaquetamiento de Sf9-vp80. (D) Expresión de la proteína recombinante con baculovirus. Las células Sf9 convencionales se infectan con la progenie de virus de gemación por complementación en *trans*. La proteína recombinante se expresa desde promotores baculovíricos muy tardíos (*p10* o *polh*), lo que permite una expresión 30 muy elevada, mientras que no se producen viriones baculovíricos (BV/ODV) contaminantes.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

#### 35 Materiales y métodos

##### Células de insecto y virus

Las células de *Spodoptera frugiperda* (Sf9) se mantuvieron en el medio SF900-II sin suero (Invitrogen) en 40 condiciones estándares. El virus AcMNPV procedente del bárcmido recombinante (AcMNPV-EGFP) que lleva un gen indicador *egfp* bajo el control del promotor de la polihedrina, muy tardío, transpuesto en el locus de la polihedrina, se obtuvo de Pijlman et al. (2006). El virus se propagó y se determinaron sus títulos mediante un ensayo de dilución hasta el límite en las células Sf9.

##### Síntesis *in vitro* del dsRNA

El procedimiento utilizado para sintetizar el dsRNA es similar al descrito por Ramadan et al., (2007) con 45 modificaciones menores. Todos los moldes de ADN se amplificaron por PCR con cebadores con extremos protuberantes de veinticinco nucleótidos homólogos a la secuencia del promotor de la ARN polimerasa de T7 5'-gcttctaatacgactcactataggg-3'. La secuencia de los cebadores que se indican a continuación se ofrecen en la tabla 1. Para amplificar estos genes se utilizaron los siguientes cebadores: los cebadores vp39-F y vp30-R para vp39; los cebadores 45510 y 46235 para vp1054, los cebadores 90292 y 90889 para vp80; los cebadores ec-27-F y ec-27-R para odv-ec27; y los cebadores dbp-F y dbp-R para dbp. Para analizar la eficacia de los estudios de RNAi, 50 fabricamos dsRNA contra *egfp* con los cebadores gfp-F y gfp-R, y para tener un control negativo fabricamos dsRNA con los cebadores cat-F y cat-R para el gen de la cloranfenicol acetiltransferasa (cat).

Los productos de la PCR se purificaron con el kit GFX Illustra de purificación de banda en gel y de ADN de PCR (GE Healthcare, Buckinghamshire, Gran Bretaña) y se utilizaron como moldes para la síntesis *in vitro* del dsRNA con el sistema de RNAi T7 RiboMAX™ Express (Promega, Madison, WI, EE. UU.) de acuerdo con el protocolo del

5 fabricante. Brevemente, aproximadamente 1 µg de molde de ADN purificado se utilizó para la síntesis del ARN a 37 °C durante 4 h. Después de la síntesis, se retiraron los moldes de ADN mediante digestión con ADNasa. Las hebras de ARN complementarias se hibridaron mediante incubación a 70 °C durante 10 min y luego un enfriamiento lento a temperatura ambiente (aproximadamente 30 min). Las moléculas de ARN sin hibridar (monocatenarias) se degradaron mediante el tratamiento con la ARNasa A (30 min, 37 °C). Finalmente, el dsRNA se precipitó con isopropanol, se resuspendió en agua estéril tratada con DEPC a una concentración final de 0,5-1 mg/ml y su pureza e integridad se comprobaron mediante electroforesis en gel de agarosa. El dsRNA se mantuvo a -80 °C en alícuotas de 40 µl. Inmediatamente antes de la transfección, el dsRNA se descongeló en hielo.

#### Procedimiento de RNAi en las células de insecto infectadas con baculovirus

10 Las células Sf9 se inocularon en placas de cultivo de 24 pocillos ( $2 \times 10^5$  células/pocillo) en 1 ml del medio de cultivo Sf900-II sin suero a 28 °C. Al cabo de dos horas se retiró el medio de cultivo y las células se infectaron con el baculovirus recombinante AcMNPV-EGFP a una multiplicidad de infección (MDI) de 10 unidades de TCID<sub>50</sub>/célula durante 1 h, en condiciones estándares. Una hora después de la infección (p.i.), el dsRNA (20 µg/pocillo) se introdujo en las células mediante transfección con Cellfectin™ (Invitrogen) en medio sin suero de Grace. Al cabo de 15 4 h, la mezcla de transfección se reemplazó por el medio Sf900-II sin suero. Las células se incubaron en total 48 h p.i. a 28 °C y, a continuación, se recogieron por centrifugación a 1000×g durante 5 min para el análisis por microscopía electrónica y transferencia Western. Sin embargo, una quinta parte del medio de cultivo se recogió a 36 h p.i. y se utilizó para la titulación de viriones de gemación mediante ensayos de dilución de punto final o para la detección del ADN vírico por PCR. En todos los experimentos, el dsRNA que corresponde al gen *cat* se tomó como control negativo. Por otra parte, el dsRNA específico del gen *egfp* se utilizó como control positivo para el procedimiento de RNAi.

#### Electroforesis en SDS-poliacrilamida y transferencia Western

25 Para la inmunodetección, las células Sf9 se lisaron a 95 °C durante 10 min en Tris-HCl a 125 mM, dodecilsulfato de sodio (SDS) al 2%, 2-mercptoetanol al 5%, glicerol al 10%, azul de bromofenol al 0,001%, pH 6,8. Las proteínas se separaron en geles de SDS-poliacrilamida al 10% y posteriormente se transfirieron a membranas de Immobilon-P (Millipore) por electrotransferencia semiseca. Las membranas se bloquearon durante 30 min en PBS a 1X que contiene leche en polvo desnatada al 2%, seguido de la incubación durante 1 h a temperatura ambiente con antisuero polyclonal anti-GFP de conejo (Molecular Probes), antisuero polyclonal anti-VP39 de conejo o antisuero monoclonal anti- $\alpha$ -tubulina (Sigma-Aldrich), todos diluidos a 1/2000 en PBS a 1X que contiene leche en polvo al 0,2%. Despues del lavado (3 × 10 min) en PBS a 1X, las membranas se incubaron con una dilución 1/4000 de anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo o bien anticuerpos de conejo anti-IgG de ratón conjugados a la fosfatasa alcalina (Sigma). Despues del lavado final (3 × 10 min) en tampón AP (Tris-Cl a 100 mM [pH 9,5], NaCl a 100 mM, MgCl<sub>2</sub> a 5 mM), las transferencias se revelaron con azul de nitrotetrazolio (NBT)/5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (BCIP) (Bio-Rad) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

#### 30 35 Preparación de ADN genómico de virus y su detección por PCR

35 Se recogieron 200 µl del medio de cultivo celular a las 36 h p.i. y se utilizaron para preparar el ADN vírico. Las células y los residuos celulares se retiraron de las muestras por centrifugación a 1000×g durante 5 min. Los sobrenadantes que contienen los viriones de gemación se transfirieron cuantitativamente a nuevos tubos estériles y se centrifugaron de nuevo a 12000×g durante 90 min. Los BV sedimentados se resuspendieron en 200 µl de tampón 40 TE (Tris-HCl a 10 mM [pH 7,5], EDTA a 1 mM) con proteinasa K (540 µg/ml) y se incubaron a 55 °C durante 2 h. Posteriormente se realizó una extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y una extracción con cloroformo. El ADN se precipitó por la adición de una cantidad igual de isopropanol y el sedimento se lavó con etanol al 70%. El sedimento de ADN se disolvió en 15 µl de agua estéril y 2 µl de la solución final de ADN se aplicaron a la detección por PCR de la secuencia del gen *vp39* con los cebadores mencionados más arriba. Todas las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de 25 µl que incluía: 2 µl de ADN, dNTP a 200 µM, 10 pmol de cada cebador, MgCl<sub>2</sub> a 1,5 mM, y 1,5 U de la ADN polimerasa GoTaq (Promega). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: una desnaturización inicial a 94 °C durante 2 min, y tras ella 30 ciclos de desnaturización (30 s a 94 °C), hibridación de cebadores (20 s a 60 °C) y extensión de cebadores (25 s a 72 °C). El ciclo de terminación era de 45 7 min a 72 °C. Los controles negativos estaban incluidos en todas las amplificaciones por PCR para comprobar los 50 contaminantes en los reactivos. Se analizaron alícuotas (3,0 µl) de los productos de PCR por electroforesis en geles de agarosa al 1,2% (p/v), con tampón TAE a 1X, teñido con bromuro de etidio (0,5 µg/ml).

#### 55 Generación de un bácmido de AcMNPV con *vp80* anulado (*vp80-null*) y sin el gen de resistencia a antibiótico

Para determinar si la proteína VP80 tiene una función esencial en el contexto de la producción de la progenie vírica, construimos un bácmido de AcMNPV (procedente de bMON14272 (de Invitrogen)) con una delección del ORF de *vp80* por recombinación homóloga en *E. coli*. Para llevar a cabo esto, se amplificó un gen *cat* flanqueado por los sitios *LoxP* mutantes (Suzuki et al., 2005) con los cebadores de PCR *vp80-KO-F* y *vp80-KO-R* (véase la tabla 1) a partir de un plásmido que comprende un gen *cat* flanqueado por los sitios *LoxP* mutantes. El fragmento de PCR

resultante, que contenía el gen *cat* flanqueado por los sitios *LoxP* mutantes y secuencias de aproximadamente 50 pb homólogas al AcMNPV con la región proximal en 5' o 3' del ORF de *vp80*, se trató con *DpnI* y se purificó en gel para eliminar el plásmido molde. A continuación, el producto de la PCR se introdujo por transformación en las células de *E. coli* DH10 $\beta$  que contienen bMON14272 (Invitrogen) y el plásmido pKD46 productor de la recombinasa Lambda RED (Datsenko y Wanner, 2000), que se había preparado de la siguiente manera. Las células de *E. coli* transformadas DH10 $\beta$ -bMON14272/pKD46 se hicieron crecer en cultivos de 50 ml de LB (peptona al 2,0%, extracto de levadura al 0,5%, NaCl a 85,5 mM, [pH 7,0]) con kanamicina (50  $\mu$ g/ml), ampicilina (100  $\mu$ g/ml) y L-arabinosa (1,5 mg/ml) a 30 °C hasta una DO<sub>600</sub> de  $\approx$  0,6 y, a continuación, se hicieron electrocompetentes mediante un procedimiento estándar. Las células electroporadas se incubaron a 37 °C durante 3 h en 3 ml de medio LB y se sembraron en placas en LB-agar con cloranfenicol a una concentración de 6,5  $\mu$ g/ml. Después de incubar 48 h a 37 °C, las colonias resistentes al cloranfenicol se rasparon y sembraron en medio de LB-agar nuevo con cloranfenicol a 34  $\mu$ g/ml. Las placas se incubaron a 37 °C durante una noche y se seleccionaron las colonias resistentes al cloranfenicol para otra confirmación del genotipo relevante por PCR. Se utilizaron los cebadores 90292 y 90889 para confirmar la ausencia del ORF de *vp80* y los cebadores *cat*-F y *cat*-R se emplearon para verificar la presencia del casete *cat* en el bácmido (se detallan las secuencias en la tabla 1).

Para eliminar del esqueleto del bácmido el gen de resistencia a antibiótico introducido (*cat*), se empleó un sistema de recombinasa Cre/LoxP. Un plásmido pCRE que lleva la recombinasa Cre obtenido de Jeanine Louwerse (LUMC Leiden, Países Bajos) se introdujo en las células de *E. coli* DH10 $\beta$ -bMON14272-*vp80*null y la expresión de CRE se indujo posteriormente mediante la adición de isopropiltiogalactósido (IPTG). Brevemente, las células electroporadas se incubaron a 37 °C durante 3 h en 3 ml del medio LB (peptona al 2,0%, extracto de levadura al 0,5%, NaCl a 85,5 mM, [pH 7,0]) y se sembraron en placas con el medio LB-agar que contienen kanamicina a 50  $\mu$ g/ml, ampicilina a 100  $\mu$ g/ml e IPTG a 2 mM. Después de incubarlas 24 h, las colonias resistentes a kanamicina y ampicilina se seleccionaron para hacer otra verificación del genotipo deseado por PCR. En el análisis por PCR, los cebadores 89507 y 91713 (tabla 1) se utilizaron para verificar la eliminación del gen *cat* del esqueleto del bácmido. Los clones positivos también se confirmaron por secuenciación del ADN.

Para recuperar la competencia de la transposición, el plásmido pMON7124 (Invitrogen) que codifica la transposasa cooperadora se volvió a introducir en las células de *E. coli* DH10 $\beta$ -bMON14272-*vp80*null. Finalmente, el gen indicador *egfp* se introdujo en el bácmido *vp80*-null para facilitar la observación de su comportamiento en las células de insecto. Brevemente, el gen indicador *egfp* se amplificó con los oligonucleótidos de PCR *gfp*-*Nhe*I-F y *gfp*-*Sph*I-R (tabla 1) a partir del plásmido pEGFP-N3 (Clontech). El producto de la PCR se clonó en el plásmido pJet1.2/Blunt con el kit de clonación de productos de PCR CloneJET<sup>TM</sup> (Fermentas) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Posteriormente, el ORF de *egfp* se escindió del pJET1.2-*egfp* sin errores con *Nhe*I y *Sph*I y se subclonó en el pFastBacDUAL (Invitrogen) digerido con *Nhe*I y *Sph*I para generar el plásmido pFB-*egfp*. Un casete de expresión que contiene el gen indicador *egfp* bajo control transcripcional del promotor muy tardío de p10 se transpuso desde el pFB-*egfp* al locus de la polihedrina del bácmido *vp80*-null, tal y como se describe en el manual de Bac-to-Bac (Invitrogen). En el genoma resultante se ha retirado el ORF completo de *vp80* (véase la figura 2). Esto corresponde a la delección de 2074 pb de las posiciones de nucleótidos 89564 a 91637 en el genoma del clon C6 de AcMNPV dado a conocer en la SEQ ID n.º 1.

#### Construcción de los bácmidos *vp80*-null reparados

Para preparar los vectores donantes de reparación de *vp80*, modificamos el plásmido pFB-*egfp* (véase más arriba) por retirada del promotor de la polihedrina y su reemplazo por un fragmento que contiene la región del promotor de *vp80* y el ORF de *vp80*. Primero se amplificó un fragmento de 2300 pb que contiene el promotor de *vp80* y la secuencia del ORF mediante los cebadores *pvp80-Stu*I-F y *vp80-Xba*I-R (tabla 1) del molde del bácmido bMON14272, y se clonó en el vector pJet1.2/Blunt (Fermentas) para formar el pJet1.2-*pvp80*-*vp80*. Después de la verificación de la secuencia de ADN, el casete de *vp80* se escindió del pJet1.2-*pvp80*-*vp80* mediante la doble digestión con *Stu*I y *Xba*I y, a continuación, se subclonó en el pFB-*egfp* digerido con *Bst*I1071 y *Xba*I y purificado en gel para generar el plásmido donante pFB-*egfp*-*pvp80*-*vp80*. En paralelo se construyó un plásmido donante pFB-*egfp*-*polh*-*vp80*, en donde el ORF de *vp80* está impulsado por el promotor muy tardío de la polihedrina (polh). Con este objetivo, un fragmento de 2105 pb que lleva el ORF de *vp80* se amplificó con los cebadores *vp80-Sac*I-F y *vp80-Xba*I-R (tabla 1) y se clonó en el pJet1.2/Blunt para generar el pJet1.2-*vp80*. En la etapa final, se escindió el ORF de *vp80* (*Sac*I/*Xba*I) del pJET1.2-*vp80* y se subclonó en el pFB-*egfp* digerido con *Sac*I y *Xba*I para crear el pFB-*egfp*-*polh*-*vp80*.

Para solucionar un problema asociado a que no se dispone del anticuerpo anti-VP80, se le añadió la etiqueta FLAG (fusión en el extremo amino y en el carboxilo) a VP80 para facilitar la inmunodetección. La secuencia de FLAG-*vp80* fusionada en el extremo amino se generó mediante una estrategia de PCR de doble etapa, la llamada PCR de fusión. Primero, un fragmento de 259 pb que contiene el promotor de *vp80* y la etiqueta FLAG se amplificó por PCR con los cebadores *pvp80-Stu*I-F y *vp80-FLAG-R1* a partir del bácmido molde bMON14272. Después de la purificación en gel y la cuantificación del ADN, se utilizó el fragmento de 259 pb como cebador directo en una segunda etapa de amplificación por PCR con el cebador inverso *vp80-Xba*I-R en el bácmido molde bMON14272. El

5 producto final de la PCR (2324 pb) se clonó en el vector pJet1.2/Blunt (Fermentas) para formar el pJet1.2-pvp80-FLAG-vp80. Después de verificar la secuencia del ADN, el casete FLAG-vp80 se escindió de pJet1.2-pvp80-FLAG-vp80 mediante la doble digestión con *Sst*I y *Xba*I y, a continuación, se subclonó en el pFB-egfp purificado en gel y digerido con *Bst*11071 y *Xba*I para generar el plásmido donante pFB-egfp-pvp80-FLAG-vp80. El casete vp80-FLAG con la fusión en el extremo carboxilo se amplificó con pvp80-*Sst*I-F y pvp80-FLAG-R a partir del bárcmido molde bMON14272. El fragmento de 2324 pb se clonó en el pJet1.2/Blunt y posteriormente se transfirió al pFB-egfp de una manera similar a la de las construcciones anteriores.

10 Los insertos de todos los plásmidos donantes desarrollados se transpusieron en el bárcmido vp80-null siguiendo el protocolo Bac-to-Bac (Invitrogen). El cribado de las construcciones donde se produjo la transposición en el locus de *polh* se hizo mediante el ensayo por PCR triple que emplea los cebadores directo e inverso de M13 y un cebador GenR específico del gen de resistencia a la gentamicina (tabla 1).

#### Ensayo de transfección-infección

15 Los ADN de los bárcmidos se prepararon a partir de cultivos bacterianos de una noche en 1,5 ml inoculados con 2 a 3 colonias independientes que llevan el bárcmido con el gen heterólogo insertado de acuerdo con el manual Bac-to-Bac (Invitrogen) y se analizaron en paralelo. Para las transfecciones se utilizó 1 µg de cada preparación de ADN de bárcmido para transfectar  $1 \times 10^6$  células Sf9 en una placa de 6 pocillos mediante el protocolo de transfección con Cellfectin™ tal y como se describe en el manual Bac-to-Bac (Invitrogen). De 72 h a 120 h después de la transfección (p.t.), se comprobó la propagación vírica mediante microscopía de fluorescencia. A las 120 h p.t., el medio de cultivo celular se centrifugó durante 5 min a 2000×g para retirar los residuos celulares y este sobrenadante aclarado se utilizó para infectar  $1,5 \times 10^6$  células Sf9 en las placas de 6 pocillos. Al cabo de 72 p.i., la diseminación de la infección del virus se monitorizó de nuevo mediante microscopía de fluorescencia. En todos los experimentos se utilizó como control positivo un bárcmido bMON14272 de tipo silvestre que lleva el gen indicador *egfp* bajo control del promotor de p10. Un bárcmido bMON14272-*gp64*null que también lleva el gen indicador *egfp* bajo control del promotor de p10 sirvió como control negativo porque había perdido la capacidad de transmisión de la infección de una célula a otra (Lung et al., 2002).

#### Caracterización a lo largo del tiempo de la propagación vírica en el cultivo celular

30 Se realizaron análisis a lo largo del tiempo para comparar la producción de virus de gemación del virus AcMNPV-vp80null y las diferentes construcciones de reparación en comparación con el bárcmido de AcMNPV de tipo silvestre (Ac-wt) que contiene *egfp*. Brevemente, las células Sf9 se inocularon en placas de cultivo de tejidos de 6 pocillos ( $1 \times 10^6$  células/pocillo en 1 ml de medio de cultivo Sf900-II sin suero a 28 °C). Al cabo de dos horas se retiró el medio de cultivo y las células se transfectaron con 5 µg del ADN del bárcmido, en las condiciones estándares que se recomiendan en el manual Bac-to-Bac (Invitrogen). Se recogieron los sobrenadantes de los cultivos celulares a las 24, 48, 72, 96 y 120 h p.t. y se les analizó la producción del virus de gemación infeccioso mediante un ensayo de dilución hasta el límite para determinar la dosis infecciosa 50 para el cultivo del tejido (TCID<sub>50</sub>). La infección se determinó mediante la monitorización de la expresión de *egfp* (a partir del promotor de p10). Se calcularon los valores promedio de los títulos infecciosos procedentes de tres transfecciones independientes y representaron en gráficos.

#### Microscopía electrónica de transmisión

40 Las células Sf9 de insecto se inocularon en un matraz 25T ( $3,5 \times 10^6$  células/matraz) y se transfectaron con 20 µg de las construcciones de bárcmido Ac-Δvp80, el Ac-Δvp80-vp80 de rescate o Ac-wt. Al cabo de 48 h p.t., las células se recogieron y prepararon para la microscopía electrónica de transmisión tal y como se ha descrito previamente (van Lent et al., 1990). Se examinaron las muestras y se fotografiaron con un microscopio electrónico Philips CM12.

#### Ensayo de producción del virus de gemación

45 Las células Sf9 de insecto se inocularon en dos matraces 25T ( $3,5 \times 10^6$  células/matraz) y se transfectaron con 20 µg de las construcciones de bárcmido Ac-Δvp80, Ac-Δvp80-vp80, Ac-Δvp80-pH-vp80, Ac-Δvp80-FLAG-vp80, Ac-Δvp80-vp80-FLAG o Ac-wt. Cinco días p.t. se recogieron los sobrenadantes de los cultivos celulares enriquecidos en BV y se ultracentrifugaron a través de un colchón de una solución de sacarosa al 10% (25.000 rpm durante 1,5 horas, Beckman SW32). Los viriones de gemación sedimentados se resuspendieron en agua desmineralizada estéril y se prepararon para la microscopía electrónica de tinción negativa, o bien para la electroforesis en SDS-poliacrilamida, o bien para la detección por PCR (como se menciona más arriba).

#### Purificación de ODV y estructuras con forma de bastoncillo a partir de las células infectadas

50 Se analizó por microscopía electrónica (EM) la presencia de ODV y estructuras de tipo bastoncillo en las células de insecto infectadas/transfectedas. Con este propósito, las células de insecto se recogieron 48 p.i., se lisaron, y los lisados celulares se ultracentrifugaron (45.000 rpm durante 1 hora, Beckman SW55) a través de un colchón de

sacarosa al 40% en tampón TE (Tris-HCl a 1 mM, pH 7,4, EDTA a 0,1 mM). Los sedimentos se resuspendieron en agua desmineralizada estéril y se analizaron mediante EM de tinción negativa tal y como se había descrito previamente (van Lent et al., 1990).

Desarrollo de la línea celular transgénica procedente de Sf9 que expresa *vp80*

- 5 Para desarrollar una línea celular que produce la proteína VP80, un fragmento de 2105 pb que lleva el ORF de *vp80* se amplificó con los cebadores *vp80-Sacl-F* y *vp80-Xba1-R* (tabla 1) y se clonó en el pJet1.2/Blunt para generar el pJet1.2-*vp80*. En la siguiente etapa se escindió el ORF de *vp80* (*Sacl/Xba1*) del pJet1.2-*vp80* y se subclonó en el pIZ digerido con *Sacl* y *Xba1* (Invitrogen) para crear el pIZ-*vp80*. El vector plasmídico resultante pIZ-*vp80* se linealizó con *Eco57I* y se purificó en gel. Las células Sf9 se inocularon en placas de seis pocillos ( $1 \times 10^6$  células/pocillo) y se 10 transfectaron con 10 µg del vector linealizado. Al cabo de 24 horas de la transfección, las células se seleccionaron mediante su cultivo en un medio que contiene Zeocin™ (300 µg/ml) durante 2 a 3 semanas hasta que ninguna célula Sf9 de control sobrevivió en las mismas condiciones. A continuación, las células se propagaron como una línea celular sin clonar.

Generación y caracterización de un bácmido de AcMNPV con *vp39* anulado (*vp39-null*)

- 15 Para estudiar la importancia del gen *vp39* en el contexto de la producción de la progenie vírica y el proceso de ensamblaje de las nucleocápsidas, construimos un bácmido de AcMNPV (bMON14272) con una delección de *vp39* por recombinación homóloga en *E. coli* de acuerdo con el mismo procedimiento que se observó anteriormente para la construcción del bácmido de AcMNPV *vp80null*. Ya que la secuencia del ORF de *vp39* se solapa con las 20 secuencias promotoras de los dos ORF flanqueantes (*cg-30* y *lef-4*), sólo se pudo eliminar una parte interna del ORF de *vp39* para evitar desregulaciones de la expresión de *cg-30* y de *lef-4*. Para llegar a esto, un gen *cat* flanqueado por los sitios *LoxP* mutantes se amplificó con los cebadores de PCR *vp39-KO-F* y *vp39-KO-R* (tabla 1) a partir de un plásmido que comprende un gen *cat* flanqueado por los sitios *LoxP* mutantes. El fragmento de PCR resultante, que contenía el gen *cat* flanqueado por los sitios *LoxP* mutantes y secuencias de aproximadamente 50 pb homólogas a una región interna del ORF de *vp39*, se trató con *DpnI* y se purificó en gel para eliminar el plásmido molde. A 25 continuación, el producto de la PCR se introdujo por transformación en las células de *E. coli* DH10β que contienen el bácmido bMON14272 (Invitrogen) y el plásmido pKD46 productor de la recombinasa Landa RED (Datsenko y Wanner, 2000) preparado de la manera mencionada más arriba. En la última etapa, las colonias resistentes a la kanamicina se analizaron por PCR con los cebadores 75834 y 76420 (tabla 1) para verificar la inserción o eliminación del gen *cat* del esqueleto del bácmido. Los clones positivos se verificaron adicionalmente por secuenciación del ADN de los productos obtenidos de la PCR. De acuerdo con este protocolo, se retiró una parte 30 interna (498 nt = 166 aa) del ORF de *vp39*, coordenadas: 75894-76391 como se indica en la figura 9.

Construcción y análisis de los bácmidos *vp39-null* reparados

- Para preparar un vector donante de reparación de *vp39*, modificamos el plásmido pFB-egfp (descrito más arriba) mediante la introducción del ORF de *vp39* bajo el control del promotor de la polihedrina. Inicialmente, se amplificó un 35 fragmento de 1.073 pb con los cebadores *vp39-Sacl-F* y *vp39-Xba1-R* (véase la tabla 1 para la secuencia de los cebadores) a partir del molde bMON14272 y se clonó en el vector pJet1.2/Blunt (Fermentas) para formar el pJet1.2-*vp39*. Después de la verificación de la secuencia del ADN, el ORF de *vp39* se escindió de pJet1.2-*vp39* por digestión doble con *Sacl/Xba1* y, a continuación, se subclonó en el pFB-egfp digerido con *Sacl/Xba1* y purificado en gel para 40 generar el plásmido donante pFB-egfp-*vp39*. Después de un intento infructuoso para rescatar el *vp39null* de AcMNPV con pFB-egfp-*vp39*, se preparó una serie de plásmidos donantes nuevos. Primero, un fragmento de 2.498 pb que contenía los ORF de *vp39* y *lef-4* se generó por PCR con los cebadores *vp39-Stu1-F* y *lef-4-Xba1-R* a partir del bácmido molde bMON14272 y se clonó en el vector pJet1.2/Blunt (Fermentas) para formar el pJet1.2-*vp39-lef-4*. 45 Después de la confirmación de la secuencia del ADN, el fragmento con los ORF de *vp39* y *lef-4* se escindió del pJet1.2-*vp39-lef-4* por digestión doble con *Stu1/Xba1* y, a continuación, se subclonó en el pFB-egfp digerido con *Stu1/Xba1* y purificado en gel para generar el plásmido donante pFB-egfp-*vp39-lef-4*.

- En paralelo se construyó el plásmido donante pFB-egfp-*vp39-cg30*, en donde la ORF de *vp39* y la de *cg-30* las impulsaba el promotor muy tardío de la polihedrina, y el ORF de *cg-30* también puede utilizar su promotor nativo situado en del extremo 3' del ORF de *vp39*. Brevemente, un fragmento de 1.868 pb que llevaba los ORF de *vp39* y *cg-30* se amplificó con los cebadores *cg30-Xba1-F* y *vp39-Xba1-R* (descritos más arriba) y se clonó en el pJet1.2/Blunt para generar el pJet1.2-*vp39-cg30*. El casete *vp39/cg-30* se subclonó como *Sacl/Xba1* en el pFB-egfp para crear el pFB-egfp-*vp39-cg30*. Adicionalmente se construyó un vector donante similar pFB-egfp-FLAG-*vp39-cg30*, en donde el ORF de *vp39* está etiquetado con FLAG en el extremo amino. Se empleó la misma estrategia para construir este vector, salvo que para amplificar el casete *vp39/cg-30* se utilizó el cebador inverso *vp39-FLAG-Sacl-R* en vez del cebador *vp39-Xba1-R*.

- 55 Todos los plásmidos donantes construidos se transpusieron en el bácmido *vp39-null* según el protocolo del kit Bacto-Bac (Invitrogen) y se detectó selectivamente según se detalla más arriba para los bácmidos de reparación de *vp80*. El análisis funcional se realizó como se describe más arriba para las construcciones de *vp80*.

Generación y análisis del bácmido de AcMNV *vp1054*-null

Para verificar la función esencial del gen *vp1054* en el contexto de la producción de la progenie vírica y el ensamblaje de las nucleocápsidas, construimos un bácmido de AcMNPV (bMON1472) con una delección de *vp1054* por recombinación homóloga en *E. coli* de acuerdo con el mismo procedimiento que para la construcción del bácmido *vp80* null con alteraciones menores. Ya que el ORF de *vp1054* se solapa con el ORF esencial de *lef-10*, no pudimos retirar el ORF entero de *vp1054* sino sólo una parte de 955 pb del extremo 3' del ORF. Para impedir la traducción del mutante VP1054 con el extremo carboxilo truncado en células de insecto, decidimos mutar el primer codón de traducción ATG →Met a ACG →Thr. Esta sustitución de un único nucleótido cambió también un codón interno, el n.º 32, de (AAT) a AAC en el ORF de *lef-10*, aunque ambos codifican el mismo aminoácido (Asn). Para cumplirlo, amplificamos el extremo en 5' del ORF de *vp1054* con los cebadores *vp1054*-KO-F y *vp1054*-KO-R1 a partir del bácmido bMON14272 (Invitrogen). El producto de la PCR de 214 pb contenía una mutación del codón de inicio ATG del ORF de *vp1054*, introdujo una secuencia señal de parada/poli-A sintética para el ORF de *lef-10*, y tiene un extremo 3'-protuberante con homología al casete *cat* para facilitar la segunda PCR, y una secuencia de homología de 49 pb con el extremo en 5' del ORF de *vp1054* para mediar la recombinación homóloga dirigida por Lambda RED en *E. coli*. Después de la purificación en gel y la cuantificación del ADN, el fragmento de 214 pb se utilizó como cebador directo en una PCR de segunda etapa con el cebador inverso *vp1054*-KO-R2 con un plásmido que comprende un gen *cat* flanqueado por los sitios *LoxP* mutantes como molde. El fragmento de PCR resultante de 1.230 pb, que contenía el gen *cat* flanqueado por los sitios *LoxP* mutantes, un extremo en 5' mutado del ORF de *vp1054* y las secuencias de aproximadamente 50 pb homólogas a la región proximal en 5' o 3' del ORF de *vp1054*, se trató con *DpnI* y se purificó en gel para eliminar el plásmido molde. La recombinación de este producto de PCR con el bácmido bMON14272 se realizó tal y como se ha descrito más arriba para el mutante de *vp80*. Las colonias resistentes a la kanamicina se verificaron por PCR con las parejas de cebadores *cat*-F/*cat*-R, 45510/46235 y 45122 y 46411 para comprobar la inserción o eliminación del gen *cat* del esqueleto del bácmido. Los sitios de inserción también se confirmaron por secuenciación del ADN. Este procedimiento dio lugar a la delección de 955 pb de las posiciones nucleotídicas 45365 a 46319 en el genoma del clon C6 de AcMNPV dado a conocer en la SEQ ID n.º 1. Todas las secuencias de cebadores se ofrecen en la tabla 1.

Construcción de un bácmido reparado de *vp1054*-null

Para preparar el vector donante de reparación de *vp1054*, modificamos el plásmido pFB-egfp (descrito más arriba) mediante la retirada del promotor de la polihedrina y su reemplazo por un fragmento que contiene la región del promotor de *vp1054* y el ORF de *vp1054*. Primero, un fragmento de 1.714 pb que contiene el promotor de *vp1054* y la secuencia del ORF se amplificó con los cebadores *vp1054*-Rep-F y *vp1054*-Rep-R a partir del bácmido molde bMON14272, y se clonó en el vector pJet1.2/Blunt (Fermentas) para formar el pJet1.2-pvp1054-*vp1054*. Después de la verificación de secuencia de ADN, el casete de *vp1054* se escindió del pJet1.2-pvp1054-*vp1054* mediante la digestión doble con *Stu*I y *Xba*I y, a continuación, se subclonó en el pFB-egfp purificado en gel y digerido con *Bst*11071 y *Xba*I para generar el plásmido donante pFB-egfp-pvp1054-*vp1054*. Los plásmidos donantes desarrollados se transpusieron en el bácmido *vp1054*-null según el protocolo de Bac-to-Bac (Invitrogen) y se detectaron selectivamente. Los bácmidos recombinantes se analizaron tal y como se detalló más arriba para los bácmidos de *vp80*.

Generación y análisis del bácmido de AcMNPV *p6.9*-null

Para verificar la función esencial de *p6.9* en el contexto de la producción de la progenie vírica, construimos un bácmido de AcMNPV (bMON1472) con una delección de *p6.9* por recombinación homóloga en *E. coli*. Para conseguirlo, un gen de resistencia al cloranfenicol (*cat*) flanqueado por los sitios *LoxP* mutantes se amplificó con los cebadores para PCR *p6.9*-KO-F y *p6.9*-KO-R a partir de un plásmido que comprende este gen *cat* flanqueado por los sitios *LoxP* mutantes. Se obtuvieron virus mutantes siguiendo el mismo procedimiento que para los otros mutantes. Para el análisis por PCR de los clones mutantes obtenidos al final, las parejas de cebadores *cat*-F y *cat*-R y 86596 y 86995 se utilizaron para comprobar la inserción o eliminación del gen *cat* del esqueleto del bácmido. Los clones positivos también se confirmaron por secuenciación del ADN. Este procedimiento da lugar a la delección de 164 pb de las posiciones nucleotídicas 86716 a 86879 en el genoma del clon C6 de AcMNPV dado a conocer en la SEQ ID n.º 1. Véase la tabla 1 para la secuencia de cebadores.

50 Construcción y análisis funcional de los bácmidos reparados de *p6.9*-null

Para preparar los vectores donantes de reparación de *p6.9*, se utilizó el vector pFB-GFP-*p6.9*, que fue construido por Marcel Westenberg (Universidad de Wageningen). Para fabricar este vector, la secuencia del promotor de *p6.9* de AcMNOV se amplificó a partir del plásmido pAcMP1 (Hill-Perkins y Possee, 1990) con los cebadores pp6.9-F y pp6.9-R con el sistema de PCR de alta fidelidad de moldes largos Expand (Roche). El producto de la PCR se clonó como un fragmento *Sall*I en el pFastBac1 (Invitrogen), del cual se delecionó el promotor de la polihedrina antes de fusionar el sitio *Bst*11071 al *Stu*I para obtener el pFB1-*p6.9*. El promotor *p6.9* del pFB1-*p6.9* se volvió a clonar como el fragmento *Sna*BI/*Bam*HI en los sitios *Bst*11071 y *Bam*HI del pFastBacDUAL (Invitrogen), con lo que se eliminó el

5 promotor de la polihedrina. Posteriormente, el gen indicador *egfp* se clonó detrás del promotor de p10 en el sitio *Xma*I para obtener el pFB-GFP-*p6.9*. Finalmente, los genes *p6.9* de AcMNPV y del MNPV de *Spodoptera exigua* (Se) se amplificaron por PCR del bácmido de AcMNPV (bMON14272) o bien del ADN genómico de SeMNPV con el sistema de PCR de alta fidelidad de moldes largos Expand y los cebadores que generan sitios *Eco*RI y *Not*I en los extremos en 5' y 3', respectivamente (tabla 1). Los productos de la PCR se clonaron detrás del promotor de *p6.9* entre los sitios *Eco*RI y *Not*I de pFB-GFP-*p6.9*. Todos los clones generados se secuenciaron para verificar las secuencias de *p6.9* incorporadas.

10 Los casetes de expresión de ambos plásmidos donantes desarrollados se transpusieron en el bácmido *p6.9-null* siguiendo el protocolo Bac-to-Bac (Invitrogen). El cribado de las construcciones positivas para la transposición en el locus *polh* se realizó mediante el ensayo por PCR triple como se describe más arriba para las construcciones de *vp80*. El análisis se realizó como para las construcciones de *vp80*.

## Resultados

### El silenciamiento del *vp80* de AcMNPV no afecta a la expresión génica muy tardía del baculovirus

15 Exploramos el efecto de transfectar las células Sf9 con diferentes dsRNA durante la infección con AcMNPV-GFP. Para desencadenar el silenciamiento inducido por el dsRNA sobre los genes baculovíricos seleccionados (*vp1054*, *vp39*, *vp80*, *dbp* y *odv-ec27*), generamos dsRNA específicos del gen mediante la síntesis *in vitro* con la ARN polimerasa de T7. Sin embargo, cuando empezamos estos estudios no estaba claro qué cantidad y qué momento de la transfección del dsRNA eran los más eficaces para silenciar los genes baculovíricos. Para determinar una cantidad óptima de dsRNA para los ensayos de RNAi en las células infectadas con baculovirus, primero intentamos 20 silenciar el gen *egfp* indicador con diferentes cantidades de dsRNA. Estos ensayos piloto demostraron que el efecto de RNAi más potente se consigue con 100 pg de dsRNA por célula (datos sin mostrar). Al mismo tiempo, también se demostró que el tratamiento de RNAi no tiene efectos negativos sobre la producción de la progenie de viriones de gemación infecciosos. También intentamos transfectar el dsRNA en las células en dos momentos de tiempo 25 diferentes, 24 h antes de la infección o 1 h p.i. Los resultados demostraron que la transfección realizada 1 h p.i. es más eficaz para el silenciamiento de los genes expresados en las fases tardía/muy tardía de la infección baculovírica, a diferencia de la transfección realizada 24 h antes de la infección (datos sin mostrar). Además, para asegurar que el silenciamiento era genoespecífico, el dsRNA que corresponde al gen *cat* se transfectó como control 30 negativo de RNAi. En este caso pudimos observar una inhibición moderada de la propagación de la infección del baculovirus en comparación con las células de insecto sin transfectar. Sin embargo, también se observó el mismo fenómeno cuando las células de insecto se trataron solo con reactivos de transfección. Por lo tanto, podemos concluir que el efecto se puede explicar por un impacto negativo (citotoxicidad) de la presencia de reactivos de transfección sobre la viabilidad celular.

35 El cribado del silenciamiento de los genes de baculovirus reveló que la represión de *vp1054*, *vp39*, *dbp* y *odv/ec-27* también está asociada a una reducción o inhibición de la expresión génica muy tardía medida mediante la detección de la EGFP (figuras 1A y 1B). La mayor inhibición se observó en las células en las que se actuó selectivamente sobre *dbp* y sobre *odv/ec-27*. La causa de este efecto se puede explicar por la presencia de transcritos de ARNm solapantes y bicistrónicos que se producen durante un ciclo de replicación del baculovirus. Finalmente, en el proceso 40 también podía intervenir una reacción cruzada con dianas que tienen poca similitud de secuencia. Sólo las células tratadas con el dsRNA de *vp80* mostraron un nivel de la expresión de EGFP similar al de las células sin transfectar o en particular al de células tratadas con el dsRNA de *cat*. Es importante que se observaran muy pocas células productoras de EGFP en las células de insecto donde se introdujo el dsRNA específico de *egfp* (control de RNAi positivo), lo que demuestra que la eficacia de la transfección era alta. Según nuestros logros sobre el cribado por RNAi, el gen (locus) *vp80* parece ser un candidato adecuado para la acción selectiva por RNAi en el contexto de la interferencia con la expresión génica muy tardía del baculovirus.

45 La anulación de *vp80* impide totalmente la producción de los BV y de los ODV de aspecto normal

50 Para determinar la importancia de los genes candidatos seleccionados (*vp1054*, *vp39*, *vp80*, *dbp* y *odv/ec-27*) en la producción de la progenie de viriones por gemación, al medio de cultivo celular (36 h p.i.) de las células tratadas con el dsRNA se le examinó la presencia de los BV. Las titulaciones por dilución hasta el límite confirmaron que todos los genes analizados son esenciales para la producción de la progenie infecciosa del virus por gemación (figura 1C). No fuimos capaces de detectar ningún BV infeccioso en las células en las que se actuó selectivamente sobre *vp80* y *dbp*. Además, el ensayo por PCR indicó que tampoco se producían las partículas víricas no infecciosas o defectuosas en las células en las que se actuó selectivamente sobre *vp80*. Es importante destacar que los resultados también mostraron una disminución significativa de la producción de BV infecciosos en los controles de RNAi (células tratadas con el dsRNA específico de *egfp* y *cat*) en comparación con las células sin transfectar. La citotoxicidad de los reactivos de la transfección es de nuevo la causa supuesta de este efecto negativo. El análisis 55 por microscopía electrónica de los lisados celulares mostró que la formación de los ODV y de las estructuras en forma de bastoncillo se inhibió totalmente en las células tratadas con el dsRNA de *vp39*, tal y como se esperaba

(figura 1D). La producción de los ODV y de las estructuras en forma de bastoncillo también se redujo significativamente en las células de insecto tratadas con el dsRNA de *vp80* (figura 1D). Sin embargo, en las células en las que se actuó selectivamente sobre *vp80* pudimos encontrar principalmente nucleocápsidas de fenotipos aberrantes (de forma puntiagudas). Por otra parte, la introducción del dsRNA de *cat* en las células de insecto no 5 ocasionó ningún cambio en la producción de los ODV.

El gen *vp80* de AcMNPV es esencial para la replicación vírica

Se construyó un virus de AcMNPV con delección tal y como se detalla en la figura 2. Se diseñaron construcciones de reparación de tal forma que el ORF del *vp80* de tipo silvestre o los genes *vp80* etiquetados con FLAG en el extremo amino o carboxilo junto con sus regiones del promotor de la polihedrina o nativas se insertaron en el locus de la 10 polihedrina junto al gen *egfp* bajo el promotor de p10 (figura 3A). Para investigar la función del gen *vp80*, las células Sf9 se transfecaron con las construcciones de bácmidos con anulación o de reparación y se les monitorizó la expresión de EGFP por microscopía de fluorescencia. Cuando el Ac-*vp80*null se introdujo en las células Sf9 no se 15 observó ninguna propagación vírica en el cultivo celular desde las 72 h y las 120 h p.t. Pudimos observar tan sólo un fenotipo de «infección de una sola célula» similar al fenotipo del bácmido Ac-*gp64*null (figura 3B). Los resultados indican que Ac-*vp80*null es capaz de alcanzar la fase muy tardía de infección como se confirmó mediante la 20 expresión de EGFP impulsada por el promotor de p10. Desde las 72 h a las 120 h p.t. se pudo observar la expresión generalizada de EGFP en monocapas de células de insecto que se transfecaron con las tres construcciones de reparación (*vp80* impulsado desde su promotor nativo, *vp80* impulsado desde el promotor de la polihedrina y *vp80* etiquetado con FLAG en el extremo amino impulsado por su promotor nativo), lo que indica que estos bácmidos eran 25 capaces de producir una cantidad viriones de gemación infecciosos que era suficiente para iniciar la infección secundaria a un nivel similar al del bácmido de tipo silvestre (figura 3B). En cambio, en las células de insecto transfecadas con las construcciones de reparación de *vp80* etiquetado con FLAG en el extremo carboxilo, la expresión de EGFP al cabo de 72 h p.t. sólo se observó en células aisladas que ya estaban transfecadas inicialmente, lo que indica que esta construcción de bácmido es incapaz de replicar el virus (figura 3B). Sin embargo, 30 al cabo de las 96 h p.t. se observó la formación de calvas diminutas y a las 120 h p.t. se desarrollaron muy pocas calvas de tamaño normal. Los resultados muestran que el mutante etiquetado con FLAG en el extremo carboxilo retrasa mucho la producción de virus de gemación y mostró que para la función de VP80 era muy importante que el extremo carboxilo estuviera sin modificar. A los 5 días p.t. se retiraron los sobrenadantes de los cultivos celulares y 35 se añadieron a las células Sf9 recién sembradas en placas y a continuación se incubaron durante 3 días para detectar la infección por el virus generado desde la células transfecadas con estos bácmidos. Tal y como se esperaba, las células Sf9 incubadas con los sobrenadantes de las transfecciones con construcciones de reparación contenían muchas células que expresaban la EGFP (figura 3C). No obstante, las células incubadas con el sobrenadante de las construcciones etiquetadas con FLAG en el extremo carboxilo presentaban una reducción significativa del número de células positivas para EGFP. Por otra parte, en las células de insecto incubadas con el sobrenadante de la transfección con el *vp80* anulado no se detectó ninguna expresión de EGFP en ningún momento 40 del tiempo analizado hasta las 72 h (figura 3C).

Además, para caracterizar el efecto exacto de la delección del gen *vp80* sobre la infección de AcMNPV, la propagación vírica en las células Sf9 transfecadas se comparó entre Ac-wt, Ac-*Δvp80*, Ac-*Δvp80*-*vp80*Rep, Ac-*Δvp80*-polh-*vp80*Rep, Ac-*Δvp80*-FLAG-*vp80*Rep y Ac-*Δvp80*-*vp80*-FLAGRep. Los sobrenadantes del cultivo celular 45 de las construcciones de los bácmidos anteriores se analizaron en los momentos de tiempo indicados en busca de la producción de BV (figura 4). Tal y como se esperaba, los virus reparados de Ac-*Δvp80*-*vp80*Rep, Ac-*Δvp80*-polh-*vp80*Rep, Ac-*Δvp80*-FLAG-*vp80*Rep mostraban una cinética de replicación vírica que concordaba con la propagación del virus de tipo silvestre (Ac-wt). La producción de viriones de gemación mediante el virus Ac-*Δvp80*-*vp80*-FLAGRep, con la etiqueta en el extremo carboxilo, se redujo a aproximadamente el 0,06% en comparación con el virus Ac-wt o los otros virus reparados.

Estos resultados indican que el gen *vp80* es esencial para la producción de BV infecciosos. Se ha demostrado con claridad que se puede eliminar toda la secuencia del ORF de *vp80* del esqueleto del bácmido y se puede rescatar adecuadamente mediante la introducción del ORF de *vp80* en un sitio heterólogo (locus de la polihedrina) del genoma. También se ha demostrado que la expresión del gen *vp80* se puede impulsar desde la secuencia del promotor heterólogo de la polihedrina sin ningún efecto negativo sobre la replicación vírica en el cultivo celular. Adicionalmente, observamos que el extremo amino, a diferencia del extremo carboxilo, del VP80 acepta que se le 50 hagan modificaciones génicas (marcación con etiquetas epítópicas). Señalamos que la cinética del virus con VP80 etiquetada con FLAG en el extremo carboxilo presentaba un retraso significativo cuando se comparó con otros virus de tipo silvestre o rescatados, lo que indica la importancia funcional del extremo carboxilo de VP80.

55 Se necesita VP80 para la producción de BV y de ODV

Los resultados descritos más arriba indicaban que el mutante Ac-*vp80*null no es capaz de producir ningún virus de gemación infecciosos. Sin embargo, también había una posibilidad de que el mutante pudiera aún producir partículas de gemación no infecciosas. Para investigar esta capacidad, las células Sf9 se transfecaron con las construcciones

de los bácmidos con anulación, de reparación o de tipo silvestre y los medios de cultivo celular se ultracentrifugaron para sedimentar los virus de gemación 7 días p.t. Los sedimentos formados se analizaron por microscopía electrónica de tinción negativa o bien mediante detección por PCR y transferencia Western para confirmar la presencia de los virus de gemación. Ningún virus de gemación intacto, ni partícula similivírica, ni sus estructuras (tal como la proteína principal de la cápsida VP39 y la secuencia del genoma vírico) aparecieron en el sedimento de las células transfectadas con el mutante Ac-*vp80*null (figuras 5A y 5B). Por otra parte, todas las construcciones de reparación analizadas produjeron virus de gemación de aspecto normal cuando se comparaban con el virus de gemación procedente del virus de tipo silvestre (figura 5A). No obstante, era muy difícil hallar viriones de gemación representativos en el sedimento de las células transfectadas con la construcción de reparación del gen *vp80* etiquetado con FLAG en el extremo carboxilo.

Para caracterizar adicionalmente el efecto de la delección del gen *vp80* sobre el ciclo de vida del baculovirus, se realizó microscopía electrónica con cortes ultrafinos generados a partir de células transfectadas con el bácmido. Las células transfectadas con Ac-*vp80*null desarrollaron típicamente el fenotipo de célula infectada con el baculovirus, con un núcleo alargado, una cromatina hospedadora fragmentada, un estroma virógeno electrodenso, etc. (figura 6A). La ausencia de VP80 no impidió la formación de nucleocápsidas de aspecto normal dentro del estroma virógeno (figura 6C). Las nucleocápsidas formadas eran fenotípicamente indistinguibles de las producidas por los bácmidos Ac-wt o Ac-*vp80*null reparado. Sin embargo, las nucleocápsidas ensambladas eran quizás menos abundantes que con las células transfectadas con los bácmidos Ac-wt o Ac-*vp80*null reparado (figuras 6E y 6G). Además, no se pudo observar ningún virión derivado por oclusión ni haces de nucleocápsidas antes de que apareciera una envoltura en el compartimento periestromal de un nucleoplasma (también llamado la zona anular) de las células transfectadas con el bácmido Ac-*vp80*null (figuras 6B y 6D). Parece ser que VP80 desempeña su función durante la maduración de las nucleocápsidas y/o su liberación o transporte desde el estroma virógeno. Finalmente, VP80 puede, de algún modo, contribuir a un ensamblaje de nucleocápsidas eficaz, lo que se podría explicar por que el número de nucleocápsidas presentes en el estroma virógeno de las células transfectadas con Ac-*vp80*null es pequeño. Cuando el gen *vp80* se introdujo de nuevo en el bácmido mutante, se pudieron observar muchas nucleocápsidas y viriones derivados por oclusión en las zonas del anillo de las células transfectadas (figura 6F). La abundancia y el aspecto de los viriones derivados por oclusión producidos en las células transfectadas con el bácmido con reparación Ac-*vp80*-*vp80* eran similares a los de los producidos con el bácmido de tipo silvestre (figuras 6F y 6H).

La función de VP80 se puede complementar mediante el gen *vp80* por acción en *trans*

Para demostrar que la función de VP80 se puede complementar mediante el ORF de *vp80* de acción en *trans*, se realizó un ensayo de complementación con una línea de células transgénica, Sf9-*vp80*, que estaba transformada de forma estable con el gen *vp80* expresado bajo el control de un promotor temprano de *ie-2* del baculovirus de *Orgyia pseudotsugata*. En el ensayo, las células Sf9 y Sf9-*vp80* se transfectaron con el bácmido mutante Ac-*vp80*null (figura 7). La diseminación de la infección del virus se monitorizó mediante fluorescencia específica de EGFP a las 72 h y a las 96 h p.t. En las células Sf9-*vp80* se pudieron observar calvas víricas, lo que demuestra la diseminación del virus. Por otra parte, en las células Sf9 sólo se pudo observar el fenotipo «infección de una sola célula» tal y como ya se describió más arriba. Al cabo de seis días, los sobrenadantes de cultivo de las células se recogieron y se utilizaron como un inóculo para infectar grupos nuevos de células Sf9. Al cabo de 5 días, las células positivas de EGFP se monitorizaron con microscopía de fluorescencia. Sólo se observó el fenotipo de «infección de una sola célula» en las células Sf9 que recibían el sobrenadante de las células Sf9-*vp80*. Como se suponía, no se detectó ninguna señal de EGFP en las células Sf9 que recibieron el sobrenadante de las células Sf9. Estos resultados demuestran que el Ac-*vp80*null se puede rescatar con las células que expresan VP80 (Sf9-*vp80*) y demuestran que la complementación observada se debe a la proteína VP80 expresada desde la línea celular hospedadora y no por la adquisición del gen *vp80* desde la línea celular. En otras palabras, los resultados satisfacen los requisitos que se le piden para producir productos biofarmacéuticos (proteína EGFP en nuestro modelo de ensayo) sin viriones baculovíricos contaminantes.

#### Generación y caracterización del bácmido *vp39*-null

Para estudiar la funcionalidad del gen *vp39* de AcMNPV durante la infección del virus, se construyó un bácmido de AcMNPV *vp39*-null mediante la delección parcial del gen *vp39*. La construcción con la delección se seleccionó por su resistencia al cloranfenicol, lo que indicaba que se había producido la delección específica de sitio del gen *vp39*. En el bácmido de AcMNPV *vp39*-null resultante, la parte interna del gen *vp39* estaba reemplazada correctamente por el gen *cat*. Posteriormente, el *cat* se eliminó por la recombinación *Cre/LoxP* (figura 8A). La secuencia de *vp39* se retiró desde los nucleótidos 75894 a 76391 de acuerdo con la secuencia del genoma del clón C6 de AcMNPV (SEQ ID n.º 1). La estructura de las construcciones con la delección de *vp39* se confirmó por PCR con los cebadores 75834 y 76420 (figura 8B). Se amplificó un fragmento de ADN de 647 pb cuando se utilizó como molde el bácmido de AcMNPV de tipo silvestre, mientras que se pudo amplificar un fragmento de ADN de 1.113 pb con el molde de AcMNPV *vp39*-null(+*cat*) (figura 8B). Cuando la construcción final de AcMNPV *vp39*-null(-*cat*) con eliminación del casete de *cat* se utilizó en el análisis por PCR, sólo se pudo detectar un pequeño fragmento de ADN de 183 pb (figura 8B). Los resultados se confirmaron por secuenciación del ADN.

El mapeo funcional del ORF de *vp39* indica una probable relación funcional entre los ORF de *vp39* y *cg-30*

Las construcciones de reparación se diseñaron de tal modo que el ORF de *vp39* de tipo silvestre bajo control de la secuencia del promotor de la polihedrina se insertó en el locus de la polihedrina junto con el gen *egfp* controlado por el promotor de p10 (figura 9A). Para estudiar la función del gen *vp39*, las células Sf9 se transfectaron con las construcciones de bácmidos con anulación o de reparación y se les monitorizó la expresión de EGFP mediante microscopía de fluorescencia. Cuando el Ac-*vp39*null se introdujo en las células Sf9, no se observó ninguna propagación vírica desde las 72 h a las 168 h p.t. Pudimos observar sólo un fenotipo de «infección de una sola célula» similar al fenotipo del bácmido Ac-*gp64*null (figura 9B).

Estos resultados indican que la construcción Ac-*vp39*null es capaz de alcanzar la fase muy tardía de la infección, tal y como se demuestra por la expresión de EGFP impulsada por el promotor de p10. Inesperadamente, no se pudo observar ninguna propagación vírica en las monocapas de células de insecto que se transfectaron con la construcción de reparación de *vp39* (*vp39* impulsado por la polihedrina, Ac- $\Delta$ *vp39*-polh-*vp39*Rep) (figura 3B). Por este motivo, decidimos preparar tres bácmidos más de reparación que llevaban los ORF de *vp39* y *lef-4* bajo el control de sus promotores nativos. Cuando las células de insecto se transfectaron con estas construcciones de reparación, de nuevo no se produjo la replicación vírica (figura 9B) y se observó un fenotipo de «infección de una sola célula» desde las 72 h a las 168 h p.t. Resulta interesante que en las monocapas de células de insecto que se transfectaron con las construcciones de reparación que llevan *vp39* (o *vp39* etiquetado con FLAG) y *cg-30* pudiéramos observar agrupaciones diminutas de células que expresaban la EGFP (3-5 células) (figura 9B). Sin embargo, no vimos una replicación vírica que se pudiera considerar completa, como la del vector de tipo silvestre (Ac-wt).

Al cabo de 7 días p.t. se recogieron los sobrenadantes de los cultivos de células y se añadieron a las células Sf9 recién sembradas en placas, que a continuación se incubaron durante 3 días para detectar la infección mediante los virus generados por las células transfectadas con todos los bácmidos mencionados aquí (figura 9C). Como se esperaba, las células Sf9 incubadas con el sobrenadante de las transfecciones de Ac-wt mostraron numerosas células que expresan la EGFP. Por otra parte, las células incubadas con los sobrenadantes de las construcciones Ac- $\Delta$ *vp39*-polh-*vp39*Rep y Ac- $\Delta$ *vp39*-*vp39*-*lef-4*Rep no mostraron ninguna célula positiva para la EGFP. Sin embargo, en las células de insecto incubadas con los sobrenadantes de Ac- $\Delta$ *vp39*-*vp39*-*cg30*Rep y Ac- $\Delta$ *vp39*-FLAG-*vp39*-Rep se detectaron muchas células que expresaban la EGFP (figura 9C). Estos resultados indicaron que se requiere una posible relación funcional entre los ORF de *vp39* y *cg-30* para la replicación del baculovirus.

Ya que la secuencia del ORF de *vp39* se solapa con las secuencias promotoras de los dos ORF flanqueantes (*lef-4* y *cg-30*), no pudimos eliminar el ORF de *vp39* completo en nuestra construcción de bácmido *vp39*null. Por lo tanto, también puede ser que se pudieran expresar el mutante o los mutantes truncados en el extremo carboxilo o amino de *vp39*, lo que podría interferir como un inhibidor competitivo con la proteína VP39 normal.

#### Construcción y análisis del bácmido *vp1054*-null

Para estudiar la funcionalidad del gen *vp1054* de AcMNPV durante la infección del virus, se construyó un bácmido de AcMNPV *vp1054*-null mediante la delección parcial del gen *vp1054* del bácmido de AcMNPV (bMON14272) por recombinación homóloga en *E. coli*. La construcción de delección se seleccionó por su resistencia al cloranfenicol, lo que indicaba que se había producido la delección específica de sitio del gen *vp1054*. En el bácmido de AcMNPV *vp1054*-null resultante, la parte de 955 pb del extremo 3' del gen *vp1054* se reemplazó correctamente por el gen *cat*. Posteriormente se eliminó el casete de resistencia antibiótica (*cat*) del esqueleto del bácmido mediante el sistema de recombinación *Cre/LoxP* (figura 10A). La secuencia eliminada se retiró de las coordenadas nucleotídicas 45365 a 46319 de acuerdo con la secuencia del genoma del clón C6 de AcMNPV (SEQ ID n.º 1). La estructura de todas las construcciones de delección se confirmó por PCR (figura 10B). Cuando el gen *vp1054* está presente, como en el bácmido parental de AcMNPV de tipo silvestre, se puede amplificar un producto de PCR de 775 pb con los cebadores 45510 y 46235, mientras que se produce un fragmento de PCR de 596 pb con los cebadores *cat*-F y *cat*-R sólo cuando el gen *cat* se introduce en la secuencia del bácmido en el caso de la construcción *vp1054*null(+*cat*) de AcMNPV (figura 10B). El procedimiento de recombinación correcta también se confirmó mediante el mapeo por PCR del locus de *vp1054* con los cebadores 45122 y 46441. Se amplificó un fragmento de ADN de 1.320 pb cuando se utilizó como molde el bácmido de AcMNPV de tipo silvestre, mientras que se pudo amplificar un fragmento de ADN de 1.353 pb en el molde de AcMNPV *vp1054*null(+*cat*) (figura 10B). Cuando la construcción final AcMNPV-*vp1054*null(-*cat*) con eliminación del casete de *cat* se utilizó en el análisis por PCR, sólo se pudo detectar un fragmento de ADN de 423 pb (figura 10B). Los clones positivos se verificaron con éxito por secuenciación del ADN.

El gen *vp1054* de AcMNPV es esencial para la replicación del virus

La construcción de reparación se diseña de tal manera que el ORF de *vp1054* de AcMNPV con su región promotora nativa se inserta en el locus de la polihedrina junto con el gen *egfp* bajo el control del promotor de p10 (figura 11A). Ya que el promotor de *vp1054* y la secuencia del ORF se solapa con el ORF de *lef-10*, la construcción de reparación también es capaz de expresar la LEF-10. Para estudiar la función del gen *vp1054*, las células Sf9 se transfectaron

con la construcción del bácmido con anulación de *vp1054* o bien con la de de reparación y se monitorizaron por la expresión de EGFP por microscopia de fluorescencia. Cuando la construcción Ac-*vp1054*null se introdujo en las células Sf9, no se observó ninguna propagación vírica en el cultivo celular desde las 72 h a las 120 h p.t. Pudimos observar sólo un fenotipo de «infección de una sola célula» similar al fenotipo del bácmido Ac-*gp64*null (figura 11B).

5 Los resultados indican que Ac-*vp1054*null es capaz de alcanzar la fase muy tardía de la infección, tal y como se confirmó mediante la expresión de EGFP impulsada por el promotor de p10. Es decir, los resultados sugieren que la expresión del factor de expresión tardío 10, LEF-10, no estaba afectado en el mutante del bácmido *vp1054*-null. Desde las 72 h a las 120 h p.t., la expresión generalizada de la EGFP se pudo observar en las monocapas de células de insecto que se transfecaron con las construcciones de reparación (Ac- $\Delta$ *vp1054*-*vp1054*). Los resultados 10 indican que el bácmido de reparación es capaz de producir una cantidad suficiente de viriones de gemación infecciosos para que se inicie la infección secundaria a un nivel similar a la del bácmido de tipo silvestre (figura 11B). Al cabo de 6 días p.t. se retiraron los sobrenadantes de los cultivos celulares y se añadieron a las células Sf9 recién 15 sembradas en placas, y a continuación se incubaron 3 días para detectar la infección por el virus generado desde las células transfecadas con estos bácmidos. Tal y como se esperaba, las células Sf9 incubadas con los sobrenadantes de las transfecciones con las construcciones de reparación mostraron numerosas células que expresan la EGFP (figura 11C). Por otra parte, en las células de insecto incubadas con el sobrenadante de la transfección con el Ac-*vp1054*null anulado no se detectó ninguna expresión de EGFP en ningún punto del tiempo analizado hasta las 72 h (figura 11C).

20 Estos resultados indican que el gen *vp1054* es esencial para la producción de BV infecciosos. Se ha demostrado con claridad que la parte de la secuencia de 955 pb del extremo 3' del ORF de *vp1054* se puede eliminar completamente del esqueleto del bácmido y se puede rescatar adecuadamente por la introducción del ORF de *vp1054* de AcMNPV en un sitio heterólogo (locus de la polihedrina) del genoma. Además, los resultados 25 demostraron que la delección del gen *vp1054* no altera la expresión génica muy tardía, como se demuestra mediante las células que expresan la EGFP entre las células transfecadas con el bácmido mutante Ac-*vp1054*null (figura 11B).

#### Generación y caracterización del bácmido *p6.9*null

Para estudiar la funcionalidad del gen *p6.9* de AcMNPV durante la infección del virus, se construyó un bácmido de AcMNPV *vp80*-null mediante la delección del gen *p6.9* del bácmido de AcMNPV (bMON14272) por recombinación homóloga en *E. coli*. La construcción con la delección se seleccionó por su resistencia al cloranfenicol, lo que 30 indicaba que se había producido la delección específica de sitio del gen *p6.9*. En el bácmido de AcMNPV *p6.9*-null resultante, el gen *p6.9* estaba reemplazado correctamente por el gen *cat*. Posteriormente se eliminó el casete de resistencia antibiótica (*cat*) del esqueleto del bácmido con el sistema de recombinación Cre/LoxP (figura 12A). La secuencia eliminada se retiró desde el codón de inicio de la traducción (ATG → Met) hasta el codón de parada (TAT → Tyr), coordenadas nucleotídicas 86716 a 86879 de acuerdo con la secuencia del genoma del clon C6 de 35 AcMNPV (SEQ ID n.º 1). No se eliminó el codón de parada del ORF de *p6.9* ya que su secuencia se solapa con el codón de parada del ORF flanqueante de *lef-5*. La estructura de todas las construcciones de delección se confirmó por PCR (figura 12B). Cuando el gen *p6.9* está presente, como en el bácmido de AcMNPV de tipo silvestre parental, solo se pudo amplificar un fragmento de PCR de 596 pb con los cebadores *cat*-F y *cat*-R cuando el gen *cat* se 40 introdujo en la secuencia del bácmido en el caso de la construcción *p6.9*null(+*cat*) de AcMNPV (figura 12B). Todos los procesos de recombinación correcta se pudieron confirmar también por PCR al mapear el locus de *p6.9* con los cebadores 86596 y 86995. Se amplificó un fragmento de ADN de 400 pb cuando se usó como molde un bácmido de 45 AcMNPV de tipo silvestre, mientras que se conseguía amplificar un fragmento de ADN de 1.220 pb con el AcMNPV *vp80*null(+*cat*) de molde (figura 12B). Cuando la construcción final AcMNPV-*vp80*null(-*cat*) sin el casete de *cat* se utilizó en el análisis por PCR, sólo se pudo detectar un fragmento pequeño de ADN de 290 pb (figura 12B). Los clones positivos se verificaron satisfactoriamente mediante secuenciación del ADN.

#### El gen *p6.9* de AcMNPV es esencial para la replicación vírica

50 Las construcciones de reparación se diseñaron de tal manera que los ORF de *p6.9* de tipo silvestre de AcMNPV o de SeMNPV con la región promotora de *p6.9* de AcMNPV se insertaron en el locus de la polihedrina con el gen *egfp* bajo el promotor de p10 (figura 13A). Para estudiar la función del gen *p6.9*, las células Sf9 se transfecaron con las construcciones de bácmido con anulación o de reparación de *p6.9* y se les monitorizó la expresión de la EGFP mediante microscopia de fluorescencia. Cuando el Ac-*p6.9*null se introdujo en las células Sf9, no se observó ninguna propagación vírica en el cultivo celular desde las 72 h a las 120 h p.t. Pudimos observar sólo un fenotipo de «infección de una sola célula» similar al fenotipo del bácmido Ac-*gp64*null (figura 13B). Los resultados indican que el Ac-*p6.9*null es capaz de alcanzar la fase muy tardía de infección como se confirmó por la expresión de la EGFP impulsada por el promotor de p10. Desde las 72 h a las 120 h p.t. se pudo observar la expresión generalizada de 55 EGFP en las monocapas de células de insecto que se transfecaron con las dos construcciones de reparación (Ac- $\Delta$ *p6.9*-*Acp6.9* y Ac- $\Delta$ *p6.9*-*Sep6.9*). Los resultados indican que estos dos bácmidos de reparación son capaces de producir una cantidad de viriones de gemación infecciosos suficientes para iniciar la infección secundaria a un nivel similar al del bácmido de tipo silvestre (figura 13B). A los 6 días p.t. se retiraron los sobrenadantes del cultivo celular

5 y se añadieron a las células Sf9 recién sembradas en placas y a continuación se incubaron durante 3 días para detectar la infección por el virus generado por las células transfectadas con estos bácmidos. Tal y como se esperaba, las células Sf9 incubadas con los sobrenadantes de las transfecciones con las construcciones de reparación mostraban numerosas células que expresaban la EGFP (figura 13C). Por otra parte, en las células de insecto incubadas con el sobrenadante de la transfección con el Ac-p6.9null anulado, no se detectó ninguna expresión de EGFP en ningún momento del tiempo analizado hasta las 72 h (figura 3C). Además, para caracterizar el efecto exacto de la eliminación del gen *p6.9* en la infección de AcMNPV, la propagación vírica en las células Sf9 transfectadas se comparó entre Ac-wt, Ac-Δp6.9, Ac-Δp6.9-Acp6.9Rep, Ac-Δp6.9-Sep6.9Rep. A los sobrenadantes del cultivo celular de todas las construcciones de bácmidos anteriores se les analizaron en los momentos de tiempo indicados la producción de BV (figura 13D). Tal y como se esperaba, los virus Ac-Δp6.9-Acp6.9Rep y Ac-Δp6.9-Sep6.9Rep mostraron una cinética de replicación vírica acorde con la propagación del virus de tipo silvestre (Ac-wt).

10 Estos resultados indican que el gen *p6.9* es esencial para la producción de BV infecciosos. Se ha demostrado con claridad que la secuencia completa del ORF de *p6.9* se puede eliminar totalmente del esqueleto del bácmido y que se puede rescatar adecuadamente mediante la introducción del ORF de *vp80* de AcMNPV en un sitio heterólogico (locus de la polihedrina) del genoma. También demostramos que el gen *p6.9* se puede complementar con eficacia mediante el ORF de *p6.9* procedente de SeMNPV (M. Westenberg). Además, los resultados demostraron que la delección del gen *p6.9* no altera la expresión génica muy tardía, tal y como se demuestra mediante las células que expresan la EGFP entre las células transfectadas con el bácmido mutante Ac-p6.9null (figura 15B).

15 Ejemplo 2. Los inventores han corregido el mejor modo de la presente invención en el siguiente ejemplo.

## 20 Materiales y Métodos

### Generación de un bácmido *vp80*-null de AcMNPV sin el gen de resistencia a antibióticos

25 Para determinar si la proteína VP80 desempeña una función importante en el contexto de la producción de la progenie vírica, construimos un bácmido de AcMNPV (derivado de bMON14272 (de Invitrogen)) con una delección del ORF de *vp80* por recombinación homóloga en *E. coli*. Para conseguirlo, un gen *cat* flanqueado por los sitios 30 *LoxP* mutantes (Suzuki et al., 2005) se amplificó con los cebadores para PCR *vp80*-KO-F y *vp80*-KO-R (véase la tabla 1) a partir de un plásmido que comprende un gen *cat* flanqueado por los sitios *LoxP* mutantes. El fragmento de PCR resultante, que contenía el gen *cat* flanqueado por los sitios *LoxP* mutantes y las aproximadamente 50 pb con homología de secuencia con AcMNPV con la región proximal en 5' o 3' del ORF de *vp80* se trataron con *DpnI* y se purificaron en gel para eliminar el plásmido molde. A continuación, el producto de la PCR se transformó en células de *E. coli* DH10 $\beta$  que contenían el bMON14272 (Invitrogen) y el plásmido pKD46 productor de la recombinasa Lambda RED (Datsenko y Wanner, 2000), que se habían preparado de la siguiente manera. Las células de *E. coli* transformadas DH10 $\beta$ -bMON14272/pKD46 se hicieron crecer en cultivos de LB de 50 ml (peptona al 2,0%, extracto de levadura al 0,5%, NaCl a 85,5 mM, [pH 7,0]) con kanamicina (50  $\mu$ g/ml), ampicilina (100  $\mu$ g/ml) y L-arabinosa (1,5 mg/ml) a 30 °C para una DO<sub>600</sub> de  $\approx$  0,6 y a continuación se hicieron electrocompetentes mediante un procedimiento 35 estándar. Las células electroporadas se incubaron a 37 °C durante 3 h en 3 ml de medio LB y se sembraron en placas en LB-agar que contenían cloranfenicol a una concentración de 6,5  $\mu$ g/ml. Después de una incubación de 48 h a 37 °C, las colonias resistentes al cloranfenicol se extendieron para aislar colonias en el medio LB-agar recién preparado con cloranfenicol a 34  $\mu$ g/ml. Las placas se incubaron a 37 °C durante una noche y las colonias 40 resistentes al cloranfenicol se seleccionaron para otra confirmación del genotipo pertinente por PCR. Los cebadores 90292 y 90889 se utilizaron para confirmar la ausencia del ORF de *vp80* y los cebadores *cat*-F y *cat*-R se emplearon para verificar la presencia del casete de *cat* en el bácmido (las secuencias se detallan en la tabla 1).

45 Para eliminar el gen de resistencia antibiótica introducido (*cat*) del esqueleto del bácmido, se empleó un sistema de la recombinasa Cre/*LoxP*. Un plásmido pCRE que lleva la recombinasa Cre, que se obtuvo de Jeanine Louwerse (LUMC Leiden, Países Bajos), se introdujo en las células de *E. coli* DH10 $\beta$ -bMON14272-*vp80*null y la expresión de CRE se indujo posteriormente mediante la adición del isopropilgalactosido (IPTG). Brevemente, las células electroporadas se incubaron a 37 °C durante 3 h en 3 ml de medio LB (peptona al 2,0%, extracto de levadura al 0,5%, NaCl a 85,5 mM, [pH 7,0]) y se sembraron en placas de medio LB-agar con kanamicina a 50  $\mu$ g/ml, ampicilina a 100  $\mu$ g/ml e IPTG a 2 mM. Después de la incubación de 24 h, las colonias resistentes a la kanamicina y a la ampicilina se seleccionaron para otra verificación del genotipo deseado por PCR. En los análisis por PCR, los cebadores 89507 y 91713 (tabla 1) se utilizaron para verificar la eliminación del gen *cat* del esqueleto del bácmido. Los clones positivos también se confirmaron mediante secuenciación del ADN.

55 Para recuperar la competencia de la transposición, el plásmido pMON7124 que codifica la transposasa cooperadora (Invitrogen) se volvió a introducir en las células de *E. coli* DH10 $\beta$ -bMON14272-*vp80*null. Finalmente, el gen indicador *egfp* se introdujo en el bácmido de *vp80*-null para facilitar la observación de su comportamiento en las células de insecto. Brevemente, el gen indicador *egfp* se amplificó con los oligonucleótidos para PCR *gfp*-*Nhe*I-F y *gfp*-*Sph*I-R (tabla 1) a partir del plásmido pEGFP-N3 (Clontech). El producto de la PCR se clonó en el plásmido pJet1.2/Blunt con el kit de clonación de PCR CloneJET<sup>TM</sup> (Fermentas) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Posteriormente

5 se escindió el ORF de *egfp* de pJet1.2-*egfp* sin errores con *Nhel* y *SphI*, y se subclonó en el pFastBacDUAL (Invitrogen) digerido con *Nhel* y *SphI* para generar el plásmido pFB-*egfp*. Un casete de expresión que contiene el gen indicador *egfp* bajo el control transcripcional del promotor muy tardío de p10 se transpuso desde pFB-*egfp* al locus de la polihedrina del bácmido *vp80*-null tal y como se describe en el manual de Bac-to-Bac (Invitrogen). En el genoma resultante, se ha eliminado el ORF de *vp80* completo (véase la figura 2). Esto corresponde a la delección del 2.074 pb desde las posiciones nucleotídicas 89564 a 91637 en el genoma del clon C6 de AcMNPV dado a conocer en la SEQ ID n.º 1.

#### Construcción de los bácmidos *vp80*-null reparados

10 Para preparar los vectores del donante de reparación de *vp80*, modificamos el plásmido pFB-*egfp* (descrito más arriba) retirándole el promotor de la polihedrina y reemplazándolo por un fragmento que contiene la región del promotor de *vp80* y el ORF de *vp80*. Primero, un fragmento de 2.300 pb que contiene el promotor de *vp80* y la secuencia del ORF se amplificó con los cebadores pvp80-*Stu*I-F y pvp80-*Xba*I-R (tabla 1) a partir del bácmido molde bMON14272 y se clonó en el vector pJet1.2/Blunt (Fermentas) para formar el pJet1.2-pvp80-*vp80*. Después de la verificación de la secuencia del ADN, se escindió el casete de *vp80* del pJet1.2-pvp80-*vp80* mediante la doble digestión con *Stu*I y *Xba*I, y a continuación se subclonó en el pFB-*egfp* digerido con *Bst*1107I y *Xba*I, y purificado en gel, para generar el plásmido donante pFB-*egfp*-pvp80-*vp80*. En paralelo se construyó un plásmido donante pFB-*egfp*-polH-*vp80*, en donde el ORF de *vp80* está impulsado por el promotor muy tardío de la polihedrina (*polh*). Con este objetivo, un fragmento de 2.105 pb que lleva el ORF de *vp80* se amplificó con los cebadores vp80-*Sac*I-F y vp80-*Xba*I-R (tabla 1) y se clonó en el pJet1.2/Blunt para generar el pJet1.2-*vp80*. En la última etapa se escindió el ORF de *vp80* (*Sac*I/*Xba*I) de pJet1.2-*vp80* y se subclonó en el pFB-*egfp* digerido con *Sac*I y *Xba*I para crear el pFB-*egfp*-polH-*vp80*.

25 Para superar el problema de la falta de anticuerpos anti-VP80, se realizó la marcación de VP80 con la etiqueta FLAG ( fusión en el extremo amino y en el carboxilo) para facilitar la inmunodetección. La secuencia de FLAG-*vp80* con la fusión en el extremo amino se generó mediante una estrategia de PCR en dos etapas, la llamada PCR de fusión. Primero, un fragmento de 259 pb que contenía el promotor de *vp80* y la etiqueta FLAG se amplificó por PCR con los cebadores pvp80-*Stu*I-F y pvp80-FLAG-R1 a partir del bácmido molde bMON14272. Después de la purificación en gel y de la cuantificación del ADN, el fragmento de 259 pb se utilizó como cebador directo en una segunda etapa de amplificación por PCR con el cebador inverso pvp80-*Xba*I-R sobre el bácmido molde bMON14272. El producto de PCR final (2.324 pb) se clonó en el vector pJet1.2/Blunt (Fermentas) para formar el pJet1.2-pvp80-FLAG-*vp80*. Después de la verificación de la secuencia de ADN, el casete FLAG-*vp80* se escindió de pJet1.2-pvp80-FLAG-*vp80* mediante la digestión doble con *Stu*I y *Xba*I, y a continuación se subclonó en el pFB-*egfp* digerido con *Bst*1107I y *Xba*I, y purificado en el gel, para generar el plásmido donante pFB-*egfp*-pvp80-FLAG-*vp80*. El casete vp80-FLAG con la fusión en el extremo carboxilo se amplificó con pvp80-*Stu*I-F y pvp80-FLAG-R a partir del bácmido molde bMON14272. El fragmento de 2.324 pb se clonó en el pJet1.2/Blunt y posteriormente se transfirió al pFB-*egfp* de un modo similar a como se realizó para las construcciones anteriores.

30 Los insertos de todos los plásmidos donantes construidos se transpusieron en el bácmido *vp80*-null según el protocolo de Bac-to-Bac (Invitrogen). La detección selectiva de las construcciones positivas para la transposición en el locus de *polh* se realizó mediante el ensayo por PCR triple con el empleo de los cebadores directo e inverso de M13 y un cebador GenR específico del gen de resistencia a la gentamicina (tabla 1).

#### 40 Ensayo de transfección-infección

45 Se prepararon los ADN de bácmido a partir de cultivos bacterianos de 1,5 ml de una noche a partir de 2 o 3 colonias independientes que llevan el bácmido con el gen heterólogo insertado de acuerdo con el manual de Bac-to-Bac (Invitrogen) y se analizaron en paralelo. Para las transfecciones, 1 µg de cada preparación de ADN de bácmido se utilizó para transfectar  $1 \times 10^6$  células Sf9 en una placa de 6 pocillos mediante el protocolo de transfección con Cellfectin™ tal y como se describe en el manual de Bac-to-Bac (Invitrogen). Desde las 72 h a las 120 h después de la transfección (p.t.), se comprobó la propagación vírica mediante microscopía de fluorescencia. A las 120 h p.t., el medio de cultivo celular se centrifugó durante 5 min a 2000×g para retirar los residuos celulares y este sobrenadante aclarado se utilizó para infectar  $1,5 \times 10^6$  células Sf9 en placas de 6 pocillos. Después de 72 h p.i., se monitorizó de nuevo la diseminación de la infección del virus mediante microscopía de fluorescencia. En todos los experimentos se utilizó como control positivo un bácmido bMON14272 de tipo silvestre que lleva el gen indicador *egfp* bajo el control del promotor de p10. Un bácmido bMON14272-*gp64*null que también lleva el gen indicador *egfp* bajo el control del promotor de p10 sirvió como control negativo, ya que había perdido la capacidad de movimiento de una célula a otra para la infección (Lung et al., 2002).

#### 55 Caracterización de la propagación vírica en el cultivo celular a lo largo del tiempo

55 Se realizaron análisis a lo largo del tiempo para comparar la producción de virus de gemación a partir del virus AcMNPV *vp80*null y las diferentes construcciones de reparación en comparación con el bácmido de AcMNPV de tipo silvestre (Ac-wt), todos ellos con *egfp*. Brevemente, las células Sf9 se inocularon en placas de cultivo de tejidos de 6

5 pocillos ( $1 \times 10^6$  células/pocillo) en un medio de cultivo de 1 ml de Sf900-II sin suero a 28 °C. Al cabo de dos horas se retiró el medio de cultivo y las células se transfecaron con 5 µg de ADN de bácmido en las condiciones estándares que se recomiendan en el manual de Bac-to-Bac (Invitrogen). Los sobrenadantes de los cultivos celulares se recogieron a las 24, 48, 72, 96 y 120 h p.t. y se les analizó la producción de virus de gemación infecciosos mediante un ensayo de dilución hasta el límite para determinar la dosis infecciosa 50 para el cultivo del tejido (TCID<sub>50</sub>). La infección se determinó mediante la monitorización de la expresión de *egfp* (a partir del promotor de p10). Se calcularon los valores promedio de los títulos infecciosos procedentes de tres transfecciones independientes y se representaron gráficamente.

#### Microscopia electrónica de transmisión

10 Las células Sf9 de insecto se inocularon en un matraz 25T ( $3,5 \times 10^6$  células/matraz) y se transfecaron con 20 µg de la construcción del bácmido Ac-Δvp80, Ac-Δvp80-vp80 de rescate o Ac-wt. Al cabo de 48 h p.t., las células se recogieron y prepararon para la microscopia electrónica de transmisión tal y como se describió anteriormente (van Lent et al., 1990). Se examinaron las muestras y se fotografiaron con un microscopio electrónico Philips CM12.

#### Ensayo de producción del virus de gemación

15 Se inocularon las células de insecto Sf9 en dos matraces 25T ( $3,5 \times 10^6$  células/matraz) y se transfecaron con 20 µg de la construcción de bácmido Ac-Δvp80, Ac-Δvp80-vp80, Ac-Δvp80-pH-vp80, Ac-Δvp80-FLAG-vp80, Ac-Δvp80-vp80-FLAG o Ac-wt. Al cabo de 5 días p.t. se recogieron los sobrenadantes del cultivo celular enriquecidos en BV y se ultracentrifugaron a través de un colchón de una solución de sacarosa al 10% (25.000 rpm durante 1,5 horas, Beckman SW32). Los viriones de gemación sedimentados se resuspendieron en agua desmineralizada estéril y se prepararon para la microscopia electrónica de tinción negativa, electroforesis de SDS-poliacrilamida o la detección por PCR (como se mencionó más arriba).

#### Purificación de los ODV y de las estructuras con forma de bastoncillo a partir de las células infectadas

20 La presencia de los ODV y de las estructuras de tipo bastoncillo en las células de insecto infectadas/transfectedas se analizó por microscopia electrónica (EM). Con este propósito, las células de insecto se recogieron 48 h p.i., se lisaron y los lisados celulares se ultracentrifugaron a través de un colchón de sacarosa al 40% en tampón TE (Tris-HCl a 1 mM, pH 7,4, EDTA a 0,1 mM) (45.000 rpm durante 1 hora, Beckman SW55). Los sedimentos se resuspendieron en agua desmineralizada estéril y se analizaron mediante EM de tinción negativa tal y como se describió previamente (van Lent et al., 1990).

#### Purificación y fraccionamiento de los viriones de BV y ODV

25 30 Para producir los BV,  $3,0 \times 10^7$  células Sf9 se infectaron con Ac-Δvp80-Flag.vp80 o el virus Ac-wt de control a una MDI = 1. Al cabo de 6 días p.i. se recogieron 72 ml del medio enriquecido con BV y se centrifugaron a 1500×g durante 10 min. A continuación se ultracentrifugó el sobrenadante a 80.000×g (rotor Beckman SW28) durante 60 min a 4 °C. El sedimento de BV se resuspendió en 350 µl de tampón TE a 0,1X y se cargó en un gradiente lineal de sacarosa (del 25% al 56% (p/v)) y se ultracentrifugó a 80.000×g (rotor Beckman SW55) durante 90 min a 4 °C. Se recogió la banda de BV formada y se diluyó en 12 ml de TE a 0,1X. La preparación de BV se concentró a 80.000×g durante 60 min a 4 °C. El sedimento de virus final se resuspendió en 150 µl de TE a 0,1X.

35 40 Para producir los ODV,  $6,0 \times 10^7$  células Sf9 se coinfectaron con los virus Ac-Δvp80-Flag.vp80 (MDI = 25) y AcMNPV (MDI = 5) (cepa E2, Smith y Summers, 1979). Cinco días p.i. se recogieron las células infectadas y los ODV se purificaron de los cuerpos de oclusión víricos tal y como se describió previamente (Braunagel et al., 1994). El sedimento de ODV final se resuspendió en 0,5 ml de TE a 0,1X (Tris a 10 mM, EDTA a 1 mM, pH = 7,5).

45 Los viriones de BV y ODV purificados se fraccionaron en las fracciones de la envoltura y de la nucleocápsida tal y como se describió previamente (Braunagel et al., 1994). Las fracciones finales se procesaron para SDS-PAGE y se inmunotransfrieron contra el anticuerpo monoclonal anti-Flag de ratón (Stratagene), antisuero policlonal anti-VP39 de conejo (amablemente proporcionado por Lorena Passarelli, Kansas State University, EE. UU.), antisuero policlonal anti-GP64 de conejo (amablemente proporcionado por Hualin Wang y Feifei Yin, Instituto de Virología Wuhan, China (Yin et al., 2008), o antisuero policlonal de conejo contra el factor 1 de infectividad por vía oral (PIF-1) (amablemente proporcionado por Ke Peng, Universidad de Wageningen, Países Bajos (Peng et al., 2010)).

#### Desarrollo de la línea celular transgénica derivada de Sf9 que expresa vp80

50 Para desarrollar una línea celular, que produce la proteína VP80, un fragmento de 2.105 pb que lleva el ORF de vp80 se amplificó con los cebadores vp80-SacI-F y vp80-XbaI-R (tabla 1) y se clonó en el pJet1.2/Blunt para generar el pJet1.2-vp80. En la siguiente etapa se escindió (con *SacI* y *XbaI*) el ORF de vp80 de pJet1.2-vp80 y se subclonó en el pIZ digerido con *SacI* y *XbaI* (Invitrogen) para crear el pIZ-vp80. El vector plasmídico resultante pIZ-vp80 se linealizó con *Eco*57I y se purificó en gel. Las células Sf9 se inocularon en una placa de seis pocillos ( $1 \times 10^6$

células/pocillo) y se transfectaron con 10 µg del vector linealizado. Al cabo de 24 horas de la transfección, las células se seleccionaron mediante el medio de cultivo celular que contiene Zeocin™ (300 µg/ml) durante 2 o 3 semanas, hasta que ninguna célula Sf9 de control sobrevivió en las mismas condiciones. A continuación, las células se propagaron como una línea celular sin clonar.

5      Expresión de la proteína recombinante con el virus *vp80null*

Para medir la capacidad de expresar la proteína recombinante con el inóculo del virus Ac-*Δvp80* (complementado en *trans*),  $3,0 \times 10^7$  células Sf9 sin transformar se infectaron (ensayo por triplicado independiente) con los virus Ac-wt, Ac-*Δvp80*-Flag.vp80 (ambos producidos en la línea celular sin transformar) o Ac-*Δvp80* (producido en la línea celular Sf9-*vp80*) con una MDI = 10. Todos estos inóculos de virus expresan *egfp* como un gen heterólogo modelo a partir del promotor muy tardío de p10 de baculovirus. A las 48 h y a las 72 h p.i., se recogieron las células y el medio de cultivo, y se utilizaron para transferencia Western, ensayo inmunoenzimático (ELISA) o titulación de BV (véase más arriba). Para la transferencia Western se utilizaron los mismos anticuerpos que se mencionaron más arriba para detectar la etiqueta Flag, EGFP y GP64, así como un anticuerpo monoclonal antiactina de ratón (ImmunO).

10     Para la cuantificación relativa, las placas de 96 pocillos Maxisorp (Nunc) se revistieron durante una noche a 4 °C con 100 ng de anticuerpo anti-GFP policlonal de conejo (Molecular Probes) en un volumen de 100 µl por pocillo, a lo que siguieron procedimientos estándares de ELISA como los descritos previamente (Fric et al., 2008). Se calculó el porcentaje de la producción de EGFP (ensayo por triplicado independiente) de acuerdo con la fórmula: % de expresión de EGFP =  $(\text{absorbancia problema}_{nh} - \text{absorbancia de fondo}) / (\text{EGFP de Ac-wt}_{72h} - \text{absorbancia de fondo}) \times 100\%$ , en donde nh representa el momento temporal p.i. La significación estadística de las diferencias observadas entre el Ac-wt de control y los genotipos experimentales de Ac-*Δvp80*-Flag.vp80 y Ac-*Δvp80* se analizaron con la prueba *t* de Student.

20     Resultados

25     El gen de *vp80* de AcMNPV es esencial para la replicación vírica

30     Se construyó un virus de AcMNPV con delección como se detalla en la figura 2. Se diseñaron construcciones de reparación de tal modo que el ORF de *vp80* de tipo silvestre o los genes *vp80* etiquetados con FLAG en el extremo carboxilo o amino junto con las regiones promotoras de la polihedrina o la nativa se insertaron en el locus de la polihedrina junto con el gen *egfp* bajo el promotor de p10 (figura 3A). Para investigar la función del gen de *vp80*, las células Sf9 se transfectaron con las construcciones de bácmidos con anulación o de reparación y se monitorizaron por la expresión de EGFP mediante microscopía de fluorescencia. Cuando el Ac-*vp80null* se introdujo en las células Sf9 no se observó ninguna propagación vírica en el cultivo de células a las 72 h ni a las 120 h p.t. Solo pudimos observar un fenotipo de «infección de una sola célula» similar al fenotipo del bácmido Ac-*gp64null* (figura 3B). Los resultados indican que el Ac-*vp80null* es capaz de llegar a la fase muy tardía de la infección, como se confirma por la expresión de EGFP impulsada por el promotor de p10. Desde las 72 h a las 120 h p.t. se pudo observar una expresión de EGFP generalizada en las monocapas de células de insecto que se transfecaron con las tres construcciones de reparación (*vp80* impulsado desde su promotor nativo, *vp80* impulsado desde el promotor de la polihedrina y *vp80* etiquetado con FLAG en el extremo amino impulsado desde su promotor nativo), lo que indica que estos bácmidos eran capaces de producir una cantidad suficiente de viriones de gemación infecciosos para iniciar la infección secundaria a un nivel similar al del bácmido de tipo silvestre (figura 3B). Por el contrario, en las células de insecto transfecadas con las construcciones de reparación de *vp80* etiquetado con FLAG en el extremo carboxilo, hacia las 72 h p.t., solo se observó la expresión de EGFP en células aisladas que inicialmente se había transfecado, lo que indica que esta construcción de bácmido no es capaz de replicarse (figura 3B). Sin embargo, hacia las 96 h p.t. se observó la formación de calvas diminutas y a las 120 h p.t., se desarrollaron muy pocas calvas de tamaño normal. Los resultados muestran que el mutante etiquetado con FLAG en el extremo carboxilo tiene muy retrasada la producción de virus de gemación y demostraron que un extremo carboxilo sin modificar es muy importante para el funcionamiento de VP80. A los 5 días p.t. se retiraron los sobrenadantes del cultivo celular y se añadieron a las células Sf9 recién sembradas en placas y a continuación se incubaron durante 3 días para detectar la infección por el virus generado de las células transfecadas con estos bácmidos. Tal y como se esperaba, las células Sf9 incubadas con los sobrenadantes de las transfecciones con las construcciones de reparación mostraron numerosas células que expresaban la EGFP (figura 3C). No obstante, las células incubadas con el sobrenadante de las construcciones etiquetadas con FLAG en el extremo carboxilo mostraron una reducción significativa del número de células positivas para EGFP. Por otra parte, en las células de insecto incubadas con el sobrenadante de la transfección con el *vp80* anulado no se detectó ninguna expresión de EGFP en ningún momento del tiempo analizado hasta las 72 h (figura 3C).

35     Además, para caracterizar el efecto exacto que tiene la delección del gen de *vp80* sobre la infección de AcMNPV, la propagación vírica en las células Sf9 transfecadas se comparó entre Ac-wt, Ac-*Δvp80*, Ac-*Δvp80*-vp80Rep, Ac-*Δvp80*-polh-vp80Rep, Ac-*Δvp80*-FLAG-vp80Rep y Ac-*Δvp80*-vp80-FLAGRep. Los sobrenadantes del cultivo celular de todas las construcciones de bácmidos anteriores se analizaron en los momentos de tiempo indicados para la

producción de BV (figura 4). Tal y como se esperaba, los virus de reparación Ac- $\Delta$ vp80-vp80Rep, Ac- $\Delta$ vp80-polh-vp80Rep, Ac- $\Delta$ vp80-FLAG-vp80Rep mostraron una cinética de replicación vírica que concordaba con la propagación del virus del tipo silvestre (Ac-wt). La producción de viriones de gemación mediante el virus Ac- $\Delta$ vp80-vp80-FLAGRep etiquetado con FLAG en el extremo carboxilo se redujo a aproximadamente el 0,06% en comparación con el virus Ac-wt o los otros virus reparados.

Estos resultados indican que el gen *vp80* es esencial para la producción de BV infecciosos. Se ha demostrado con claridad que se puede eliminar completamente toda la secuencia del ORF de *vp80* del esqueleto del bácmido y rescatarla adecuadamente mediante la introducción del ORF de *vp80* en un sitio heterólogo (locus de la polihedrina) del genoma. También demostramos que la expresión del gen *vp80* puede ser impulsada por la secuencia del promotor de la polihedrina heterólogo sin ningún efecto negativo sobre la replicación vírica en el cultivo celular. Adicionalmente, observamos que el extremo amino de VP80, a diferencia de su extremo carboxilo, permite que se le hagan modificaciones génicas (marcación con la etiqueta de epítopo). Observamos que la cinética del virus con VP80 etiquetado con FLAG en el extremo carboxilo estaba significativamente retrasada en comparación con otros virus de tipo silvestre o de rescate, lo que indica la importancia funcional del extremo carboxilo de VP80.

#### 15 Se necesita VP80 para la producción de BV y de ODV

Los resultados descritos más arriba indicaban que el mutante Ac-*vp80*null no produce absolutamente ningún virus de gemación infeccioso. Sin embargo, también estaba la posibilidad de que el mutante todavía pudiera producir partículas de gemación no infecciosas. Para investigar esta posibilidad, las células Sf9 se transfecaron con las construcciones de bácmidos con anulación, de reparación o de tipo silvestre, y se ultracentrífugaron a los 7 días p.t. los medios de cultivo celular para sedimentar los virus de gemación. Los sedimentos formados se analizaron por microscopía electrónica de tinción negativa o mediante detección por PCR y por transferencia Western para confirmar la presencia de los virus de gemación. No se revelaron ningún virus de gemación intacto, ni partículas similivíricas, ni sus estructuras (tal como VP39, la proteína principal de la cápsida, y la secuencia del genoma vírico) en el sedimento de las células transfecadas con el mutante Ac-*vp80*null (figuras 5A y 5B). Por otra parte, todas las construcciones de reparación analizadas produjeron virus de gemación que parecen normales en comparación con los virus de gemación derivados del virus de tipo silvestre (figura 5A). No obstante, era muy difícil encontrar viriones de gemación representativos en el sedimento procedente de las células transfecadas con la construcción de reparación del gen *vp80* etiquetado con FLAG en el extremo carboxilo.

30 Para caracterizar aún más la delección del gen *vp80* en el ciclo de vida de los baculovirus, se realizó la microscopía electrónica con cortes ultrafinos generados de las células transfecadas con el bácmido. Las células transfecadas con Ac-*vp80*null desarrollaron típicamente el fenotipo de célula infectada con baculovirus, con un núcleo agrandado, una cromatina hospedadora fragmentada, un estroma virógeno electrodenso, etc. (figura 6A). La ausencia de VP80 no impidió la formación de nucleocápsidas que parecen normales dentro del estroma virógeno (figura 6C). Las nucleocápsidas formadas eran fenotípicamente indiferenciables de las producidas por los bácmidos Ac-wt o Ac-*vp80*null de reparación. Sin embargo, las nucleocápsidas ensambladas era más bien poco abundante en comparación con las células transfecadas con los bácmidos Ac-wt o Ac-*vp80*null de reparación (figuras 6E y 6G). Además, en el compartimento periestromático de un nucleoplasma (también llamado la zona anular) de las células transfecadas con el bácmido Ac-*vp80*null no se pudo observar ningún virión derivado por oclusión ni haces de nucleocápsidas antes de una envoltura (figuras 6B y 6D). Parece ser que la VP80 desempeña una función importante durante la maduración de las nucleocápsidas y/o su liberación o transporte desde el estroma virógeno. Finalmente, la VP80 puede contribuir, de algún modo, a un ensamblaje eficaz de nucleocápsidas que se podría explicar por un número pequeño de nucleocápsidas presentes en el estroma virógeno de las células transfecadas con Ac-*vp80*null. Cuando el gen *vp80* se reintrodujo en el bácmido mutante, se pudieron observar muchas nucleocápsidas y viriones derivados por oclusión en las zonas anulares de las células transfecadas (figura 6F). La abundancia y la forma de los viriones derivados por oclusión producidos en las células transfecadas con el bácmido de reparación Ac- $\Delta$ vp80-vp80 eran similares a las de los producidos por el bácmido de tipo silvestre (figuras 6F y 6H).

#### VP80 está asociado a las nucleocápsidas de BV y de ODV

50 Para estudiar la asociación de VP80 con las preparaciones de BV, se recogieron los BV a las 48 p.i. y se separaron las fracciones de la nucleocápsida y de la envoltura. La proteína Flag.VP80 sólo se detectó en la fracción de la nucleocápsida como una doble banda con masas moleculares que oscilan entre 80 kDa y 95 kDa que se observaban en las células Sf9 infectadas (figura 14A, panel superior). La separación correcta en las fracciones de nucleocápsida y envoltura se confirmó con los anticuerpos contra VP39 (nucleocápsida solo) y GP64 (envoltura solo) (figura 14A, paneles inferiores).

55 Para examinar si la VP80 también estaba asociada a los ODV, las células Sf9 se coinfectaron con los virus AcMNPV de tipo silvestre productores de cuerpos de oclusión (OB) y los virus Ac- $\Delta$ vp80-Flag.vp80 para proporcionar la proteína POLH. El análisis por transferencia Western demostró que la VP80 estaba asociada a la fracción de la

nucleocápsida de los ODV, y que en este caso migra como una sola banda de aproximadamente 80 kDa, que corresponde a la forma de 80 kDa producida en la fase muy tardía de la infección (figura 14B, panel superior). El fraccionamiento adecuado en las fracciones de nucleocápsida y envoltura se controló con el antisero contra PIF-1, una proteína de la envoltura de los ODV (figura 14B, panel inferior).

5 La función de VP80 se puede rescatar mediante la complementación genética en *trans*

Para verificar si una delección de *vp80* en el genoma vírico se puede complementar mediante un ORF de *vp80* ofrecido en *trans* bajo el control de un promotor constitutivo, se construyó una línea celular transgénica que expresaba el *vp80* etiquetado con FLAG. En estas células, la VP80 se producía principalmente como una proteína de aproximadamente 95 kDa, tal y como se mostró con el análisis por transferencia Western con el anticuerpo anti-Flag (figura 15A). También se observaron dos bandas menores, una de aproximadamente 80 kDa y una segunda de aproximadamente 65 kDa.

10 En los ensayos de complementación en *trans*, las células Sf9-*vp80* se transfectaron con el bárcmido Ac- $\Delta$ vp80 y la 15 diseminación de la infección del virus se monitorizó mediante la fluorescencia específica de EGFP a las 96 h y 120 h p.t. (figura 15Ba-c). Se observaron calvas víricas en las células Sf9-*vp80* transfectadas, lo que demuestra que el virus se transmitió de una célula a otra. No obstante, observamos que el número y el tamaño de calvas desarrolladas era significativamente más pequeño que el observado en las células Sf9 transfectadas con el bárcmido Ac-wt (figura 15D). Como control, las células Sf9 no transgénicas mostraron solo infecciones de una sola célula cuando se transfectaron con el bárcmido Ac- $\Delta$ vp80 (figura 15Bc).

20 Cuando el medio de cultivo de las células Sf9-*vp80* transfectadas con Ac- $\Delta$ vp80 se utilizó para infectar las células Sf9 no transgénicas inoculadas recientemente, se observó un fenotipo de «una sola infección» (figura 15Bb, panel 25 derecho). Por tanto, las partículas de BV que resultan de la complementación en *trans* fueron capaces de entrar en las células, pero eran incapaces de producir nuevos BV. Esto también demuestra que el Ac- $\Delta$ vp80 no se revirtió a Ac-wt en las células Sf9-*vp80* mediante la recuperación del transgén de las células hospedadoras. Tal y como estaba previsto, no se detectó ninguna señal de EGFP en las células Sf9 que recibieron el sobrenadante de células 30 Sf9 no transgénicas transfectadas con Ac- $\Delta$ vp80 (figura 15Bc, panel derecho). El número de BV infecciosos de las células Sf9-*vp80* transfectadas con el bárcmido Ac- $\Delta$ vp80 era comparable al producido en las células Sf9 transfectadas con Ac-wt al cabo de 6 días p.i. Este experimento demostró que, para la producción de BV, el sistema actual de complementación en *trans* es aproximadamente 25 veces menos eficaz que el sistema de producción clásico basado en Sf9 (Fig. 15C).

35 El virus Ac-*vp80*null incapaz de replicarse, complementado en *trans*, es competente para expresar una gran cantidad de la proteína recombinante

40 Para valorar el efecto de la delección del gen *vp80* sobre la expresión de la proteína recombinante, se realizó un ensayo comparativo de producción a pequeña escala. En él, las células Sf9 se infectaron en paralelo con tres tipos de inóculos de baculovirus a una MDI = 10, a saber (i) Ac-wt, (ii) Ac- $\Delta$ vp80-Flag.vp80 (ambos producidos en las 45 células Sf9) y (iii) Ac- $\Delta$ vp80 (producido en las células Sf9-*vp80*) que codifican todos ellos la EGFP. Los perfiles por transferencia Western demostraron que la proteína EGFP se expresaba en la misma cantidad en los tres genotipos de baculovirus analizados, al igual que la glucoproteína GP64 que sirvió aquí para propósitos de control (figura 16A, panel superior). La cantidad relativa de EGFP se cuantificó por ELISA a las 48 y 72 h p.i. en los lisados de las 50 células infectadas (figura 16B) y no se puso de manifiesto entre los tres genotipos de baculovirus analizados ninguna diferencia estadísticamente significativa respecto a la cantidad de EGFP. Así pues, los resultados demuestran que el inóculo del virus Ac- $\Delta$ vp80 complementado en *trans*, aunque incapaz de replicar el virus, es capaz de producir una proteína recombinante al igual que los vectores de expresión de baculovirus convencionales, siempre y cuando la multiplicidad de infección inicial sea suficientemente elevada para infectar todas las células.

55 De igual forma, durante el cultivo de producción no se detectaron genotipos del virus revertente que lleven el gen *vp80*, ya que no se detectó la proteína Flag.VP80 expresada *de novo* (figura 16A) en las immunotransferencias. Teóricamente, una cierta cantidad de la proteína Flag.VP80 asociada al inóculo del virus complementado en *trans* está entrando en las células de insecto, pero esto ya no se detectaba en tiempos muy tardíos después de la infección y probablemente se degradaba por la actividad mediada por el proteasoma o bien por el lisosoma. En el mismo experimento no se registró ninguna liberación de BV a los sobrenadantes de los cultivos celulares procedentes de las células Sf9 inoculadas con el inóculo del virus Ac- $\Delta$ vp80 (figura 16C), lo que demuestra que no se había producido ni la generación de virus revertentes ni la contaminación del virus de tipo silvestre.

#### Resumen

55 En este estudio nos centramos en mejorar las herramientas convencionales de expresión en baculovirus con el objetivo de eliminar la progenie de baculovirus que contaminan la fabricación de proteínas recombinantes. Este iniciativa está muy apoyada por las expectativas farmacéuticas, ya que los fármacos expresados en baculovirus recombinantes se usan cada vez más en la medicina humana y veterinaria. Por lo tanto, perseguimos identificar el

gen o genes de baculovirus cuya acción selectiva da lugar a un baculovirus incapaces de producir viriones, pero que no afectan, o sólo afectan levemente, a la expresión génica muy tardía. De este modo, el alto nivel de expresión de los genes heterólogos quedará salvaguardado.

Una visión general resumida de la nueva tecnología con el gen *vp80* como ejemplo se presenta en la figura 16. Con el uso de la manipulación genética mediante bácmidos, los inventores construyeron un genoma de AcMNPV que carecía del gen *vp80* (figura 16B). La genómica funcional y los análisis por microscopía electrónica revelaron que la falta de *vp80* impide la producción de los BV y de los ODV. En paralelo se construyeron células Sf9 para producir la VP80 que complementa en *trans* el bácmido Ac- $\Delta$ vp80null (figura 14A,C). Finalmente, demostramos que el inóculo de baculovirus incapaz de replicarse y complementado en *trans* es capaz de producir una cantidad de proteína recombinante similar a la producida mediante los vectores baculovíricos convencionales (figura 14D).

Tabla 1. Lista de cebadores para PCR en orden de aparición en el texto

| SEQ ID n.º | Nombre del cebador | Secuencia   | Orientación |
|------------|--------------------|---|-------------|
| 2          | vp39-F             | 5'-gcttctaatacgactcaactatagggtcgatccgctaagcgctt-3'                        | Directo     |
| 3          | vp39-R             | 5'-gcttctaatacgactcaactatagggacgcacgcgttatacacag-3'                       | Inverso     |
| 4          | 45510              | 5'-gcttctaatacgactcaactataggacagcggtacgagtcat-3'                          | Directo     |
| 5          | 46235              | 5'-gcttctaatacgactcaactataggatctcgagcgtagctgg-3'                          | Inverso     |
| 6          | 90292              | 5'-gcttctaatacgactcaactatagggtaccgcgaacattacacc-3'                        | Directo     |
| 7          | 90889              | 5'-gcttctaatacgactcaactataggctattggcacggttgc-3'                           | Inverso     |
| 8          | ec-27-F            | 5'-gcttctaatacgactcaactataggaaaggcagacactcgccagat-3'                      | Directo     |
| 9          | ec-27-R            | 5'-gcttctaatacgactcaactatagggttagtgctcaacctcg-3'                          | Inverso     |
| 10         | dbp-F              | 5'-gcttctaatacgactcaactataggcgctcgtagttgtct-3'                            | Directo     |
| 11         | dbp-R              | 5'-gcttctaatacgactcaactataggaaagatcggaagggtg-3'                           | Inverso     |
| 12         | gfp-F              | 5'-gcttctaatacgactcaactataggctgaccctgaagttcatctg-3'                       | Directo     |
| 13         | gfp-R              | 5'-gcttctaatacgactcaactataggaaactccagcaggaccatgt-3'                       | Inverso     |
| 14         | cat-F              | 5'-gcttctaatacgactcaactataggacggcatgtaaacctgt-3'                          | Directo     |
| 15         | cat-R              | 5'-gcttctaatacgactcaactataggatcccaatggcatgtaaag-3'                        | Inverso     |
| 16         | vp80-ko-F          | 5'-ctgtattgtatctgtaaagcgcacatggcattcgatataaccgtataatgtgt-gctgaatgcct-3'   | Directo     |
| 17         | vp80-ko-R          | 5'-aaatgtactgaataataaaaaataaaaaatatttataatttttattaccgtt-cgtatagcatacat-3' | Inverso     |
| 18         | 89507              | 5'-agcggtcgtaatgttaaacc-3'  | Directo     |
| 19         | 91713              | 5'-tgtataaacaatgttaatgt-3'  | Inverso     |
| 20         | gfp-Nhel-F         | 5'-ccaaacccgtacaaatgttgcgcaaggcgag-3'                                     | Directo     |
| 21         | gfp-SphI           | 5'-agggaaaggcatcttaacgcgtaccgttgcgtacagctgtccatgc-3'                      | Inverso     |
| 22         | pvp80-StuI-F       | 5'-ggaacaaaggccgtacaaatgttgcgtaccgttgcgt-3'                               | Directo     |
| 23         | vp80-XbaI-R        | 5'-cctcttatcttagattataacattgttagttgcg-3'                                  | Inverso     |
| 24         | vp80-SacI-F        | 5'-ttatcttgcgtacaaatgttgcgtaccgttgcgt-3'                                  | Directo     |
| 25         | vp80-FLAG-R1       | 5'-caacagagaattggaatcgcttacgtcgcatccgttaatcatacatattataagggtatcgatg-3'    | Inverso     |
| 26         | vp80-FLAG-R        | 5'-cctcttatcttagattatcgctgtacatccgttaatctataacat-tgttagttgcgttc-3'        | Inverso     |
| 27         | M13-F              | 5'-cccaagtacgacgtgttaaaacg-3'   | Directo     |
| 28         | M13-R              | 5'-agccgataacaattcacacagg-3'  | Inverso     |
| 29         | GenR               | 5'-agccacactccaaacatc-3'  | Inverso     |

ES 2 542 740 T3

| SEQ ID n.º | Nombre del cebador | Secuencia   | Orientación |
|------------|--------------------|---|-------------|
| 30         | vp39-ko-F          | 5'-cttcttatcggttgcacaac-3'  | Directo     |
| 31         | vp39-ko-R          | 5'-gcgtatcatgacgatggatg-3'  | Inverso     |
| 32         | vp39-Sacl-F        | 5'-aagggtctctagataggacgcattccac-3'  | Directo     |
| 33         | vp39-XbaI-R        | 5'-ttatcttgagctcaatatggcgtagtgcgg-3'                                      | Inverso     |
| 34         | vp39-StuI-F        | 5'-ggaaacaaggcctgagcttagacgcattccac-3'                                    | Directo     |
| 35         | lef-4-XbaI-R       | 5'-ccttctatctagatataattggcacgtcggtc-3'                                    | Inverso     |
| 36         | cg-30-XbaI-F       | 5'-aagggtctctagatatactacattttgtaacatttg-3'                                | Directo     |
| 37         | vp39-FLAG-Sacl-R   | 5'-ttatcttgagctcaatatggattacaaggatgacgacgataaggc-gctagtcccgtgggt-3'       | Inverso     |
| 38         | vp1054-ko-F        | 5'-gtactgaaagataattttttagatagataataattacattttaa-acgtgttcgaccaagaaccat-3'  | Directo     |
| 39         | vp1054-ko-R1       | 5'-aggcgaattccagcacacttattacgtggacgcgtactttgc-3'                          | Inverso     |
| 40         | vp1054-ko-R2       | 5'-gataagaatgtgttaacaaataggctagctgttaataact-ggcgtatgtaccgtatagcatacat-3'  | Inverso     |
| 41         | vp1054-Rep-F       | 5'-ggtgttttaggcgtgactcccttggtagctgttagagtgt-3'                            | Directo     |
| 42         | vp1054-Rep-R       | 5'-cccttcctctagattacacgttgtgtcggtcaga-3'                                  | Inverso     |
| 43         | p6.9-ko-F          | 5'-gttgcgttcattcgctactgtcggtgtggaaatgtctggtgtt-aagtgtcggtaaattccct-3'     | Directo     |
| 44         | p6.9-ko-R          | 5'-aatattaataaggaaaaattacagctacataaattacacaattta-aactacgtgtatagcatacat-3' | Inverso     |
| 45         | Ac-p6.9-F          | 5'-tttgaattcatgttgtcccgaaatccaaagac-3'                                    | Directo     |
| 46         | Ac-p6.9-R          | 5'-tttgcggccgttaatagtagcgtgttgtaac-3'                                     | Inverso     |
| 47         | Se-p6.9-F          | 5'-tttgaattcatgtatcgctgtgttcatc-3'  | Directo     |
| 48         | Se-p6.9-R          | 5'-tttgcggccgttaatagtgccgacgtgtatc-3'                                     | Inverso     |
| 49         | 86596              | 5'-gggcttagttaaaatcttgca-3'   | Directo     |
| 50         | 86995              | 5'-aattcaaaacgaccaagacgag-3'  | Inverso     |
| 51         | 45122              | 5'-gcaatcatgacgaaatcgatgg-3'  | Directo     |
| 52         | 46441              | 5'-cgataattttcaagcgctac-3'  | Inverso     |
| 53         | pp6.9-F            | 5'-ggtcgacgtaccaaattcggtttgcacg-3'  | Directo     |
| 54         | pp6.9-R            | 5'-ggtcgacggatccgttaattgtgtatc-3'   | Inverso     |
| 55         | 75834              | 5'-cttcttatcggttgcacaac-3'  | Directo     |
| 56         | 76420              | 5'-gcgtatcatgacgatggatg-3'  | Inverso     |

**Referencias**

- Abe, T., Takahashi, H., Hamazaki, H., Miyano-Kurosaki, N., Matsuura, Y. & Takaku, H. (2003). Baculovirus induces an innate immune response and confers protection from lethal influenza virus infection in mice. *Journal of Immunology* **171**, 1133-1139.
- Aslanidi, G., Lamb, K. & Zolotukhin, S. (2009). An inducible system for highly efficient production of recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors in insect Sf9 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* **106**, 5059-5064.
- Boyce, F. M. & Bucher, N. L. R. (1996). Baculovirus-mediated gene transfer into mammalian cells. *Proceedings of the National Academy U S A* **93**, 2348-2352.
- Braunagel, S. C. & Summers, M. D. *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, PDV, and ECV viral envelopes and nucleocapsids: Structural proteins, antigens, lipid and fatty acid profiles. *Virology* **202**, 315 (1994).
- Bright, R. A., Carter, D. M., Crevar, C. J., Toapanta, F. R., Steckbeck, J. D., Cole, K. S., Kumar, N. M., Pushko, P., Smith, G., Tumpey, T. M. & Ross, T. M. (2008). Cross-clade protective immune responses to influenza viruses with H5N1 HA and NA elicited by an influenza virus-like particle. *PLoS ONE* **3**.
- Carbonell, L. F., Klowden, M. J. & Miller, L. K. (1985). Baculovirus-mediated expression of bacterial genes in dipteran and mammalian cells. *Journal of Virology* **56**, 153-160.
- Carbonell L. F., Hodge M. R., Tomalski, M. D., Miller, L. K. (1988). Synthesis of a gene coding for an insect-specific scorpion neurotoxin and attempts to express it using baculovirus vectors. *Gene* **73**, 409-18.

- Charlton, C. A. & Volkman, L. E. (1991). Sequential rearrangement and nuclear polymerization of actin in baculovirus-infected *Spodoptera frugiperda* cells. *Journal of Virology* **65**, 1219-27.
- Charlton, C. A. & Volkman, L. E. (1993). Penetration of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus nucleocapsids into IPLB Sf 21 cells induces actin cable formation. *Virology* **197**, 245-54.
- Cohen, D. P. A., Marek, M., Davies, B. G., Vlak, J. M. & van Oers, M. M. (2009). Encyclopedia of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus genes. *Virologica Sinica* **24**, 359
- Condreay, J. P. & Kost, T. A. (2007). Baculovirus expression vectors for insect and mammalian cells. *Curr Drug Targets* **8**, 1126-31.
- Cox, M. M. J. & Hollister, J. (2009). FluBlok, A next generation influenza vaccine manufactured in insect cells. *Biologicals* **37**, 182-189.
- Dai, X., Willis, L.G., Palli, S.R. & Theilmann, D.A. (2005). Tight transcriptional regulation of foreign genes in insect cells using an ecdysone receptor-based inducible system. *Protein Expression and Purification* **42**, 236-245.
- Datsenko, K. A. & Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* **97**, 6640-6645.
- Fric, J., Marek, M., Hrusková, V., Holán, V. & Forstová J. (2008). Cellular and humoral immune responses to chimeric EGFP-pseudocapsids derived from the mouse polyomavirus after their intranasal administration. *Vaccine* **26**, 3242
- Friesen, P. D. & Miller, L. K. (1986). The regulation of baculovirus gene expression in: "The Molecular Biology of Baculoviruses" (W. Doerfler and P. Boehm, eds.) Springer-Verlag, Berlin, pp. 31-49.
- Funk, C. J. & Consigli, R. A. (1993). Phosphate cycling on the basic protein of *Plodia interpunctella* granulosis virus. *Virology* **193**, 396-402.
- Gheysen, D., Jacobs, E., De Foresta, F., Thiriart, C., Francotte, M., Thines, D. & De Wilde, M. (1989). Assembly and release of HIV-1 precursor pr55(gag) virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Cell* **59**, 103-112.

- Gronowski, A. M., Hilbert, D. M., Sheehan, K. C. F., Garotta, G. & Schreiber, R. D. (1999). Baculovirus stimulates antiviral effects in mammalian cells. *Journal of Virology* **73**, 9944-9951.
- Harper, D. M., Franco, E. L., Wheeler, C. M., Moscicki, A.-B., Romanowski, B., Roteli-Martins, C. M., Jenkins, D., Schuind, A., Costa Clemens, S. A. & Dubin, G. (2006). Sustained efficacy up to 4·5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial. *The Lancet* **367**, 1247-1255.
- Hill-Perkins, M. S., &, Possee, R.D. (1990). A baculovirus expression vector derived from the basic protein promoter of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of General Virology* **71**: 971-976.
- Hofmann, C., Sandig, V., Jennings, G., Rudolph, M., Schlag, P. & Strauss, M. (1995). Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* **92**, 10099-10103.
- Jeong, S. H., Qiao, M., Nascimbeni, M., Hu, Z., Rehermann, B., Murthy, K. & Liang, T. J. (2004). Immunization with hepatitis C virus-like particles induces humoral and cellular immune responses in nonhuman primates. *Journal of Virology* **78**, 6995-7003.
- Jing Chen, S., Er Hui, Z., Lun Guang, Y., Hong Ling, Z. & Peng Fei, J. (2009). A high efficient method of constructing recombinant *Bombyx mori* (silkworm) multiple nucleopolyhedrovirus based on zero-background Tn7-mediated transposition in *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress* **25**, 524-529.
- Kaikkonen, M. U., Viholainen, J. I., Narvanen, A., Yla-Herttuala, S. & Airenne, K. J. (2008). Targeting and purification of metabolically biotinylated baculovirus. *Human Gene Therapy* **19**, 589-600.
- Kanginakudru, S. S., Royer C., Edupalli S.V., Jalabert A., Mauchamp B., Chandrashekaraiah, Prasad S.V., Chavancy G., Couble P., Nagaraju J. (2007). Targeting ie-1 gene by RNAi induces baculoviral resistance in lepidopteran cell lines and in transgenic silkworms. *Insect molecular biology* **16**, 635-644.

- Kato, T., Kajikawa, M., Maenaka, K. & Park, E. Y. (2010). Silkworm expression system as a platform technology in life science. *Applied Microbiology and Biotechnology* **85**, 459-470.
- Kelly, D. C., Brown, D. A., Ayres, M. D., Allen, C. J. & Walker, I. O. (1983). Properties of the major nucleocapsid protein of *Heliothis zea* singly enveloped nuclear polyhedrosis virus. *Journal of General Virology* **64**, 399-408.
- Kitajima, M. & Takaku, H. (2008). Induction of antitumor acquired immunity by baculovirus *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus infection in mice. *Clinical and Vaccine Immunology* **15**, 376-378.
- Kost, T. A., Condreay, J. P. & Jarvis, D. L. (2005). Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nature Biotechnology* **23**, 567-575.
- Lackner, A., Genta, K., Koppensteiner, H., Herbacek, I., Holzmann, K., Spiegl-Kreinecker, S., Berger, W. & Grusch, M. (2008). A bicistronic baculovirus vector for transient and stable protein expression in mammalian cells. *Analytical Biochemistry* **380**, 146-148.
- Lebacq-Verheyden AM, Kasprzyk PG, Raum MG, Van Wyke Coelingh K, Lebacq JA, Battey JF. (1988) Posttranslational processing of endogenous and of baculovirus-expressed human gastrin-releasing peptide precursor. *Molecular and Cell Biology* **8**, 3129-35.
- Lesch, H. P., Turpeinen, S., Niskanen, E. A., Mähönen, A. J., Airenne, K. J. & Ylä-Herttuala, S. (2008). Generation of lentivirus vectors using recombinant baculoviruses. *Gene Therapy* **15**, 1280-1286.
- Li, X., Pang, A., Lauzon, H. A. M., Sohi, S. S. & Arif, B. M. (1997). The gene encoding the capsid protein P82 of the *Choristoneura fumiferana* multicapsid nucleopolyhedrovirus: Sequencing, transcription and characterization by immunoblot analysis. *Journal of General Virology* **78**, 2665-2673.
- Liu, X., Li, K., Song, J., Liang, C., Wang, X. & Chen, X. (2006a). Efficient and stable gene expression in rabbit intervertebral disc cells transduced with a recombinant baculovirus vector. *Spine* **31**, 732-735.

- Liu, Y. K., Chu, C. C. & Wu, T. Y. (2006b). Baculovirus ETL promoter acts as a shuttle promoter between insect cells and mammalian cells. *Acta Pharmacologica Sinica* **27**, 321-327.
- Lopez, M. G., Alfonso, V., Carrillo, E. & Taboga, O. (2009). Trans-complementation of polyhedrin by a stably transformed Sf9 insect cell line allows occ- baculovirus occlusion and larval per os infectivity. *Journal of Biotechnology* **145**, 199-205.
- Lu, A. & Carstens, E. B. (1992). Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the *p80* gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: a homologue of the *Orgyia pseudotsugata* nuclear polyhedrosis virus capsid-associated gene. *Virology* **190**, 201-209.
- Luckow, V.A. & Summers, M.D. (1988). Trends in the development of baculovirus expression vectors. *Bio/Technology* **6**, 47-55.
- Luckow, V. A., Lee, S. C., Barry, G. F. & Ollins, P. O. (1993). Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site- specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *Journal of Virology* **67**, 4566-79
- Ludwig, C. & Wagner, R. (2007). Virus-like particles-universal molecular toolboxes. *Current Opinion in Biotechnology* **18**, 537-545.
- Lung, O., Westenberg, M., Vlak, J. M., Zuidema, D. & Blissard, G. W. (2002). Pseudotyping *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus (AcMNPV): F proteins from group II NPVs are functionally analogous to AcMNPV GP64. *Journal of Virology* **76**, 5729-5736.
- Maeda, S., Kawai, T., Obinata, M., Fujiwara, H., Horiuchi, T., Saeki, Y., Sato, Y. & Furusawa M. (1985). Production of human alpha-interferon in silkworm using a baculovirus vector. *Nature* **315**, 592-4.
- Maranga, L., Rueda, P., Antonis, A. F., Vela, C., Langeveld, J. P., Casal, J. I. & Carrondo, M. J. (2002). Large scale production and downstream processing of a recombinant porcine parvovirus vaccine. *Applied Microbiology Biotechnology* **59**, 45-50.
- Martin, B. M., Tsuji, S., LaMarca, M. E., Maysak, K., Eliason, W., Ginns, E. I. (1988). Glycosylation and processing of high levels of active human

glucocerebrosidase in invertebrate cells using a baculovirus expression vector. *DNA* **7**, 99-106.

- McKenna, K. A., Hong, H., van Nunen & Granados, R. R. (1989). Establishment of new *Trichoplusia ni* cell lines in serum-free medium for baculovirus and recombinant protein production. *Journal of Invertebrate Pathology* **51**, 82-90
- Mellado, M. C., Peixoto, C., Cruz, P. E., Carrondo, M. J. & Alves, P. M. (2008) Purification of recombinant rotavirus VP7 glycoprotein for the study of in vitro rotavirus-like particles assembly. *Journal of Chromatography B Analytical Technology Biomedical Life Science*. **874**, 89-94
- Miller, D. W., Safer, P. & Miller, L. K. (1986). in *Genetic Engineering: Principles and Methods* Vol. **8** (eds Setlow, J. & Hollaender, A.) Plenum Publishing, New York, pp. 277-298.
- Miller, L.K. (1988). Baculoviruses as gene expression vectors. *Annual Review Microbiology*. **42**, 177-99.
- Miyajima,, A., Schreurs, J., Otsu, K., Kondo, A., Arai, K. & Maeda, S. (1987). Use of the silkworm, *Bombyx mori*, and an insect baculovirus vector for high-level expression and secretion of biologically active mouse interleukin-3. *Gene* **58**, 273-81.
- Mortola, E. & Roy, P. (2004). Efficient assembly and release of SARS coronavirus-like particles by a heterologous expression system. *FEBS Letters* **576**, 174-178.
- Muller, R., Pearson, M. N., Russell, R. L. Q. & Rohrmann, G. F. (1990). A capsid-associated protein of the multicapsid nuclear polyhedrosis virus of *Orgyia pseudotsugata*: Genetic location, sequence, transcriptional mapping, and immunocytochemical characterization. *Virology* **176**, 133-144.
- Murges, D., Kremer, A. & Knebel-Morsdorf, D. (1997). Baculovirus transactivator IE1 is functional in mammalian cells. *Journal of General Virology* **78**, 1507-1510.
- Noad, R. & Roy, P. (2003). Virus-like particles as immunogens. *Trends in Microbiology* **11**, 438-444.

- Olszewski, J. & Miller, L. K. (1997). Identification and characterization of a baculovirus structural protein, VP1054, required for nucleocapsid formation. *Journal of Virology* **71**, 5040-50.
- Peng, K., van Oers, M.M., Hu, Z.H., van Lent, J.W.M., Vlak, J.M. (2010). Baculovirus *per os* infectivity factors form a complex on the surface of occlusion derived virus. *Journal of Virology* (in press).
- Pijlman, G. P., Roode, E. C., Fan, X., Roberts, L. O., Belsham, G. J., Vlak, J. M. & van Oers, M. M. (2006). Stabilized baculovirus vector expressing a heterologous gene and GP64 from a single bicistronic transcript. *Journal of Biotechnology* **123**, 13-21.
- Ramadan, N., Flockhart, I., Booker, M., Perrimon, N. & Mathey-Prevot, B. (2007). Design and implementation of high-throughput RNAi screens in cultured *Drosophila* cells. *Nature Protocols* **2**, 2245-2264.
- Ramqvist, T., Andreasson, K. & Dalianis, T. (2007). Vaccination, immune and gene therapy based on virus-like particles against viral infections and cancer. *Expert Opinion on Biological Therapy* **7**, 997-1007.
- Salem, T. Z. & Maruniak, J. E. (2007). A universal transgene silencing approach in baculovirus-insect cell system. *Journal of Virological Methods* **145**, 1-8.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. . (1989). Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY.
- Slack, J. & Arif, B. M. (2006). The baculoviruses occlusion-derived virus: virion structure and function. *Advances in virus research* **69**, 99-165.
- Smith, G. E, Ju, G., Ericson, B. L, Moschera, J., Lahm, H. W, Chizzonite, R. & Summers, M.D. (1985). Modification and secretion of human interleukin 2 produced in insect cells by a baculovirus expression vector. *Proceedings National Academy of Sciences U S A* **82**, 8404-8.
- Smith, R. H, Levy, J. R. & Kotin, R. M. (2009). A simplified baculovirus-AAV expression vector system coupled with one-step affinity purification yields high-titer rAAV stocks from insect cells. *Molecular Therapy* **17**, 1888-1896.
- Smith, G.E. & Summers, M.D. (1979). Restriction maps of five *Autographa californica* MNPV variants, *Trichoplusia ni* MNPV, and *Galleria mellonella* MNPV DNAs with endonucleases SmaI, KpnI, BamHI, SacI, Xhol, and EcoRI. *Journal of Virology* **30**, 828-838.

- Suzuki, N., Nonaka, H., Tsuge, Y., Okayama, S., Inui, M. & Yukawa, H. (2005). Multiple large segment deletion method for *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **69**, 151-161.
- Tang, X.-D., Xu, Y.-P., Yu, L.-I., Lang, G.-J., Tian, C.-H., Zhao, J.-F. & Zhang, C.-X. (2008). Characterization of a *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus with Bmvp80 disruption. *Virus Research* **138**, 81-88.
- Tellez, M. (2005). Process optimization protocol for tangential flow filtration of insect cells and baculovirus. Presented at WilBio Conference on Baculovirus & Insect Cell Culture - Process Development and Production Issues, Savannah/Georgia, 21<sup>st</sup> - 24<sup>th</sup> February, 2005.
- Thiem, S. M. & Miller, L. K. (1989a). A baculovirus gene with a novel transcription pattern encodes a polypeptide with a zinc finger and a leucine zipper. *Journal of Virology* **63**, 4489-4497.
- Thiem, S. M. & Miller, L. K. (1989b). A baculovirus gene with a novel transcription pattern encodes a polypeptide with a zinc finger and a leucine zipper. *Journal of Virology* **63**, 4489-97.
- Thiem, S. M. & Miller, L. K. (1989c). Identification, sequence, and transcriptional mapping of the major capsid protein gene of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Virology* **63**, 2008-2018.
- Tjia, S. T., Meyer zu Altenschildesche, G. & Doerfler, W. (1983). *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) DNA does not persist in mass cultures of mammalian cells. *Virology* **125**, 107-117.
- Urabe, M., Ding, C. & Kotin, R. M. (2002). Insect cells as a factory to produce adeno-associated virus type 2 vectors. *Human Gene Therapy* **13**, 1935-1943.
- van Lent, J. W. M., Groenen, J. T. M., Klinge-Roode, E. C., Rohrmann, G. F., Zuidema, D. & Vlak, J. M. (1990). Localization of the 34 kDa polyhedron envelope protein in *Spodoptera frugiperda* cells infected with *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Archives of Virology* **111**, 103-114.
- van Oers, M. M. (2006). Vaccines for Viral and Parasitic Diseases Produced with Baculovirus Vectors. In *Advances in Virus Research* **68**, 193-253.
- Vlak J. M., Klinkenberg, F. A, Zaal, K.J., Usmany, M., Klinge-Roode, E. C., Geervliet, J. B, , Roosien. J, & van Lent, J.W. (1988). Functional studies on

the p10 gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus using a recombinant expressing a p10-beta-galactosidase fusion gene. *Journal of General Virology* **69**, 765-76.

Wang, M. Y., Kuo, Y. Y., Lee, M. S., Doong, S. R., Ho, J. Y., Lee, L. H. (2000). Self-assembly of the infectious bursal disease virus capsid protein, rVP2, expressed in insect cells and purification of immunogenic chimeric rVP2H particles by immobilized metal-ion affinity chromatography. *Biotechnology and Bioengineering* **67**, 104-11.

Wu, W., Liang, H., Kan, J., Liu, C., Yuan, M., Liang, C., Yang, K. & Pang, Y. (2008). *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus 38K is a novel nucleocapsid protein that interacts with VP1054, VP39, VP80, and itself. *Journal of Virology* **82**, 12356-12364.

Yin, F., M. Wang, Y. Tan, F. Deng, J. M. Vlak, Z. Hu, and H. Wang. 2008. A functional F analogue of AcMNPV GP64 from the *Agrotis segetum* granulovirus. *Journal of Virology* **82**, 8922-8926.

## LISTA DE SECUENCIAS

&lt;110&gt; GENETHON

&lt;120&gt; Producción de productos biofarmacéuticos a base de baculovirus sin viriones baculovíricos contaminantes

5 &lt;130&gt; B943PC00

&lt;160&gt; 56

10 &lt;170&gt; PatentIn versión 3.3

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 133894

&lt;212&gt; ADN

15 &lt;213&gt; Autographa californica nucleopolyhedrovirus

&lt;400&gt; 1

|             |             |            |             |            |            |      |
|-------------|-------------|------------|-------------|------------|------------|------|
| gaattctacc  | cgtaaagcga  | gttagtttt  | aaaaaacaaa  | tgacatcatt | tgtataatga | 60   |
| catcatcccc  | tgattgttt   | ttacaagtag | aattctatcc  | gtaaagcgag | ttcagtttg  | 120  |
| aaaacaaaatg | agtcataacct | aaacacgtta | ataatcttct  | gatatcagct | tatgactcaa | 180  |
| gttatgagcc  | gtgtgcaaaa  | catgagataa | gtttatgaca  | tcatccactg | atcgtgcgtt | 240  |
| acaagtagaa  | ttctactcgt  | aaagccagtt | cggttatgag  | ccgtgtgcaa | aacatgacat | 300  |
| cagcttatga  | ctcatacttg  | attgttttt  | acgcgtagaa  | ttctactcgt | aaagcgagtt | 360  |
| cggttatgag  | ccgtgtgcaa  | aacatgacat | cagcttatga  | gtcataatta | atcgtgcgtt | 420  |
| acaagtagaa  | ttctactcgt  | aaagcgagtt | gaaggatcat  | atttagttgc | gtttatgaga | 480  |
| taagattgaa  | agcacgtgta  | aaatgtttcc | cgcgcgttgg  | cacaactatt | tacaatgcgg | 540  |
| ccaagttata  | aaagattcta  | atctgatatg | ttttaaaaaca | ccttgcggc  | ccgagttgtt | 600  |
| tgcgtacgtg  | actagcgaag  | aagatgtgtg | gaccgcagaa  | cagatagtaa | aacaaaaccc | 660  |
| tagtatttgg  | gcaataatcg  | attnaaccaa | cacgtctaaa  | tattatgatg | gtgtgcattt | 720  |
| tttgcggcgc  | ggcctgttat  | acaaaaaaat | tcaagtacct  | ggccagactt | tgccgcgtga | 780  |
| aagcatagtt  | caagaattta  | ttgacacggt | aaaagaattt  | acagaaaagt | gtccggcat  | 840  |
| gttgggtggc  | gtgcactgca  | cacacggtat | taatgcacc   | ggttacatgg | tgtcagata  | 900  |
| tttaatgcac  | accctggta   | ttgcgcgc   | ggaagccata  | gatagattcg | aaaaagccag | 960  |
| agtcacaaa   | attgaaagac  | aaaattacgt | tcaagattta  | ttaatttaat | taatattatt | 1020 |
| tgcattctt   | aacaaataact | ttatcctatt | ttcaaattgt  | tgcgttctt  | ccagcgaacc | 1080 |
| aaaaactatgc | ttcgcttgct  | ccgttagct  | ttagccgat   | cagtggcg   | gttccaatcg | 1140 |
| acggtaggat  | taggcggat   | attctccacc | acaatgttgg  | caacgttgc  | gttacgttta | 1200 |
| tgcttttgtt  | tttccacgta  | cgtctttgg  | ccggtaatag  | ccgtaaacgt | agtgcgtcg  | 1260 |
| cgcgtcacgc  | acaacaccgg  | atgttgcgc  | ttgtccgcgg  | ggtattgaac | cgcgcgatcc | 1320 |
| gacaaatcca  | ccactttggc  | aactaaatcg | gtgacctgcg  | cgtttttt   | ctgcattatt | 1380 |

20

ES 2 542 740 T3

tcgtctttct tttgcgttgtt ttccatggaa cgggtgtaca tgggttttag atcagtcatg 1440  
acgcgcgtga cctgcaaatac ttggcctcg atctgtttgt cttgtatggc aacgtgcgt 1500  
tcaataaaact cttgtttttt aacaagttcc tgggtttttt gggccaccac cgcttgcage 1560  
gggtttgtgt gtcgggtaa tgtcgaatc agcttagtca ccaactgttt gctctctcc 1620  
tcccgttggtt tgatcgcccc atcgtaacttgc cgggtgcaga gcacttgagg aattacttct 1680  
tctaaaagcc attcttgtaa ttctatggcg taaggcaatt tggacttcat aatcagctga 1740  
atcacgcggg atttagtaat gagcaactgta tgccgtgcga aatacagccg gtcgcggcc 1800  
ttcacgacgc tgtagggtt agggccccc tttggatgg tctgtctaaa taacgatttg 1860  
tatattttgt ctacatgaac acgtataget ttatcacaaa ctgtatattt taaactgtta 1920  
gcccacgtct tggccaccaa cggacactgt tggcgcgcct ctacgtacgtt cccggatgtt 1980  
aacgtatctt ctccaaattt aaattctcca attttaacgc gagccatttt gatacacgtt 2040  
tgtcgattttt gcaacaacta ttgtttttt aegcaaaacta aacttatttg ggtaaagcaat 2100  
aattaaatat gggggacat gcccgcctac aacactcgctc gttatgaacg cagaegggcgc 2160  
cggtctcggc gcaagcggtt aaaacgtttt ggcgttcaaa cggccaaac atcgccaaag 2220  
ccaatagtagc agtttgattt tgcattattaa cggcgattttt taaaattatc ttatataata 2280  
aatagttatg acgcctacaa ctccccgccc gcgttgcactc gtcgcaccc gaggcgttgc 2340  
ttgacgcctt ctcgggttg gccaacacg tggcgggtt ggtcgatgac cagggcgttgc 2400  
ccgcacgcga cgcacaagta tctgtacacc gaatgatcgt cgggcgaagg cacgtcgcc 2460  
tccaaagtggc aatattggca aattcgaaaa tatatacagt tgggtttttt ggcataatct 2520  
atcggtgggt tgggcattgtt cgtccgaacg ttgatttgca tggcaagccga aattaaatca 2580  
ttgcgatttag tgcgattttt acgttgcata tcctcgctt taatcatgccc gtcgattttt 2640  
tcgcgcatac gagtcaagtg atcaaagtgt ggaataatgt ttctttgtt tccccgatgc 2700  
aagcgcacgcg cgtattttaa caaactagcc atcttgcataa ttagtttcat ttaatgcac 2760  
tttatccaaat aatataattat gtatcgacgc tcaagaattt acaatgcgc cgttgcgc 2820  
tctcaacacg actatgatag agatcaaata aagcgcgaat taaatagctt ggcacgcac 2880  
gtgcacgcatac tggcgcacgcg ttccggcacg agctttgattt gtaataagtt ttacgcac 2940  
gatgacatgtt ccccgatgtt gacaacgcatac acgccccaaa gaaactgcgcga ctacaaaattt 3000  
accgagttatg tcgggtgcgtt taaaactattt aagccatccaa atcgaccgtt agtgcacatca 3060  
ggaccgcgtgg tgcgagaagc cgcgaagtat ggcgaatgcga tggataacgc tggagttcc 3120  
gctcattaga ggcgtatgtt tagacaagaa agctacatattt ttaattgtatc ccgtatgtttt 3180  
tattgataaa ttgaccctaa ctccatatac ggtattctac aatggcggggg ttttggtcaa 3240  
aatttccgga ctgcgttgcgtt acatgcgtt aacggctccg cccacttata atgaaattaa 3300  
aatttccaaat tttaaaaaac gcaacaaagag aacattttgtt atgaaagaat ggcgtatgtt 3360

|   |      |
|---|------|
| aaagaaaaat gtcgtcgaca tgctgaacaa caagattaat atgcctccgt gtataaaaaa     | 3420 |
| aatattgaac gatggaaag aaaacaatgt accgcgcggc ggtatgtaca ggaagaggtt      | 3480 |
| tatactaaac tgttacattg caaacgtggt ttctgtgtcc aagtgtgaaa accgtatgtt     | 3540 |
| aatcaaggct ctgacgcatt tctacaacca cgactccaag tgggtgggtg aagtcatgca     | 3600 |
| tcttttaatc aaatcccaag atgtgtataa accacccaaac tgccaaaaaa tgaaaactgt    | 3660 |
| cgacaagctc tggccgtttt ctggcaactg caagggtctc aatcttattt gtaattattt     | 3720 |
| aataataaaa caattataaa tgctaaattt gtttttattt aacgatacaa accaaacgca     | 3780 |
| acaagaacat ttgttagtatt atctataatt gaaaacgcgt agttataatc gctgaggtaa    | 3840 |
| tatTTaaat cattttcaaa tgattcacag ttaatttgcg acaatataat tttatTTtca      | 3900 |
| cataaaactag acgccttgc tgcattttct tcgtattccct tcttttttc atttttctcc     | 3960 |
| tcataaaaaat taacatagtt attatcgat ccatatatgt atctatcgta tagagtaat      | 4020 |
| tttttgggtt catabatata tatgtctttt ttaatgggtt gtatagtacc gctgcgcata     | 4080 |
| gtttttctgt aatttacaac agtgcattt tctggtagtt ctgcggatgt tggtgttta       | 4140 |
| attattaaat ttatataatc aatgaatttg ggatcgccg ttttgcacaa tatgtgcgg       | 4200 |
| gcatagtagc cagttcttc tagttcaattt acaccattttt ttagcagcac cggttacaa     | 4260 |
| taactttcca aaatgttgcg cgaaccgtt aacaaaaaca gttcacctcc cttttctata      | 4320 |
| ctattgtctg cgagcagttt tttgttgcg aaaaataacag ccattgtat gagacgcaca      | 4380 |
| aactaatatc acaaactgga aatgtctatc aatataatgt tgctgatatc atggagataa     | 4440 |
| ttaaaaatgtt aaccatctcg caaataaataa agtattttac tggtttcgta acagttttgt   | 4500 |
| aataaaaaaaa cctataaataa tgccggatta ttccatccgt cccaccatcg ggcgtaccta   | 4560 |
| cgtgtacgac aacaagtact acaaaaattt aggtgcgtt atcaagaacg ctaagcgcaa      | 4620 |
| gaagcacttc gcccgaacatg agatcgaaaga ggctaccctc gaccccttag acaactacct   | 4680 |
| agtggctgag gatcctttcc tgggacccgg caagaaccaa aaactcactc tcttcaagga     | 4740 |
| aatccgtat gttaaacccg acacgtgaa gcttgcgtt ggatggaaag gaaaagagtt        | 4800 |
| ctacaggaa acttggaccc gtttcatggc agacagcttc cccattgtt acgaccaaga       | 4860 |
| agtgtggat gttttccttg ttgtcaacat gcgtcccact agacccaaacc gttgttacaa     | 4920 |
| attcctggcc caacacgctc tgcgttgcg ccccgactat gtacctcatg acgtgattag      | 4980 |
| gatcgatcgag ctttcatggg tggcagcaa caacgatgtc cgcacatcgcc tggctaaagaa   | 5040 |
| ggcgccggc tgcccaataa tgaacccatca ctctgatgtc accaactcgatc tcgaacagtt   | 5100 |
| catcgatcgatgtc gtcacatcggtt agaacttca caagccatc gtttacatcg gtaccgactc | 5160 |
| tgctgaagag gaggaaatcc tccttgcgtt ttccctgggtt tcctaaagtaa aggagtttgc   | 5220 |
| accagacgca cctctgttca ctggccggc gtatTTaaac acgatacatt gttattagta      | 5280 |

catttattaa gcgctagatt ctgtgcgttg ttgatttaca gacaattgtt gtacgtattt 5340  
 taataattca ttaaatttat aatctttagg gtggatgtt agagcgaaaa tcaaattgatt 5400  
 ttcagcgtct ttatatctga atttaaatat taaatcctca atagatttgt aaaatagtt 5460  
 tcgatttagtt tcaaacaagg gttgttttc cgaaccgatg gctggactat ctaatggatt 5520  
 ttcgctcaac gccacaaaac ttgccaaatc ttgtagcagc aatctagctt tgctgatatt 5580  
 cgttgtgtt ttgtttgtt ataaaggttc gacgtcgttc aaaatattat gcgctttgt 5640  
 atttcttca tcactgtcgt tagtgtacaa ttgactcgac gtaaacacgt taaataaagc 5700  
 ttggacatata ttaacatcg gctgttttagc tttatttaggc cgattatcgt cgctgtccca 5760  
 accctcgctcg ttagaagttt cttccgaaga cgattttgcc atagccacac gacgcctatt 5820  
 aatttgtcgt gctaacacgt cccgcgtcaa atttgttagtt gagcttttg gaattatttc 5880  
 tgattggggg cggttttggg cgggttcaa tctaactgtg cccgatttttta attcagacaa 5940  
 cacgttagaa agcgatggtg caggcgggtgg taacatttca gacggcaaatt ctactaatgg 6000  
 cggcgggtggt ggagctgtatg ataaatctac catcggtggaa ggcgcaggcg gggctggcgg 6060  
 cggaggcggga ggcggaggtg gtggcgggtga tgcagacggc gggttaggct caaatgtctc 6120  
 tttaggcaac acagtcggca cctcaactat tgtactggtt tcgggcggccg tttttggttt 6180  
 gaccggtctg agacgagtgc gattttttc gtttctaata gcttccaaca attgttgct 6240  
 gtcgtctaaa ggtgcagcgg gttgagggtc cgctggcatt ggtggagcgg gggcaattc 6300  
 agacatcgat ggtgggtggtg gtggtgaggcg cgctggaaatg ttaggcacgg gagaagggtgg 6360  
 tggcgggggt gccgcggta taatttgc tggtttagtt tggtcgccca cgattgtggg 6420  
 cacggcggca ggcggcgctg gctgcacaac ggaaggctgt ctgcttcgag gcaagcgctt 6480  
 ggggtggc aattcaatat tataatttgc atacaaatcg taaaatctg ctataagcat 6540  
 tctaatttcg ctatcgatca ccgtgcggat atttaacaac cgctcaatgt aagcaattgt 6600  
 attgtaaaga gattgtctca agctcgatc ccgcacgccc ataacaagcc ttttcatttt 6660  
 tactacagca ttgttagtggc gagacacttc gctgtcgatc acgtacatgt atgctttgtt 6720  
 gtcaaaaacg tcgttggcaa gctttaaat atttaaaaga acatctctgt tcagcaccac 6780  
 tggttgtcg taaatgttgtt ttttgataat ttgcgttcc gcaatgtatcga cacgttcaaa 6840  
 aaattgtatgc gcatcaattt tgggtttccct attattgaat aaataagatt gtacagatcc 6900  
 atatctacga ttctgtatgg ccaccacaaa tgctacgctg caaaacgctgg tacaatttt 6960  
 cggaaaactgc aaaaacgtca aaactcggtt taaaataatc aacggggcgct ttggcaaaaat 7020  
 atctatattta tcgcacaagg ccactagcaa attgtatttg cagaaaacaa ttgcggcgca 7080  
 caattttaaac gctgacgaaa taaaaggatca ccagttatg agcgaccacc caaatttat 7140  
 aaaaatctat tttaatcactg gttccatcaa caaccaagtg atcgtgatgg actacatttg 7200  
 ctgtccccat ttatgtaaa cactacaaat taaaggcgag ctttcgtacc aacttggtag 7260

|   |      |
|---|------|
| caatattatt agacagctgt gtgaagcgct caacgatttg cacaaggcaca atttcataca    | 7320 |
| caacgacata aaactcgaaa atgtcttata ttgcgaagca cttgatcgct tggatgtttg     | 7380 |
| cgattacgga ttgtgcacaa acgaaaactc acttagcggt caccgacggca cgttggagta    | 7440 |
| tttttagccg gaaaaaattc gacacacaac tatgcacggtt tgggttgact ggtacggcgt    | 7500 |
| cggcgtgtta acatacaagt tgctaacccgg cggccgacac ccatttgaaa aaagcgaaga    | 7560 |
| cgaaaatgtt gacttgaata gcatgaagcg tcgtcagcaa tacaatgaca ttggcggttt     | 7620 |
| aaaacacgtt cgtaacgtta acgctcgta ctttgcgtac tgcctaaacaa gatacaacat     | 7680 |
| agattgtaga ctcacaaatt acaaacaatataaaaacat gagttttgt cgtaaaaatg        | 7740 |
| ccacttgcgtt tacgagtaga attctacgtg taacacacga tctaaaagat gatgtcattt    | 7800 |
| tttatcaatg actcatttgtt tttaaaacag acttgcgttta cgagtagaaat tctacgtgt   | 7860 |
| aagcatgatc gtgagtggtt ttaataaaat cataaaaattt attgtaaatg tttatttttt    | 7920 |
| aaaaacgatt caaatatata ataaaaacaa tctacatcta tttcttcaca atccataaca     | 7980 |
| cacaacaggt ccatcaatga gttttgtct ttatccgaca tactatgtgc atgtaacaaa      | 8040 |
| tcaaatacat cttttaaattt tttatacaca tctttacattt gtctaccaaa atctttaata   | 8100 |
| accctataac aaggaaaaga cttttttttt tgcgtggttt tgccgcgcag atattgaaat     | 8160 |
| aaaatgtgca tgcacgacaa cttgtgttta cttaaatgtt cttgcctat accgcaaaac      | 8220 |
| cggccatata cttcggcgat tacacgacca caattgtacg attcgtctac gtgtaaacga     | 8280 |
| tcatcataat cacttttgcg caaacgaaata aatttttca ccgttccga caaacgaggc      | 8340 |
| accaattcgg cgggcacgt tcgatacattt attctgtgca cataagttac cacacaaaat     | 8400 |
| ttattgtacc accatccgac aacgtcgta ttaggggttga acacgttggc gatgcgcagc     | 8460 |
| agtttccgt ttctcatgaa atattcaaag cggccaaaaa taatttgcaaa gcaatccaa      | 8520 |
| atgtcttgag aaatttctcg ttcaaaattt ttc当地agaga atatctgcca tccgtttga      | 8580 |
| acgcgcacgc tgacggaaac caccgcacgt atttgctcca acacttcacg gacgttatcg     | 8640 |
| tcgatgcccac tgcgttgcgtt ggtgtcaac caatggaaa ggctttgtat ggaatcgccc     | 8700 |
| gctgttatca ttttgcacgc ttgtcaacaa gtcacactgc cgttgcgttcaaa acgcccgcata | 8760 |
| gcggtcacgt cccgctctat gcacgacata ccgttacgt acgatttgcgt taggtattcc     | 8820 |
| tgaactatac ggtaatgggtt atacgactcg ccatacacgt cgtgcacccatttgcgtt       | 8880 |
| gcataataat tgtaaattat taacttgca gcgagagaca tggatgtcaat aaagcggtgc     | 8940 |
| taggctcaat aatactgtatc tacaggcactg cgtgttgcgtt atatataattt tcgcaaggag | 9000 |
| gggagctgtt atcggttgcgtt attttaaaat aatggccgtc tgggtttatc acaagcttgg   | 9060 |
| cagcctcaac catgaagcggtt cgttgcgtt aatggatcc tctgcctcaaa gaatttttg     | 9120 |
| acaagattgtt cgagtttta tctttatctg attactgcaaa tttgggtgtt gtctgtaaaa    | 9180 |

gaccttctag taaaatataac gtgatatttgc atagtaactaa tcaccaacat ttgaaaggcg 9240  
 tgtacaaaaa gacagacgtg caaataacaa gctacaacga atacatcaac tgtatggca 9300  
 acgaactgag acaagacgaa ttctatgcca aatcatcatg gattgcgagt atttgcggtc 9360  
 accagagagc gacaatttt agtgtAACaa ataaacaagt agaaatgaaa tatcatttgt 9420  
 ataataatgc aattgtggaa agtgaagatt gcaacggatt ttaccattt gagccaacgc 9480  
 gcgattgttt aatatgcAAA caaaaaacc aatgcctcg taattcattt attgtttcgt 9540  
 tgtgtAAata ttttagaaaaa caaaatgtac aatcaaactt tatataattat ttatacgaaa 9600  
 taaatacata ataataacta ttatacatgt ttttattttca aataacttcc tgtataacct 9660  
 ctctaaactac attaggagta caatccacgt caattacacg ttttagctatt tttctaattt 9720  
 tgaatgttt atcgttagagt ttttcgttaa tacattgaat agccaacaag ggatttgggt 9780  
 gcacacccgtc atagagtact tccatgtcgt cttcaaagcg cattttcgc ttgcgaaaat 9840  
 gcccgttgc gccccaaaaca aaagcgagtt tgatgcggc gtcgatgcgt tccgaaaata 9900  
 cgcccaaatg ctgggttttgc tgatgtcgc gggaaacgt caccgtgcca ttttgcttt 9960  
 ccggccacgac ggcgggttttgc aattttcgg ccgactgcag catgttaatgt ttggcgtcga 10020  
 gttcgtgcaa acgcaattca aactgctcaa acctgttgcc cacctcggttgc ttgaacgtct 10080  
 cgtgggtgac cataaaatttt tcgctgtttgc cattcagttt ctttacatgt tttaaaacag 10140  
 attcaatctt gtcgcgcaaa tcatcacgt cgccttcgtt ttgaatgtgc agcaacgcgt 10200  
 tgctttgtt ggccaaaattt aaccgcataca aaatttccaa caaccgtgc ttggcgtcga 10260  
 acaatgcgcc caacgagtttgc agatcggttgc tggatctctg tttgtgaaaa acaatttcgt 10320  
 ttaaatggta aacttgcatttgc ccgtcccaat tgcaatcaag tatgtcggtc tgcgcaattt 10380  
 caagacctttt gccccaaaatctt atcacattttgc agcattttgc gttcgtgtcg ctgtgcacgt 10440  
 atctgtactt gaaactgtgc gtgttgcatt tgaatgagtc ccatttaacgc atgtgcgacc 10500  
 attgttgggc gttttagtgg tactttttgtt agtcgtctgc attgaaccga ttttcggcgg 10560  
 ccatggcggtc gttgtcggttgc tcaccggacc acatccacca gttccataac caggatagca 10620  
 ttgttttagc ttgtctagca attcctttgtt tatacaacgc gaaaatttgc ttcccttata 10680  
 attatacgctg tacgggtgcgc gtattttttttttt gtttaacgttca cccatgtccac 10740  
 gtccggccaa tactgcacgt tgagcgcgtc caagtttgc gtttgcataat gggaaacgt 10800  
 caaacgtacg ccgttctctca cacaatgcgc aaaactgccc ggctgaatgt aatcaactgtc 10860  
 caactttgcgaa ggtttctcgaa aagccttgcgaa ccgtgcacgt cgaacattttt gggccggacgt 10920  
 gattttaaac ttgtcggtgaa atttttacca caaatgaaaat ccacgggtgc cggtataacat 10980  
 gactcttgcac acgttctctt ccgtgtaaaaa caacagaaac ggggtggcgc caatgtaaat 11040  
 tttcagcatt aaatcggttgc tgcacata atttttgttgc ttggcgtctca cgaccatcc 11100  
 cctggccggccg ccgtcggtccca acgggttgcac gtgcacgtc gacactttgttgcataat 11160

ataactatac aattgtgcgg aggtatcaa atatctgtcg gcgtgaatcc agcgccgcgtt 11220  
 gaccgtcatg aacgcgtact tgcggctgtc gttgtacgc atggcgcccc acatcatgtc 11280  
 gacgcgccttc tgcgtataat tgcacactaa catgttgccc tttgaacttg acctcgattt 11340  
 tggtaatttt tggctataaaa aaggtaaccc tttaaaattt gttacataat caaattacca 11400  
 gtacagttat tcgggttggaa gcaaaatgac tattctctgc tggcttgcac tgctgtctac 11460  
 gcttactgtgt gtaaatgcgg ccaatatatt ggccgtgtt cctacgccc cttacagcca 11520  
 ccataatgtg tacaaagtgt atattgaagc ctttgcgaa aatgtcaca acgttacggt 11580  
 cgtcaagccc aaactgtttt cgtattcaac taaaacttat tgcggtaata tcacggaaat 11640  
 taatgccgac atgtctgtt agcaatacaa aaaacttagtgc gcaatttcgg caatgttttag 11700  
 aaagcgcgga gtgggtgtccg atacagacac ggtaaccgcg cctaactacc taggctttag 11760  
 tggaaatgttc aaagaccagt ttgacaatat caacgtgcgc aatctcattt ccaacaacca 11820  
 gacgtttgat tttagtcgtcg tggaaagcggt tgccgattat gcgttgggtt ttggtcactt 11880  
 gtacgatccg gcccggtaa ttcaaatcgc gcctggctac gtttggcgaa aaaaactttga 11940  
 cacggtcggc gccgtggcgc ggcacccgtt ccaccatcct aacatttggc gcagcaattt 12000  
 cgacgacacg gaggcaaacg ttagtgcggaa aatgcgtttt tataaagaat tttaaaatttt 12060  
 ggcacacatg tccaaacgcgt tgctcaaaca acagtttggc cccacacac cgacaatttga 12120  
 aaaaactacgc aacaagggtgc aattgtttt gctaaacctg catcccatat ttgacaacaa 12180  
 ccgacccgtg ccgccccagcg tgcgtatct tggcgagga atccatcttgc taaagagcgc 12240  
 gccgttgacc aaattaagtc cggtcatcaa cgcgcacatg aacaagtcaa aaagcggaaac 12300  
 gatttacgta agttttgggt cgagcatttgc caccaaatcg tttgcaaacg agtttcttta 12360  
 catgttaatc aatacgttca aaacgttgaa taattacacc atattatggaa aatgtacgaa 12420  
 cgaagtagta aaaaacataa cgttccccgc caacgtatc acgcaaaattt gtttaatca 12480  
 acgcgcgtg ctgcgtcata aaaaatggc ggcgtttattt acgcaaggcg gactacaatc 12540  
 gagcgacgag gccttggaaag cggggatacc catgggtgtt ctgcccatttgc tggcgacca 12600  
 gttttaccat ggcacaaat tacagcaact cggcgtagcc cgcgccttgg acactgttac 12660  
 cgtttccagc gatcaactac tagtggcgat aaacgacgtg ttgtttaacg cgcctaccta 12720  
 caaaaaacac atggccgagt tataatgcgtt catcaatcat gataaagcaa cgtttccgc 12780  
 tctagataaa gccatcaaattt tcacagaacg cgtaatttgcg tataagacatg acatcgtcg 12840  
 tcaattgtat tcattaaaaa caacagctgc caatgttaccg tattcaatattt actacatgtt 12900  
 taaatctgtg ttttcttattt tataatgcgtt cttaacacac tttttaatttgc tttttaatattt 12960  
 gttatttcacc attatatttacc tggttttttt gagaggggct ttgtgcgttcc ggcacttcc 13020  
 agcctttata aacgctcacc aaccaaaagca ggtcatttattt gttccaggac gttcaaaaggc 13080



|   |       |
|---|-------|
| gcccgttaat ctataggcgc cggtttgata acatttcagc actacccaacg gatccgacat  | 15120 |
| gtaaaacttga cgcgttagca cgtccaaattc agcgtaatgt tggtcgacgc atttttgtaa | 15180 |
| attagtttcgc aggttgc当地 acatTTTgc gcaaaaagccg taatagtcaa aatctatgca   | 15240 |
| ttttaatgcg cttctgtcgt cgtcaatatg gcatgtcagc gctgcgcctc cagttAACAC   | 15300 |
| gaataaaACCG ccgtttcgc aaactacggc ttGAAACAA tctttgataa atGCCAACTT    | 15360 |
| tgctttAGCC acaatTTTat cgCGCAGGCG atcttcaata tccttgc当地 taatataagg    | 15420 |
| taggacGCCA agatttagtt gattcaACAA acgttccata atGAATAGCG gCGACGCAAC   | 15480 |
| acgactacac tGTTCAAATG cgCACGCAAA acaaACCCt gcaactttat ttGCCAAATCG   | 15540 |
| taatcacAGT agttttacg agtacGCCat cgCGTTGTA agcacattgc ttttAAAAAA     | 15600 |
| taatttaat ttaatgaccg cgtGCAATT gatcaactcg ttGATCAACT ttGAACTCAA     | 15660 |
| catgtttGGT aaaagtttat tgctAAATGG atttgttaat ttctgcatttG ctaacAGCGA  | 15720 |
| cggggttACG attcaACATA aaatgttaac caacGTTTA agttttttgt tggAAAATA     | 15780 |
| ttattttAAA taaataAAATA aacttGTTCA gttctaattt ttGTTTATT ttttATAAA    | 15840 |
| taatACAATT ttatttatac attaataactt tggTATTtAT taatACAATT atttACAATA  | 15900 |
| ctttatTTAC actataatac ttatTTACA ttagtactaa attaataacta aattacGCTA   | 15960 |
| ataactAAATT aatactttat ataataAAAA ataataactt atataatact ttctAAATCAT | 16020 |
| cataAAACGGG taatAGTTT ttctttGAA atttacGCTG caacttCTG ctaAAACACA     | 16080 |
| tgggCGGTGG agtgggAGCG ggtggAGTAG gagtccttac gggTTGATG ggcACAGTT     | 16140 |
| ctctGGACTT GCGAACAGC ttgggCGAAA acgtcggcgt gCGCCGACTA atGATTCTT     | 16200 |
| catCGCACGA ggcgtcgac attgtgcacg cgtccggta ggtacacAAA actttttGG      | 16260 |
| gcacGCTGTA caccGGCTT ggcacGCTAT atgtgttGCC AAAACTAGAA ctcgttGTTG    | 16320 |
| ttGCCGAACG gagacGATGG gtgtGAAGAC ggcGATGGT gtGAAGACAA gtccGAAGGC    | 16380 |
| gCGATAAAAG atGAAAGTGT ttctGAAACC gaagtGGTGG tagaAGTGGT agaAGGCGGG   | 16440 |
| tgcgttacGG caaccACGCT gctgtatTT ctgcTTCGG agaccACTC cagcaatCTA      | 16500 |
| gagttactCT ctCGTtCTC GCGGCGATAG tcaatgtcgc aataatgttC ataaAGATGCC   | 16560 |
| ttttCGGCTT CGGCGCGCT ttTCATGTAT atgttGtGAC gcatctCCtt taactGCACG    | 16620 |
| tacAAATTCC agcattGcAC agccAGTATC gtaAGCAGC ccattatGAT tacGGATAA     | 16680 |
| ttttGATTAA acacGGTcGG ctCGTgATG cttacaatGc ctCGGcacat gatGATTtT     | 16740 |
| ttgtAAATGT tcacataCAC acAGTTTGG ctcaAGGTT cggTATTGc gtAGTCAATT      | 16800 |
| tccAGATAcA cgatAGAGTT ccAGCACATT gattCCAAAT cgtAGTGCAGC atataAAACa  | 16860 |
| tctAGCGCCG gtagatGACC atTTTGAAC acgtAGATTt gaaACGCGGC aaACAGCAtC    | 16920 |
| caacacAGCC caGTGATCAC GtttACCAAt atACACGTa tagcGACGta aaAGTTTCT     | 16980 |

ttgcgcattga aatttacatt tgtgttgaa gagctgctgc gatTTTcgt ccacacgata 17040  
 atcttccata taaaataaaa catgtaaaat aatatccaca tgccgaacgc cagcattatc 17100  
 ggtatagata gattgataac cgattgctt cttcaattt ccagcaaaaa cgcgtatctg 17160  
 ctgtctatca ctcccattat agataacaca aacactatca gatatgctaa taataatgag 17220  
 gcattaagcc cgaattgtaa aactgcagtg attttattt acaTTTgaa tatttaattc 17280  
 aacaactaag taatggcaat atgtatcgag tactgatcgt gttttcctg ttcgtgttc 17340  
 tttatatagt gtaccagccc ttttattcagg catacttgca tatcggacat gccaacaag 17400  
 attacaatga cacgttggac gataggatgg attacattga atccgtaatg cgtagaaggc 17460  
 actacgtgcc gattgaagcg ttgcccgc aa tcaggttga tactaatctc ggcacgttgg 17520  
 ccggtgacac gattaaatgc atgtcggtgc ctTtgggtgt tagtgcattt gacctgcccga 17580  
 tggggattt tagtcagata tgcgataacc cgtctgcggc gtatttctt gtcaacgaaa 17640  
 cggatgtgtt tgggtcaac ggcacacagac tgacggtggg cggatactgc tccactaata 17700  
 gtttgcggcg caactgtaat cgcgagacga gogtcatttt aatgagtctc aatcagtgga 17760  
 cgtgcatacg cgaggacccg cgTTTactatg cgggcacacaga taacatgacg caactcgacg 17820  
 gcagacaaca ctTtgcaccgc attatgccc gacagagtga taggaacgtc ctgtttgacc 17880  
 gattactagg ccgagagggtg aacgtgacca ctaacacgtt tcgcccgcagc tgggacgagt 17940  
 tgctggagga cggcactagg cggTtcgaaa tgcgctgc aa cggccgagat aacaacaata 18000  
 atctcatgtt tggtaatccg cttaatcccc tggactgtct cccgaacgtg tgcactaacc 18060  
 ttagcaacgt gcacaccagt gtttagacccg tatttgaaac gggagagtgt gactgcggcg 18120  
 acgaagggtt cacgcgtgtt acgcacattt tgccggggga caggacctct atgtgtgc 18180  
 gcattataga tggcctggat aaaagtacgg catcatatac atatcgctgta gactgcgtt 18240  
 atctgtacac ctctattcta aattattcta ataacaattt gttatgtccc agtgcacatt 18300  
 ttgatagtaa cacggacgca gctttgcct ttgaagtgc cggctcctac ctttattcgc 18360  
 gcaacggcat caacgagcca acttatcgct ttatcttga taccagatct cgagttatt 18420  
 acaatgacgt cagagggcag ttatcttaat tgtgataaca caaacaataa gtcatttaaa 18480  
 tggatgtca gtagtttagta tataaggcgt acatgttggc ttgcaattt agtcaatattc 18540  
 aggTTTtat catggacgggt gtaaagctgc tagggacgtg cggcgtataa attttggat 18600  
 cggacgacgag tacagttgtc gggcgtgacc gtatcacgtt tacggccgata gaagatagcg 18660  
 caggcctcat gtttgaacgc atgtacggct tgcgacatca tacagacgac agatttgggt 18720  
 ttgtgaaaaa attcaatttt gtttgcgtgc tgcaagagct caataatatc aaatctaaaa 18780  
 ttgaattata tgaagcgcaa gtttcaactt gcacaaacgt cagacaaata aaacagaaca 18840  
 gatcgagttt catcaaaagct cgcattgaaa atcagctgca gttttgacg caactaaaca 18900  
 aaaaatctcat cacatactct gttggaaagca gatTTtaag caacgacgtg ctggacaaca 18960

tcgatctgga atatgacgac agcggtgagt ttgacgttta cgacgaatac gaacagccctt 19020  
 cgcattggag caacatgact gtatccgacg cgcaagctt gctccgaaac ccgccccaaag 19080  
 acagagtaat gttttggac acggttacca ccagcgacgt gaggcagcaaa tacgaagaat 19140  
 acataaaactg cattgtgagc aaccgttaccg ttgaaaacga gtgcgttta ttagccaaaca 19200  
 ttagtgcgtt gctcaacgac aaattggacg acgcagcgc tttggccaaag atgctggagc 19260  
 gaatagtaaa acaaacgcga aagaacaaac tcaacatctc caacacgggtt atagacgacg 19320  
 acacgctgct aacggaaatg aaaaaattaa cacaactttt atacaaccaa aaccgcgtgt 19380  
 gggtagtggaa tttaacaag gacatgaata gttatttcga tttgtcgcaa gcgtataaat 19440  
 tgcatttata tggatttta aacacggtca ttatgtttat taccatgcca ttgttaaat 19500  
 ccaccggcgt ttcgtttaat ttgtatcgcg tcatgacggt gccttttgc aggggcaaaa 19560  
 tgggttttttgc tatcatttcg ggcaatgaat actttggat tacagacagc aaaaactatt 19620  
 atgtgcccgt atctgataac tttagacaag attgccaaga gtttacgggc tacaatgagt 19680  
 ttttggcccg cggaaactgag ccgattgcca ctatgaactc gaaagtgtgc gagattgaaa 19740  
 tggatggg tcgatatacg gacgacgtgg acaacatgtg cgacattagg gtggccattt 19800  
 ataatcccaa aaaagcttac gtgaacactt taatagacta ccgaaaatgg ttgtacattt 19860  
 ttccaaacac gaccgtgtcc gtccacttattt attgtcacga cgccgttgc gaagttgata 19920  
 caaaagtttc gcccggcgtt ggttttatgt ttgcactat ggccaaacgc tggtcgatta 19980  
 gaataacgta tgatgtgacc ataactgttag attcgcgatt ttatgtcagc cattcaacta 20040  
 catactggcc taaaaagaaa tttaatttta acaactacat cgacccaaatg ttgcttggaa 20100  
 aagcgaccac cagttttata ccgactgttg acaattttac ccggcccggtt ttattgcaac 20160  
 ttccctataa atttcacatt aaagattaca catcgacgcc ccatcatttt ttccatcagt 20220  
 ctaaaattta caccaacagc gcggcccg acgaagactc gcaagacgac agtaataccca 20280  
 ccgtggttat tatcgcttattt qtcgctgaa tgatccttattt ctgtggattttt ttgttatttt 20340  
 tgggttttttttgc tataaaaaaaa cgggtgtcatc aatcaaataa cgtgggttgcaatcacaaaa 20400  
 ataacaatga atttgcaca atttgcataa atttagaaga caatcgagca tacattaattt 20460  
 tacctaattga atacgatagc gatgatatgc caaaaccatt gtacccttta cttggcttta 20520  
 atgatgattt gttaaaagat gataaacctg tggatgttcc tatgattata gaaagaataa 20580  
 aataaaacat gtataattga aataaatata ttatataata aatgttttt tatttataata 20640  
 ctatatttcta ttacatatttcaatgcacac aatgtttaa tggctatcag tttaattttt 20700  
 actaattcgat ctaaaacaaaa attatttcaact tgctgtttt catttttgc acatgtggcg 20760  
 ttatataata attcgctgtg ttttatgaac gaatcgtaaa ccgctgcctg ggccttcagc 20820  
 acggtcggcg cattgttattt ttgggtaaag tacgcaatat tttagtcaa acacagagat 20880

tttaaatctt tttcattttat atccaagtcg gaacaatcg atacaaaatc tagctttca 20940  
 ctttcggcg cgccccagata ctggttacg agttcgagct gctccacttg gcctttgata 21000  
 tcggccgcta tgcacaacat tttgtcgatt gcagttcat tgtttttaac ataataattt 21060  
 ttaactttttt tattttgcaa ttaatcaaa ctatTTaaat tcgcttgacc tttcttacaa 21120  
 agcgcagtttta atatgcaga cattttgact tataataaaa aacaaaactt ttatataattc 21180  
 atttattgtt caataataac aaatattcca ggcttaaaag ctaacgaata gggctttcg 21240  
 gtaatTTTct tattattcat gtccgtcata tgcatactttt tgccgtactt gacgcccgtca 21300  
 atgggtgcca tcatgtacat ttaatctcc tccgaaggta cgtctatTTTt gtcacatttcg 21360  
 aacaatctat caaaatcttc aacgctcatt ctctgcataat caagaggaac gtttctgatc 21420  
 ttccgggtgg cgttaatttga tccgttggc tcacgggtga ttatgtaaaa ccgacgaatc 21480  
 aacatgtcg cgtcgctagt tttgttctta tccggcaaat gaatgcacac gtttggttcc 21540  
 atcttcaaag gaaaatcgct ttgcaagtgt ttttgcaaaa tggccaaa tatattgtt 21600  
 tgggtgtgaa tgcgtccgta ttgaatgcta aaaaactggc caaagttgct tttggcacgt 21660  
 tttatggttc caaagtcgga aaacaaaaat ccgcagggtc tgccctgcac tcttggaccg 21720  
 atgggttacg tagtcttgcc gttggccggc tccaacacca cgatattttt atcgggctcg 21780  
 ggatacaact tgcgttccca ttcgtgcaaa ctgtcaaat tagacagtcg aaaaaattcg 21840  
 ttttcaaaa atctgccttc gaaacaacta caattcagta ttgaaaagtt gctcgTTTc 21900  
 acattaatcg ccatactgctc ctgccacaaac atcttcgtca actcgtgtgg ctccaatttga 21960  
 atggacgacg gctgtaaaata gcacattacg cccgttgcgt cgtgtttcac gttaaaagcg 22020  
 ccgctgttgt acggcaccaag ctgctggtcc tcaaccaccc ttccatcttc ccgcttcggc 22080  
 tgggtgtcg tgcgtcgatc atatccatcg ccaatcttgc gtttagttgc catgctaccc 22140  
 acgtgcgtg tctgtgtgg ttcaagtcta attgaagtgt ttacacagaat ataagatata 22200  
 taataaaatat ggacgactct gttgccagca tgcgtgttgc caacgcgttt gctgtacacta 22260  
 ctgacgattt attgaaaat attccttttta gtcattccaa atgcggccct ttcaagctac 22320  
 aaaattacac cgtttgaag cggttgagca acgggtttat cgacaagtat gtggacgtgt 22380  
 gctctatcg cgagttgcaaa aagttaattt ttaagataga tggctaaacc aactacat 22440  
 caaacattttt cgagtacgag tttgttagttt tagaacacga tttgtccaca gtgcacgtca 22500  
 ttaacgcccga aacaaaaacc aaactggcc atataaacgt gtcgctaaac caaaacgacg 22560  
 caaacgtgct cattttgacc gtaactttaa cgagctaaaa tgaacgagga cacggccccg 22620  
 ttttattttta tcagcgtgtg tgacaactttt cgcgacaaca ccggccgaaca cgtattcgac 22680  
 atgttaatag aaagacatag ttgcgttggaa aattatccca ttgaaaacac ggcgtttatt 22740  
 aacagcttga tcgttaacgg gtttaataac aatcaagttt acgatcactt tgcgtgcgag 22800  
 tattgcgaag cagaaataaa aaattggtcc gaagacgagt gtattgaata tgcacacgt 22860





ttgtgcaaag ctgatgtcat cttttgcaca cgattataaa cacaatcaa taatgactca 26820  
 ttgttttc aaaactgaac tcgcttacg agtagaattc tacttgtaaa acacaatcaa 26880  
 gcgatgtgt cattttaaaa atgatgtcat ttgttttca aaactaaact cgcttacga 26940  
 gtagaattct acgtgtaaaa cacaatcaag ggatgtatgc atttactaaa ataaaataat 27000  
 tatttaata aaaatgtttt tattgtaaaa tacacattga ttacacgtga catttacgat 27060  
 ggcgaacaat aatttcactt ttatatttag gacacgacgt gtatataggg aagcttaagc 27120  
 gttcaataa agccatggcg tacacgctaa gcttgcggcag cttgcggctc tttgaaatct 27180  
 gtagtttcg gggagtaccc tcgttctca gtgccacata cgtcaacttg cgatcgata 27240  
 ctttataata cgtgtttag ttatttttt ccagaaattc cctcataaaag caatccttgg 27300  
 ataaaagttt tgatccgtac agttggccac accggtccat gcacaggtac acacacgtga 27360  
 tggcgtttt aatgacgatg cgatttctgt caacggcaac ggcgttgaat atggtgtcga 27420  
 cgttgcggc ttcaatgggtt ccgtaaacag ctccgtctgg atttactgccc aaaaactgccc 27480  
 ggttaataaa cagctggccg ggaatagacg tgccgtat gtgtgtcagc agagctgagc 27540  
 agtcagccat agaggctaga gctacaagtg ccagcaagcg atacatgatg aactttaagt 27600  
 cccccacagca aactggcgct tttatataaa aatttggcc attttggcg attagataat 27660  
 ttttgaagat tagataatat tgagattagt taataatttg tgtgattaga taactttta 27720  
 ggttattgcg cattataaat caaggtcgag ttgtataaac tgctctggcg tgtaaaactg 27780  
 cagacttaag tttttgc当地 acactcggtc tgaatcgcta aatctttt gaccgggttgt 27840  
 tagattaatt cggccagccg cgtcgcccac ataaaaagat tgttccttgcg caatatgcgt 27900  
 aactgtttt gccatctcgc gccacattcc cgtgtcgccg tttcgatgct cattttttttt 27960  
 gggcgacaca taaaacgata tgggcacgccc agtagttt ttaatattct ctaattata 28020  
 taataaatcg ctgcgttgc ttttgc当地 acctaaatgg gttgggtcg taaaacaac 28080  
 taaatcgtag cctaattcgat acaaacgctt tagttgtgt ggcgcacggaa ggagctgcca 28140  
 gtcgtctggg tttttggaa atttggaccg tgcgtttgag ctaattagcg tgccgtccaa 28200  
 atcaaaaagcc gcaattttgg ttcttttagc ggcgtcatga accgggtacg cataacaatc 28260  
 gggctgtgt aacgtccaca tggtgaatgc atcttactca aagtccatca attcgatgc 28320  
 gtttgc当地 aggtcgccg tttttggaa atttggaccg tgcgtttgag ctaattagcg atagcgattc 28380  
 aaattttgtt aacgtttgtt ggcgcacgctt ggcgcacggaa ggagctgcca 28440  
 acagtaaaaaa tattcctcga taagcatgac tacacccata tcactgttta agtgc当地 28500  
 gtagttgttgc当地 catgttatgt cgcgtgtgcg ggcgcacggaa ggagctgcca 28560  
 ccacaaccag tcggcggtcg tttttggaa atttggaccg tgcgtttgag ctaattagcg atagcgattc 28620  
 aaaatttaaa tactcgacag ttttgc当地 tagattccgc gtttgattca cttttttttt 28680

gtcgtcagcc tctataatct cgggcaacag cttgccttgt tgccccatcg tatcgatcac 28740  
 ctcggccaaag tggcccggtg ttatattaag tcgtttaaaa tcatttattt cttctgcac 28800  
 gtcggcctgg taattttga ccacggcgt ggaaatcaat tgccgttcaa gggaaataat 28860  
 tcgtggtgtg ggtatcgcc gcctgtgca caattccacc agcggtggag gcaagggcgc 28920  
 attcacagca accgttgtca tttataagta atagtgtaaa aatgcaaaa ttcatcaaaa 28980  
 cattgacggg caaaaaccatt accgcccggaa cggaacccgc agagacggtg gccgatctt 29040  
 agcaaaaaat tgccgataaa gaaggtgtgc ccgtagatca acaaagactt atctttgcgg 29100  
 gcaaacaact ggaagattcc aaaactatgg ccgattacaa tattcagaag gaatctactc 29160  
 ttcacatggt gttacgatta cgaggagggt attaataata acaataataa aaaccattaa 29220  
 atatacataaa aagttttta tttaatctga catatttgcata tcttgcgtat tatcgctaac 29280  
 cattaaaagt gctggagcca cagtgttgcg gcgagtcttt atagaagatc gttgtttggc 29340  
 tggaaactgag ctttccctt tctctgcgtcc gctaattggaa gtgggcacgt actctgttagt 29400  
 agacggtgca acgggcaact tgagcgtcac cgtcttaaat ttggccataac ttttagtgc 29460  
 gaaatcgccgc gttAACACTT cgtcgtaaat gttacttagc agaggcgcaaa cattgtgatt 29520  
 aaatgtctcg tttacaacgc tgtaaaactc cgaataaaagc ttatcgccca tttcgcagct 29580  
 ctccctcaat tctgccaat ttgcgttggt aagcaccaca gtctgtcttt ttttgcgc 29640  
 tggaaattgtc gctgttctcg ttttttttttgcgat cgtatgtcgat cggtcggccca 29700  
 cagctttca gttgtgatcaa aaatgaacac aaaatctgcc aattcgggct tttttttcac 29760  
 caaatcccac atggccgggc tactaggcca ctcgggctgc ttgatcttag ttttttttgcg 29820  
 gttaaacaaa atgtatttat ttttttttttgcgat ctttttttttgcgat 29880  
 ttcgtcttgc atgacaggca ccacgttaag gatatagtta atgttcttc ttttttttgcg 29940  
 atttacaata acggccagct ggtccatgtt ggatttgcgtt taagagctcg attccagtt 30000  
 attcaacagc ttttcatttt tgcacacggc cgcagtcgtt cggatgtt gtttttttgcg 30060  
 gtttaccatg ttttgcgtt gtaaaacctt gaaacaaccc gtttgcgtt ttttttttgcg 30120  
 attttttttaa tggccaaacaa cctggcaattt cgtttgtgtt gaaacacacac cttacgcttc 30180  
 gaacatttgtt cggtgattac ttttttttgcgat ctttttttgcgat 30240  
 cgcctaaacg acacgtgtc caacatgtgc gtcgttgcgtt ttttttttgcgat 30300  
 ttgagcgtgt ttttttttgcgat ctttttttgcgat 30360  
 gaatcacacc cgcctaaatgtt ctttttttgcgat 30420  
 agtggcgttag aaaaagtccctt gcaatttgcgtt attatcaaaa cggcccttgcgtt gtttttttgcg 30480  
 aaaaatcaaaa aattcaatgtt aatttgcgtt atcgtacgtt atcgttgcgtt ttttttttgcg 30540  
 ataattaaag ttttttttgcgat ctttttttgcgat 30600  
 gctgttgcgtt ttttttttgcgat 30660

ggtgtacgtg ttgggtttgg cgttcacgtt aatcaagttg cccgcgcacga cgcctacgta 30720  
 tatcaaatac ttgttaggtga cgcgcgtcata ttccattgt aacgtaaatg gcaacttgc 30780  
 gatgaacgcg ctgtaaaaaa accggccagt ttcttccaca aactcgcgca cggctgtctc 30840  
 gtaaaactttt gcgtcgcaac aatcgcgatg acctcgtggt atggaaattt tttctaaaaa 30900  
 agtgcgttc atgtcgccgg cgggcgcgtt cgcgcgtccgg tacgcgcgac gggcacacag 30960  
 caggacagcc ttgtccggct cgattatcat aaacaatcct gcagcgtttc gcattttaca 31020  
 tatttgcacac ttaaaaaattt ggcacacga gcaccatcgt ttgataccta attgcaacta 31080  
 tttacaattt atcagtttac gttgaacccg ttttaatttt ttagatccgt ccttgcgtcag 31140  
 ttgcagaatttgcgactaaatgac aaaatttttc ggttctgcaa aaccggccctt gtctgttcca 31200  
 cccgttgtat ttgaaaaaac ttttttcac gcggcgacaa ctgcttgtat aatattgccc 31260  
 aatgtaaaca tgcaaaattt tgtaacttc gtcaaaacag cgggtggcgt tccattccat 31320  
 aattttttta ttatattatca acgatggcca ttgtaaatttgcgtcatttacatcat 31380  
 atgatttaac aaaagctttt cgtatagccg aacttcaattt cccttggaaac attttcaaa 31440  
 cgataattta atttgcgttgcgatccatgc ttgattaaca atcgccgtac 31500  
 ttttatagcc acgtttatgt ctgcacag caaatgtggg ttgtcgacaa tgtaatagtg 31560  
 caaagcattt gttacggcaa atgcgttagtt tgatggacg acggccctttt tcttgcacggg 31620  
 cattgcggct tttaaaattt ctgcagca ttgtacgaat acctttttgt gtttaaaca 31680  
 taatatggac aaacatcgac gaaacaattt gtaataatta tgaaatcccc aattgcaggt 31740  
 tttaaaacttc ttgttactt gtttataat aaataaaatt tgctgacccca tgcgtgcgc 31800  
 cacaatttttta attaaccatt tgcgtgcata ttgttgcgtc cttttttccc aaccggaaaa 31860  
 ttgttgcgtc tgcgtgcata ggcattggc gtttgcgttgc gtcgttacgc cggacgcgtcc 31920  
 tgcgttgcgttgcgatccatgc ttgttgcgtc gtttgcgttgc gtcgttacgc cggacgcgtcc 31980  
 gtagtattttt ggcaggcaat aatcaaaaaaa atccgtaaacg aatttctgc atctattat 32040  
 attcgttgcgtc tacgaatcga gttttcaaa aattacttttgcgttgc gtttgcgtc 32100  
 gggcttcata caataataat ctgcgttgc gaaacagaaac gtttgcgtc gtttgcgtc 32160  
 tttgtccatg attggctcgtc tgtaacgatt gatccaaatc aaaaattgaca acacgttgc 32220  
 cgtatgtgc accgggttcgc acacgttgc cgcgtatgtatccatgtttt atttcgttgc 32280  
 cgcattgtat tacacgatttgcgttgc gtcgttgcgtc gtcgttgcgtc 32340  
 acaactccaa aggattgtaa agcgcagatttccagatgaaacgatgtttt aagtggccac 32400  
 cgttgcgttgc gtcgttgcgtc gtcgttgcgtc gtcgttgcgtc 32460  
 tttcaaacgc aaacttgcgtt ttttaggcata agtagtaaaa tttaacgaa ttgtataaaat 32520  
 aaaacataaa attggccattt tttaaagtaaa attctacatc cgtgacgaaac aaaagggttta 32580

ctatTTgtt ctccaacaag tgtgccaatt ttcttaagta caccattgaa tttttgtcgt 32640  
 cgtccatctc gatcaacaac acgtacggcg ttttggatt taaaattatt ctaaaatttt 32700  
 cctgttgcaa cgattccaca gcgtccgacc aatatgacgc tgccacctct agacagatgt 32760  
 atttcttggaa aaacacgtgt cgTTTgataa cctcgctgtat ggacgtgatc gattgtaaat 32820  
 actttcaaa cgTCGCGTCT tcccaaccac gcaccgaaac gggcgctgtc gtgtcgggct 32880  
 gatgttgaa atccaaacca ctctgaatta acttgggtgt gattcgatg ctcaactgtt 32940  
 gacccaacgt gtagtgatct tcgttaggcgc gtcTTTcacat cacgttacac acaaatttga 33000  
 cgagatctc aacgtcttcc tggcggccaa aegcgccaca tggcccttgc 33060  
 accaccgatc tcggcacaca agctgttagca tttttaatc gtgatcgctc aagctattaa 33120  
 ttctggttag atttatatacg tcgtcaatat cctcgccgtt ggTTTgcgtc atgtctgtaa 33180  
 aacgtgaaa atcaaacatt tttatgtgt agtcaatct aacaaatcca tggcggttca 33240  
 ctgcacttc ggcgtttaca aaacgaggta gctgttaatc gaacccgttt aaatagattg 33300  
 cgtacaaaac cagcacttca tttccagtt tgcaacgcttgc cggcaaaaat tggcggttgc 33360  
 gctccaaccg ggtgacaaac atgactatgg aaaataacgc ggaattcaac agacgactag 33420  
 agtacgtggg cacgatcgcc acaatgtatc aacgaacatttta gacacgagg 33480  
 gctattgcac gcaacaggat gggattttt tggcggtgtc agacgacacg gggcctgg 33540  
 tatggggccg tttggccacc tgcatttttgc tgcgttccg cgtgcacatc gaccagtttgc 33600  
 agcatccaaa tccggcggttgc gaatatttttgc aatttgcggaa aagtctggcg caacgccaac 33660  
 acgtggccgc gcttacacg tacatgttattt acacgctttt taaaacgtc gtggccctca 33720  
 aatttgcgttgc tgcacacgc acgctacaag ctaacatgttgc cggacgggg ttggcggttgc 33780  
 ttgtgcggaaa ttttgcggaa acaagctaca aacatgttgc tggcggttgc agaaaaacttgc 33840  
 gtgcgataca agtagcgaca ttatcgtttt acgaacaaat tatttgcggaa acaataatgc 33900  
 aactcgtcgat ctttgcgttgc gatttgcggaa ttttgcgttgc aatgtgtata ttttgcgttgc 33960  
 cggcgccgcata ataaaccatag ttttgcgttgc gggcgccgcata ttttgcgttgc ttttgcgttgc 34020  
 caaatttgcggaa ttggcgatca aacatgttgc ttttgcgttgc aacatgttgc ttttgcgttgc 34080  
 acatcaaaccg cccaaatctat tggcgccatca gaaaaaggc atacatgttgc ttttgcgttgc 34140  
 agaaaaaaac gggcgccgcata acggcgccgtt gtttgcgttgc aacatgttgc ttttgcgttgc 34200  
 gctctctgttgc ttttgcgttgc aacatgttgc ttttgcgttgc aacatgttgc ttttgcgttgc 34260  
 gtgtccttttgc ttttgcgttgc atcattgggtt aacccggaaatc aagaaggatc ttttgcgttgc 34320  
 taacattttgc ttttgcgttgc aatcttttgc ttttgcgttgc aacatgttgc ttttgcgttgc 34380  
 ggtgaccacg tacgacgtttt tatttgcgttgc ttttgcgttgc aacatgttgc ttttgcgttgc 34440  
 aagtctgttttgc ttttgcgttgc aacatgttgc ttttgcgttgc aacatgttgc ttttgcgttgc 34500  
 ctgcaagacg ggcgtgcaca acggcgccgtt gtttgcgttgc aacatgttgc ttttgcgttgc 34560

taccggcaca ccgatccaca acaagcattg ggacatgtac tcgatgatta atttttgca 34620  
 atgtcgctt tttacaatc caagagtgtg gaaaatgtt aataaaaaaca acgactctac 34680  
 aaatcgata aaaagtatta ttaaaaaat tggttaaaaa cgcgacaaat ctgaaattc 34740  
 ttctaacatt cctaaacaca cggttgagta tgcacatgtt aattttatg aagaagaaaa 34800  
 aacgttgtac gataaattaa agtgtgaatc ggaagaggcg tatgtgaagg ctgtggcagc 34860  
 gcgtgaaaac gaaaacgcac taagccgatt gcagcaaatg cagcacgtgt tatggctaat 34920  
 actgaaattg aggcaaactt gctgccaccc gtatggcc atgcacggta aaaatattt 34980  
 gggaaacaaac gactgtttt aatggatta tatgagcagc aagtgcacac gagtgcgtca 35040  
 ctggtagac gacatttga acacaagaa cgacaagata atattggttt cgcaatgggt 35100  
 ggaatattt aaaaatattt aaaaattttt taaacaaaaa aacattgcta cgttaatgtt 35160  
 cacgggcca taaaagtgg aagacaggat tttggccgag acgacattca atgatgcgtc 35220  
 caatactcaa catcgaattt tgctgcttc cattaagtgc ggcggcgtcg ggttaaactt 35280  
 aataggcggaa aaccacattt taatgttgg gcctcattgg aacccgcacaa ttgaattgca 35340  
 ggcgcaagac cgaatcagtc gtatggaca aacaaaaac acgtacgtgt acaagatgt 35400  
 aatgtggaa gacaacagca tcgaaaaata cattaaacaa cgccaagaca aaaagattgc 35460  
 gtttgcac acggctttt aagagactct gctcaattac gaagacatta aaaaattttt 35520  
 caactttagt ctggtaagtc gtcatgaaaca cccgatatgc tacttgctat gtttgcgtac 35580  
 agttggtta cttgttaag aaaaacgtttt gtaacatgtc cccttcggcc gctgcgtttt 35640  
 accaacggcg catggccatt gtaaaaacg gtatcgtgt gtgcacgtgt tggtcgcc 35700  
 aactaaaaat tggcaacggc gtttcgatcc caatttaccc ccacccgcgtt caacaacatg 35760  
 cacgacggtc gcttgcgtt aacggcgatc acacggctgc aaggtgttca cggtgccggc ctacaacaga 35820  
 tacgactcga cggcgtatcg acacggctgc aaggtgttca cggtgccggc ctacaacaga 35880  
 cggcgtatcg actttgcggg catttcgcaac aaaaacgtgg aatcattaa aacggataga 35940  
 aacttgcgc tcaacacaga atgcaatgtt aagttgtcg acagtgcgtt catgcgttgc 36000  
 agaaaaagtt tggcgtttt cccggccgtt acctatctgc attggggaca ttgcgtgttgc 36060  
 tgcacccgact ggcacgaaac ggtttacgtt gacaacacgt gtcctaaatg taaaagcggc 36120  
 attagatata aattaaaata caaaactttt taacatgtt ccctacgaaa tggtatttgc 36180  
 cgtgttgcgtt tacttgcgtc cggcgacat tctaaattt aaccccttcc ttgcatacca 36240  
 aaaaagttgtt ctgtttgcac gcaactctgc aaaaatgtt aacggcatca ggcggcgtac 36300  
 gctgtacgac aacgacgacg acccccttattt ttactacaaa cagttcataaa agattaattt 36360  
 tttaactaaa aaaataataa atgtttataa taaaactgaa aagtgttataa gagcgacgtt 36420  
 tgatggtcgg tatgtggta cacggcgttcc ttatgtgc ttgtaaaca agagttat 36480

gaagcaattg ctgcgcgagg ttgacactcg cattacacta cagcaacttg taaaaatgta 36540  
 tagtccagaa ttgggtttt atgttaatag caaaattatg ttgtgttaa ctgaatcggt 36600  
 gtggcgtct atttgtttaa aacactcggt cggcaaatgc gagtggttgg aaaaaaat 36660  
 aaaaactgtg tgtttacaat taagaaaaat ttgttataat aataagcaac attcgacatg 36720  
 tctatcgat tgattattgt catagttgta atattttaa tatgtttttt gtacctatca 36780  
 aatagcaata ataaaaatga tgccaataaa aacaatgctt ttattgatct caatccctg 36840  
 ccgctcaatg ctacaaccgc tactactacc actgccgttgc taccaccac taccaacaac 36900  
 aacaacagca tagtggcctt tcggcaaaac aacattcaag aactacaaaa ctttgaacga 36960  
 tggttcaaaa ataatctctc atattcgttt agccaaaaag ctgaaaaggt ggtaaatccc 37020  
 aatagaaatt ggaacgacaa cacggtattt gacaatttga gtccgtggac aagcggttccg 37080  
 gactttggta ccgtgtgcca cacgctcata gggtatttgcg tacgctacaa caacaccagc 37140  
 gacacgttat accagaaccc tgaatttgcg tacaatctca ttaacgggct ggcgcattt 37200  
 tgcagcaaac tgcccgatcc gccgcgcac caacaagcgc cctggggccc ggtgcggat 37260  
 tggtaccatt tcacaatcac aatgcccggag gtgtttatga acattaccat tggctaaac 37320  
 gaaacgcagc attacgacga agctgcgtcc ctcacgcgtt actggctcggtt 37380  
 cccacggcccg tcaactcgat gggctggcac cggacggcag gcaactcaat ggcgcattgg 37440  
 gtgcctaca cgtacagtca aatcttgcgc ggatattcat tggcgttcaat taggcaagag 37500  
 cagggataac aagaaatccaa aacacgatc gcttccgt acgtgactca aggcaacggc 37560  
 ttgcacgtcg attcgatata catcgatcac attgacgtgc ggcgttacgg ctatttgcata 37620  
 aattcataact ttacgttgc ctattacacg tactatggg gacgaggtt aatcaacacg 37680  
 gtgggtttga cgagagccat cgaaaacgtg ggcagtcccg agggagttgt ggtgcgcaggc 37740  
 gtcatgtctc gaaacggcac gttgtactct aacgtgatag gcaactttat tacgtatccg 37800  
 ttggccgtcc attcggccga ttactccaaa gtgttgacca aactttcaaa aacatattac 37860  
 gtttcgggttgg tggcgtaac gaatagggtt gcttactacg aatccgatcc cacaacaac 37920  
 attcaagcgc ccctgtggac catggcgcgg cgcatttggatcggcgcgg cagaattatc 37980  
 aactataatg ccaacacggt gtcgtttgag tgggttatttttgcataag ttttgcacgg 38040  
 atcatgatcg tcccgatggg caccacgtcc acgcagtcgt tcaagacccac cattggccaa 38100  
 acggctatag ccaaaaacggc cacggccggc gccattttgg ttttgcacggc 38160  
 atgaacaatttgcattaa atcgtgcacg ttgttctacg atcacggcat gttccagct 38220  
 tattacaaca ttggcggttgg accaaactcg ctcaacaaca caaacggccg ggtgatttg 38280  
 ctaagcagag acacgtcggtt caacaccaac gatttgcacg ttgaagcgca aagaattaac 38340  
 aacaacaact cgtcgaaagg caccacgttc aacgggttgg tctgtcatcg cgttcctatc 38400  
 acaaacatca acgtgccttc tctgaccgtt cgaagtcggcatttgcgtt cgaacttagtc 38460



aactgcgcgg gttttaaattt ccgcttcgaa catttttagc agtgattcta attgcagctg 40440  
 ctcttgcata caactaattt tacgacgacg atgcgagctt ttattcaacc gagcgtgcatt 40500  
 gtttgcataatc gtgcggcgat tatcaattttt tcattatcgat attgttgcac atcaacaggc 40560  
 tgacacccac gtttgcactcg ccgcagggtt gggcaagttt ggaccggccg cgcattccat 40620  
 gcaaaacttc cgacattctg ttgcctacga acgatttgattt ctttgcctat tgatcgaaac 40680  
 gagttgccttc gacttttgcg tttccagggtt ggcttgcattt aataaattctt ttgaaaatatt 40740  
 tttttttttttt attattaaat agcatgtatg gtatgttgcgaa gatgggataaa cgcttggcg 40800  
 gggggcgatc atgatttccaa ccgcgcacca catatttgcg cttcaatttttcaaaatttgg 40860  
 actggcgaga caaaaacgag acggggcgaca ggcatttttgcgatggcgatccatcttcgg 40920  
 ccattccactc ggttcagggtct tcgcgtgcgtt taaacacacc tttctgaccg tgaatgcccac 40980  
 atatttttat tccttccaaa tcgttgggtt acgttgcattt gactttttaa agcataacgt 41040  
 tttttttttttt aaccaccatg ctggcgatcgatggcgatccat ttttttgcattt ttaattttgtc 41100  
 taaagtaaac gtacacttttgcgaa aatttgcgtt ggtgcacgtt tcaattttgtt 41160  
 accgtcgccgc gtcgtacacc caattaaatctt tcgcgttgcgtt caccaacacacccatgt 41220  
 acagcacaag tccgtcgatc agcgcaacgtt aatttttgcgatccatcttgcgttgcgtt 41280  
 ctaaacacgatc ctgcgttgggg ccgaccacaa gcttgcctt caatttgcgtt acgttgcgtt 41340  
 tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt 41400  
 tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt 41460  
 ttaccggccac agagtagccaa tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt 41520  
 acacggggcat ggcattttttt agatttttttgcgaa aattttttttttt tttttttttttt tttttttttttt 41580  
 tatgtttttttttt tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt 41640  
 tgacgttcattc gttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt 41700  
 tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt 41760  
 actttttttttt tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt 41820  
 tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt 41880  
 atttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt 41940  
 gttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt 42000  
 tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt 42060  
 tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt 42120  
 tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt 42180  
 tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt 42240  
 tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt 42300  
 tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt 42360

ttttacgacg cttgttcgccc accgtgtacg cgtcgctgca ggccgtcttg tcgagaactc 42420  
 gttgatagtt ttgc当地ttt gtc当地gtta ataacagttc tatcaatag gctgtcttgt 42480  
 atacaatttt gttggccaaa ctgtctatag aatagttt gtc当地gttccataataat 42540  
 ttatgtgttc cacgagttgt tgc当地gttgc当地 gctgtgttgc当地 tt当地gaagaga aaatcgagcg 42600  
 gtttccatcc gccgctgttgc当地 gccagatag tttccagcac agaattt当地 tcttccgtca 42660  
 ctacgttaatc gctacgttac acgtctcgag caaacaggac gtc当地gttgc当地 tt当地gttcaaa 42720  
 ctatgtggat tgc当地gttgc当地 atgtgttctt cttgatccac gttgccc当地tac aaaaacatgc 42780  
 gtttgc当地atg tttggcgtat agcttgc当地tgc当地 agaaatttgc当地 caccaaaaacg tt当地gttca 42840  
 tcattatgtt gggaaaactc aaaaatctgc cgtccagcat aaaagttccg ttaatattgt 42900  
 tggggc当地gtc gacatcgcc当地 gtttctctaa attgcttgc当地 taagc当地gttgc当地 cc当地aatataa 42960  
 cgggc当地acaca tttatgc当地tac acgcaactga gctgttgc当地tac aagagc当地ca cacaatataa 43020  
 acttgc当地ttc tt当地atagcg caaaaaagca tacgttgc当地tac gctgttgc当地 tgc当地atca 43080  
 aagtatattt taatttgc当地tac ttatattt当地tac caactc当地gttgc当地tac aatattt当地tac 43140  
 ccacgtccgt catcgtaag cgattactgc gcaactaatta tgc当地tac aacggccaaa cggc当地atca 43200  
 cggtc当地gttgc当地tac tttcgatga aacggccaaa cgc当地tac aacggccaaa cttgtcatgc当地 43260  
 aaaaatgaat ctttttggg gtttgc当地tac tt当地gaagaaa tt当地gttattt当地tac tcaatgttca 43320  
 aaaaatgc当地atg acgttccgga ccaaaaatgtt gacaacgtt当地tac ttatattt当地tac agtgtacaga 43380  
 atggcc当地acgc当地tac tggtaacgaa acaaggtaga cctgtataaca gtc当地tac gacgaa aacccat 43440  
 tacaacacgg tgc当地tac acgttccgtt当地tac gtttgc当地tac attttt当地tac atttt当地tac 43500  
 agtgtcaaaa agcaataacta tgacgttgc当地tac tt当地aaattt当地tac aaaaaatatac agacttggaa 43560  
 tc当地tacgatc cattgatttac ggttccgtt当地tac caaattggcg aatctgtt当地tac tgaagaaaata 43620  
 caaaaactca gaaaagctt当地tac ggtcaatattt当地tac tt当地actaata aacccgacaa gtc当地gtt当地tac 43680  
 aacaacccag atgtgtt当地tac gtttgc当地tac atttttggca gactt当地tac aatgtt当地tac 43740  
 agggcaatca aacaaaaaaac taaaactata attgtaaaac gtc当地tac tacaacacaga 43800  
 attcaatattt当地tac attggaaaac tcttccgaa gacgaaacaaa aatgtactt当地tac acaaggaaattt当地tac 43860  
 gccgaaaaaaa tt当地gtt当地tac tt当地gtt当地tac caatattt当地tac gactt当地tac tataatcgta 43920  
 tgc当地tac taaatgtt当地tac aacacaacccg aatttattt当地tac gactt当地tac gactt当地tac ggtt当地tac 43980  
 gccatgactt当地tac taaatgtt当地tac cactcgattt当地tac acgtt当地tac agtttccgtt当地tac gttt当地tac 44040  
 tacaacgtgg ccaaaaacaga aatggtaac cagc当地tac attt当地tac acataataag caaggacattt当地tac 44100  
 gaggattt当地tac gaaacgtt当地tac aaaaatctt当地tac acataaaattt当地tac aatatgtt当地tac caaggaaattt当地tac 44160  
 aaacaattt当地tac aacaaaaata attt当地tac attt当地tac caaattt当地tac gttt当地tac tt当地gtt当地tac agtgtt当地tac 44220  
 tttttt当地tac caaattt当地tac tgc当地tac tctt当地tac gtc当地gtt当地tac gacgaaac atattt当地tac gggccaaa 44280

ES 2 542 740 T3

gggaaaactt tatgggtgaa ttcagcagtt atttggct gcacgcacac aacgtgtac 46320  
 atcgccagta tttaacagct gacctatgg ttaaacaagg attcttatct caataattgg 46380  
 tccgacgtgg tgacaattgt atccacaatc atgaaaaaaag tagcgcttgg aaaaattatc 46440  
 gaaaacacag tagaaagcaa atataaaagg aacagtgtgt cgtcgtcatt gtcaacgggc 46500  
 gccagtgcaa aatttaggtt aagcgaatat tacaaaactt ttgaagcaaa taaagtgggc 46560  
 cagcacacta cgtacgacgt ggtcgcaag cgagattaca cgaatttga caaatttgg 46620  
 aaaaaatatt gacatgctgc gatcaatcat gcgcgttgc aagagtacaa acaatctcag 46680  
 caaaaaaccc tccgattatt atgttagtgg atgtccaaag tggttatttt tgacgtcg 46740  
 cgaagtgagc gtggctgaat acatagaaat gcataaaaat tttaacacga aattcgccga 46800  
 tcggtgcctt aacgattttt tttgtgaccaa ctctaaaagt tggataatc atgaaaattt 46860  
 ttctgcctta ttttaccctc tttgttataa aagtttgggg tttgttatttt tggtttttat 46920  
 ttatttacgc tagatattgg gtttaagggtt cttagaaata gagttgtatt ttccctacca 46980  
 aaagggattt gagcttcata taaatacaat attcgctcga caagcggtttt atttcactcg 47040  
 gaggtattat atcaggcagt cgaacgtgcg cgatgaaaca tcccggttac gctagatatt 47100  
 tggagtttga tggatgttagt ttagatttga cttagttat atttttagag tttgataacg 47160  
 ctcaaaaatga agagtacatt atttttatga atgtaaaaaa ggccgttttac aaaaacttcc 47220  
 acattacttgc tggatctgtcg cttgaaacgc tgaccgtgtt ggtgtacgaa aaagctcg 47280  
 taattgtgaa acaaattggag tttgagcagc cgccaaactt ttgttatttt atcagttca 47340  
 acgcgaccga caacgacaac tccatgataa tagacttgcg ttccgacgcg cgcataatcg 47400  
 tggccaagaa gctgacgccc gacgaaacgt atcatcagcg cgtgtccgaa tttttggatt 47460  
 ttcaaaaacg taactgcata cctcgcccc caatcgagtc ggacccaaaa gtgcgagacg 47520  
 ccttggatcg tgaactagaa ataaaactat acaagtagaa aaaaattaat ttattaatag 47580  
 ttgttataat tatcttcgtc ctcatctcg ctgggtgtcat aatcggtgg tttgtttgt 47640  
 ttttggattttt atcggttgcg cgtcgacacc acttcgcccga tagggaaattt tttggatttc 47700  
 gcattaaatg ccctcttagc gacgcggccgt ttacgactac taaacatgtt gacgcgtcg 47760  
 tcgtcttcag tgcataatc cgtcgatgt tttcggtgt tattttctat gagacgatcg 47820  
 tttgattttt tttcgtaga attgtccgcg ttatcgctcg tttcgctcgat gtcgtcccta 47880  
 actatctcgat aggcggctt gcgcggaaatc caagattttt caatgtatct attttaaacgt 47940  
 acttttcttc gagcgctttt ctatcgatgcg tttcgatgtt gtcgtcccta 48000  
 ttttatgata ctttgcataac gtcgtcgatgcg ataaactttt ggccgggggg ggcatttttt 48060  
 cattgtataa catatcgggaa atttgataca ttgttattttt aatggcaaa gttcgatcttc 48120  
 ggttgtactg tattcggtttt ctgtatctgtt agtggaaatcc tttgtacttag tagtagtg 48180

gctattgttgcgtcaggcc ttggctgcca tttaccgtct atcaacatgt atttttcct 48240  
 aacagcacaa catgctagct tggtagctat ctgtgtcgac ttatattttt gtaaactacg 48300  
 atcgtagaat ttttcaaata tcctcttacc gttataggaa aggttttgat aatatttagg 48360  
 caacatataca ataaaagaca atataaaaac tttgtgtttt tgttttatcc atcacataaa 48420  
 atggacgtct ggcaagaatc acaaccaata ttatgtttt ttttcttaca ttacgagatt 48480  
 caacttgata ctaaaattaa ttatataattt aattaaattt aattttgaag catttttcg 48540  
 ctatcgttt cagactcaaa attatcgacg ctatcgctat gaaaagcgtt atattttgt 48600  
 gctttgagat attctatatt ttgctcattt ttaacaataa acacgctgact cttttcgct 48660  
 cgtctcacca taacaccgtt tttacaaatg gaaatgtatt tgtaaaacgg caacagacg 48720  
 tcgcgagttt ttttaagtaa cagctttgc tccgctgtgg cggccacaaa tatttttacg 48780  
 gggccgtcgtt aattatgtt taaattaaaa ttttttaagtc gacgctcgcg cgacttggtt 48840  
 tgccattctt tagcgcgcgtt cgcgtcacac agctggcca caatgtggtt tttgtcaaac 48900  
 gaagattcta tgacgtgttt aaagtttagg tcgagtaaag cgcaaatctt ttttaataa 48960  
 tagttctaa ttttttattt attcaggctt ctgtcgtgaa taccgtatata ctcaacgct 49020  
 tctgtgagat tgcgttattt tagcctttt agttttcgc tcacgtactt gatattgtcc 49080  
 gacacatttt cgtcgattttt cgttttgatc aacgacttga gcagagacac gttaatcaac 49140  
 ttttcaattt gatccatattt aactatataca acccgatgcg tatatggc gtaaaatata 49200  
 ttttttaacc ctcttataact ttgcactctg cgttaataacg ctttcgtgtt cagacgtat 49260  
 catgtttctt tttttggata aaactcctac tgagtttgac ctcatattttt accctcacaa 49320  
 gttgcaaaac gtggcattttt ttaccaatga agaattttaa gttattttaa aaaatttcat 49380  
 cacagattta aagaagaacc aaaaattttaa ttatttcaac agttttatcg accaatttt 49440  
 caacgtgtac acagacgcgtt cggtaaaaaa caccgagccc gacgtgttgg cttttttat 49500  
 caaatcaact tgcgttatacg tcacagattt gccgtccaac gttttctca aaaaagttgaa 49560  
 gaccaacaag tttacagaca ctattaatta ttttttttcccaactttt tttttgtggaa 49620  
 tcacaattttt gttatattttt taaacaaagc tttcaattttt aacatgaaa acgatctgtt 49680  
 tgacatttcg ggccgtctgc agaaaatcaa acttacacac ggtgtcatca aagatcgat 49740  
 gcagagcaaa aacgggtacg cggtccaata cttgtacgcg acgtttctca acacggccct 49800  
 gttctacgccc aacgtgcaat gttttaaatgg tgcgttacgaa attatggcgc cggcggcag 49860  
 cgttttttttattatggac gtgtatgtggaa caacgtgcgtt gcatggacca cgcgtcatcc 49920  
 caacatttttgc cagctgagta cgcaagtctc ggacgtccac attaacgagt catctaccga 49980  
 ctggaaatgttcaaaatggcgttccggatattt tcccgccgtt aacacagact ggcacgggtt 50040  
 caaaaaattt attacattttt tacccaaacc taattcccta atcgactcggtt aatgcctttt 50100  
 gtacggcgac cctcggttttatttcatttt gtttgcacaaaccgggttgcgttgc 50160

acaacaaatt tattatgtt acaaaaatat tgacgcaatg gaggcggtt ttaaatctac 50220  
 accattgggtt tacgcgtgt ggcaaaaaca taaaacatgag cagttgcac agaggctaga 50280  
 gatgttggc cgtgatttt gcttaattgc cagttcaaac gctagttatt tactttttaa 50340  
 acagcttaca cagctcatag ctaacgaaga aatgggtgtc ggagatgaag aaatattcaa 50400  
 tttaggcggc caattttagt acatgattaa aagcggtgct aaaggcagtc aaaatctgat 50460  
 taaaaggcacg caacaataacc gacagactt aaatacagat attgaaactg tgcgtttcacg 50520  
 agccaccacc agtttaaata gttacatatac ttctcacaat aaggtaaaag tgcgtggcgc 50580  
 cgacatatacataacacgg ttgtgttaca gagcgtgtt attaaaaata actatgttgc 50640  
 ttacaaaac gacgaacgta caatcatgaa tatttgcgt ttgcctctgt agtttctgtt 50700  
 tccagaacat ttgctcgaca tggttattgtt atgataatataaataatgagcg catttgcgtt 50760  
 catgcaatca gtgttttattt aatttttagag caacatgtac gataaattta tgatctatct 50820  
 tcacttgaat gggctgcacg gagaagcaaa atactacaaa tatttaatgt ctcaaatgg 50880  
 ttttggaaat caagtagccg atgaaatcaa gcgggtttgt gaaaactcgctc tgaaaccggc 50940  
 aatcagttgc aacactttaa ctgcggaaag tctcaatacg ctcgttagaca gcgttgtcg 51000  
 caaaaatgga ctgttaatc cttaacccaa agaagtacag tttgtttgc aatatctttt 51060  
 tgacgatgac gaaatatcca aacgagatca agatggctt aaactatttt tattacataa 51120  
 ttatgacagg tgtgaaaata tggaaqataa ttttttaattt aacaattttt gcatagcaga 51180  
 ctacgaattt gaagacatgt ttgaaattgt tcgttattgtatgttgcgttattact 51240  
 tcttgctaaa tataatatgt aattaaaattt ttgtttgtt tattaaaatc ctggattaaa 51300  
 aaatgacgaa taatttgatt tgctgcacg ccaacaagat tcttcgtcat tatgtataat 51360  
 gcgtgcata agtttatgtt tttgttatttgcgttgcacc actttagcca tttgagcgta 51420  
 tctgcattcg tcgtcttagag tttcaaacac cagatcgccg caattataaa atccttcacc 51480  
 cacgggatct atgcgcgtcc aacgcacata cattacaaat tgatggacc tgcgttgcgtt 51540  
 tactacgggt atagaataga cttagactgtt gtcacataat gaatcgcccg gatttggaaat 51600  
 taaatttggaa tcgttaccac ctatgttattc taattcgttc caagttatttgcgttgcgtt 51660  
 atccccatgtt gattttagtaa taaacacttc aaaataactg ggctcggtta tggctgttgg 51720  
 acaaaaatga acattcatct gataaaccgg ttgatagcga tttaaatataa gctgttgcgtt 51780  
 cctccagttt taaaagggtt cgtccattcc gcttttatca ccaacacacag aattgcgttgcgtt 51840  
 gtttggaaaccgg gcaccggcaaa gtgtgtgcgg cacaaccctt tggttgcgttgcgtt 51900  
 gtcataatta ggaccggcca cagccgcgtt ttcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt 51960  
 tgtggaaaccgg gcccggccgg attctaaatc gagagctcga tatttataat agactgat 52020  
 gtaaggcatttgcggcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgtt 52080

tccatcttta aaacatttat attgacgggc cgtcgccacg gacaaatagc cgtgagagcg 52140  
 cactgceggc gcgtgaatcg cagcaaaaca tgcaattaat aatgcaatca ttatgattat 52200  
 acttatagaa cactaatcgg aataataacc gctgtcgtaa tcttggtcaa aaacgttatg 52260  
 ttgaaacata ataacacacctt acagtaacat acaataaaac aacatagttat cgtatataat 52320  
 tataaaacttt atttttcat ttttatacaa caaaatttat acgtattgtt agcacattga 52380  
 gtgtcatttt cgctgtctga actatcaca tcatcgcat catcatcatc attgtcatcg 52440  
 tagtcgtcac gtttgcgttt gacactgcat ttttttggt taatttcac taacactggt 52500  
 tctttcgtat cgtacaattt attctgcatt tactttgca tgatcgccgt aaaacacttt 52560  
 gcaattttat ccttttgttc gtcgccaaat atttccagca actcgatcat aatgtgcac 52620  
 aaaaatgccc a tttttttat ccagctgatt cgcattttca ctggatcgaa caaacgcaag 52680  
 ggttacgctt tttctgttac cttgccttcg atgtctatca aaaggtaacgg gatacgtatc 52740  
 ccgttgcggg gcacaaaatc cgtgccttg ttaaccaaaa tttctctaca atgcctagcc 52800  
 accgtaatca cgcgtctttt gggtgacgga ccctcattat cgtcagttga tttgcgtttt 52860  
 ttgccccgggt ttcgttata ggtcataacta aagctgttagt cggtcaacga ttttgcattt 52920  
 gcaaactcat catagttattc ataaaaacta gtctgtaaac tttgcaaaaca tttgtccatg 52980  
 tccaaatgac gcaatatttg ttccactgac gtcctaaacg cgattctcat aaaaacggc 53040  
 atatcctttt taactaacc aaccctgtat acgattttat ttcactgtt gagatagcaa 53100  
 tattttttct ttttaatag tattaaaact ttcattaaat tttcaaatgc cattttgtaa 53160  
 ccgtccgtga atgagttatt aacgcgtgtc tcaacatgtg tgcatttttgc ttttaatgtg 53220  
 tcgggttcgt tggatatttc gttatagttt aatgtgggca aaacaaaatgt agaatctgt 53280  
 tcgcccgtaca caactttaaa agtgtatgtg cccagattga atttttctaa aatctcagg 53340  
 tcgttgcata aaccttcaat cagagaaatg gccagccgca actgattgcg accaactcta 53400  
 gtgatgttagt ttgcaaggcac tttgtaaaaa atgcataat aaccgtatata gctattggc 53460  
 gtgcgttca cggatatttg ttttgcattc tacagatgt acaagaatgc cgattcgctt 53520  
 tgattgtcgc gattctttt aaatttgcac ctttcgttca acaattttaa tagcaattta 53580  
 acaactattt cacgcgaattt gtgggtcaaa tacacgttgc cgttgcgtca taaaattaa 53640  
 ttggacaaac aagcacaat ggctatcatt atagtcaagt acaaagaattt aaaatcgaga 53700  
 gaaaacgcgt tcttgcataat gcctgcacga ggtttaaca ctttgcggcc tttgtactt 53760  
 accgtttgat tggcggttcc caaatttgcattt gcatcttttagt gatgtttt tagaggtatc 53820  
 aatttttttt tgagatttgc aatacccgat gggctttgtt cggctttgaa ttggcccgat 53880  
 attattgaca gatcgttttt gttaaaaaaa tacgggtcag gtcctttt gccgggtgtc 53940  
 tcgttaatgc gctgtttgtt gatggctgtc taaaaggcacg ccacgctaat caaatgcgaa 54000  
 atattacata tcacgtcgatc ttttgcataat cgtgcataa tacattgcga atatacagaa 54060



atcacaaaaa acaaacatac gttttgcaat agatcagtat ctgtgcacta acatagttac 56040  
gtttatagat ttttttacta gagtcttta tttggtgatg cgaacaaatt ttcagttcac 56100  
caactttgac caattgaccc aatactctaa cgaactttac acaagaattc aaacgagcat 56160  
acttcaaaacg gcggcttcctc ttctcctcc gaccgtggaa acggtcaaca gcgatatacg 56220  
catttcaaatt ttgcaagaac aataaaaaag agaacgcgct ttgatgcaac aaatcagcga 56280  
gcaacataga attgcaaaccg aaagagttgga aactctgcaa tcgcaatacg acgagttgga 56340  
tttaaagtat aaagagatat ttgaagacaa aagtgaattc gcacaacaaa aaagtggaaa 56400  
cgtgcgaaaa attaaacaat tagagagatc caacaaagaa ctcaacgaca ccgtacagaa 56460  
attgagagat gaaaatgccc aaagattgtc tgaaatacaa ttgcaaaaag gcgatttgga 56520  
cgaatataaa aacatgaatc gccagttgaa cgaggacatt tataaactca aaagaagaat 56580  
agaatcgaca tttgataaaag attacgtcga aaccttgaac gataaaattg aatcggttgg 56640  
aaagcaattt gatgataaaac aaaattttaaa ccgggaaacta agaagcagca ttcaaaaat 56700  
agacgaaact acacagaggt acaaacttga cgccaaagat attatggaaac tcaaaccatc 56760  
ggtatcgatt aaagatcaag aaattgccat gaaaaacgct caatatttag aattgagtgc 56820  
tatatatcaa caaactgtaa atgaattaac tgcaactaaa aatgaattgt ctcaagtcgc 56880  
gacaaccaat caaagtttat ttgcagaaaaa tgaagaatct aaagtgcctt tagaggcac 56940  
gttggcgttt atagatact tttatcaaatt aattatgcag attgaaaaac ctgattacgt 57000  
gccgatttct aaaccacacg ttacagcaca agaaagtata tatcaaacgg atttatataa 57060  
agattgggtt caaaattga ggtctaaact gtcaaaccgc gacgttgcac atttgcatac 57120  
agtttccgaa ttgaqtgatt taaaaagtca aataatttct attgtaccac gaaatattgt 57180  
aaatcgaatt ttaaaagaaa attataaagt aaaagttagaa aatgtcaatg cagaattact 57240  
ggaaaagtgtt gctgtcacaat gtgtgtaaag cgcttttagta cagcaatatg aacgtcaga 57300  
aaagcaaaac gttaaactta gacaagaatt cgaaataaaa tttaacgatt tacaaagatt 57360  
attggagcaa aatcagactg attttgagtc aatatcagag tttatctcac gagatccggc 57420  
tttcaacaga aattttaaatg acgagcgatt cccaaacttg aggcaacaat acgacgaaat 57480  
gtcttagtaaa tattcagcct tggaaacgc taaaattaaa gagatggagt ctattgcaga 57540  
tcaggctgtc aaatctgaaa tgagtaaattt aaacacacaaat ctagatgaat taaaactttt 57600  
attttgttaaa tataatcgta aagctcaaga catatggag tggaaaacta gcatgcttaa 57660  
aaggtaacgaa acgttggcgc gaaacacacg ggccagcggtt caaccaaaacg tcgaatagaa 57720  
ttacaaaaat ttatattcat tttcatcttc gtcatacttc aacagtcctt acacggttcat 57780  
gttgtgatc tgcggcttc cgacagttac gtaaaatagtt actttgatta aattatcttc 57840  
cagcagcatt gagatttgat tggaaatccgc acatagctt tggatgcaat ccgcttcgggt 57900  
tttttttattt gtgttgcgtt agaaaacaga tttgttccat ttgccccaaat cgaaagggat 57960



atgggtttta tacaaaccgc cttcttctcg gcctgccaat tccgaacgct atttaatttg 59940  
 tttcaataaa tttagttagac cgtattgtaa caattatgtc aacgagttgg aaaaacagtt 60000  
 taaaaaatat tatcgatac aattaaaaaa cttaaacaag ttgataaact tggataaaat 60060  
 ataacgtgtg tataaaaagc cagcggcttc aaatcaggca tcattcaaca tggattcgct 60120  
 agccaatttg tgcttgaaaa ccctgcctta caagtttgag ccgcctaagt ttttacgaac 60180  
 aaaaatttgc gacgcatagtc gctacagatt tttacaaaaa ttttctgtat aaaaatttg 60240  
 tggacaatgc atatgcaaca tatgcaacaa tccaaaaat atagattgtc catcatcata 60300  
 tatatcgaaa attaaaccga agaaagaaaa caaagaaaata tatattacca gcaacaagtt 60360  
 taataaaacg tgcaaaaacg aatgtaatca acaatcaaac cggagatgtt taatttccta 60420  
 ttttacaaat gaaagttgt aagagctaa ttgttggat ttaataaaaa actgttacat 60480  
 gtgttggaa tataaaaaga atttatacaa tgtaaatttg tatacgattt atggtcattg 60540  
 tccttcgttt aaagccgttt gttttcatg tataaaaaga atcaaaacgt gccaagttg 60600  
 caatcaaccc ttattgaaaa tgtacaaaga gaagcaagaa gagcgtttga agatgcagtc 60660  
 gctgtacgca acgttggccg atgttagattt aaaaatatta gacatttacg atgtcgacaa 60720  
 ttattctaga aaaaatgatat tggtgtctca atgtcatata tttgcacgct gttttgtac 60780  
 caataccatg caatgtttt gtcctcgaca gggttataag tgtaatgtt tatgccgacg 60840  
 atctaaat tttaaaaata atgtattgtg tgtaaaaatgaaacggccgtt gttttataaa 60900  
 aatgaaaata aaacgtgttc caaaatggaa gcatagtgtt gattataactt tcaaaagtat 60960  
 atacaagtta ataaatgttt aatttttaagg atattgtt ggaataaaact ataaaatgaa 61020  
 tttgatgcaa tttaaaaatttt tgatacttcc cacagacggt agattcagaa cgatggcaaa 61080  
 catgtcgcta gacaatggatg acaaaacttga attggccaaa acggggctgt tttctcacaa 61140  
 taacctgatt aatgtatag gctgtcgac gattttggac aagattaacg ccaagcaaat 61200  
 taaacgacac acgtattcgat attattgtat atcgtaacc aacgcgttga tggtaatgt 61260  
 atcgatgaga aaaaaatcat ttacgagttt taaaagctct cggcgtcagt ttgcacatcaca 61320  
 atccgtggtc gttgacatgt tggctcgatc cggcttctat tattttggca aagccggca 61380  
 tttgcgttgt tccggatgcc atatagttt taaatataaa agcgttagacg acgcccacg 61440  
 ccggcacaaa caaaatttgcgatggatg acgtttctaa cgcaatagaa gactattccg tcaatgaaca 61500  
 atttggcaaa ctcgatgttg cggaaaaaaga aatactggct gccgatttga ttccctccg 61560  
 gctaaggctt aaaccttcgg cggcccccgc cgaaccgcta actcaacagg ttcggatgt 61620  
 caaaatgtt tttgatagag aaaaatcggt gtgttcatg cggcgttgc acctggctgt 61680  
 gtgcacggaa tggatgttgc ggtgcaagcg ttgttggatg tgcaacgcaaa aaattatgca 61740  
 gcgcatcgaa acattacccatc agttaaacatt gcaaaacgact acgacattct taaaataaa 61800  
 gctatataata aatattgtat tggatgtacaa aaaaatttattt aacctactgc aaagtaaaac 61860

ttgtaaaagg cttttcaaaa aaatttgcga gtttattttg tgcgtgcgtc gtgtcgcatc 61920  
 taagcgacga agacgacagc gacgggtgate gctattatca gtataataac aattgttaatt 61980  
 tcataatacat aaatattgt aataaaaaga catattattt tacataatgt tttattgtaa 62040  
 ttaaatttaat acaccaattt aaacacatgt tgatgttggt gtgaataatt tttaaatttt 62100  
 tactttttc gtcaaacact atggcggtgc tttcgattag tttttcggt agcattcat 62160  
 ctaaaaaatc aaactgtttg cccggcggtt ttagggatc tatgggttag tcgggcgtgt 62220  
 cgctgtttag atattggtcc acttcgcgc ttatgtccaa gacgttggtc tgcaaatgaa 62280  
 tgagctttgt caccacgtcc acggacgtgt tcatgtttct tttttgaaaaa ctaaattgca 62340  
 acaattgtac gtgtccacta tacaatttgg cttaatatac tcgtcgccgc aatcgatattt 62400  
 gcaatccaat ttctgtttca acaaatttggt gatgatatct ttgaacgtgc acgttttcaa 62460  
 tttgtccctta tcggccaaacg caagttcaa ttctgtctgt aaagtttcta aaattttgtc 62520  
 ttatttggt tcaaatttgcgtt gctgtttgcg ttccaaccac aatttgaacg gctcggtcgac 62580  
 aaaaatgctg cgcaacacact cgtacaactg tctgcctaaac gtgtacactt gctcgatattc 62640  
 tttcatgctg acctctttgc taacgtacat tactaaaaaa tctacaagta ttttcaaaaca 62700  
 ttgttaatag ggcacgtatt ttgatttaag ttttaaaccg tccaccgtgt attcgccac 62760  
 gttcgcatcg accacttttgc gattattatc gcccgttgcgtt gccggcggtt cggcgttgc 62820  
 gtttttaact atatccgggtt caatatttaa agttcaaaa gatttaatgg cattcataaaa 62880  
 atcatttttt tgctttggcg tggtaatgg taaatctatc gaggagttgt cgtccgtgt 62940  
 ctcttcgggc acgctgttca gacgtaacgt aatcttttgcgtt cattcataaaa 63000  
 caaatcggtt ttaattttat tagaatttgg caacgacatg gtggcgctt gttaattttaa 63060  
 taaattaattt aaagactgaa attgtatattt gcacaaattt attttcattt ttattgtatct 63120  
 tactattaat acgctggcag ttggatgtct tcatccattt ttgtgacttag aaaaatttgc 63180  
 aaaaaactga gctcgctcg tggtaatgg tggatgtctt tggatgtctt aatttcattt 63240  
 gttacactga cattgtttaa caatgcgtt attaaaaaat caacctgtcg cctactgagt 63300  
 ttatttggatg agtcgaccgt ttctactagt ttgttagattt tggatgtctt aatttcattt 63360  
 tttaaaaaaca tggtaactac tcgtttggatg ttaagcgaaa aatccttgcg cggatagact 63420  
 tggatgtctt gccaatttgcg aagatgggtt ttgaccacgg acaccttggt ggtgaacgtc 63480  
 gtcgatgttgcg tggatgtctt aaaaaatgggtt ttgaccacgg acaccttggt ggtgaacgtc 63540  
 tatcaatctt tggatgtctt agtcgatgtt tggatgtctt aatttcattt 63600  
 aatttttttc ggacgttgcgtt agtcgatgtt tggatgtctt aatttcattt 63660  
 ttcttactta taatggccgg gctgacgata ataaacacgaa gaaacaatat gagcagatac 63720  
 aaaaagatgc tggatgtctt tttgtcatac actaggctaa atatggccag tggcccaac 63780

aacaaataaa aattcatttt tattccctta ctctattcgt tgcgatagta caacaacgat 63840  
tctcccgacg aaccggacga attgcgatta tgctgcgcgt cgtcgtcgtc gttgttggc 63900  
tcctcttcgc tgctcggtt gctaaacct atattgtatt tggtaaagta atggttggc 63960  
cttgcggagg attcggtt cattaatttgc gcaactttt gtaaaggac gcccgtatttgc 64020  
tataggttac tgctcaaata atgtcttatac atgttgcgtgc gcccgggttc catctcgacg 64080  
cccgactctt caaggagtcg cctgaaatct ttgaaggcg tcgagggtttt ttttagatatt 64140  
tgcaaaatgg tcgggttgc tgaataaatac tgcgtgcata attccaaacgg tttcattttgc 64200  
atgttgcgttgc gtgtgttattt acgactgcgt tttcgcttta attaaatcg tgcgtgtgc 64260  
agttttccctc ttttaatttag cacgttgaga tgcgtccacgc tgagttggcg cgcttcgttgc 64320  
attcgatatac ccgtccctaa catgatgcaaa aacactatcg cgccttcaat tagaccgggg 64380  
tcgtgaacat aatcgctgtt gaggcattta attttatcat taataaaattt taatatggta 64440  
tctattacgt ttttaagcat taaattctttt tccctttccc tgatattttt gagctccttgc 64500  
tcgcgcggca gcataaccat gcggggattt ttgtattcgg gcaagttcat catgttggc 64560  
taaaaagttt tagtcaactg tagtgtttctt ttggtgaccg agcgaagttc gagcatgcgc 64620  
ctgcacagtt ctggggatc aatgagaagt gtttgggtttt ctatcgatc aaactccttgc 64680  
tccaaacgagt acgacatgtc ttccaggtga acatcgctca cccgagcagta cacaattttt 64740  
atgaatcgag acttgcgttact ttttaaaatgt gtgggcgcaaa acgggtttggg gaacatgtac 64800  
ttgtccaca gactgttgc ttccacctcg tcgggcgtgc atcggttgcg atcggtggcc 64860  
aaatcgaca cggactcgaa ccggggagcg gattgaattt ttatttccaa agaattaaaa 64920  
ttgttttgcgt tgcaacattt aaaaaccgttca attgtggta atcaaaatttta taaaaaaca 64980  
aaggagaatc ggtgtcaata ctatccgaat attgttgcgtt ttctcttaat attacgaaat 65040  
aatatattac atacagcgt aagaataaaag ctataaaagc gactacacta attaaaattt 65100  
taattcccgcc cgacacgttg ctgcgtgt tgcatagcc caccatgtcg tttattggca 65160  
ttttgtgaac gggctcgcta aattgttgcg gttcgctggc agtacgtcg ttgagcgc 65220  
atttcaacgg gatgttgcgttcc accttttcgtt gtttgcggca cccgatagtag ggcacgtcca 65280  
aattcatgtt tacaacttat ttgctaacag gaatttatgc aacaaaagtg gtttggcttt 65340  
gatgagacgc aatttgcgttcc accttttcgtt gtttgcggca cccgatagtag ggcacgtcca 65400  
ggcgggtgttgc tagtgcgtacg cgctcgcgct gtgatacagc agccgtaaat tgggttgcgtt 65460  
gcccggccatc ttggcgccattt gtttgcgttgc atgcgtttt atgcgtctgt taagattgt 65520  
cgatgcgttgc gtttgcgttgc atgcgtttt atgcgtctgt taagattgt 65580  
gttgggtgttgc agagtcgtcg ccatgattat gcaatgcgttgc ctttcgttgc gggccggact 65640  
gcccggccatc ttggcgccattt gtttgcgttgc atgcgtttt atgcgtctgt taagattgt 65700  
aaaataaaaac gtcttagatgtt ttcatttgc ttggcgccattt gtttgcgttgc atgcgtttt atgcgtctgt taagattgt 65760

|   |       |
|---|-------|
| gcgcgtttgg tcaaatttgcgc ggcggccgaa ttgaccgcgt tggcgccga cgttaagaag    | 65820 |
| gtggcgttct ggaacatgtc gggctgttgc cccgctcgcg tcgccagctc ggccatgtaa     | 65880 |
| ttgaataatgt tggcagacgc agatagcggc gccaaaaacg caacgttctc ttttaaactc    | 65940 |
| atgactcgcg ccctgttttt ttcgttgcgc acgttagtggt agtaatcgcc gccggccgca    | 66000 |
| aacagatcgt caatcacggc gttgatcaga tcggtgatca tggatgtg cggaaagcga       | 66060 |
| cgcgactcga ctgcgtctg tatgtttggc ggcagagtgg cgtgcttgcg caacagagtc      | 66120 |
| atgtaattgt tggccagctg ctgattgaaa ggttaacggaa tggaaatgtt gcacgtcacc    | 66180 |
| gcttccgcca ccatgtactg gacggccaga ctgagttgtt tggcggccctc ggccaaagcg    | 66240 |
| tctttggcca acatatcgc gccaccgtt taaaactttt gcgcgtacgc cggcagcga        | 66300 |
| tttagcacaa acgtggctg aaatataattt gaatcgctcg acaggactc ggccgcgttg      | 66360 |
| ctctgtccca actcttttg caaccgaatc aggtggcgta tcatgttgc tcggattca        | 66420 |
| aaccgttttta ccacgtttac gctgattggg ttcgtgtcga tgcacatgtc acgaatagt     | 66480 |
| tttataaaaaa gaatcatgag aggactaagt tctgacatgt cattgcaccc ttaatatcta    | 66540 |
| ataatctttt gaacaaaatc cacacatttgc ttgtacccaa tagattcacc ggcgtcgagc    | 66600 |
| gtcggttctt tgctttgtt gtacggtgca atcgctaccg agtttgcgtt gttgtcgccg      | 66660 |
| ctcgtgtaat ccatcctgtt gtcgcgcgtg ggcacggcgt taggcaccgt cgccggccgc     | 66720 |
| acgtacccgg ggcgttgcg agtttgcgcg ctggtaataa tggccgttgc cggatttagag     | 66780 |
| ggataccctca gcccggagg ggtgttgc taaaattgc cacgttcatc tgcatactt         | 66840 |
| tttatttgc tctttatgt tacaaaactc aatatacggc ttacttataa tatagttgc        | 66900 |
| gtgacaaaaaa agcgataataa aatttacaa aattatcaac aagttaatca tggaaaattt    | 66960 |
| ttcaacgttg aataacaaca acaaaaatggc gcaggtaac agcaccgtt gaaaactgac      | 67020 |
| gcgcgcacac aaaatgtttt cgcaatttct aaaagccaca taaaacgaat ttccaccttt     | 67080 |
| gatataatca cgcagttttt tttacaaca ttgcgtcgac aaaattaaca cctttataat      | 67140 |
| gaggccgtcg gtgtgtatcg tttgaaatgt cccgggttgc ctgcctggat gaaattcaaa     | 67200 |
| cgagttccca gtggacacgt gatctgtgc aaaataatgg gctaataatcg aggcccccgt     | 67260 |
| ttttttttaacc ttacttttg atattttat aacattaatg ttgttatttg cgtaatcaga     | 67320 |
| gtttttatttgc ttgtgtatcat cgtacaaaata atgaagcaac agttcactat cgtatttaat | 67380 |
| cttgcgttgc gttgtcaagt tttgtttct taggcgttgg agcgctcgg tcgtcgatata      | 67440 |
| tttcttcgaa atcgagtcga acaacgtcgg cgtttcccttc ttgcgtatcg atagccggcg    | 67500 |
| cgaggccggc ctctccgtcg tgcgtatcg cggtttctac agtgcgtttg ggcgacgcacg     | 67560 |
| tgtgtacagc agcggtccgtc ttacttattt cggaccgcga aatttttgcgtt tgaataaca   | 67620 |
| tttggccctt gttcaactttt atttcggcgc agttaaacat tattgcattt agatcatatt    | 67680 |

cggcgtttg caccaaattt cacaaaacac catagttgcc gcacgacact gtagaatagg 67740  
 cgttttgtt caacaatctg agttgcggcg agctagccac cttgataata tggcgccaa 67800  
 cggcccgttt ttttaagtaa tattcgtttt caattataaa atcttagtacg ttttcattt 67860  
 cactgttgc tttggcggtt acgatgtatgt ctggcgtaat gttgctcatg cttgcccatt 67920  
 ttcttataat agcgtttact ttaatgtatt tggcaattta ttttgaattt gacgaaacga 67980  
 ctttcaccaa gcccgtccaa gtgtactg aatatgtgaa gcccaccaac gcagacgaac 68040  
 ccacacccga cgtaataggc tacgtgtcggtt atattatgca aaacacttat attgtacgt 68100  
 ggttcaacac cgtcgacccctt tccacccatc acgaaagcgt gcatgtgac cggattgaaa 68160  
 ttttgcattt cttaaatcaa aaatttcaac ctgtgtatcg aatcgacac gatcgctta 68220  
 gagcaaatga tgaaaatccc aacgagttt ttttgcggcg cggacaaggcc gacgtgacca 68280  
 tgaaaatgccc cgcataattttt aactttgattt acgcacaact aaaaatgtgtt cccgtgccc 68340  
 cgtgcgacaa caagtctgcc ggtcttatac ccatggacga gctttgcgtg gacacgttgg 68400  
 tggtaacca acacttggac aaagattttt ctaccaacgc gcacttgcata catccccacgt 68460  
 tctatcttag gtgtttgtt aacggagcgc acgcagtcga agaatgtcca gataattaca 68520  
 cgtttgacgc ggaaaccggc cagtgtaaag ttaacgaattt gtgtgaaaac aggccagacg 68580  
 gctatataact atcatactttt ccctccaattt tgctcgtaa ccaagtttatg cagtgcgtaa 68640  
 atggcgccca cgtggggcga gaatgcccccg cgaataaaaat atttgcgc aacttaatgt 68700  
 cgtgcgtgga agcgcaccccg tgcgcgttta acggcgccgg acacacgtac ataacggcc 68760  
 atatcgccga cacgcaatattt ttcaaatgtt tgaataataa cggatcacaatc ctgataacgt 68820  
 gcatcaacccg gatcagaacac tctgacaacc agtacgagtg ttccggcgac tccagatgca 68880  
 tagatttacc caacggtaacg ggccaaacatg tattcaaaaca cgttgcacgac gatatttgcgt 68940  
 acaacagtgg ccaattggtg tgcgataattt ttgaagttt ttccggacatc gaatgtgatc 69000  
 aatcaaacgt gtttgcggc acggcggtcg tgccagccac cggacaaat gtcaactttt 69120  
 tacgttccac gtttgcattt gaaaatattt caaaccattt tggcatcgac atgcaaacct 69180  
 ccatgttggg caccggccaa atggtaaaac agttggtttcaaaatggatgg tggtaaaaca 69240  
 acgacgcccattt ctgttgcataa tggctttgtt atgcgagaga caaagacgcc atcgggctta 69300  
 acccggttccac cggcgacccat atcgactgtt ttggagacaa ctgtacgtat gtgtttgcac 69360  
 cttagacgcgc aaacattttt aacgattcgg gaaacggcgat tttaaaacgt ctcaattttt 69420  
 gcgatggcgaa gttttaaac gtattgagca gacgctgac cggaaaagat gaggattatc 69480  
 gccaattttt tgctatatacc tacgaaaacg gccaatggat cgttagaaac gaacattttc 69540  
 agcgacgtat attgacaat atactacatgtt cggacgttttgcgcgaccta tataactacac 69600  
 ttaccaaaa atataactaca ctaaactcta aatataactac aactccactt caatataacc 69660

acactctcgtaaaacggccc aaaaatatacg aaatataatgg ggcaaataaca cgtttaaaaa 69720  
 acgctacgat tccaaaaaac gctgcaacta ttccggccgt gtttaatccc tttgaaaacc 69780  
 agccaaataa caggcaaaac gattctattc taccctgtt taaccctttt caaacgaccg 69840  
 acggcgatg gtacagcgaa ccaggtggcg acgacgacca ttgggttagtg gcggcccaa 69900  
 ccgcaccacc tccaccgccc gagccagaac cagagccaga accecgagcca gaaccggagc 69960  
 cagagttacc gtcaccgcata atattagaca acaaagattt attttattca tgccactact 70020  
 cggttccgtt tttcaagcta accagttgtc atgcggaaaa tgacgtcatt attgatgctt 70080  
 taaacgagtt acgcaacaac gttaaagtgg acgctgattt cgaattggcc aaagacctat 70140  
 cgacgtttt gaacgcgtac gcttatgtgg gcaatggat tggtttaga tccgcgtacg 70200  
 acggagatgc gatagtggta aaaaaagaag ccgtgcctag tcacgtgtac gccaacctga 70260  
 acacgcatac caacgacggc gtcaaataaca accgttgggtt gcacgtcaaa aacggccaaat 70320  
 acatggcgtg tcccgaagaa ttgtacgata acaacgaatt taaatgtaac atagaatcg 70380  
 ataaattata ctatttggat aatttacaag aagattccat tgtataaaaca ttttatgtcg 70440  
 aaaaacaatg acatcattcc ggatcatgat ttacgcgtag aattctactt gttaagcaag 70500  
 ttaaaataag ccgtgtgcaa aatgacatc agacaaatga catcatctac ctatcatgat 70560  
 catgttaata atcatgtttt aaaaatgacat cagcttatga ctaataattt atcgtgcgtt 70620  
 acaagtagaa ttctactcgtaaaagcgtt tagtttggaa aaacaaatga gtcacatcattt 70680  
 aacatgttaa taatcgtgta taaaggatga catcatccac taatcgtgcg ttacaagtag 70740  
 aattctactc gttaagcggag ttccgggtttt aaaaacaaat gacatcattt cttgatttg 70800  
 ttttacacgt agaattctac tcgtaaagta tgttcagttt aaaaaacaaat tgacatcattt 70860  
 ttacagatga catcatttct tgattatgtt ttacaagtag aattctactc gttaagcaag 70920  
 ttttagttta aaaaacaaat gacatcatct cttgattatg ttttacaatg agaattctac 70980  
 tcgtaaagcg agtttagttt tgaaaaacaa atgacatcat ctcttgattt tgtttacaa 71040  
 gtagaattct actcgtaaag cgagtttagt ttccaaaaac aatgacatc atcccttgat 71100  
 catgcgttac aagtagaatt ctactcgtaa agcgagttga attttgatttta caaatatttt 71160  
 gtttatgata gcaagtataa ataaccgcac aaagttaat tttttcatt tactgtcac 71220  
 catgtttcga atatacccta ataacacaac tggcccggt tgtttagtgg gtgacattat 71280  
 tcaagttcgtaaaatg tataaagatg tatacataat tcgttttttgcattt tttttttttt 71340  
 gcctaacgtt gcgattgtaa acgaatatgg acctaacaac cagtttagtaa taaaacgcaa 71400  
 aaacaaaatcg ctgaaaagct tgcaagatgg tttcgctcaaa 71460  
 gaaacctttt cgtcagttaa aatcgtaaa tgctgtttgt ttgatgcgag acattatatt 71520  
 ttccgtgggt ttaccaatta ttttaatcc ggctttgcta caaagaaaaag tgccgcagcg 71580

cagcgtggga tatttcatga attcaaaaatt ggaaagggtt gccaattgtg atcggggtca 71640  
tgtcgttcaa gagaaacaat tgcagagtaa tttgtatata gattattttt gtatgatttg 71700  
tggtttaat gttttaaaaaaa taaaagaata acaatttaca cattgttttta ttacatggat 71760  
aatgttgtt gtttgcatt aaaggttatc atggtcaat gattaataat aaaacaataat 71820  
tatgacatata ttttccgtt atttacaat ataaaatcac accaattgtg caaagttta 71880  
ttatgtttt gtcgacggc gaggggtcag cggcgtgtgc aacaataaaa aacatgaagc 71940  
tgttaacaat ttgttattta ttttattcat tttttatgaa ttgcagcg ctaccagatt 72000  
accatcaagc aaatagggtgt gtgttgcgtgg gaactcgcatt tggatggaaac gatgacaata 72060  
gccaagatcc caacgtatata tggaaatggt gttaaataaaa agtgaatata tttttataa 72120  
aattttttat taaaattcc aagtaatccc tgcaaacatt aaacactgtt ggtatttta 72180  
aatcttgcca catgcgaaca acgcacggcc tgcgtcgaa caccgctatt acattatatt 72240  
ttccctctgtat atagttgtta aacaatttttta attttaataaa ataatcttta caagtatcgt 72300  
ctgaaggcct cataaacaat ttatatgatt taatatcaaa atacttttca atccgatttc 72360  
gagtgggctg ttccaaaattt acgcttctcc cgctcataaaa cacgataatt gcgtcgtggc 72420  
aatttgccaa atacttaacg caagtaataa cgtctaagcg ggcttcatct tgagaactc 72480  
tattatcaaa atcataaaac gatctatttg tggcaaaagc tactgtaccg tctaaatcac 72540  
ataatacagc gcccccaat ttgtcgccga caggaacgta atattcgaaa ttatttacct 72600  
tttagaaactt ttatattgc tttaatag ttctggatt taatggaaat ttatcagagc 72660  
gtttataatt gcgttcaaga gcccgttcca aagaaacgct catcaaacgc gttaaaaaat 72720  
ggtaattatg cgttcgccg atttttgc acatgtccac cgattgagtg ttcaatttag 72780  
tgcgtctac aaccacgttgc acaccacatt ttgcggctt taaaaactgt tcaatgcaca 72840  
ttttggtaat ttgttcttct ttagttgtc tacatttccg cgattggta tagaaacgct 72900  
tcagttttgt ataatcgccg tttaaaaaca acttaacgctg cacgtcgctt ctgttgcattt 72960  
ctgtatagcc tttaaactt ttggcatacg tgctttgc cgaacccgaa atgcctatca 73020  
acaccaacaa ttgtttgaa gaaggcaatt taattgttgg agcaagttta ttatataatg 73080  
cctgcttagt cgatacaat ttataatatttttgc ttttgcattttt tcaggctcgg 73140  
ttaattttaa aaatcgctc tccacatcgta tcgtttgtgc tttacgcattt ctgtacgctt 73200  
aacatttcca cggcaaaagt tgcaccagtt cggtgaaacg ctgttgcattt aagatcaaac 73260  
ccgacacccat aatatttttgc ttagactcgat tggtaacgctt gtttgcatacg tcaacgtacg 73320  
gtttatgac actttttaaa tgccggaaaaa gagctagaaa gtcatcgat tgcgcatttt 73380  
taacaagctg cgccaaatttgc ttaggatttt cagcacggctt ctgttgcattt tgcgttca 73440  
aatacacgtc gcttttaatc ttgcatacg tggcgatgtt tttatcgtaa actacaat 73500  
cttcttccaa attttcaac tggccgcgtt gtttgcacaca ttcttgcaca gacgtaaact 73560

cgtaacattt ggggtatttg caaaacggca aattggaaca gtaaaaataa tcgcccgtt 73620  
 cgttgttct gcttgc当地 taccacaacg ttggctgttc atcgtaaacg gttacaattc 73680  
 tgggtgttt gcttgttaac tcaaacatgt gagtcgacgc gcagtctaaa tattcggtac 73740  
 acaacgcttg aaattgattt tgggc当地 ctaagttgaag agcttgc当地 actaaacgtt 73800  
 taaacgtcac gtctgacacg caaaggttt ctgcaaaagc acttctcggt gtc当地 73860  
 gccattcgcc gttgtacttg tagattttaa taaaacttcc gtc当地 73920  
 taaaattctc cttcgatttg aacagttgt gatgagcatc ttgc当地 73980  
 gcaattctt当地 aaaattaaag aaacgatcga aagaacgc当地 cacaacggcg tacgtgc当地 74040  
 tgtaagaat taaaccgc当地 cattccacga ccacaggatg atctcgatcg cgtaaacg 74100  
 attcgttaattt aagaaccatc aaatcggtt cggtaattt ttaattttt actttaaact 74160  
 tgtcaca当地 attttactt ccgc当地 74220  
 ctgttaata atgc当地 atgctaaact gtcttataata taaaatgc当地 tgataactt 74280  
 gttatcaacg cgttcgatgc cgacatataaa acacgcaatg taacagttt tgcttagtacc 74340  
 atcgc当地 acattatgaa tacaagggtt tggttaata ataataaaat gatatttg 74400  
 aatgcttgg gcttgc当地 tcaaagtaaa ttgaaaatta ttgc当地 aataactagaa 74460  
 aaatgttaaaac gtgacgc当地 cacgc当地 aaggcgtaa aggcgatcaa gaatgaacta 74520  
 aaaacataca atcttacgtt gcaacaatac aacgaggcg当地 tcaatcagtg cgctt当地 74580  
 gatagccgat ggc当地 gagacaa aataattgg catcacgata ttgaagaagg tgtaaaaata 74640  
 aacaagagac atatatata agttaattt aattctaaa cccaaagaaat tgaagaatata 74700  
 tattacatta aagtagaaatg ttatgtaaac agttaatttata tctacatttata ttgttaacatt 74760  
 tggttaata gtggcggttgg ttatacattt atatgattgt aatgttgc当地 actcgttt 74820  
 taataaaattt ttgtgtttaa tcaattcaat attttatttata gataaaacct tatttc当地 74880  
 actcaatttgc当地 gcttttttag acgcaatttgc当地 tgc当地 attttgc当地 74940  
 cttttgc当地 gtaattcgtt tcaatttgc当地 ttctttaaaa gatttgc当地 tggtgttgc当地 75000  
 gtc当地 ttttgtctt acttttgc当地 catagaaacg cttgtttgtt gtaatttgc当地 75060  
 taaatctaat tggtgtttaa tggtgagctg cgtttgc当地 gcaatgtctt cctgttagttt 75120  
 ttttagtatac gcttgc当地 cagacagcat agtgc当地 cgtc当地 gcatttgc当地 tggtgttgc当地 75180  
 tgc当地 tgc当地 aacagacttt tttcaaaacaa cacactggcc aaagaggccg catcaaaattt 75240  
 agcgtttattt ttattccattt gtgc当地 acgcttgc当地 cgc当地 catttaatca catccacaac 75300  
 gtttgc当地 acgcttgc当地 cgttgc当地 ctttttttgc当地 gcaatgtctt cctgttagttt 75360  
 tactttttt cgttttctaa tcttgc当地 acacatttgc当地 cataatttgc当地 gtttgc当地 75420  
 gtcttagtttctt aatacgggtttaa ttatagtctt gtttgc当地 gtttgc当地 aataattttt 75480



cgctaaacaa cattgtggcc tttcaatgcg aggttatgga caaacaaaag atttacatta 77520  
 cagatttgct gcaagtgttt aaatacaaat acaacaatcg aacacagtac gaatgcggcg 77580  
 tgaacgcgtc atacgctata gatccggtga cggccatcg atgtataaaac tacatgaaca 77640  
 acaacgtgca aagcgtcacg ttgaccgaca cttgccccgc aattgaattt cggtttcagc 77700  
 aatttttga tccaccgcta cagcagagca attacatgac cgtgtccgtg gacgggtatg 77760  
 tcgtgctcga caccgagttg agatacgtca aatataaaatg gatgccaaca accgaggtag 77820  
 agtatgacgc cgtgaataag tcgtttaaca cactcaatgg gccattgaac ggtctcatga 77880  
 ttttaaccga cttgcccggag ttactgcacg aaaacattt cgaatgtgta atcacggaca 77940  
 cgacaataaa cgtgttggaaa catcgctcgcc accgaatcg gccaaattaa agcacgttaa 78000  
 gcggatacaa cgggcagtcg gagctgttaa agtcaataca accatcgtaa acaaacgaaat 78060  
 acgcattgtt gtgacagctg aggtataaa aaggaataga gaagtaattt caatgaaata 78120  
 tcccgttaca attccacggc acagcgatg ttgctcgagt tctatcgatg gcacacaacg 78180  
 gcctaagaaa atttattaaat gcttcattt tatctatattt agaaggataa tacataggtt 78240  
 cggccaaagg actgggagaa ggcggcggcg aaggtgttagg tggtaggagga ataggagaag 78300  
 gcccggcga aggtgttaggt gttggaggaa taggagaagg cggccggcgaa ggtgttaggt 78360  
 taggaggaat aggagaaggt ggaggtgttag gtttaggtgt tggaggtataa ggtgtggag 78420  
 gaggtgttagg tggtaggtttt ggaggtatag gtgttggagg aggtgttaggc gaaggtggag 78480  
 aaggtgttagg agtaggtgga ggtgttaggtt acggtaaat tggtaggtt gtaggtgggt 78540  
 gtacaattgg tggatttggaa tacaatttcct gaatgtcgtaa taatattttt aaagttaata 78600  
 aaattattat aaataaaattt aatatttattt ttattattat tatacacaata atgtaccaca 78660  
 tggtagttaa atataaaaat taaacaaaaga atgttgtattt attgcaaaattt taacaatttt 78720  
 ttgtatttctc cccatgtcat gcgttcgtaa tgagcggcg gttttttattt tctttgtatc 78780  
 cacttggtaat cgtaatgtg gttgtaaaaa gtcataactga cgtaggccat taaattttt 78840  
 atgagcatat tatttgcacac aactgcaaca tctgcgcctg ccgtttcttgcgttacgaa 78900  
 tcgacaaacg taatgtctgt gccgtatattt tctttgtcaa tgcaatttc tataagctca 78960  
 atgtggtaaa tgatgaaacc tttgacgttc atataatgtat cgccggcacat ggcgcactgt 79020  
 agtataaaaaa atacgttgcataa aatagcacc ttcatgtttt tcaactgctg catgacaaaa 79080  
 tctaaactgc tttgtctcg cgtatacacc atatgtcgtaa tgatgagact gagaaagtgc 79140  
 atgggttccc atatggtagt aaacgtgtaa gtaaaactct tgggtggca cgaacgc当地 79200  
 ttgagttctg tgggtttgtc cataaattct atgcgaaact gttgcaagtc catgtcgcccc 79260  
 gatgcgtttaa tggcccatcc gatcaactgc tgcacctcgat tttttgaat gtctttgtat 79320  
 ttcatcaaac acgacaaaaatg gtataagtaa gttgcttgcg aagacaacag tttgggtgagg 79380



tacttttagca gccccttggta ttttctgctc ttggaatcgc ttttgctcga atcggcatgc 81420  
 ttcttaaagt acgactcgct gcattgttcc aactcggtga tagtgtacaa ctgcgagttg 81480  
 agtttgcgtca cttcccttgc ctcgttcc ttgttggact ctccgctgtg gttgtcatcg 81540  
 tcaaaacttgt gcatcaacac caaatagtc aacagctcaa aaaacgacga cttgcccga 81600  
 cccgggttcgc cgggcatgt aatagccttc tttccgtaat ctacggaaat ggccaaacta 81660  
 gccggcgaat gcatcaacat aatcggttc gctgtgattaa aattggtcaa gctgtttaaag 81720  
 tacaatagc cttcgacaat cttttcaaa taattgtacg agtactcctt caagtccact 81780  
 ttggacatga tgatgcgc aatgcgttgc gtcagccaag tggcaaaatc gtccgtgctg 81840  
 cgcgccaata tgatgttgc ccaccacaca ttgtacttct tcaagatcat taacgcgtcg 81900  
 gctgtggtgcg tggaaaattt ggaaatgtta tccgattctt caaaactgaac atcgggttca 81960  
 cgtgcaacat catcgccaa ttccgttaaa aacaaacgtt tatcattaaa cttgtccatc 82020  
 aacatgtcga catattcgat ttgtgaatt gttcgatata agtactgaat aattttgtt 82080  
 tggttttgg aaaaaaactc tccgtgttgg ttaacaaattt cgctgttgcg gcaatcaac 82140  
 gttgtcgaca cgtacgtttt gtttagtaaaa attagcatcc aaatcaattc gctcaattct 82200  
 gcatcggttac cgaacatgtc cgccatcaag cagacttttta gctgtttctt attgtatctt 82260  
 attttcttgcg agcatttgca ttttggtcga gatcccgata ccgttgcaccc acacgggtt 82320  
 catttttaggt tggcaacat gtcggaaacc ctgttcttgc ttacgtacag agcgagcgt 82380  
 atcagattttt catcgccaa atccacaaaa tcgcgaaaca gttgtttaa cgccactcg 82440  
 atatcggtt ggcattgtttt gcaattggcc atgttagttaa ctatggccgt gtttagtttt 82500  
 agcattttta catctcgccaa cattttggcg atgtgataag ttctataaaat gctgagctcg 82560  
 tcggcgctag tagatagcat gtaattaaac gctgttgcgg gcaaatactt ttctgttgc 82620  
 ggttttttgcg atgtctgcgg caacgtggc gccaacaaaa atggacagct cgaatgaaag 82680  
 ctgttgcg acacgttgcg cacaccgtgc gttgtcaagt acaagtattt ccaattgtt 82740  
 aattttatgt tgctcaactt gtaacaattt cttttggcata atttgaatag gtcatccct 82800  
 ttctttacaa tttgataatg tttggccgtt gaaaccaat tgcgttgcgtt cactacgtt 82860  
 tccaaattttc taaagaatcc tttacacaca atgtcaggcg gcaagtttag cgccatcaca 82920  
 ttctcgatcg tggatcgccca caattcatcg tgatccaaa ttctgtttttt agccgactcg 82980  
 gtcacaaata tcatgtatgt tatgcacaaa taatagccca acgatacgca caattggta 83040  
 tgcgtcaatg caaccaatg attgcaggcc ctatcaaaca ctatccctt tttgtttttt 83100  
 taaggctcac atcgcttcaaa agcttcattt aagcttctt tgatcgccggc aaataatgt 83160  
 tcacacaaaa gttccaaaaa cagtttgatg tcggtttctt tgcgttgcgtt gacgagaa 83220  
 ttggtcaata tttccacag tacatagatt aaaaaatcaa aatttttaaa tttgtttttt 83280

tcaaagtatt gttgtagaag gtttggatcg ttggatcg ttggatcg cttttttttt 83340  
 accatgttct cgtgaattgc tataagcccc aaattgattt gctttttttt gttttttttt 83400  
 ttttcgatgc tcgatgcata aatgggtacg atgcgtttttt ttctttttttt cttttttttt 83460  
 aatgtttttttt cttttttttt aatgtttttttt ttctttttttt cttttttttt 83520  
 acgtttttttttt cttttttttt aatgtttttttt ttctttttttt cttttttttt 83580  
 cttttttttttt cttttttttt aatgtttttttt ttctttttttt cttttttttt 83640  
 gttttttttttt cttttttttt aatgtttttttt ttctttttttt cttttttttt 83700  
 gttttttttttt cttttttttt aatgtttttttt ttctttttttt cttttttttt 83760  
 acgtttttttttt cttttttttt aatgtttttttt ttctttttttt cttttttttt 83820  
 tttttttttttt cttttttttt aatgtttttttt ttctttttttt cttttttttt 83880  
 cttttttttttt cttttttttt aatgtttttttt ttctttttttt cttttttttt 83940  
 gttttttttttt cttttttttt aatgtttttttt ttctttttttt cttttttttt 84000  
 atataactttt tttttttttttt aatgtttttttt ttctttttttt cttttttttt 84060  
 aatgtttttttt cttttttttt aatgtttttttt ttctttttttt cttttttttt 84120  
 gttttttttttt cttttttttt aatgtttttttt ttctttttttt cttttttttt 84180  
 aatgtttttttt cttttttttt aatgtttttttt ttctttttttt cttttttttt 84240  
 cttttttttttt cttttttttt aatgtttttttt ttctttttttt cttttttttt 84300  
 tttttttttttt cttttttttt aatgtttttttt ttctttttttt cttttttttt 84360  
 tttttttttttt cttttttttt aatgtttttttt ttctttttttt cttttttttt 84420  
 cttttttttttt cttttttttt aatgtttttttt ttctttttttt cttttttttt 84480  
 gttttttttttt cttttttttt aatgtttttttt ttctttttttt cttttttttt 84540  
 aatgtttttttt cttttttttt aatgtttttttt ttctttttttt cttttttttt 84600  
 tttttttttttt cttttttttt aatgtttttttt ttctttttttt cttttttttt 84660  
 aatgtttttttt cttttttttt aatgtttttttt ttctttttttt cttttttttt 84720  
 cttttttttttt cttttttttt aatgtttttttt ttctttttttt cttttttttt 84780  
 gttttttttttt cttttttttt aatgtttttttt ttctttttttt cttttttttt 84840  
 gttttttttttt cttttttttt aatgtttttttt ttctttttttt cttttttttt 84900  
 aatgtttttttt cttttttttt aatgtttttttt ttctttttttt cttttttttt 84960  
 aatgtttttttt cttttttttt aatgtttttttt ttctttttttt cttttttttt 85020  
 tttttttttttt cttttttttt aatgtttttttt ttctttttttt cttttttttt 85080  
 tttttttttttt cttttttttt aatgtttttttt ttctttttttt cttttttttt 85140  
 gttttttttttt cttttttttt aatgtttttttt ttctttttttt cttttttttt 85200  
 gttttttttttt cttttttttt aatgtttttttt ttctttttttt cttttttttt 85260

gtgaatgtca aaaacaaatt tattttcaat gaaacgctt tttaaattgt aatctacaat 85320  
 agcgttgtgt gaattttgaa ctaaatcaga gcgttctct tgaacggtg aaccccgct 85380  
 gataatgata tcaaaatagc cttccaaatc gacgtctcgac atcgagtgtg ctacatgatc 85440  
 tctactgcca tacgaccaca agactaaaac gcaacccatc tctgtcaact cctgcaagct 85500  
 gtcatacaca aacggatctc gaatctcaac ttgtctctct tcggttatga gagtgctgtc 85560  
 caaatcaaaac acgaccacgt gcgaaatcc ccacgtcaaa gattcgctt tgagagagac 85620  
 cactttgttag tgtggcaata gaaaccattc tttaaagaaac gaatacattt gcggttgtt 85680  
 gctaaggacacg cacatgtggc ccaacactgg cggtttgaat ggcgcgtttaa tattgtgcct 85740  
 gatgtcgccg atgtcgctgg cggggcgtt gaatatttgc atacagtaat tgtaattgtt 85800  
 ttctatgatc ttgcacagct gcggtcggtt gcaaaattga aatattacat attcaaaaaaa 85860  
 ttatacttt tcaaagccaa ggtattttag gtcggcgtac tggcttaaaa cgagaacatg 85920  
 tcggtttagt atggcgtcgt taaggcgaa acagatccat ttgctttgaa gcgaggaggc 85980  
 cataatgtac aaaaatggac cagttacgac ttattnaaac tggttaaaga gtttcgtata 86040  
 aacaaaaact actctaaact aatagatttc ttaacagaaa atttcccaa caacgtcaaa 86100  
 aacaaaacgt tcaacttttc gtctaccggc catctgttcc actcggtgca cgcgtacgt 86160  
 cccagcgtca gtgatttggta gaaagacgcg aaacaaattc gattgcacac agaatattt 86220  
 gcaaaagctgt tcaacaacac aataaacgtat ttcaaaactgt acactgagct gtacgagttt 86280  
 atcgaacggc cggaggcgt cgattgtgt tgccgtgcc agctatttgc caagagtata 86340  
 ctcaacacca aaaattacgt ggaaaactta aattgcaaac tggttgacat aaagccgccc 86400  
 aaatttaaaa aggaaccttt tgacaacatt ctttacaagt attccctaaa ttacaaaagt 86460  
 ttgttggta aaaaaaagga aaaacatacc agcaactgggt gtacacgcaaa aagaaaaatc 86520  
 aaacacaggc aaatattgaa tgataaaagtt atttattttac aaaacagtaa taaaaataaa 86580  
 ctatttggc tttagggct tagttaaaaa tcttgcacac atgattttgt aacagtgcga 86640  
 agccaaacga gggcaggcga cggaaatcgct tcgttcatc gctactgtcg gctgtgtgga 86700  
 atgtctgggtt gttaatagta gctgttctg taacttcggc gacctgtcga tgaacggctc 86760  
 ctggatcttc tggatgtgcg gggctcaccc gggcgccgc tggtaacccga gcttctgcgc 86820  
 ctgcgtgtcg aaccatatgt ggtaccgggtt gaagaacggc gacggcgacg ataaaccatg 86880  
 tttaaattgt gtaattttatg tagctqtaat ttttaccttta ttaatatttt ttacgcttg 86940  
 cattcgacga ctgaactccc aaatataatgt ttaactcgtc ttggctgttt gaattttgt 87000  
 tgctgtgttt cctaataattt tccatcacct taaatatgtt attgtaatcc tcaatgttga 87060  
 acttgcaatt ggacacggca tagtttcca tagtcgtgtaa aaacatggta ttggctgcat 87120  
 tgtaatacat ccgactgagc gggtaacggat ctatgtgttt gagcagcctg ttcaaaaaact 87180

tcgcacatgt gcaaaaacgga atttcggta cgctgttgc gttttgtgc ggctgcaaca 87240  
tttgcacatctt ttgcgcgcgc tcgatcaaca attcttcaag agtgggtgcgt ttgtgcgcgt 87300  
gtttaagccac gttttgtaac agcactattt tcgcatatct cataatcgga ctgttgaac 87360  
agcgtgcaaa cgacgaccgc ataataatcgta cggtcgtaa gtcgattgtg gtcgaaggca 87420  
tctccaacag agatcgacag gcgtccaaca gcgtgtccgt ttgaacctgc gtcatttgcg 87480  
gtctgcacgt gtagtcgtca aacgtggttt cgagcagttt gaacaacgaa tgatactttt 87540  
ccgatcgacag caaaaatatac atggcatga ccacgtcgct gatggatgtat tctgtagaac 87600  
tggtgctgtt caacgaatag tgatggatta gtttgcgagc agcatttctg tateggcgc 87660  
tggtgatcaa ctcttcggaa ggctgcgcgg ggcggggggc gttggctcgc gcaaaacaaat 87720  
ttattacggg acgcggcgta ggctgcgcgg acgctggcgcc ggacgacgacg tccgcgtttc 87780  
ccggcgcgta ctgagacgct atggcagcgt tggttattaa aattgtgttt tgcgatttgc 87840  
gagccacgtg catcataaaa tttatcaaca cgtcggtgtt caactgcacg ctttgcgtt 87900  
cgtcgcagag caaaggaaat agctggggcc atatcgccaa ttgcataaggc tcgtctatcc 87960  
ttaaccgcaa tttgtttatt tccaaataca acgcgatagc gtcatcgta accgacgacg 88020  
cacacttact ctgttaactat cacttggatc gtgttgcgt aaacgcttcc caaaaagtct 88080  
aacacgttga ccttttcgat tctattcaac ttaattgtgg acgcgttggc ttgcattcggt 88140  
tccaaacagac tgcgcgctcc gacagattga gtagacaaaa tttttaact ttccgttta 88200  
ttgggcgtaa tgtcgttgcgat taacaacgac gcagccgtt gagaggccgc agtggatgt 88260  
gtttgcacaca tgtcgacggc cgccatttgc gtttgcgcggc aaggcttgc tggccgcgt 88320  
ttgcggcggt ttcttcgtgc ttgcgacatg ttgtcgtaa gttccatatac ggtatcattt 88380  
attgaagcaa tcatggttga gttcgataag cagagatatt tcgttgccttca attggactt 88440  
ggtaatgtatg tgccttataa atgtttcggtt cacaatcatt tcgtcattta gcacgttaca 88500  
aatatctatt ttgatcaatt tcaatttgcg aatggatgtt gttttttttt cgtccgatgt 88560  
cttgcgtcatg atgaaacgac aaacgttgcg gagttccaaac tccgcgtaccg gatacgctt 88620  
gttgggcggaa ctctctaaat agtgtctcaa ataaaagccg atcaatacgg tggacgctat 88680  
tttgcgtttaacc ttttgcgtttagtattgcg gcccatttct atcatgaagt ttttaacgg 88740  
tagcaacacgc ctgtctccgt tagcaacagt ggagcagccg ttgcatttgcg cgctaaaaat 88800  
actcaacacgc cgctcgatgt ctttttgcg caatccgacg gttgcgtttt tgcatttctt 88860  
gacaaatggc acgcacatgt cgcggttcgt gtacaaagaa ttcgtttgtt cgcaaatcaa 88920  
gttataaaaa aattgcacaa atatctgcgt aatcaagttt ttttgcgttta taatgtcact 88980  
ttcggttttgcgtttaatcggttc gaaacacac gtacaacatc agaggcatgc cgaacatggg 89040  
tcttaaaaaaa atgtccaaac cattttgcgaa gcccgcgtcg aggggtgcgtca gcgaggacgc 89100  
caagtatttgcgtt catttgcact caaaacatttgcg aattttgtttt gcgccgttgc acgactgaca 89160

catgatcgca tccacgtcgg gtgcggcggt cggattgtaa tattttgca agtattgcat 89220  
 aatggtccta aaatgggta cctgtttgat aaactcgctg cgaaaaata tcgaaaaat 89280  
 gtttttaca ttgtgtatgt tgcgtgttt gttggcttga ttctcaaaac tactctttat 89340  
 gaaaaacaata catttgttaa attctgtgaa aaaagtaaga cttttactgt ccacgatcaa 89400  
 gcttggttg aaatattttg aaaataaaaa acacaacgaa tcgatttcat cttgtaaacaa 89460  
 ttgcgcttca aaacacacgt ttcaaaagcg gtcgtaaatg ttaaacctta aactgtattg 89520  
 taatctgtaa ggcacatgg tgcattcgat ataaccttataatgtaaacg attccaattc 89580  
 tctgttgatt acgcgtttgg cagcgcaaat actgtccaga aacatgcaaa cggtgatgt 89640  
 gattgttgac gacaaaacgc tcagtttggaa agaaaaataa gacacgttga ccagcatgtt 89700  
 gttggctgta aatagccgcg cgcaatcgcc gccgcggta acatccagcg acctggccgc 89760  
 atcgatcatt aaaaataaca gcaaaatggt gggcaacgat tttgaaatgc gataacaacgt 89820  
 gttgcgtatg gccgtcgat ttgttaagca ttatccaaag tattacaacg agacgaccgc 89880  
 cggttttagt gccgaaatag aaagtaatct gttcaatataaaaattatg taaaccaagg 89940  
 caattatcag aacattgagg gttacgatag tttattaaat aaggcggaaag agtgttatgt 90000  
 taaaattgat agactattta aagagagcat taaaaaaatc atggacgaca cggaagcgtt 90060  
 cggaaagagaa caggaagcgg agagattgag ggccgaacaa actgcccga acgctttct 90120  
 ggagaggcga ggcgagacgt ccgcacgacgat tgcgttaat cgtgccgacg ccaatattcc 90180  
 cacggcattt acgcgtccgc ttccaggcccc cagcgcgcgg cggtacatgt acgaaagtcc 90240  
 agagtcggac acgtacatgg aaacccccc acgtaccggc gaacattaca ccgatcagga 90300  
 caaagactac aacgcggcgt acactgcccga cgagtacaat tccctggtca agacggttct 90360  
 tttgcgttta atcgaaaagg cgctggccac tctaaaaat cggttgcaca taacaactat 90420  
 tgatcaattt aaaaagttt aagattatct gaatagcgat gctgatgctg gagaatttca 90480  
 aatattttta aaccaggaag attgtgtatgt actgaaaaat ttgtcaattt tagcgtcaaa 90540  
 gttttcaac gttcgttgcg tggccgacac gtttagaggtt atgttggaaag cgcttcgca 90600  
 taatattttagt ttgggtgcagc ctgaaagcga tgccgtacgg cgaatagtca taaaatgac 90660  
 gcaagaaaattt aaagattcga gcacgcgcgt gtacaacatt gccatgtaca aaagcgatata 90720  
 tgacgccata aaaaacaaaa acattaaaac cttgttgcac ttgtacaacg acaggctgcc 90780  
 aatcaatttc ttggacacgt ccgcacccag tccagttcgc aaaaacttccg gcaagagatc 90840  
 tgcggaaagac gacttggcgcg cgcactcgac cagcaacgt gccaatagac ccgaaattaa 90900  
 tggatatcg tcagaagacg agcaggaaaga tgcgtacgtt gaaatgtcg actacgaaaa 90960  
 agaaaagtaaa cgcagaaaaat tagaagacga agatttctc aaattaaaag cattagaattt 91020  
 tagcaaggac attgtcaacg aaaagcttca aaaaattattt gttggtcacccg acggtatgaa 91080

acggctgtac gaatactgca actgcaaaaa ttcttagag actttaccga ggcggctaa 91140  
 ctatggcagc ttgctcaaaa ggctaaacct gtacaatctc gatcatatcg aaatgaatgt 91200  
 aaattttac gagttgtgt ttccattgac actgtacaat gacaatgata acagtgacaa 91260  
 aacgctttct catcaattgg taaattacat attttggcc agtaactatt ttcaaaaactg 91320  
 cgctaaaaac ttcaactata tgcgcaaac ttttaacgtg tttggccgt ttaaacaat 91380  
 cgactttatg gtcatgtttg ttataaaaatt taactttta tgcgacatgc gtaattttgc 91440  
 caaattaatc gacgagctgg tgcccaacaa acagcccaac atgagaattc acagcgtgtt 91500  
 ggtcatgcgg gataaaaattt ttaaacttagc ttttagtaat ttacaatttc aaacctttc 91560  
 aaagaaagac aagtgcgcga acacaaaaca tttgcaaaga ctaataatgt tgatgaacgc 91620  
 aaactacaat gttatataat aaaaatttat aaaatatttt taatttttat ttatattcag 91680  
 tacatttaca catattaaca tattgtttat acaaattctt ataatcatta tgatttaat 91740  
 tgaattgttg tctaaacaaa ttaaacactt tattaaacaa taactttcg ttgttaattt 91800  
 ttactttgca catgttataa caaaaaatta aaattttcat catgtctgat ttgtctatgg 91860  
 cgtcacagtt gctttaatg taatcgcaag ttaaccactc aaaaggaccc ttttctattt 91920  
 ttaatttggc taaatcttta taatcagact tcagttgtt aatttagattt ccacatcgaa 91980  
 taataaatcc ttccagcggg ctttggggaa acatcaaaga cttgaaattt aacctttcta 92040  
 caaaaatcggtt gtacaaatat ttgtgacacg gaatagtatt aaaccccaacg ttgtcaaca 92100  
 actttgcgc ctccacaaag ggcacaaact ccccgccgtt taattgaatt tcgtaagcgt 92160  
 agtatttcaa actcttttc tggccacgt agttaattac gttaatgggt tcgttttg 92220  
 cgtcgctttt ccaacccatt aattcggcgtt agacaataaa accgtcattt aaccgcgcct 92280  
 gaagecgatcg catgcacgtt tctaaatctt ttcgaatgcg gtaataattc ataaaattgc 92340  
 cgtccggctt gtaagtgttt cttgaccgtt acgttaatttt atttgggtt caaatgattc 92400  
 tgaatttaca accgttcaac ttttcttgcgaa caataatttc ttgtcggcc aacgtacattt 92460  
 ttttacatttgc atctagatgc gacacagatg gataaatttg atacacaattt ttattctcat 92520  
 cttcgggcat tacgggtccg cgttcattt acgcgtacat gacaatgttgc tggcgaatgt 92580  
 cggcgcgtt cggcgggtt ggcacgtggt gcagtcgtt ctgcaattgt tgcttccatt 92640  
 gttgaaaata ttccggccat tcttgggttactcgttgc ttgcgttgcatttttacgttaca 92700  
 gttttaaaag ttgcatttca ttttacaaata acgttagagt ttgcgttgcatttttacgttaca 92760  
 cattttttt gttttaatcc aatacatttta aatcggttac taccagggttga ttgtttttat 92820  
 ccatcgtaat ttttatctca tgcggccacgt tgaacaacat gttttaaaattt ttgggtggatt 92880  
 tcggcgcacg ttataatctt aaataatattt caacgtacac gtaattgaac atgagctgca 92940  
 acaatccattt ggcattgttca aaaaattttgtt atctcatcaa agtataaaata attttccacca 93000  
 tcgacaccgtt catcaacttgc ttacaaacttgc gtcacatttgc caagtttca ataccgtattt 93060

tgtctttaaa atcttcacgt ttactgaaca tgcttaattc gggagatttt ccagtcaaaa 93120  
 tgccaaattaa tcccgtgtac aagtcaacgt atttgacatc gttccccatc tcacattttg 93180  
 catgtcgatt tttcaaaaagc tctttattgt cgataaaattt ttcaaaggtc tctcgatcac 93240  
 atttagtgta aatatggtag tcagtgtcgac tgcttcgac cgctgtatccc ttggcatggc 93300  
 tgcccgatc aatgcaaatg tacaccatgt tagaatgtgc tgcttactgt gcctgtatca 93360  
 agccttatat acctcaaaaat atttcacatt ttgcacatcat cgtaaaatatacatgcata 93420  
 aattgtgtac aaaatatgac tcattaatcg atcgtgcgtt acaagtagaa ttctactggt 93480  
 aaagcaagtt cggttgcgag ccgtgtgcaa aacatgacat cataactaat catgttata 93540  
 atcatgtgca aaatatgaca tcataccgacg attgtgtttt acaagtagaa ttctactcg 93600  
 aaagcgagtt taaaaatttt gtgacgtcaa tgaaacaacg tgtaatattt tttacaatata 93660  
 ttaagtgaaa cattatgact tccaataatt ttgtggatgt ggatacgttt gcaagacaat 93720  
 tgattacaga taaatgttagt gctctaattca aagtgcggat ctgttgcggg caaacatttt 93780  
 agagattgtgata gagaaggcca gagaacaagta ttttgagggc caactcaaaa aaactatgaa 93840  
 tacattaaaa aattattttt acgaaaaaat atatggacga ttgcataatgata tataaagatt 93900  
 ttaacagacg catcctattt atagtttttta aattcgctttt aaacaagacg acaataacttt 93960  
 ccatcgatcaca aagagatcat cgagtggcca ttaaacgtttt aaacaaaattt aaccccgatt 94020  
 taaagagttc tccgcgcaat gcttcagcat tacaatgaat gtttggaaaaa tctagacaat 94080  
 ccagtcacgg acgaacatca tttgttgaca aaagagttgc tacaatataat tttatcgaa 94140  
 cgtttgaata cagttacacc aacactaatg ccatcagcat ggacaaaaca gatgaattt 94200  
 atttttattaa accggcatttggaa acacccatgc cagatgcaag accggccatcg cttttggcca 94260  
 acgtgatgaa cgaacgtaaa agaaaattac aaaacaccaa ctcaacggca aaatgtttgc 94320  
 taccagcacc accggccacaa ttgcgtaaac ttgaaaaaaa gaatcattta ttgcctttgt 94380  
 tttctttgttta attatattgt tgcatttca tttcttaatataat catagttttc taataaagta 94440  
 gtttcatatt tttgtttttg tacagtaatt gtttcttgggt ttaacaagat cacaaccaat 94500  
 aacataaaaga ataacacaaat cataacaaaaa attaaaaagc cgcataactac tagaacaat 94560  
 tcttttaatta gcgatcggtt tctatttaca aattggccga gctgatcgcc ttcaatcgcc 94620  
 gagttgtgggg cttggatgat gtcgacgata ttgttgcggg cgcgacccgc tgcgtctc 94680  
 gatataatgt cggccgcgtt cgggttcatg atgtgcttaa ctacaatataat tagttgtact 94740  
 tgacgggcgtt caccgtgatg cgcgtctaa aaccccgatc cgttaagacg cgttgcgtt 94800  
 caaaatataat gtttgcggta tttagcgtat cggataatc aacacgttttgc ggcggactaa 94860  
 aatcgggcattt gttgatgggc acaatgcggc tggagctgat agcaatgctg tgcgttgc 94920  
 aaaaacagccg aatttttttg tagggctctg ctttattcgg cgcagacgac accatctgg 94980

caaagttgtt caatttatg attacgttgg gtaccaattt atagggaaa attatttct 95040  
 ggaacatttt gacaaagtcc acaaccgtt ggctatagtc gggaatgccg agcaaagact 95100  
 ggcctgttt aatgtatgg agactggagc ggtttactgt agcgcaattt gatggcacgt 95160  
 cgccttcat aagccggcgc gttctctccc aattcaattt gttgtacaaa ttatcaatct 95220  
 cctcggtcg 95280  
 cagattgatt acatagcg 95340  
 aatgcgttt caacgacaat atcttaccca tggggacgt ttccagattt aacataaca 95340  
 aaaagtcat 95400  
 gcttccacc aattcttaa aatgagacag cggaaatttca caagcgatcg 95460  
 gtcgcaaatt gcttttatt ggaggcggaa cgcttgcacc gttgcgggtt ttttagtaacg 95520  
 cgcgtcacgc agattgcatt tccgttcgg gatacgtaaa ctgcgtggg catttgggt 95580  
 tttcatggtg aacgatcata gtgttgcattt aaaaacaaatgtt gttggtcagg agcacgctaa 95640  
 aacacgcgt ttcgccccca 95700  
 ccgatttcgg tgatgggtac caacgggttc cagtagacta 95760  
 tggggcgga cgctgtttt tttggcgate gactgtctat gttaacatca tgctcggtcc 95820  
 ttttttttttggg cacgtacacg atcaaggatggg aacgcaaaaa agcgatcg 95880  
 gttccacca 95940  
 attgtgaggg aacgcaaaaa agcgatcg 95980  
 acgggactc catcgatg 96000  
 tataatgtctt acttcatttgc acttttagatt attttaattt 96060  
 gtgaactcg 96120  
 acgggttca atagggtgtc 96180  
 ctgttgaaca 96240  
 cgtgcgttgc tcaactacat 96300  
 tgaaatgcaaa 96360  
 cactatgatt 96420  
 agaaaggtag cagacagaaa atatttcata 96480  
 aataaaatc 96540  
 atatgtacttt tatacgttta 96600  
 tttatatttgc 96660  
 tttatatttgc 96720  
 tttatatttgc 96780  
 tttatatttgc 96840  
 tttatatttgc 96900  
 ccgacacgtt 96960

|   |       |
|---|-------|
| aaaggccgaca aagttttgat agttatcttg aaaactatgc aactctaatt cgagtcaaac    | 97020 |
| aagtgcagca acatcgaaaa gaattaatac tgcatgtgt ggattttctt acaatgaaag      | 97080 |
| caaatgacaa tttatggtg ttcaaaaattt atattaacat gattataaaa gtgtatggc      | 97140 |
| aattttacaa ttacagattt cccatcaatt ttgaggacaa cacgtgaaa ccttgtgtaa      | 97200 |
| attnaacttt tagacgtggc ggcagttgga aaactcaact gcaaccgtt tgcaattatg      | 97260 |
| tttacaaaaag taaaaatatg cccaaaattt ttaaataaaa caaattaatt taaacaagcg    | 97320 |
| tttttattga caataactcac atttgatatt atttataatc aagaaatgtat gtcattgtt    | 97380 |
| ttccaaaaattt aactggcttt acgagtagaa ttttacttgtt aaaaacacaat caagaaatga | 97440 |
| tgtcattttt gtacgtgatt ataaacatgt ttaaacatgg tacattgaac ttaatttttg     | 97500 |
| caagttgata aacatgatta atgtacgact cattttgttg tgcaagttga taaacgtgat     | 97560 |
| taatatatga ctcatatgtt tggcaaaaaa tgatgtcatc gtacaaactc gcttacgag      | 97620 |
| tagaattcta cttgtAACgc atgatcaagg gatgtatgtca tttgttttt taaaattcaa     | 97680 |
| ctcgctttac gagtagaatt ctacttgtaa aacacaatcg agggatgtatc tcattttag     | 97740 |
| aatgtatgtca tttgttttc aaaaccgaac tcgctttacg agtagaattc tacttgtaac     | 97800 |
| gcaagatcg ggatgtatgtt cattttaaaa atgatgtcat cgtacaaactc cgcttacga     | 97860 |
| gtagaattct acgtgtaaaa cacgattaca gcacttcgtt gttgtatcgaa aattgttca     | 97920 |
| atggctttt gttaatgtcg taattgatta atatgtcgta caatttggcg gcgttgcgtt      | 97980 |
| tgcacacgac cgtttttagt tcttggaaaca tttttcgat tatgttttgc atgttgcatt     | 98040 |
| tcagagtgcg atgtgtatg ctggtgacga gcataaaaat gataaaaatct aaagcggcta     | 98100 |
| atttgtatc ccgttcatac gctctgtatc cgccaaacaac tctgtggcca gatttttta      | 98160 |
| gatttgaca ggcgttatgg tacgaattga taatatttac tatagtttctt cttgttatcg     | 98220 |
| gtttgtcgat taaaactgtta acaaacatca cggtggccaa ggcgcacggt ttagacaccg    | 98280 |
| acttggtttt tgcgtgttca aatttgcata aattaaaaac gctcatagac tggcgatcg      | 98340 |
| gcagtggtgc gttataaaaa caaaatggta aaacgtttaa ttgcacaaac gacgagcaca     | 98400 |
| ttaaaggttt ttggctgtta acgtccctggg gatgtaaact gttattcata acgtaaacaca   | 98460 |
| cttcaatgtc ggaatgcttgc tttcaattt tgccttgc tacagttca atgggtatttgc      | 98520 |
| agcgagggtt gagtttattt tctaaattca tttggatatt ttcaatgtt gatccaccg       | 98580 |
| acacgttgcg agccagcgat ccttgatgg ttttaatcat attcaaaaata ttcatgtat      | 98640 |
| ggttgaaaaa agagtcgtc aaaaacgtttt gttgtgtt aaatatcgat ttccagggtt       | 98700 |
| tactgttgcg tgactcaacg acggccgtgt aacataacaa ggcgcacggt tgcgtgtgcg     | 98760 |
| acaacttaat gttatcaatg tcgggtatgt ttggcaccag attttcatgg cctgtttcca     | 98820 |
| gtagcgtgtc cagttccggc gagtagttat tcaacgtatcg attgtgcgtat tcaaaacaatgt | 98880 |

tttacatcgcc aggttgtaca tagttttta tgcgtcaaa ttgaattata tcgatctgt 98940  
ccctgttctc cagcataaac gacaaatttt ttaggtcgaa ttaatattt ggcgcgttt 99000  
cggtggactt ttgttaattt aacaacatcg ccaacagtt gtgtactcg cggtagtt 99060  
gatctttgtct aaacagttt tggtagcgt aattcacgtt gtgcgtcaaa aacagcaact 99120  
cggtgtatcat cattttgtt aaaagcgcgt acttgctcat gttgacagaa tctttacat 99180  
ttcagttgtt aacgcgtctg tacaattgg ccatgcgatt cggaatgcac acggggatcg 99240  
tgcgagccag tgccgttgg cgaaatagca tttttcata ggcgtcgaa caatgcacg 99300  
cggtccggcga aaattgcacc gtgttcaat tcatattca cggccgtcg ttgcatacg 99360  
aaggcctcgg tggcccgta tcgtccacca agtctctgtt cgtgtcacg catgtttgag 99420  
acacgacaaa atctccgcgg gggagaaaaa cgtgaaccaa gcccagtgcg ggatgcatt 99480  
ctatcaagtc cggagccgtc gcgttacca aagcgtcgga ggcgttgcaa aagccatcct 99540  
ggcaggtaa ctcgttgca gcgtggaga tcaacgcgtt gtctctacac tgctgatccg 99600  
tcacgcacgg taaccgggtt aatgaacaat ctacgcctcg attgcgtga aacgtaaaat 99660  
ttaacggccg cgcttccaaac tcgttaatgt gcatgtatgc atcttgcaaa ataaattttt 99720  
gaacaaattt aaacgtgtac atgtacacga ttagtataat taccagtaga ataagtattt 99780  
gccaaggatt caacatgtac gtcttaactg agtgtaaaaa gcgtgggtgt acgcacgaaa 99840  
tgactggttt cgcaaaaaat aaaccggggt ctatataact cggcgtcgac cgcgttcatt 99900  
tttaccgtca tgcacatgtac ggctaattgtt ttgcgttgc ctaacgcgtt caaaaagcgg 99960  
gacgtgaaat acatttataa taccttattt aaaaattaca gtgttaatttga aggtgtatgt 100020  
tggtaatgtt ggcgtgggtt ggcgtgggtt gtgttggacc gaaatcagct qcaaaacacg 100080  
gacatggaaag tggtagag tttagaatac actagtgaca acattgaact gttatgcgaa 100140  
aaaatatgtt tgatagttga taattacgac aagtattacc aaaaaatttg tggataataa 100200  
aaataccaaa ttttattata tcattttgtt ttatataata attaaagaat acaacgccac 100260  
atctatttcct agtacaacaa ataatttgat tattttttt gaggacat taaaaataa 100320  
caaacagtgt aaaaataacta cagaataata caatacataaa atattatagt aaatagctgc 100380  
aattttgata gcgttaatttta tacatttgata ttttcaacg tacaacgtt aatgttgata 100440  
cgccatttttc acaaataaca aaattttctt aatatgcctt ttgtccgcaa ttgttttgc 100500  
gatataaaag ctttttcaa acaattgaaa aattgcaaaac aaaaccacgt acatgacgtt 100560  
atacatatgtt taaaatgttt tacataacaa ttctataatgt aagaaaatttgc taaaacacgg 100620  
catgagcgcc cacataatcg cgtggccgc aaatatctcg tacgtacaaa aataactcgga 100680  
cattctccaa taagtaaaat gcattttgtt attatactgt tggatcttgc agtattttt 100740  
gcaatagttt acacgtatgtt agacttgata gatgtgcacc atgaagaggt gcgttacatc 100800  
attacggttt ttgacaacac accgcgcgcgg cttattgttgc acggccgtccaa aatagtaatc 100860

gaaggcaatg cacacgaatg tcacaaaact ttgacgcccgt gttcacaca cggcgattgc 100920  
 gatctgtgcc gccaaggatt agccactgc cagtttttg acgaagatac aatagtcaag 100980  
 atgcgtggag atgacggcca agaacacgag acgcttattc gagcgggaga agcgtactgc 101040  
 ttggctttgg atcgagaacg cggccatcg tgtaacccca acacgggtgt gtggttttg 101100  
 gccgaaactg aaactggtt cgcttttg tgcaactgtc tacggcccg acttgttacg 101160  
 cagctcaaca tgtacgaaga ctgcaacgtg cccgtggct gcgccctca cggccgtatc 101220  
 gacaatatca acagcgcttc gatccgggtgc gtgtgcgacg acgggtacgt gagcgactat 101280  
 aacgcccaca ccgaaactcc gtattggcgatcc cgccgcaccg tgcgacgt aatgtacgac 101340  
 gagagttttt ttccggggc gccatgcgca gacggcaag ttgtgttgc tcatccggcg 101400  
 ctcaatgatt tttaccgcag acactttaga ctcaagaca tttgcgtgat cgacccttgc 101460  
 tcggtgacc cgattagccg gcaacggcaca tcgggacgt tatttccacca accaaccgt 101520  
 aatgggtgtgg gaatcaacgg atgcaattgt ccggccgatg acgggttact gcccgtttt 101580  
 aatcgacaca ccgcccacac gggcatggtt agacaaagcg accgcaccgt cgcgacgt 101640  
 tgcttcagc cgtttaacgt gcacatgtt tcgttgcgtc atgtggatta caaattttc 101700  
 tggggccgca gcgaccacac cgagttgcc gacgcccaca tgggtttca agcgaatgtc 101760  
 aaccaactca gtcacgaacg gtatcgacg attttactt cgttgctcgat gtcgcacccg 101820  
 gacgtaacag aaatcgtaac agtcaacatg ggtgtcatga aaatttccgt gtcatacgat 101880  
 accacattga aaaatataact attaccatct tctgtttta ggctatttttag atttaaagaa 101940  
 agtggcactg ctcagccggt atgcttcttt ccaggcgttag gacgggtgcata accgtcaat 102000  
 tccgattcgt gcatcaggcg acacgctggt ggtcaagtgt ggacccgaga aacggttacc 102060  
 aactcgtggt gtgtactgag tcgtgaaggt acggatataa aagtttggag tcgcgcgtca 102120  
 cgatatccac gggagacgc gcctgcacgc ttaagattgc gcggttctt tctgaacaac 102180  
 gatcgcaac gaaacacaat aagagccgtc actacaggcg acatgacccca agggcaacaa 102240  
 atagacgcat taacccaaat acttggaaact taccggaaact actctgtata acaacatgag 102300  
 cattttaaaa gttgtagaag cgtgcaattt ggcacacact tttttaaaaat tgggttattt 102360  
 atttagggcc aagacttgg tggatatcgat ttagataat ttggaaactat tgctcgaaa 102420  
 gactaacata aaagaagtggtt cagtcgtt aaacaagaaa actacagagt gtttgcaatt 102480  
 gaaacgaaaa atagataaaa aaattgcaca acgtgttttataaaaaattt acactatcaa 102540  
 atgatgacat cataacgggt tcaatattct gtgtgcaaaa ataaatgaca tcatatttca 102600  
 aacttggggt acgcgtaaaa ttctactggt aaaacaagtt tgagatatga tgcgtatcatc 102660  
 acaaataata gtatgtataa aaataaacat atttgggtgtt aaatataatt tattacaaat 102720  
 aaattttaca ttgaatcaat ctgttgcgtt gtttgggttga aggtttcga atcttgggtt 102780

tcagccctc gggatggtca aaatgcgcgg tagtaattgt taatggatct ttcaacgatt 102840  
 tttgccccat ggcgagtgtg acaaacgcgg ccacgacaaa cagcaggata atcagttca 102900  
 tggtgttcta tattcgacaa tatatggtc gtttctaaat caccttgc 102960  
 ctttatagt ttttttagaac acgttgcgttca ttccaaacagt aattgttca 103020  
 cagccattca gcatccggcgttca gttgactgttca atcatgttca attaatttac aaacaatttc 103080  
 ggtcaatttca ggtatggcctt gggataaaact tgccggcatt tgctgtacat tttttctaaa 103140  
 gtttagtttgc gtagtttgc gttccaaagc agtcttgc 103200  
 aacaatgcggc aaactataaca tgcattttt ggggggttac acttttttga tttttctgg 103260  
 tgcagcgatc aaagtatataat tttgagggtt gttttgtata aacggtttgt atagactgcc 103320  
 aaacatgcggc cccacataca aatcaaagtc gggcccagtc atgaaaatat cttcgggatt 103380  
 aatattgtgg tgcacgtat ttacggatgttca aatcgcttca acggcgctca ccaaatcaac 103440  
 aaacttgcttca atataaaaagc caaaatccgc cgaaacttta atgttggtct ttgcaaaagt 103500  
 ttgcaaaatttgc gtttgcgttca aatagtcgttca aacatgttca tcgttttagag gtcgacgcaat 103560  
 atatatgcggc tgctgcgcg gattcaata aaccaattgt tcgggttca tggtatacag 103620  
 ttaagtgttca acgcgttcaactt aattcagac acgagcgcac gccctatata catacaattt 103680  
 atcgcacaag atgcgttcaactt cgtatctgttata aatgggttca acgcactgca ataaatttta 103740  
 gcaagcattt gtatataatc aatcgaaaccg tgactgtata taagaattaa aatgggtttt 103800  
 gtttgcgtgt tgacaaaat acacaaggct gtcgaccgac acaaaaatgtt aatgggtttt 103860  
 tggtgcttg tcgtacatca acgtgacgttca gtttgcgttca acggccatgt tggtgggata 103920  
 catggtaaca ttcaatgttca ccagcgttca aatgggttca aatgggtttt tgctgttgc 103980  
 gttttgtatg tccgtgggtgc taaacgttca gactctgtgg acgtgttca aacccacaga 104040  
 agcccatgaa gtaatttacg aatgttcaactt gttccacgttca atgttacttta gtaacgttca 104100  
 gtttgcgttca tgggtgtttt tggacaatca aatgggttca aatgggtttt tggtaaca 104160  
 tttaatttac tgggtgttca tttttatgttca attttttttca ttgttgcgttca tggtgggca 104220  
 cacaatgggc acgttacacgg attatcaata tgcgttca aatgggtttt tggtaaca 104280  
 tgggtgttca atgggtgttca tttttatgttca attttttttca ttgttgcgttca tggtgggca 104340  
 tgataacagt ttgtatgttca acgcgttca gtttgcgttca tttttatgttca attttttttca 104400  
 gtttgcgttca aaaaataatttca tgggtgttca aatgggtttt tggtaaca 104460  
 tgggtgttca tttttatgttca attttttttca ttgttgcgttca tggtgggca 104520  
 aaaaaataatttca tgggtgttca aatgggtttt tggtaaca 104580  
 aacaaaaat ataaatcaactt tttttatgttca attttttttca ttgttgcgttca tggtgggca 104640  
 tttttatgttca tttttatgttca attttttttca ttgttgcgttca tggtgggca 104700  
 aaatttatctt tacaacaatttca aacaaatgttca aatgggttttca tggtaaca 104760

tataagttta tttgcactgt agacgggtt acacagcgat ccattcgacg ttctgttgc 104820  
 atcaacttgc tggccaaactt gtaccataaa aattgtttgg acaaaaaagtt ttccaaacaat 104880  
 ggttaacggcc aattcaacgt gacgatgcgc acgtcctcgg gtatgcattt gttaaaaaac 104940  
 acacagctcg ctttaccaaa cgaaagcaaa ggtactaaat atggcgccat tggctgattt 105000  
 gtatttccaa gataattaca aataaaactga tccgtcgtgg ggtgataact ggcaggtgtc 105060  
 agctttaaat aatcttcaac gtgttgcgt cgcaaaaagtc tgcattttac acgcgttgc 105120  
 aatcccacga cttttgcgtg taaaatcgga tccaaatact gcagaatcgt gtctataatt 105180  
 tctaattggta aacgtatgcg ttttgcgtg gggcgcttg taacgctcga catcctaata 105240  
 acaactaaca caaaactaaa atgataactca atatattgtt tttacagtgc atcttttaggt 105300  
 ttaaaactgtg cgtttatcgc gttgagcaag tcggcgttat cggtcatcaat ctcccaagca 105360  
 aacaggccgc ccaattttatt tgggtcgaca tatttaactt ttccctaacac agagtgcacg 105420  
 ctgtcaaacg aaatcaaactc acctttactt ttatcgaaaa cgtacgacgc ttgagcggcg 105480  
 ctgtcaaacg tgcacacata attgttgaga tcttttgaa tttgacgata atctacaaca 105540  
 ccgtccccc acgtgcccga cccggcccg ttgccagtgc cgaaaaata gttgtcattc 105600  
 gtataatttg ttacgcccgt ccagccgcccgg ccgtacatgg cgacgcccac aattattttg 105660  
 ttgggatcga cgccttgcgtt cagtaacgc tcgacagcgt agtgtgttagt gtatagctct 105720  
 tccgagttcc aacttggcgc gtagactgtt gtttggtagc ccaaattccgt gtttgcacca 105780  
 gcccctttaa aatcgtaact catgagaaat attttgccta atgacttttgc cgcttcggcg 105840  
 tagtttacca cggcaatctt gtcgttaaccc gcgcatttag cgcttgcattaa ttcgtaaacc 105900  
 ctgcccggttt ggcgttcgag gtcgtctagc attgcgcgc agcctccaa caacaaaatg 105960  
 tatgtttgg cgtcaccgtc cgcacgcggc aacgacgggt tagccccctt gccgcccgg 106020  
 aactcccaat cgatgtctac accgtcaaag aatttccaca cttgcagaaa ttcccttaacc 106080  
 gaatctacaa aaacgtttct ttttcaaca tcgtgcataa aataaaatgg gtctgataga 106140  
 gtccagcctc ctattgaagg aagaattttt aaatgggggt ttgctaattt tgccgcacatc 106200  
 aactgtccaa aattgccttt atacggctcg ttccaaggccg acacaccttt ttggggtttt 106260  
 tgcgtccgg cccacggatc gtgaatggca actttgaaat ctgcgtcgc cttgcacgat 106320  
 ctgtccaaag attcaaagct tccgggtatc gtttggggg cgtcgatccat tccatcgccg 106380  
 ccgcagatgg gtatgaaacc atacaacaag tgcgtataat ttggcaaggg aactttgtct 106440  
 acgggaaagt tgcgtccgt aacacccac tcaacaaagt acgcagcgac aattttatcc 106500  
 tctctctgc cagggttgcgtt gtttccagc catgtgtatt cgagcggtgc cagatggccg 106560  
 ccgtcggtgt ctgcgacttt gaccaacacg ggatcgctca cggaaacagcc gtcctcattt 106620  
 caaagtttgcgtt aatgcgtt aaattgcggc ctcacaagaa cttaatggt agccctttta 106680

tttcggcgtt cgcctttcca tacctgctgc tgcgtcaaaaca acacgtacgc tatgtcgcca 106740  
atgtcgccgt tccagacgtt ccaactgact tgaacgtcga cttgttctt aggctttatt 106800  
aaattttcgta aagcgggtggc ctctgttaattt atttctacga ggcataatt ggcatacgcc 106860  
caatcgatca cccggcggtcc gggaaatcgcg ttagaaacgg cgaccaacca caaaacgttt 106920  
aacaatttgt acaacatttt aatttatctt aattttaaatgt tgtaatttatt ttatgtaaaa 106980  
aaatgaacaa aattttgttt tatttgggg tgcgtacggcgt tgtaaacacgc gcccgtacg 107040  
acctttgaa agccctaat tatttggaa aatttggta tgcattcaac aaagattatg 107100  
gtacgtcaatgtt tgaaaaattt cgaagattca aattttcca acacaattta aatgaaattt 107160  
ttaataaaaaa ccaaaacgt tcggccaaat atgaaataaa caaattctcg gatttgcgttcca 107220  
aagacgaaac tatcgaaaaa tacacagggtt tgcgtttgc tattcagact caaaattttt 107280  
gcaaaagtaat agtcctagac cagccaccgg gcaaaaggccc cttgtatc gactggcg 107340  
gtctcaacaa agtcactagc gtaaaaatc agggcatgtt tggcgctgc tggcggtttt 107400  
ccactctggc tagttggaa agtcaatttgc caatcaaaca taaccagggtt attaatctgt 107460  
cgagcagca aatgatcgat tgcgttttgc tgcgtcgctgg ctgtacggc ggttgcgttgc 107520  
acacagcggtt cgaagccatc attaaaatgg gggcggtaca gctggaaagc gactatccat 107580  
acgaagcaga caataacaat tgccgtatga actccaataa gtttctagtt caagtaaaag 107640  
attgttataatg atacattacc gtgtacgggg aaaaacttaa agatttgttca cgccttgcgt 107700  
gcccatttcc tatggccata gacgctgccc acattgttta ctataaacag ggtatttataa 107760  
aatattgttt caacagcggtt ctaaaccatcg cgggttctttt agtgggttat ggtgttggaa 107820  
acaacattcc atattggacc tttaaaaaaca cttggggcac ggattggggg gaggacggat 107880  
ttttcagggtt acaacaaaac ataaacgcctt gtggatgttgc aaacgaactt ggcgtctactg 107940  
cagtcattta ttaatctcaaa cacactcgctt atttggaaaca taatcatatc gtctcgttag 108000  
ctcaaggtagt agcgtacgc tctggatcgat atagatcttgc tcaagggttgc gagttcaagt 108060  
ctcgccctgag atattaaaaa actttgttgc ttttttttattt tattttata atatacaattt 108120  
aaaaactata caatttttta ttattacattt aataatgata caatttttat tattacattt 108180  
aatattgtctt attacgggtt ctaatcatac agtacaaaaaa taaaatcaca attaataataa 108240  
ttacaaagttt aactacatga ccaaaacatga acgaagtcgtt tttagcggcc aattcgcctt 108300  
cagccatggaa agtgtatgtcg ctcaagactgg tggcgacgccc gccaacttgc tgcgttcc 108360  
tgggtgtttt gagggtgtttt ttttggggg caataaacgtt ccagccgttgc gcatcttcc 108420  
aactgtcggtt ataggtcggtt ttggcgatgg tgggtatccaa aactcgacg tgcgtcgatca 108480  
ttgtctgttc ttgtctgttgc cttaaaatcta tgcattgcgtt cggatccgtt tggccaccc 108540  
aacgccttc ttgttagatgtt ctgttgggttgc agcaattactt ggtgtgtcc ggcggattgg 108600  
tgcacggcat cagaaaaaac gtgtcgccg acaaaaatgt tgaagaaaca gagttgttca 108660

tgagattgcc aatcaaacgc tcgtccaccc tggccacgga gactatcagg tcgtgcagca 108720  
 tattgttttag cttgttgatg tgcgcatgca tcagctcaat gttcattttc agcaaatcg 108780  
 ttctgtacat cagctccctct tgaatatgca tcaggtcgcc tttggggcgtt gttgtccct 108840  
 ctgtgtactt ggctctaaccg ttgtggcgcc aagtgggggg cccgtttttt actcggtgt 108900  
 cgactttgcg tttaatgcat ctgttaaact tgcagttcca cgtgtttta gaaagatcat 108960  
 atataatcatt gtcaatcaaa cagtgttcgc gtgtcaccga ctgggggtta ttttgcatt 109020  
 cttaatgag cagacacgca gcttttattt ggcgcgtgg gAACGTTGAC ttttgcatt 109080  
 gaatcatact cacgcccgtct cgatgaagca cagtgtccac ggtcacgttg atgggggtgc 109140  
 cctcagcgtc caaaatgtat acctggcaact cgtccgtgtc gtccgtggcac tcgagccgtc 109200  
 tgcacatccc cgaagtggaa atgcccgtat gccacgatcc gttgcacgttgg tgggtgcgca 109260  
 agtgattgtt attctgcccgc ttccaccaact ctttgccttt gacccactgg ccggggccct 109320  
 cgttgcgcg aaaacagtcg tgcgtgtcac tgccccaacg gtcgatcagc tttcgcccc 109380  
 cctcgcaactg ctgcctgtat ctccacataaa gcaaattccctt tttggccaca ttccagcg 109440  
 tcatggtttc ttccagcggt gtgttggat ccagcgagcc gcccgttgc acataccct 109500  
 ggttagtaccc ttgttagccg ataatcactt tttcggttgc tccgtctcc acgtgggtga 109560  
 ttccacgtc ctttgcagc gtttccctgg gcggggtaat gtccaaagttt ttaatctgt 109620  
 acggacccgt cttcatttgc gcgttgcagt gctccggccgc aaaggcagaa tgcggccgg 109680  
 ccggccaaag cacatataaa acaatagcgc ttaccatctt gtttgcgttgc tccttattga 109740  
 agccttggtg tgactgattt actagtagca ttgaggcattt ttatataccg gaccgttattc 109800  
 tggcctacgt gacacaaggc acgttggtag attaataatc ttatctttt atcttaattt 109860  
 ataagattat ttttatctgg ctgttataaa aacgggatca tgaacacgga cgctcagtcg 109920  
 acatcgaaaca cgcgcacattt catgtactct cccgacagca gtctggaggt ggtcatcatt 109980  
 accaattccgg acggcgatca cgatggctat ctggaaactaa ccggccggccgc caaagtcatg 110040  
 tcaccttttc ttagcaacgg cagttccggcc gtgtggacca acggggcgcc ctgcacaaa 110100  
 ttgattaaaa acaataaaaaa ttatattcat gtgtttgggtt tattttaaata tctgtcaaat 110160  
 tacaatttaa ataataaaaaa gcgtccataa gagtattaca cccttaaattc gattattagc 110220  
 gacttgccta tgggcgctca aggcaagta ttgtatccgc tttgcgaagt aaaaacgcaa 110280  
 ctgtgtgcga ttcaaggagag tctcaacgag gctatttcga ttttgcacgt tcatacgaaac 110340  
 gatgcggccgc ccaacccggcc tgcgcacagac attaacaagt tgcaagaact gatacaagat 110400  
 ttgcagtctg aatacaataa aaaaatttacc ttaccactg atacaattttt ggagaattta 110460  
 aaaaatataa aggatttaat gtgcctgaat aaataataat aagggttttg tacgatttca 110520  
 acaatgaact ttggggccac gtttagcatt tgcgttgcgtt gttttttttt gtaacgggg 110580

cacttgaata acgagactaca agaaataaaaa tcaatattag tggtcatgtc cgaatctatg 110640  
gaaaaagcatt tttccaatgt ggtagacgaa attgattctc ttaaaaacgga cacgtttagt 110700  
atgtttagca acttgcaaaa taacacgatt cgaacgtggg acgcagttgt aaaaaatggc 110760  
aaaaaaaaat ccaatctcga cgaaaaaatt aacgtttat taacaaaaaa cggggtagtt 110820  
aacaacgtgc taaacgttca ataaacgctt atcactaagt taatatacta aaaatcacat 110880  
agtcaactaca atatttcaaa atatgaagcc gacgaataac gttatgttcg acgacgcgtc 110940  
ggtccttgg atcgacacgg actacattta tcaaaaattta aaaatgcctt tgcaggcgtt 111000  
tcaacaacctt ttgttcacca ttccatctaa acatagaaaa atgatcaacg atgcggcgg 111060  
atcggtcat aacacggtca aatacatggt ggacatttc ggagcggccg ttctggttt 111120  
gcgaacgcct tgctcggtcg ccgaccagtt gttgagcaca tttattgcaa acaattattt 111180  
gtgctacttt taccgtcgtc gccgatcagc atcacgctca cgatcacgct cgcgatcagc 111240  
ttctcctcat tgcagacctc gttcgcgctc tcctcattgc agacctcggt cgcgatctcg 111300  
gtcccggtct agatcgccgt cacgttcate gtctcccagg cgagggcgtc gacaaatattt 111360  
cgacgcgcgtg gaaaagattc gtcataaaaa cgacatgttg atgagcaacg tcaaccaaatt 111420  
aaatctcaac caaaactaatac aatttttaga attgtccaaac atgatgacgg gcgtgcgcaa 111480  
tcaaaaacgtg cagctccctcg cggcggttgg aaccgctaaa gatgttattt tgaccagatt 111540  
aaacacattt cttgcccaga ttacagactc gttacccgac ttgacgtcca tgtagataaa 111600  
attagctgaa caattgttgg acgccatcaa cacgggtcgac caaacctgcg caacgagttg 111660  
aacaacacca actcttattt gaccaatttac gacgtcaagcg tcacaaacat caacggtagc 111720  
ctcaacaatt tgctagccgc tatcgaaaaac ttagtaggcg gccccggcgg tggcaatttt 111780  
aacgaagccg acagacaaaaa actggacctc gtgtacactt tggtaacga aataaaaat 111840  
atactcaacgg gaacgctgac aaaaaataaa gcatgtccga caaaacacca aaaaaaaagg 111900  
gtggcagcca tgccatgacg ttgcgagagc gccccgtaaac aaaaacccca aaaaagtctg 111960  
aaaagttgca gcaatacaag aaagccatcg ctgcccggca aacgctgcgc accacagcag 112020  
atgtttcttc ttgcagaac cccggggaga gtgcgtttt tcaagagggtt gaaagatttag 112080  
agaatgcagt ttagtattt gaaaatgaac aaaaacgatt gtatccata ttagataacgc 112140  
ctcttgataa ttttattgtc gcattcgtga atccgacgtt cccatggcc tattttgtca 112200  
ataccgattt caaattaaaa ctagaatgtg ccagaatcag aacgcattttt ctttacaaaa 112260  
acaaaaacga agtcgctatc aacaggccta agatatcgatc ttttattt caattgaaca 112320  
acgttaattt agacactata gaaactattt aatacgattt aaaaaataaa gttctcacaa 112380  
ttactgcacc tggtaagat caagaactaa gaaaatccat tattttttt aatattttaa 112440  
atagtgcacg ttggaaagta ccaaagtata tgaaaaattt gtttgatgaa atgcattttt 112500  
aacctcccgat cattttacca ttaggtctttt agatttggta aggctagcac gtcgcacatca 112560

ttttttcgctc gttgacacctca gagcaaaaaggc tgtttattaaa aaaaatataaa tttaacaatt 112620  
atgtgaaaac gatcgagttg agtcaagcgc agttggctca ttggcggttca aacaaagata 112680  
ttcagccaaa acctttggat cgtgcagaaa ttttacgtgt cgaaaaggcc accagggac 112740  
aaagcaaaaaa tgagctgtgg acgctattgc gtttggatcg caacacagcg tctgcacatcg 112800  
ccaaactcgctc cggcaacatcg ttacaacgcac cagcgctttt gtttggaaac gcgcagaaa 112860  
gtcacgtcaa agaaaccaac ggcacatcatgt tagaccacat gcgcgaaatc atagaaagta 112920  
aaattatgag cgcggtcgtt gaaacggttt tggattgcgg catgttcttt agcccccttgg 112980  
gtttgcacgc cgcttcgccc gatgcgtatt tttctctcgc cgacggaaacg tggatcccac 113040  
tggaaataaa atgtccgtac aattaccgag acacgaccgt ggagcagatg cgtgtcgagt 113100  
tggggAACGG caatcgcaag tatecggtga aacacaccgc gctgttgggtt aacaagaaaag 113160  
gcacgccccca gttcgaaatg gtcaaaacgg atgcgcattt caagcaaatg caacggcaga 113220  
tgtatgtat gAACGCGCCT atgggctttt acgtggtcaa attcaaacaa aatttgggtgg 113280  
tggtttctgt gcccgcgcac gaaacgttct gcaacaaaaga actgtctacg gaaaacaacg 113340  
cgtacgtggc gtttgcgtg gaaaactcca actgcgcgcg ctaccaatgc gcccacaacg 113400  
gacggcttc attcaaaaacg cacagctgca atcacaacta tagtggtcaa gaaatcgatg 113460  
ctatggtcga tcgcggata tatttagatt atggacattt aaaaatgtgcg tactgtgatt 113520  
ttagctcaga cagtccggaa acgtgcgtt ctgtttaaa acgcgagcac accaactgca 113580  
aaagttttaa cttgaaaacat aaaaactttt acaatcctac atactttatg tattttttaaa 113640  
gattgcaaaag tttgctaaag agtcaccact ttagaaacga cgctaaaaca cttgcctatt 113700  
ttggttacta tttaactcat acaggaaccc tgaagacctt ttgctgcggg tcgcaaaact 113760  
cgtcgccccac caaacacgat cattttaaacg actgtgtata ttatttggaa ataaaataaa 113820  
cccttatatt atatataatt cttttattta tacattttgtt tatacaattt tatttacgac 113880  
aaatattgac tcgttgcgtt gaaagtttaa taagcttgc aatttctcg gcttgcaaaag 113940  
ggctgccaac gcgttcgttt tgaatgcgcg taatccgggt tacggatttgg tggcgcgaa 114000  
caataaaactc ctcaactggc aaattaacaa ttttgcgttgc gtactcatttgcactgcgg 114060  
ccaggtttt tagaatgttt tcgggaaaaaa tggcaatttct attaaatttt acatgttttt 114120  
gattgtatac atagtttga tattcttcca gcgttaggata tttgtttaaa ctcttgacgc 114180  
attcaatgttca caatttgcgtt agtgacaaaaa ttctgtttaaa atccaaacga gacattttct 114240  
caaaagttat ttcttgaccg ttgaaatgttca cactttgcatttgcgttcaat aaactgtcg 114300  
aaaaagtttt tcccttcttca agcacaaaacg cggggcgcat cgtgttatct acaacgctta 114360  
tgtacttgcgtt aaaaacatgtt tcgtcaacaa cttcggttatg atttacttttca aaaaatttca 114420  
acgtgtcggtt taaaacatgtt tcgtcaacaa cttcggttatg atttacttttca aaaaatttca 114480

aatcttgcaa agcgtccgcg ttggtaact tggataat aaattgtct ttgcattcaa 114540  
 acgctctgtt tgcattcac tccacagcgt cccaaacgga catgcgtta aacatgtga 114600  
 tacgttttag acaatacgtt cgtttttta ccgcctcaac gttcacgtcc gtgtagtcgc 114660  
 accattgcag gatggcaac atgcctcg 3aaatgcgcg gaactgccgc agctttct 114720  
 ttccaaaatg ttgattgtcg tggtaaaaaa gcaacgtga aatttccgag acataaccaca 114780  
 aagccgtggg caattttact ttgatcagcg gtcctatagc caggttgctg aacccgatca 114840  
 tgcattccgt gttgttaatg cggttaatga catagcgtt aaagtagtcc tttacattat 114900  
 cgtcaatgtt ttctgcgtcg tttatgtgt tgcacagcaa atagtagata agggccgcgt 114960  
 taaaacgcac ctttttagcg tcaaaatacg tgcacgcac cacgttaatcg ttgtattcg 115020  
 cgaattgctc gttgggcact atggcgcccg taaaaggcg tctgctgcgc ggtgacaaac 115080  
 gcggtccatg ctgaatcaac tgcattcaaaatc tttccaaatt ataacaatata tcaattgaat 115140  
 ttttaatctc tttatattgg ctccataaaaa gaggaaactc gagtcggctt taaaacttgg 115200  
 tcaaaactgcc ctgaattgtt tcaaaacaatgt tgcattgtgt taacaatata gcccgcacac 115260  
 cgctatcggtt ggctaaaata caatcgggga atcgaatatt ttctacgttgc tgcattatcg 115320  
 acgcttcgtc gtcgtcggtt gcaacaacat cgtcggttc ggcgttaacg ctgcgtact 115380  
 tggctgtata gttaaatattt ttcattacat caaaagcgta tgacttggcg cgattgtgca 115440  
 aataatttat ggccgtgtca atgggtgtgt cgataatttt atcaaaaattt agaacatcg 115500  
 cggttatacaa cgtttataaa aattctgttg acttgaacgt gtttacaaac tcaattttat 115560  
 ttttaatctg gtcattttttt atactagaat tggtagttt tttgatttgc ctgaatagcc 115620  
 gctggcgag acgcttcage ttgtccaccc cgtttaacac gttggcggtcc gtcggcatgg 115680  
 aattgataaa ttgtaaaccga acaaaagaca gcagttcata tttttcgat ataaaatttt 115740  
 cggtgtataat gatatcgtag taaaattttt tggttaaatt gacccattcg accatttcat 115800  
 cggtgcata aatcttcagc tccgagggtt tgacaaacgc cgaggcaacg gacaaatcaa 115860  
 tctgtccgt gttattttt atggcataaa acacaatgcg ttcgaaacta aacggttttt 115920  
 cggttagcaa attttgcaaa acgtttgcct cattttggaa aatttggccg tcggtcacca 115980  
 tgcacaaatgg tttcaacttgcg cgtcgagca agtttatattt ctgtgaatc cactttatga 116040  
 attcgctggg cctgggtgtca gtaccctcgat cattggcgccg caaataacga ctcttgacgt 116100  
 ctccgatttc tttttggccg caataagcac tccaaatgcaaa atacaaaact ttgtcgcaac 116160  
 tactgtgtt ttgcatttca ttctgaaattt gttctaaatgtt tgcacgtcg ttcttgtaa 116220  
 agtaatagtc cgagttgtc gacaaggaaat cgtcggtggc gtacacgttag tagttaatca 116280  
 tctgttgat tgatatttaa ttttggccgac ggatttttt atacacgagc ggagcggtca 116340  
 cgttctgtaa catgagtgtat cgtgtgtgtt ttatctctgg cagcgccata gtcggcgca 116400  
 aaattacacg cgctgtgtaa cgtgaacgtt tatattataa atattcaacg ttgtttgtat 116460



gcattggagc tccaaatttt gccggcaaaa agctggttc ggtcgtaacg gcgtttcatac 118440  
 gtgttggcga aaacgaatgg ctgttaccgg tgacggaat tcgagaggcg tccccagctgt 118500  
 cgggacatat gaagggtctg aacggcgcc gtgtgaaaa atggcgaccc aacatgtccg 118560  
 tctacgggac tggcaattt cctgtacata aaataaaaca gcatgacgctc gagcaagaaa 118620  
 ataaaaacgcc aaacgcgtt gagtctgtg tgctattttt caaagattca gaaatacgc 118680  
 tcacttacaa caagggggac tatgaaatta tgcatttgag gatgccgggaa ccttttaattc 118740  
 aacccaacac aatatattat agttaaataa gaattattat caaatcattt gtatattaat 118800  
 taaaatacta tactgttaat tacattttt ttacaatcat gtcggcgtt aacggtttga 118860  
 cgcaaaatttt agacgcccgtt acggaaacta acacaaaggt tgacagtgtt caaactcagt 118920  
 taaacgggctt ggaagaatca ttccagctt tggacggttt gcccgcctaa ttgaccgatc 118980  
 ttaacactaa gatctcagaa attcaatcca tattgaccgg cgacattgtt cggatcttc 119040  
 cagactcaact aaagcctaag ctgaaaaccc aagctttga actcgattca gacgctcg 119100  
 gtggtaaacg cagttccaag taaatgaatc gtttttaaaa taacaaatca attgttttat 119160  
 aatattcgtt cgtttttt attatgtat aaaaatgtat cattaggaag attacgaaaa 119220  
 atataaaaaa tatgagttct gtgtgtataa caaatgctgt aaacgcacca attgtgtttg 119280  
 ttgcaaaataa acccagtatt atttgattaa aattgtgtt ttctttgttc atagacaata 119340  
 gtgtgttttgc cctaaacgtt tactgcataa actccatgcg agtgtatagc gagctagtg 119400  
 ctaacgcgtt cccccaccaaa gtagattgtt caaaatcctc aatttcatca cccttcctca 119460  
 agttaacat ttggccgtcg gaattaactt ctaaaagatgc cacataatct aataaaatgaa 119520  
 atagagatttccaaacgttcccg tttcgaccat ttccggaaag aactcgggca 119580  
 taaaactctat gatccgttgc gacgtgggtt tgcggaaact ctcaaaagtac gcagtcagga 119640  
 acgtgcgcga catgtcgatcg ggaaactcgcc gggaaacat gttgttgtaa ccgaacgggt 119700  
 cccatagcgcc caaaacccaaatccatgc tcaatagaat gggccatgcg gggccatgg 119760  
 agctggcttg gatagcgatt cgagttaaacg ctggcgttgcgatc gttttgttgc 119820  
 cgatcacgtt gggccatgcgactaactcgccg ctggcgttgcgatc gttttgttgc 119880  
 tcacgcgcgcg agtgcgtcttgcg agcaacatgt gtttcgttgcgatc gttttgttgc 119940  
 ttttttccaaatccatgc tccatgcgatc aacccggaca ttggatgttgc gggccatgg 120000  
 taccggaaac gggccatgcgatc tccatgcgatc aacccggaca ttggatgttgc gggccatgg 120060  
 cgctgatttgc gggccatgcgatc tccatgcgatc aacccggaca ttggatgttgc gggccatgg 120120  
 aattgtatgc gatccgttgcgatc tccatgcgatc aacccggaca ttggatgttgc gggccatgg 120180  
 gggccatggatc gggccatgcgatc tccatgcgatc aacccggaca ttggatgttgc gggccatgg 120240  
 caaattccaaatccatgc tccatgcgatc aacccggaca ttggatgttgc gggccatgg 120300  
 agtccacgtt gggccatgcgatc tccatgcgatc aacccggaca ttggatgttgc gggccatgg 120360

gttcgctaaa aatgttgtg gccagcattt tgaaagtgc aaagatcgta tcgcccagca 120420  
 cgaatccgat gagcgattcc caccatctaa acgaaacaacc gcccgttgaat agctctctgc 120480  
 cggaaacgtcg acagtaggct tcgttgaatt cgccctttaaa gctgtcggga aacaagggtt 120540  
 cgggatcggtt ccgaacgtta aaagccggca catcgccac gccccatgatc gtgtgttctt 120600  
 cgggtcgcaaa gtatgggctg ttaaaagtaca ttttggacag cgagtccact aagatgcatt 120660  
 tgggtcgag cgtgtatcta aactcggtcag actgaacttg ggtttcggcg ctttcaegca 120720  
 tggccggccgc cctgtccagg tggtagcactg cgggctgcgc gtaacccacg ctgtctcg 120780  
 aggtctgcat gtacatgaac ggcgtcggtt tggacacgc gcccgttgc tgaaacggat 120840  
 agcagctcat gtttacacac ccgcgttgc tgaaagccag tttgacggcc agcgctttgt 120900  
 cggccaaattt cggcggcaca taataatcgat cgtcacttgc cgccggacgc agcgtgttagt 120960  
 cgatttagtat atgcggaaac ctggtgcgc atctcgaaat aaactcgaga cgatgcataat 121020  
 gtatggcata cctactggca ttagttaaat cgacggctgt taaaaccgc atgttatata 121080  
 ggacttaaaa taaacaacaa tatataatga aatattttt agattatatt atagcaatac 121140  
 atttacattt attataacaa tacttttat ttaatctgat tatattataa cgatacattt 121200  
 ttattttagac attgttattt acaatattaa ttaactttt atacattttt aaatcataat 121260  
 atataatcat ttcgttgc atttcaaagc ttttgatgc ttcaaagtaa tacatgaatt 121320  
 tagagtattt cggaaaatga taaacgttgg taaacccgca tttggtacaa tataacacgg 121380  
 gattttata atacagtttta gttttttac acaatttgc atagttgtt gttgttagtt 121440  
 tcaaaggaaa cgtgattgcg ccgtccaata cctggtaaa ctttttgact ttaacagtgg 121500  
 caaacacgggt tcctttgata cccgaaaatc ggttgcgttgc cagagcggcc atcatttcgc 121560  
 ttggcttttgc aagtataaaa cagttgacgt catccaccac gtcgggtctg gtgcacatgc 121620  
 ttcggtagcg ctgcaacact atattgggtt atgtttccct gagaacgaga ccgcccgtgg 121680  
 tgctaaatgc gattgttgc atgcgtcgat tgggtcttt gtgatttcgc attatgcgc 121740  
 gaatttttc aaacactttt cagttgtat cgtcaatttc caattcttta acttccgtcg 121800  
 tgtgtcttaa acttacaggg aaaaatgtatt ggtaaaaaaaaa cctctctctg gctaaatagc 121860  
 tgagggtcgac caaattgata gaaggatata tttcgatcg ggtttttggc acgttgcgtat 121920  
 atagatagca ttttgcacag cagatgtcta tgcgggtcagg atcgtccaaac ggctttcg 121980  
 tgtgaaccac aacataacaa aaccatcgcc gctgttgc tttgaatcta taattgcaag 122040  
 tgggtcgatcg cgaatcgctc atgtgtccatcgat tgggttgcgat tttttccaca ggcctgttgc 122100  
 caaatttgcgc cgtcatgcgc atatcttgc tggatgttgc gcccataatg taattgggtgg 122160  
 aaaaattttag cgtggcttgc atgtgttgc gttctaaatc gtcgtacgaa tgcatacgt 122220  
 gatcgccgttc ttgtttgaaa tccagttgttgc gggcaaaacct tcaaaacttgc 122280











gcggcggtga tttggcgact catggctggg ctggtaggat actgttcaact aggctgtgag 132120  
 gcttgaactg tgcttacgag tagaacggca gctgtatcca tactgtttat cagtaactgca 132180  
 cgactgataa gacaatagtg gtgggggaac ttgccaggca aaaatgaact tttttgtaat 132240  
 gcaaaaaagt tgatagtgta gtagtatatt gggagcgtat cgtagtgcgt agactattct 132300  
 aataaaaatag tctacgattt gtagagattt tactgttatat ggagtgtcag gcaaaagtga 132360  
 actttttgc attgcaaaaa aattcatttt aaatttatca tatcacaggc tgcaagttct 132420  
 gttatctgtc ccccaactcag gcgtgcagct ataaaagcag gcactcacca actcgtaagc 132480  
 acagttcggt gtgaagtgaa cacggagagc ctgccaataa gcaaaatgcc aaggacacc 132540  
 aacaatcgcc accggtctac gccatatgaa cgtccctacgc ttgaagatct ccgcagacag 132600  
 ttgcaagaca atttggacag cataaaccgc cgagacagaa tgcaagaaga acaagaagaa 132660  
 aacctgcgtc atcaagtgcg tagaaggcag cgtcaaaacc agctccgctc catacaaattg 132720  
 gaacagcagc gaatgatggc ggaattaaac aacgagccgg tgattaattt taaatttgag 132780  
 ttagtgcgtgt gtttagaaac atattccaa caatctaacg atacttgcc tttttgatt 132840  
 ccgactacgt gcgaccacgg tttttgttca aatgcgtca tcaatctgca aagcaacgcg 132900  
 atgaatattt cgcattccac tggatgtgtgt ccatttgca atacccaggt aaaaatgtgg 132960  
 cgttccttaa agcctaacgc tggatgtgacg tggatgtttt acaagaaaac tcaagaaaaga 133020  
 gttccgccccg tgcagcagta taaaaacatt attaaagtgc tacaagaacg gagcgtgatt 133080  
 agtgcgaag acaacgacaa taattgtgac ataaatatgg agaatcagggc aaagatagct 133140  
 gctttggaaag ctgaatttggaa agaagaaaaa aatcacagtg atcaagtagc ttctgaaaac 133200  
 cgacagctga tagaagaaaa tacttgttcc aatgaacaga ttcaagagtt gcagcatcag 133260  
 gtgaggacat tggatgtccca acgtggcatt acggtaatc agcaaatgg ccgtgacgac 133320  
 agtgcgccag ccgagctgaa cgagcgtttt cgctcaacttgc tctattcgac tatttcagag 133380  
 ctgtttatttggaa aatgcgttgcgt tcatagtatt caaaattatg tttatgcggg aacttctgt 133440  
 gcttagttcat gtgatgtaaa tggatgtttt aatttttgggt ttgaaaattt atgtgatatg 133500  
 aatgtatattt ataaaaatgaa tggatataat aataaacatt tttatacttt ttatgtttt 133560  
 ttatatttcat gtgatgtaaa aacttttaag atggatagta gtaattgtat taaaatagat 133620  
 gtaaaaatcg atatgccgtt acattatcaa tggatgtttt aatggatgtt acgtttttttt 133680  
 aatgcgtatg acactatcga tggatgtttt aacaaaagat ttataattaa tcataatcac 133740  
 gaaacaacaac aagtcaatgaa aacaaataaa caagttgtcg ataaaacatt cataaatgac 133800  
 acagcaacat acaattcttgcataataaaaa atttaaatgaa catcatattt gagaataaca 133860  
 aatgacatttccctcgatt gtgttttaca agta 133894

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 45

5 &lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; cebador directo vp39-F

5                   <400> 2  
 gcttctaata cgactcaacta tagggtcgta tccgctaagg gttct       45  
 <210> 3  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> artificial

10                  <220>  
 <223> cebador inverso vp39-R

15                  <400> 3  
 gcttctaata cgactcaacta tagggacgca acgcgttata cacag       45  
 <210> 4  
 <211> 43  
 <212> ADN  
 <213> artificial

20                  <220>  
 <223> cebador directo 45510

25                  <400> 4  
 cttctaatac gactcaactat agggacagcg tgtacgagtg cat       43  
 <210> 5  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> artificial

30                  <220>  
 <223> cebador inverso 46235

35                  <400> 5  
 gcttctaata cgactcaacta tagggatctc gagcgtgt tag ctggc       45  
 <210> 6  
 <211> 44  
 <212> ADN  
 <213> artificial

40                  <220>  
 <223> cebador directo 90292

45                  <400> 6  
 gcttctaata cgactcaacta tagggtaccg ccgaacattt cacc       44  
 <210> 7  
 <211> 43

50                  <212> ADN  
 <213> artificial

55                  <220>  
 <223> cebador inverso 90889

60                  <400> 7  
 gcttctaata cgactcaacta tagggtctat tggcacgtt get       43  
 <210> 8  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> artificial

<220>  
 <223> cebador directo ec-27-F

5 <400> 8  
 gcttctaata cgactcacta tagggaaagc agacactcg agat 45

<210> 9  
 <211> 45  
 <212> ADN

10 <213> artificial

<220>  
 <223> cebador inverso ec-27-R

15 <400> 9  
 gcttctaata cgactcacta tagggtagg tggctcaac ctcag 45

<210> 10  
 <211> 44

20 <212> ADN  
 <213> artificial

<220>  
 <223> cebador directo dbp-F

25 <400> 10  
 gcttctaata cgactcacta tagggcgctc gctagtttg ttct 44

<210> 11  
 <211> 44

30 <212> ADN  
 <213> artificial

<220>  
 <223> cebador inverso dbp-R

35 <400> 11  
 gcttctaata cgactcacta tagggaaaga tcgaaagggt gtga 44

40 <210> 12  
 <211> 45

<212> ADN  
 <213> artificial

45 <220>  
 <223> cebador directo gfp-F

<400> 12  
 gcttctaata cgactcacta tagggctgac cctgaaggtc atctg 45

50 <210> 13  
 <211> 44

<212> ADN  
 <213> artificial

55 <220>  
 <223> cebador inverso gfp-R

<400> 13  
 gcttctaata cgactcacta tagggaaactc cagcaggacc atgt 44

<210> 14  
 <211> 45

<212> ADN  
 <213> artificial

5 <220>  
 <223> cebador directo cat-F  
 <400> 14  
 gcttctaata cgactcacta tagggacggc atgatgaacc tgaat 45

10 <210> 15  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> artificial

15 <220>  
 <223> cebador inverso cat-R  
 <400> 15  
 gcttctaata cgactcacta tagggatccc aatggcatcg taaag 45

20 <210> 16  
 <211> 68  
 <212> ADN  
 <213> artificial

25 <220>  
 <223> cebador directo vp80-KO-F  
 <400> 16  
 ctgtattgtta atctgttaagc gcacatggtg cattcgatata aaccttataaa tgtgtgctgg 60

30 aatgcctt 68

<210> 17  
 <211> 71  
 <212> ADN  
 35 <213> artificial

<220>  
 <223> cebador inverso vp80-KO-R

40 <400> 17  
 aaatgtactg aatataaata aaaataaaaa atatttata atttttatt taccgtttagt 60  
 atagcataca t 71

<210> 18  
 <211> 21  
 45 <212> ADN  
 <213> artificial

<220>  
 <223> cebador directo 89507

50 <400> 18  
 agcggtcgta aatgttaaac c 21

55 <210> 19  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> artificial

<220>

<223> cebador inverso 91713  
 5 <400> 19  
 tgtataaaca atatgttaat atgtg 25  
 <210> 20  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 10 <220>  
 <223> cebador directo gfp-Nhel-F  
 <400> 20  
 15 ccaaacgcgt agcaacatgg tgagcaaggg cgag 34  
 <210> 21  
 <211> 49  
 <212> ADN  
 20 <213> artificial  
 <220>  
 <223> cebador inverso gfp-SphI  
 25 <400> 21  
 agggaaagggc atgcttaacg cgtaccggtc ttgtacagct cgtccatgc 49  
 <210> 22  
 <211> 40  
 30 <212> ADN  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> cebador directo pvp80-StuI-F  
 35 <400> 22  
 ggaacaaagg cctgagctca aagtaagacc ttactgtcc 40  
 <210> 23  
 40 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 <220>  
 45 <223> cebador inverso vp80-XbaI-R  
 <400> 23  
 cctcttatct agattatata acattgtagt ttgcg 35  
 50 <210> 24  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 55 <220>  
 <223> cebador directo vp80-SacI-F  
 <400> 24  
 60 ttatcttgag ctcataatga acgattccaa ttctc 35  
 <210> 25  
 <211> 69  
 <212> ADN

|    |  |    |
|----|--|----|
|    | <213> artificial   |    |
|    | <220>  |    |
|    | <223> cebador inverso vp80-FLAG-R1                               |    |
| 5  | <400> 25   |    |
|    | caacagagaa ttggaatcgt tcttatcgta gtcatccttg taatccatat tataaggta | 60 |
|    | tatcgaatg  | 69 |
|    | <210> 26   |    |
| 10 | <211> 62   |    |
|    | <212> ADN  |    |
|    | <213> artificial   |    |
|    | <220>  |    |
|    | <223> cebador inverso vp80-FLAG-R                                |    |
| 15 | <400> 26   |    |
|    | ccttctatct agattactta tcgtcgcat cttgtataatc tataacattg tagtttgct | 60 |
|    | tc   | 62 |
|    | <210> 27   |    |
| 20 | <211> 23   |    |
|    | <212> ADN  |    |
|    | <213> artificial   |    |
|    | <220>  |    |
| 25 | <223> cebador directo M13-F                                      |    |
|    | <400> 27   |    |
|    | cccagtcacg acgttgtaaa acg  | 23 |
| 30 | <210> 28   |    |
|    | <211> 23   |    |
|    | <212> ADN  |    |
|    | <213> artificial   |    |
| 35 | <220>  |    |
|    | <223> cebador inverso M13-R                                      |    |
|    | <400> 28   |    |
| 40 | agcgataaac aatttcacac agg  | 23 |
|    | <210> 29   |    |
|    | <211> 20   |    |
|    | <212> ADN  |    |
|    | <213> artificial   |    |
| 45 | <220>  |    |
|    | <223> cebador inverso GenR                                       |    |
|    | <400> 29   |    |
| 50 | agccacccatc tcccaacatc   | 20 |
|    | <210> 30   |    |
|    | <211> 71   |    |
|    | <212> ADN  |    |
| 55 | <213> artificial   |    |
|    | <220>  |    |
|    | <223> cebador directo vp39-KO-F                                  |    |
| 60 | <400> 30   |    |

|    |  |    |
|----|--|----|
|    | tcgggcacag acgcgaccag acccgttcg tcaattatac acgtggcgca taccgttcgt | 60 |
|    | ataatgtatg c   | 71 |
| 5  | <210> 31   |    |
|    | <211> 70   |    |
|    | <212> ADN  |    |
|    | <213> artificial   |    |
| 10 | <220>  |    |
|    | <223> cebador inverso vp39-KO-R                                  |    |
| 15 | <400> 31   |    |
|    | gtttatgtc aacaaccacc tcataaaacg ttttaaaatg tcaaaaatgt accgttcgt  | 60 |
|    | tagcatacat   | 70 |
|    | <210> 32   |    |
| 20 | <211> 33   |    |
|    | <212> ADN  |    |
|    | <213> artificial   |    |
|    | <220>  |    |
| 25 | <223> cebador directo vp39-Sacl-F                                |    |
|    | <400> 32   |    |
|    | aaggttctct agatttagacg gctattccctc cac                           | 33 |
| 30 | <210> 33   |    |
|    | <211> 32   |    |
|    | <212> ADN  |    |
|    | <213> artificial   |    |
| 35 | <220>  |    |
|    | <223> cebador inverso vp39-XbaI-R                                |    |
|    | <400> 33   |    |
|    | ttatcttgag ctcaatatgg cgctagtgcc cg                              | 32 |
|    | <210> 34   |    |
|    | <211> 39   |    |
|    | <212> ADN  |    |
|    | <213> artificial   |    |
| 40 | <220>  |    |
|    | <223> cebador directo vp39-StuI-F                                |    |
|    | <400> 34   |    |
| 45 | ggaacaaagg cctgagctct tagacggcta ttccctccac                      | 39 |
|    | <210> 35   |    |
|    | <211> 34   |    |
|    | <212> ADN  |    |
| 50 | <213> artificial   |    |
|    | <220>  |    |
|    | <223> cebador inverso lef-4-XbaI-R                               |    |
| 55 | <400> 35   |    |
|    | cctcttatct agattaattt ggcacgattc ggtc                            | 34 |
|    | <210> 36   |    |
|    | <211> 39   |    |

<212> ADN  
 <213> artificial

5 <220>  
 <223> cebador directo cg-30-XbaI-F  
 <400> 36  
 aaggttctct agattaatct acatttattg taacatttg 39

10 <210> 37  
 <211> 61  
 <212> ADN  
 <213> artificial

15 <220>  
 <223> cebador inverso vp39-FLAG-SacI-R  
 <400> 37  
 ttatcttgag ctcaatatgg attacaagga tgacgacgat aaggcgctag tgcccggtgg 60

20 t 61  
 <210> 38  
 <211> 72  
 <212> ADN  
 <213> artificial

25 <220>  
 <223> cebador directo vp1054-KO-F  
 <400> 38  
 gtactgaaag ataatttatt tttgatagat aataattaca ttatttaaa cgtgttcgac 60

30 caagaaaaccg at 72  
 <210> 39  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> artificial

35 <220>  
 <223> cebador inverso vp1054-KO-R1  
 <400> 39  
 agggcgaatt ccagcacact ttattacgtg gacgcgttac ttgc 45

40 <210> 40  
 <211> 71  
 <212> ADN  
 <213> artificial

45 <220>  
 <223> cebador inverso vp1054-KO-R2  
 <400> 40  
 gataagaatg cttgttaac aaataggtaa gctgttaat actggcgatg taccgttcgt 60

50 atagcataca t 71  
 <210> 41  
 <211> 41  
 <212> ADN  
 <213> artificial

55  
 60

<220>  
 <223> cebador directo vp1054-Rep-F

5 <400> 41  
 ggtgttag gcctgagctc cttggtagtgcgtg t 41

<210> 42  
 <211> 36  
 <212> ADN

10 <213> artificial

<220>  
 <223> cebador inverso vp1054-Rep-R

15 <400> 42  
 tccttcctc tagattacac gttgtgtcg tgcaga 36

<210> 43  
 <211> 67

20 <212> ADN  
 <213> artificial

<220>  
 <223> cebador directo p6.9-KO-F

25 <400> 43  
 gtttcgttca ttccgtactg tcggctgtgt ggaatgtctg gttgttaagt gtgctggat 60

<210> 44  
 <211> 67

30 <212> ADN  
 <213> artificial

35 <220>  
 <223> cebador inverso p6.9-KO-R

<400> 44  
 aatattaata aggtaaaaat tacagctaca taaattacac aatttaaact accgttcgtt 60

40 <210> 44  
 tagcatacat 70

<211> 70  
 <212> ADN

45 <213> artificial

<220>  
 <223> cebador directo Ac-p6.9-F

50 <400> 45  
 ttgaattca tggtgcccg aagctccaag ac 32

<210> 46  
 <211> 34

55 <212> ADN  
 <213> artificial

<220>  
 <223> cebador inverso Ac-p6.9-R

60 <400> 46

ttgcggccg cttaatagta gcgtgtctg taac 34  
 5 <210> 47  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 10 <220>  
 <223> cebador directo Se-p6.9-F  
 <400> 47  
 ttgaattca tgtatcgctcg tcgttcatc 29  
 15 <210> 48  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 20 <220>  
 <223> cebador inverso Se-p6.9-R  
 <400> 48  
 25 ttgcggccg cttaatagtgcgcgacgtctgtatc 34  
 <210> 49  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 30 <220>  
 <223> cebador directo 86596  
 <400> 49  
 35 gggcttagtt taaaatcttg ca 22  
 <210> 50  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 40 <213> artificial  
 <220>  
 <223> cebador inverso 86995  
 <400> 50  
 45 aattcaaacg accaagacga g 21  
 <210> 51  
 <211> 21  
 50 <212> ADN  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> cebador directo 45122  
 55 <400> 51  
 gcaatcatga cgaacgtatg g 21  
 <210> 52  
 60 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> artificial

<220>  
 <223> cebador inverso 46441

5 <400> 52  
 cgataattt tccaaggcgt ac 22

<210> 53  
 <211> 30  
 <212> ADN

10 <213> artificial

<220>  
 <223> cebador directo pp6.9-F

15 <400> 53  
 ggtcgacgta ccaaattccg ttttgcgacg 30

<210> 54  
 <211> 34

20 <212> ADN  
 <213> artificial

<220>  
 <223> cebador inverso pp6.9-R

25 <400> 54  
 ggtcgacgga tccgttaaa ttgtgttaatt ttagt 34

<210> 55  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> artificial

30 <220>  
 <223> cebador directo 75834

<400> 55  
 cttcttatcg ggttgtacaa c 21

40 <210> 56  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> artificial

45 <220>  
 <223> cebador inverso 76420

<400> 56  
 gcgttatcatg acgatggatg 20

50

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para la producción de un producto biofarmacéutico, que comprende:
  - (a) infectar una célula de insecto productora de sustancia biofarmacéutica con al menos un baculovirus, en donde dicho al menos un baculovirus comprende un genoma que codifica dicho producto biofarmacéutico, y
  - (b) mantener la célula de insecto productora de sustancia biofarmacéutica en condiciones tales que se produce el producto biofarmacéutico,

en donde el genoma de dicho al menos un baculovirus es deficiente para vp80 o en donde dicha célula de insecto productora de sustancia biofarmacéutica comprende un sistema de control de la expresión que permite la inactivación de vp80.
- 10 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en donde
  - vp80 se hace deficiente en dicho genoma por medio de una sustitución, inserción o delección de nucleótidos; o
  - en donde la célula de insecto productora de sustancia biofarmacéutica es una célula de insecto recombinante que comprende una construcción que expresa un dsRNA específico de vp80, en donde el dsRNA se expresa opcionalmente bajo un promotor inducible.
- 15 3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde al menos un baculovirus se produce antes de la etapa (a) en una célula productora de baculovirus que expresa una copia que complementa la vp80.
- 20 4. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la deficiencia o inactivación de vp80 no afecta a la expresión muy tardía de dicho baculovirus en comparación con la expresión muy tardía del baculovirus de tipo silvestre.
5. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el producto biofarmacéutico es una proteína recombinante, un virus recombinante o una partícula similivírica.
6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el producto biofarmacéutico es un AAV recombinante.
- 25 7. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el producto biofarmacéutico está codificado por al menos un gen introducido en el genoma baculovírico recombinante bajo el control del promotor de la polihedrina o de p10.
8. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde al menos un baculovirus procede de AcMNPV o BmNPV.
- 30 9. Utilización de un sistema de células de insecto y baculovirus para la producción de un producto biofarmacéutico, en donde el sistema de células de insecto y baculovirus comprende una célula de insecto productora de baculovirus infectada con al menos un baculovirus recombinante, en donde:
  - el baculovirus recombinante, o cada uno de ellos, comprende un genoma baculovírico que codifica el producto biofarmacéutico o al menos un componente del producto biofarmacéutico, y
  - 35 – el genoma baculovírico recombinante, o cada uno de ellos, es deficiente para vp80, o la célula de insecto productora de baculovirus comprende un sistema de control de expresión que permite la inactivación de vp80.

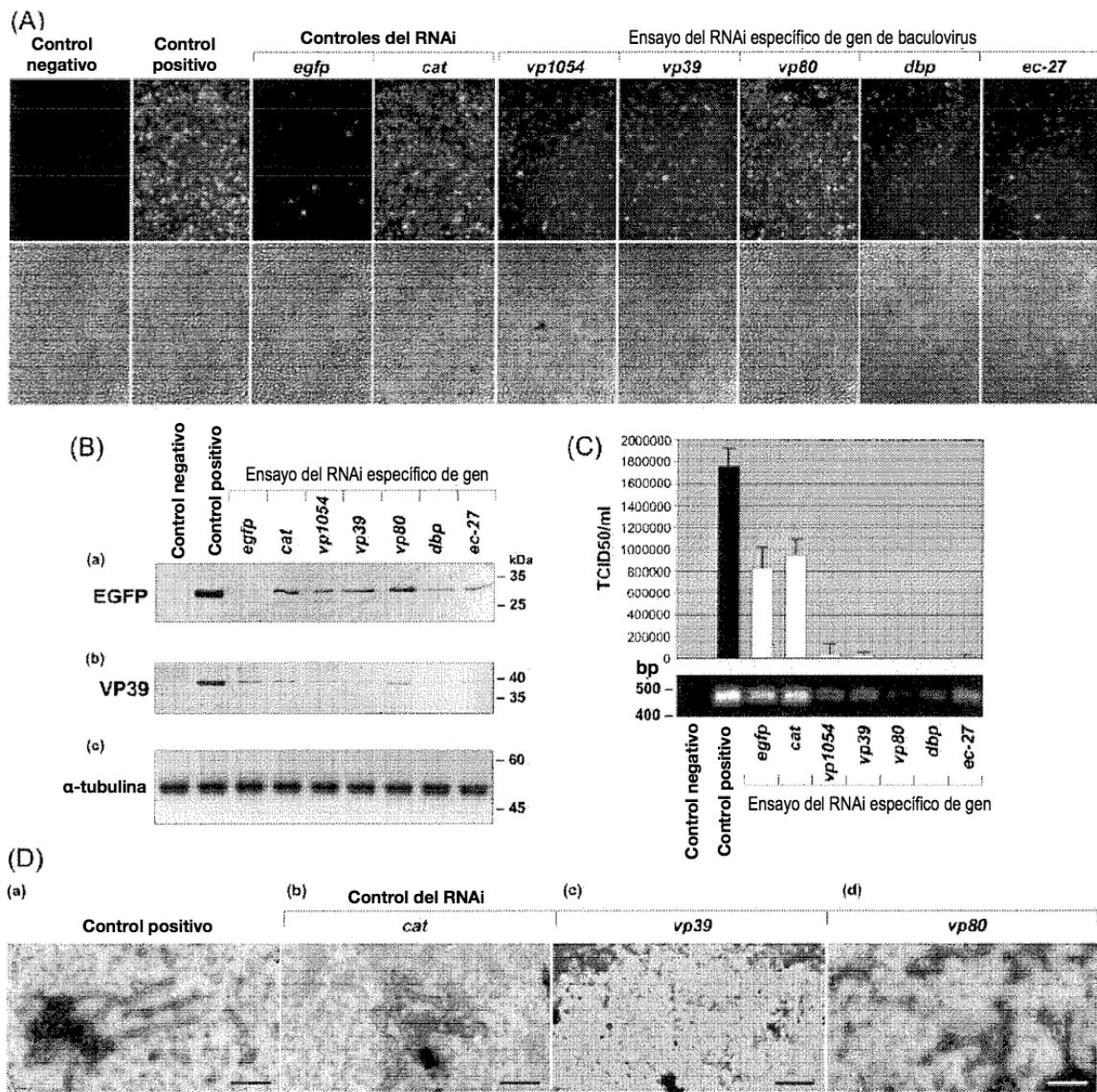


Fig 1

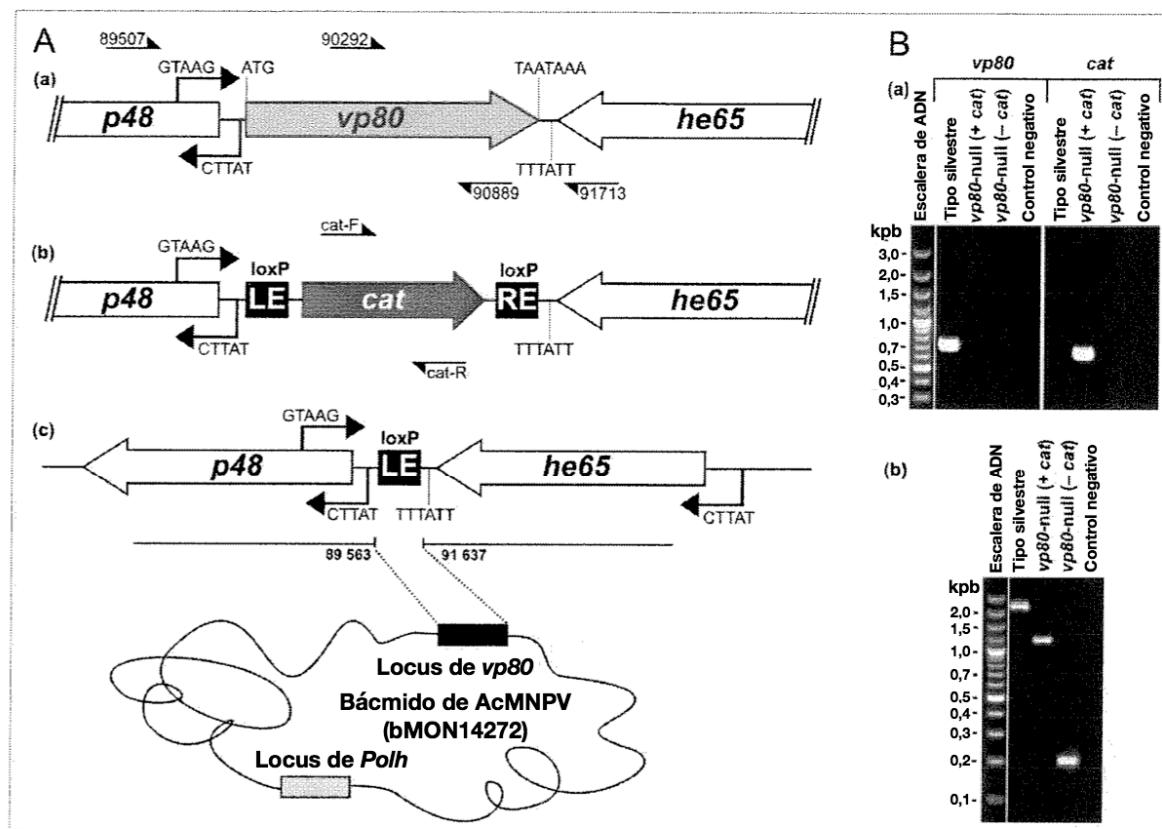


Fig 2

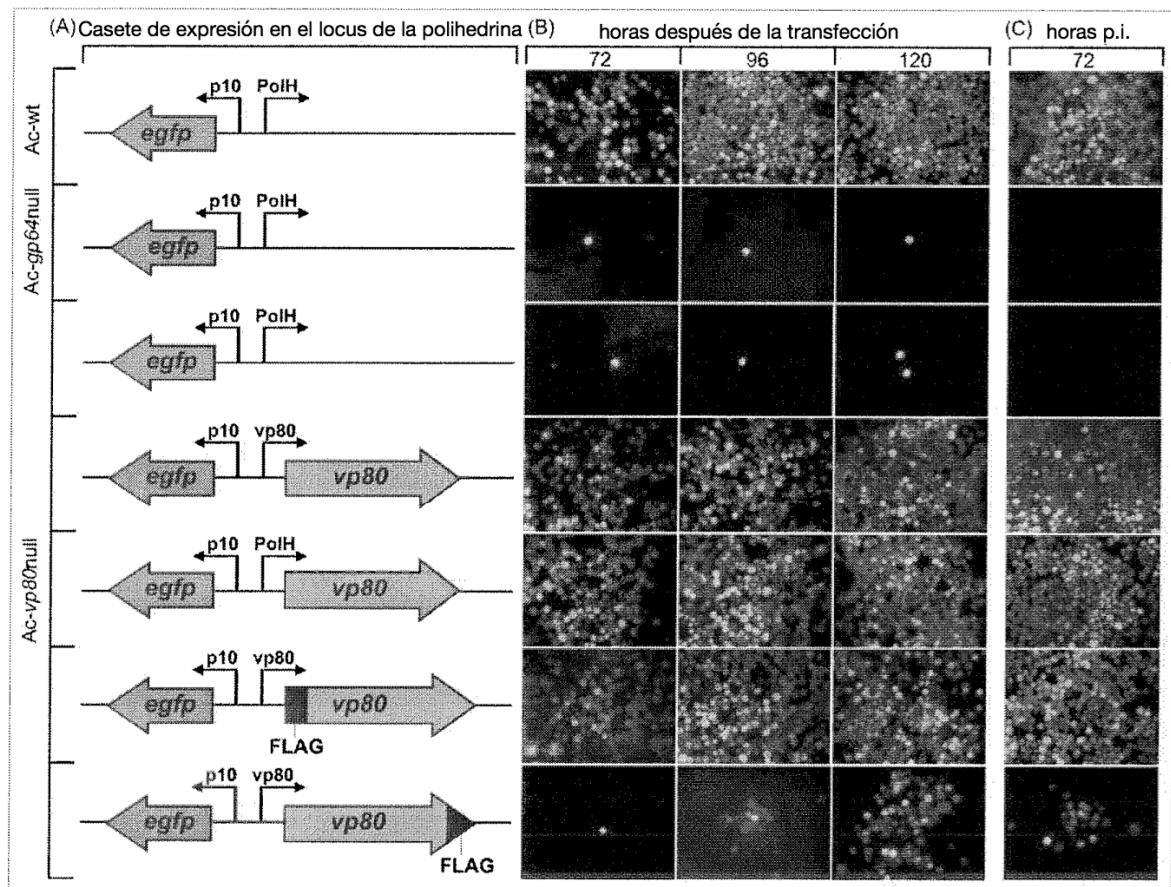


Fig 3

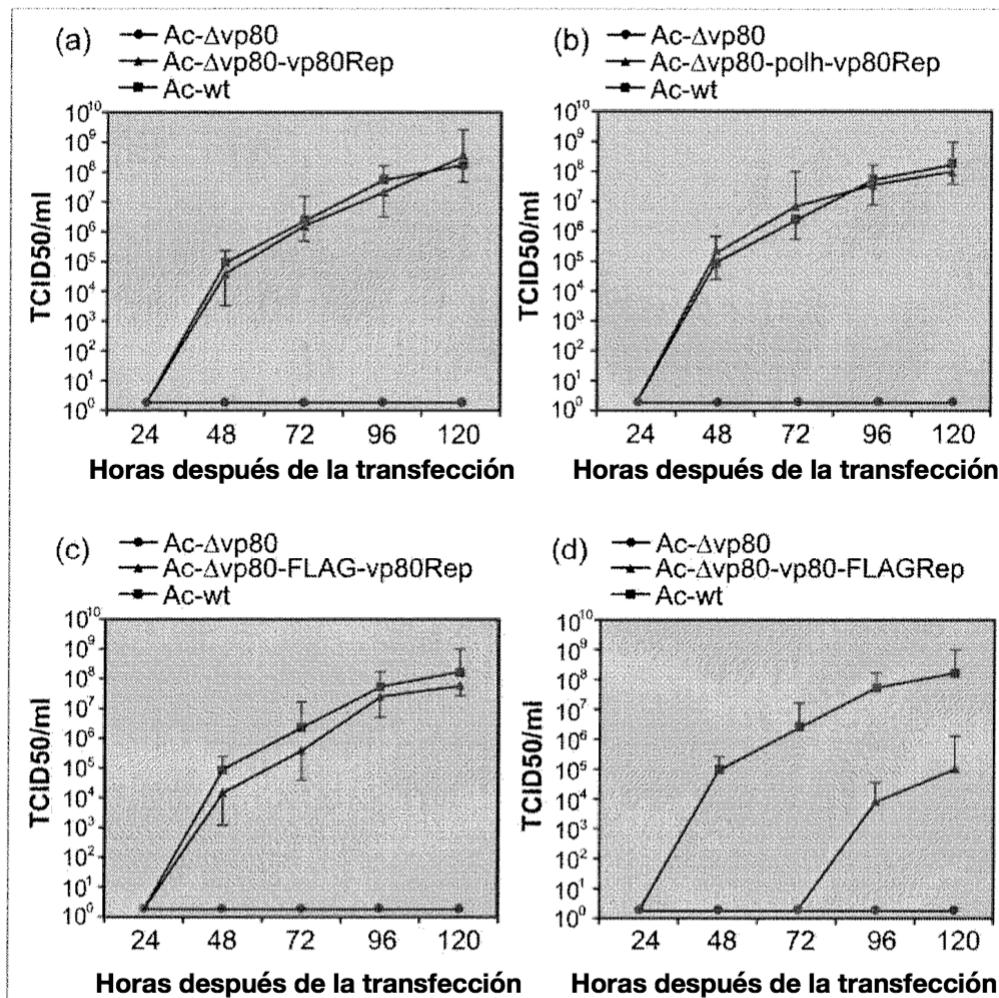
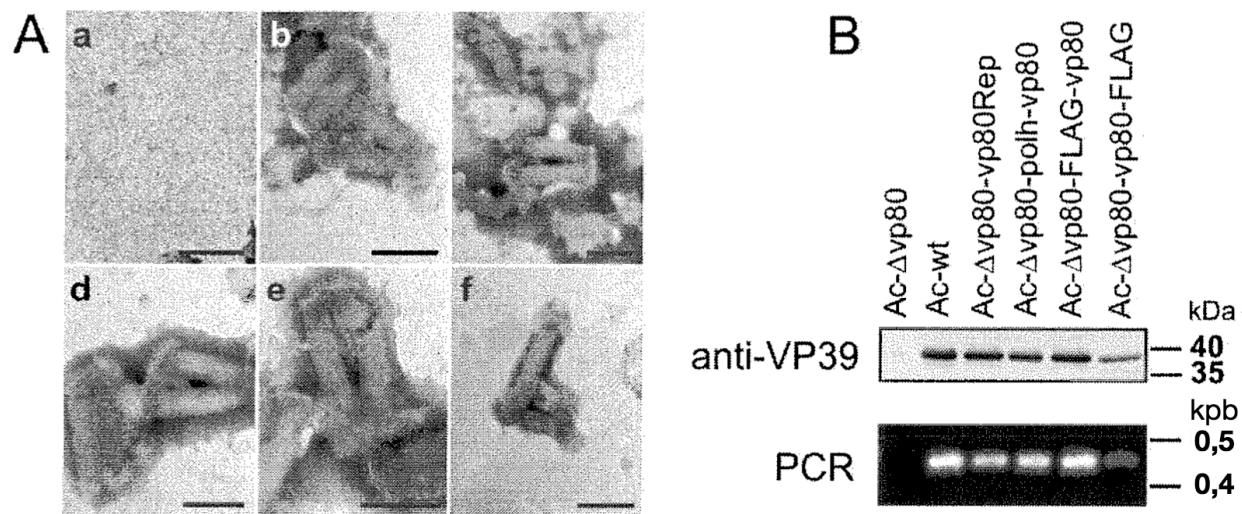
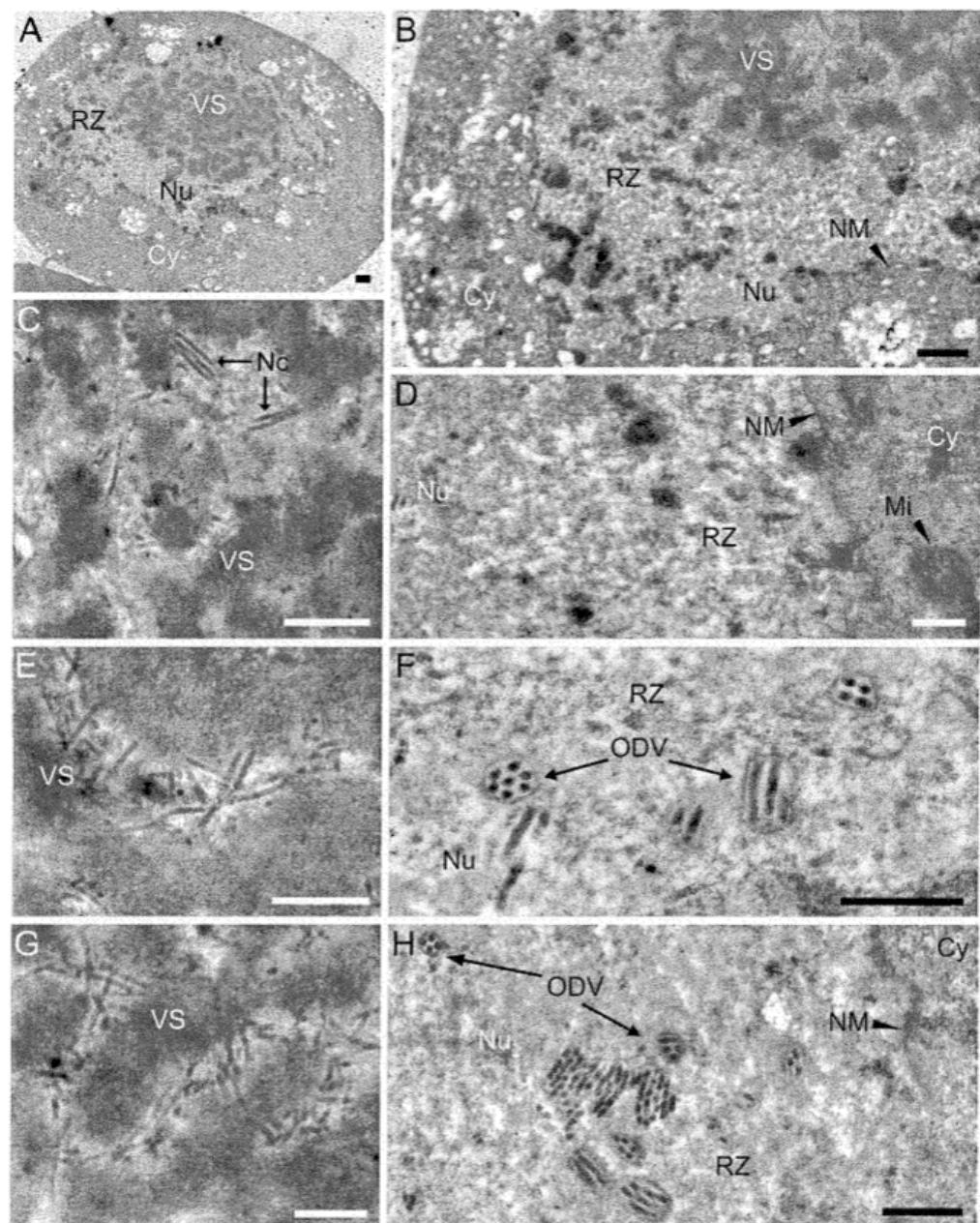


Fig 4



**Fig 5**



**Fig 6**

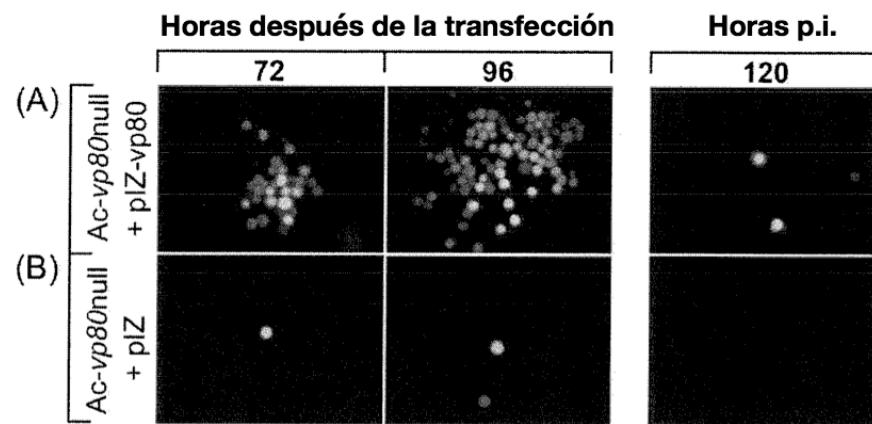


Fig 7

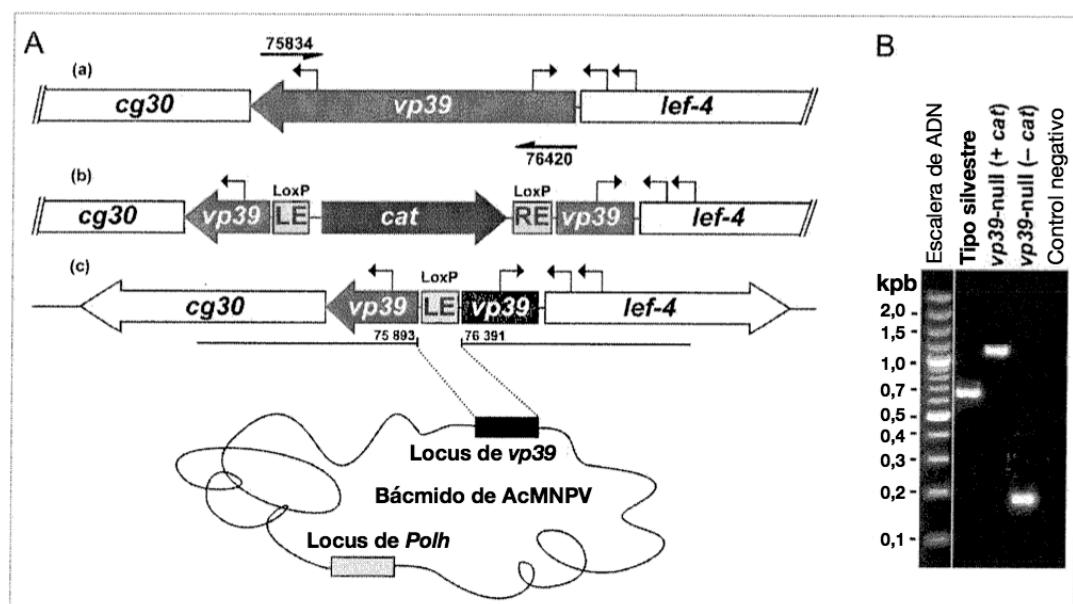


Fig 8

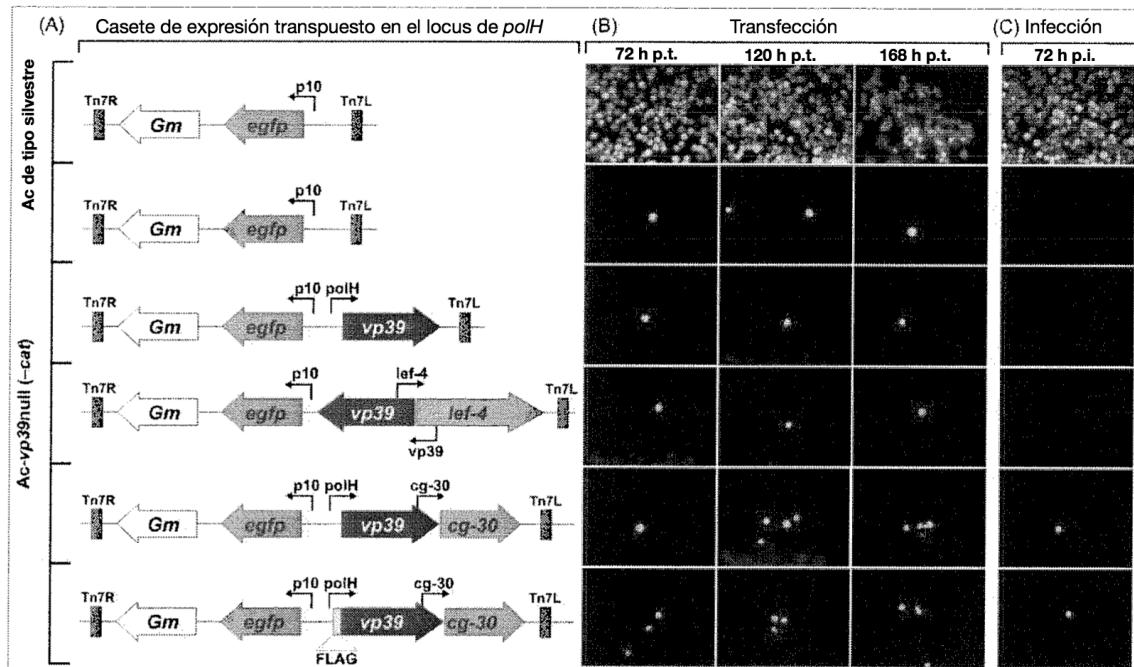


Fig 9

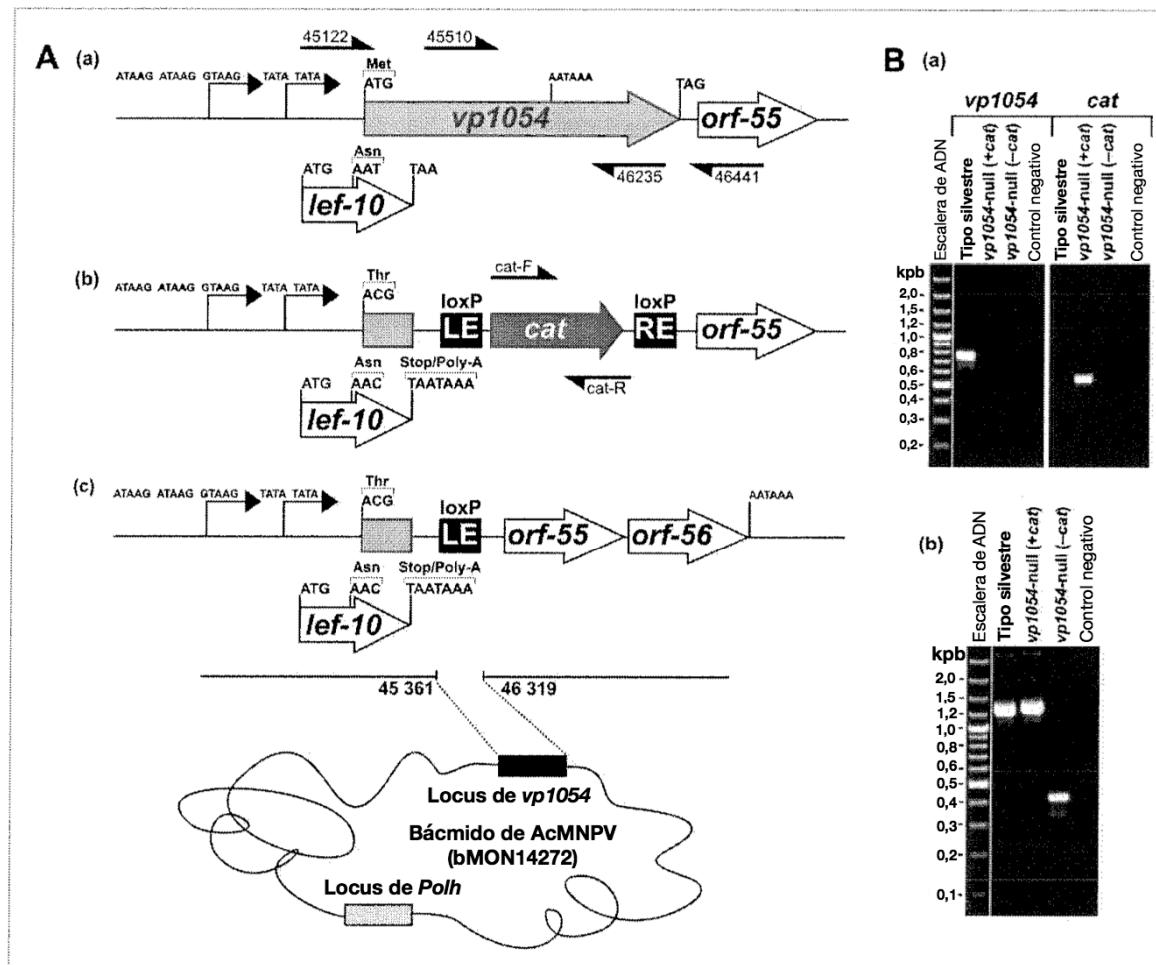


Fig 10

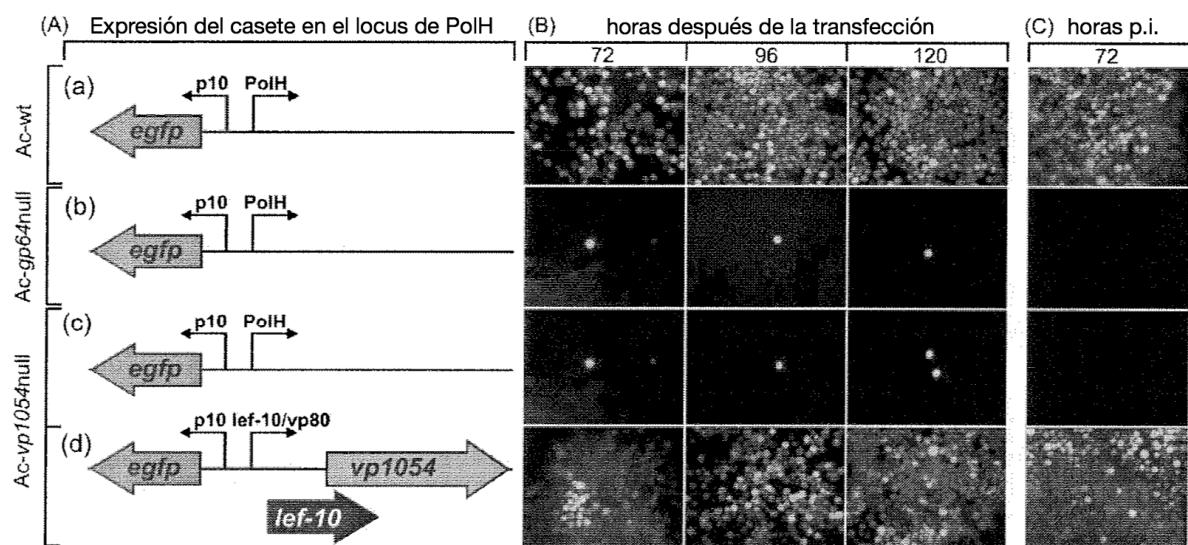


Fig 11

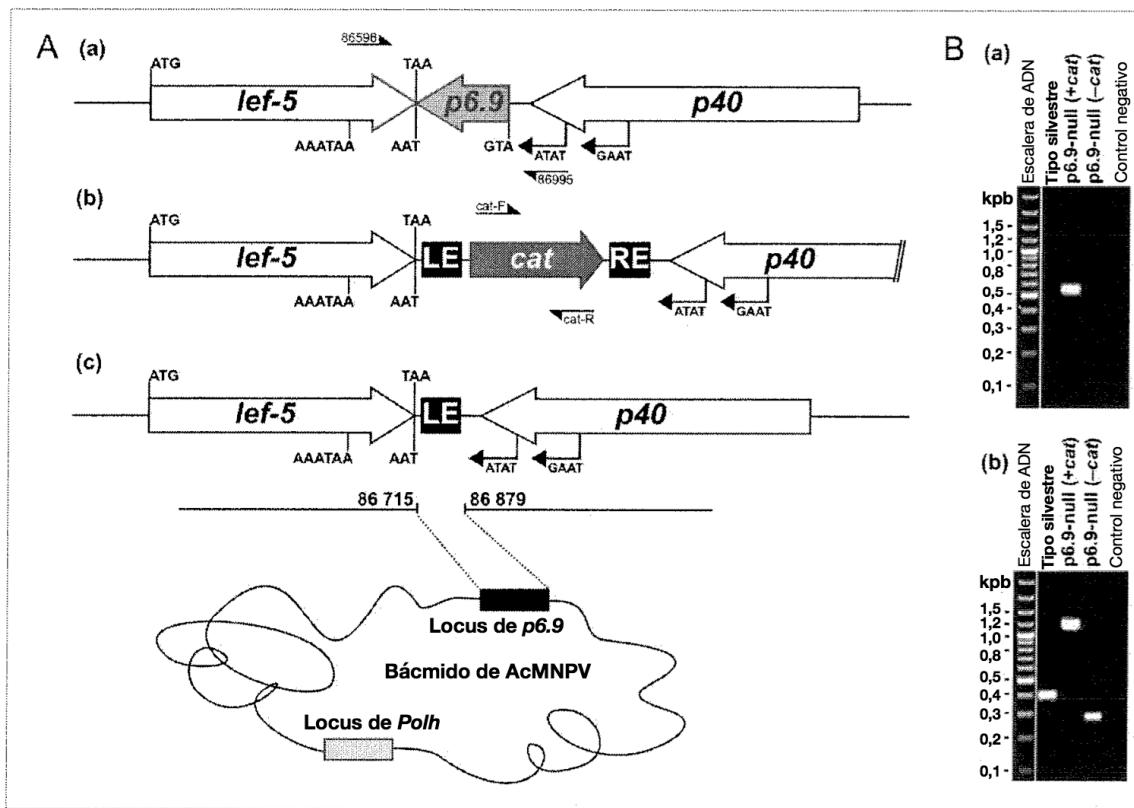


Fig 12

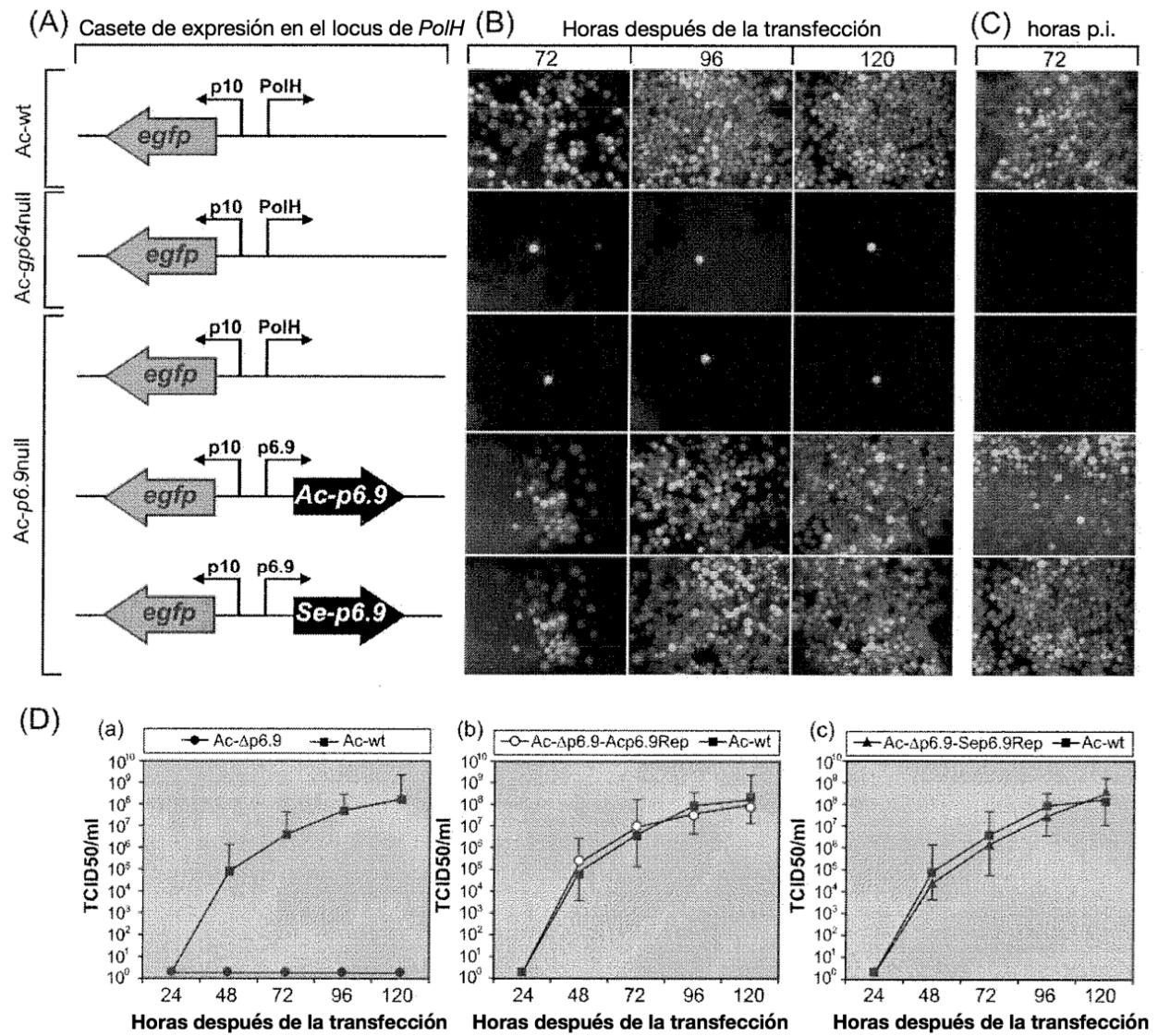


Fig 13

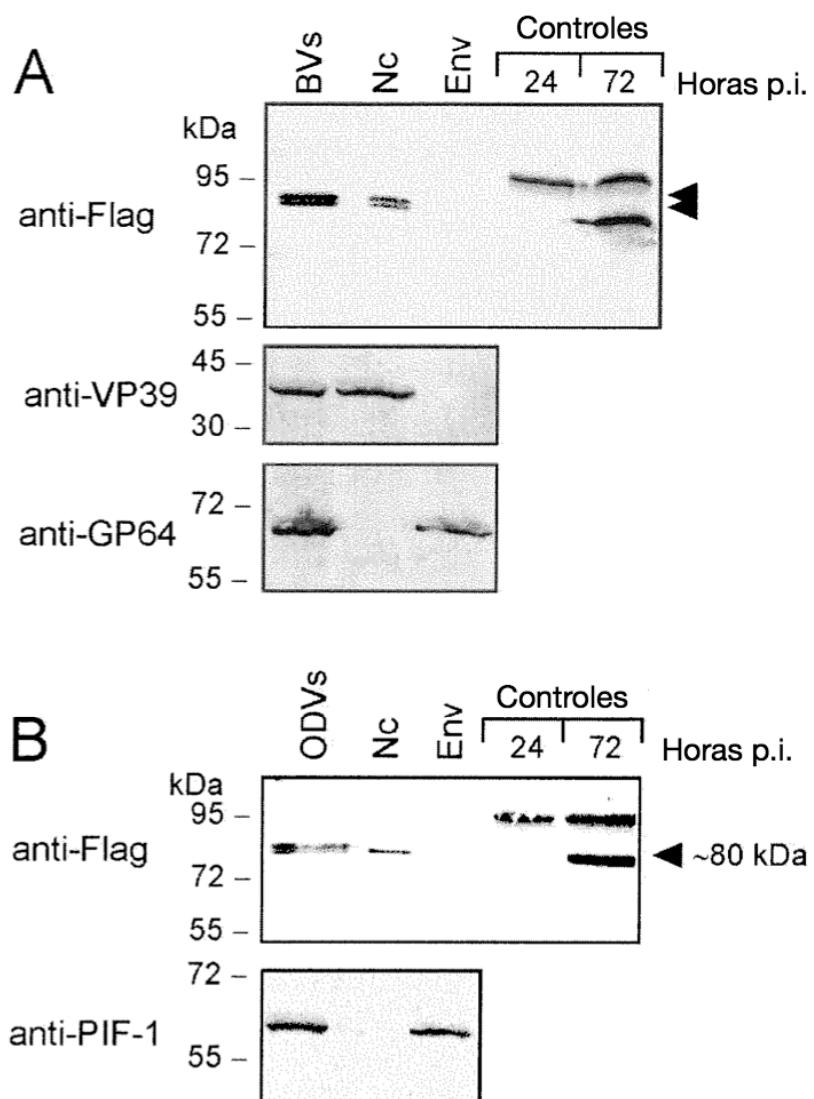


Fig. 14

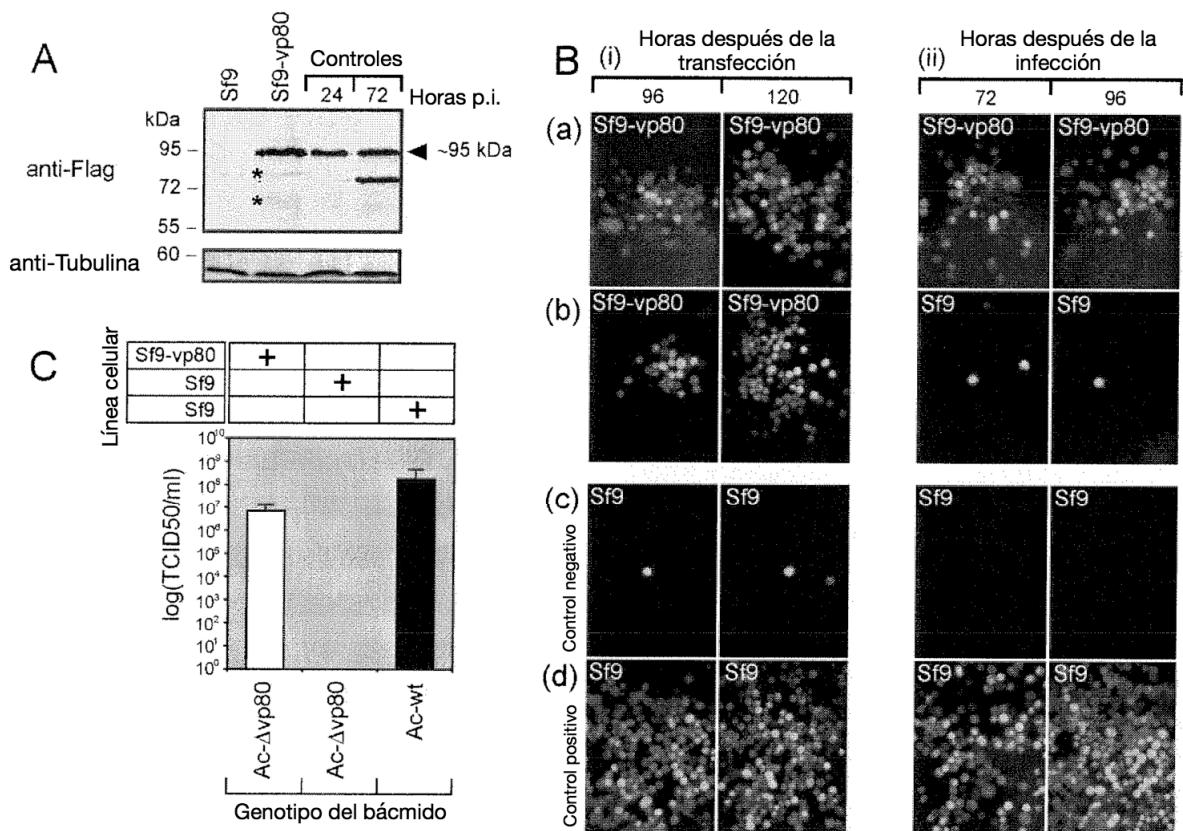


Fig. 15

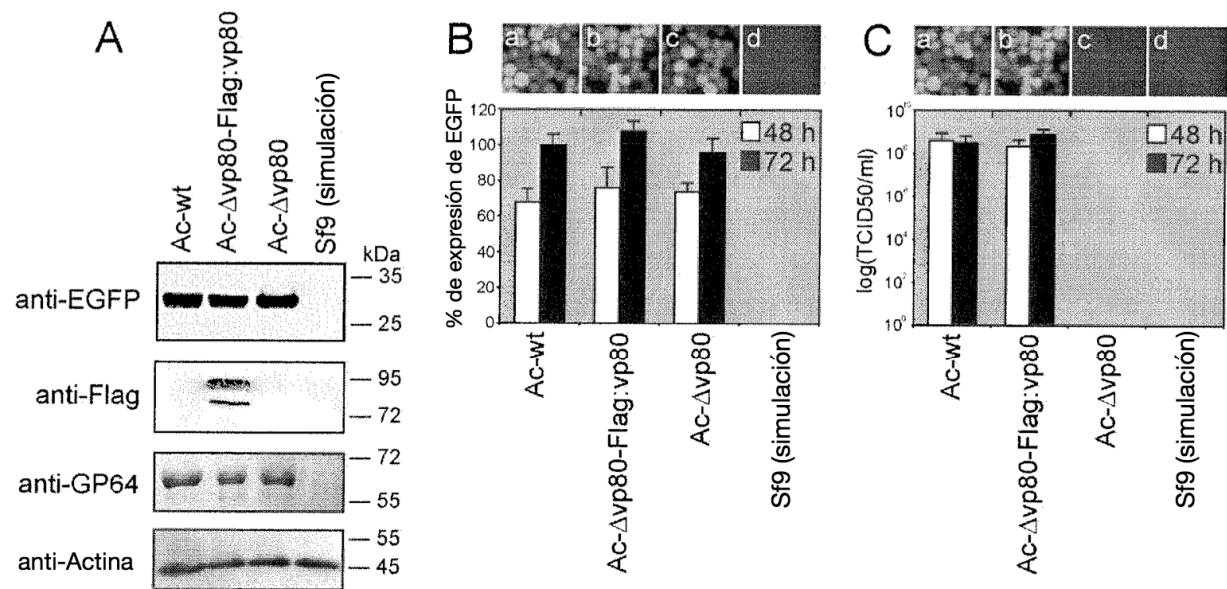


Fig. 16

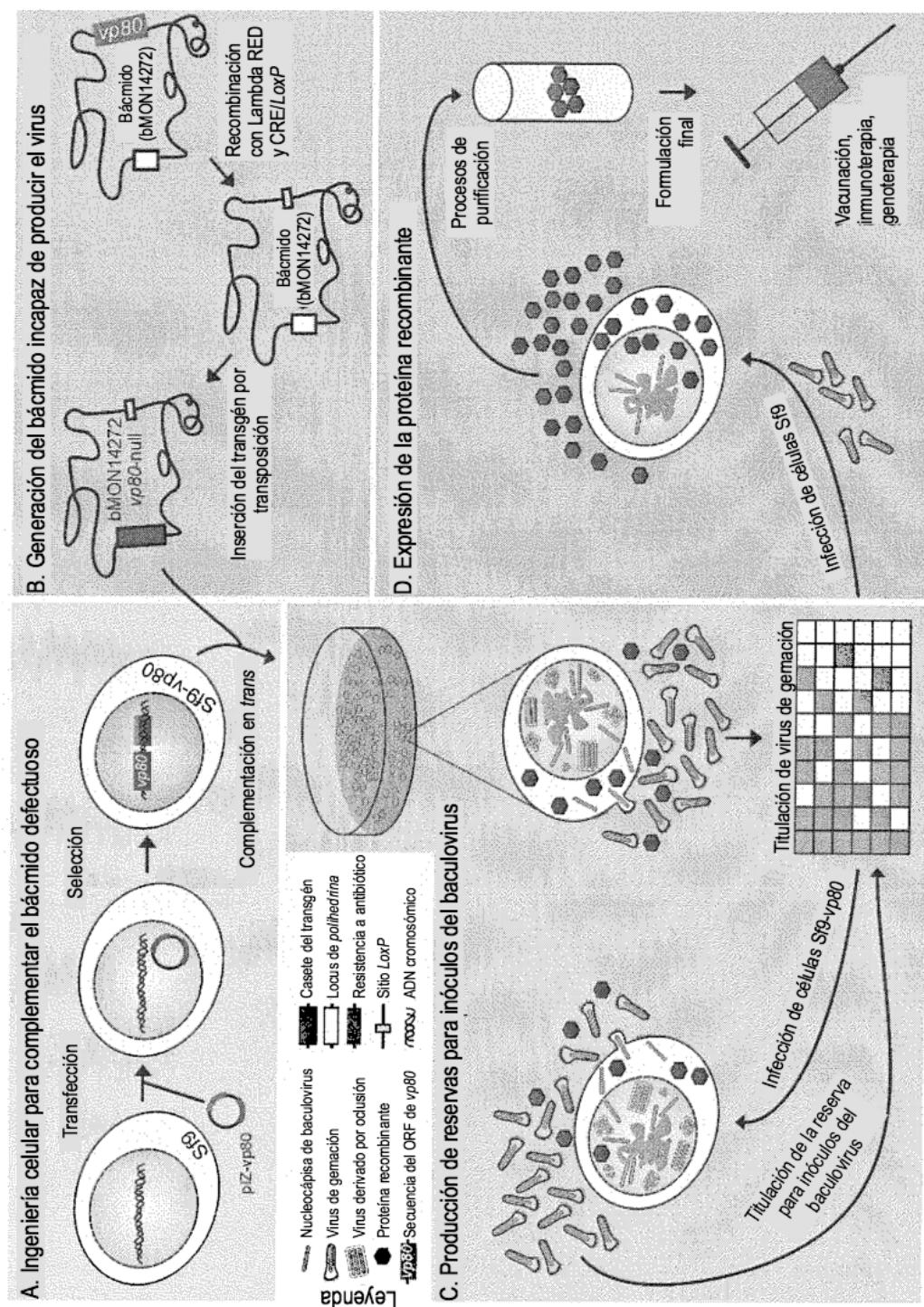


Fig. 17