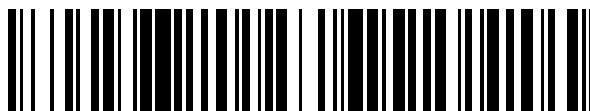


19



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 los 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 *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 postraduccionalmente, (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.

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 inmunoterapéuticas 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).

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.

Con propósitos genotéricos, 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 transdujeron 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, 10 1996, Hofmann et al., 1995, Condreay 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).

15 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 (Murgues 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 20 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, 25 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.

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 30 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 35 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 40 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.

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 45 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.

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.

50 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*.

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.

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.

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.

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 bicatenarios 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).

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); Lebacqz-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.

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).

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.

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 contruidos 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 microscopia 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 complementara); 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 complemente 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 transcrito desde el gen esencial para el ensamblaje correcto de los viriones baculovíricos, o puede corresponder a la delección, total o

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.

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.

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.

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.

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 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 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 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 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 bácmido 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 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 BmNPV o SeMNPV. Más específicamente, el genoma del baculovirus se puede hacer que carezca de *vp80*, *vp39*,

*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).

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.

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 génico). Hay que descartar como 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.

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 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.

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.

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.

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 similivíricas 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 quiméricas 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 inmunofinidad con anticuerpos camélidos (Smith et al., 2009). En particular, debido al uso de inmunoligandos muy específicos, el uso de la inmunofinidad 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 delección 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.

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 microscopia 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 antisuero policlonal 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. 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 SW55). Los sedimentos se resuspendieron en agua desmineralizada y se analizaron por microscopia electrónica con

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 casetes 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 prototipo con un fenotipo de «infección de una sola célula». (B). Microscopia 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 transfectaron 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 ultracentrifugaron 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 virógeno (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 virógeno (E), así como viriones derivados por oclusión que parecen normales en la zona anular de las células transfectadas (F). Imágenes representativas del estroma virógeno (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 transfectaron 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 transfectaron 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 casetes 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 transfectadas 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 casetes 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 prototipo con un fenotipo de «infección de una sola célula» (b). (B) Microscopia 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 prototipo con un fenotipo de «infección de una sola célula». (B) Microscopia 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-Δvp80-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 interno. (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-Δvp80-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 antisuero 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 bácmido Ac-Δvp80 (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). Se propagó un control negativo Ac-Δvp80 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 bácmido Ac-Δvp80 y las células Sf9 con el bácmido Ac-Δvp80 (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 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-Δvp80-Flag:vp80 o Ac-Δvp80 (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 revertientes 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 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 bácmido Ac-Δvp80 incapaz de producir viriones de BV y ODV. El bácmido 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 bácmido Ac-Δvp80 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 muy elevada, mientras que no se producen viriones baculovíricos (BV/ODV) contaminantes.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

#### 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 condiciones estándares. El virus AcMNPV procedente del bácmido 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 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'-gcttctaatacagactcactataggg-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, 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 Ilustra 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<sup>TM</sup> Express (Promega, Madison, WI, EE. UU.) de acuerdo con el protocolo del

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

Las células Sf9 se inocularon en placas de cultivo de 24 pocillos (2 × 10<sup>5</sup> 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 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 microscopia 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

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-mercaptoetanol 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 policlonal anti-GFP de conejo (Molecular Probes), antisuero policlonal anti-VP39 de conejo o antisuero monoclonal anti-α-tubulina (Sigma-Aldrich), todos diluidos a 1/2000 en PBS a 1X que contiene leche en polvo al 0,2%. Después 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). Después 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.

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

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 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 desnaturalización inicial a 94 °C durante 2 min, y tras ella 30 ciclos de desnaturalización (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 7 min a 72 °C. Los controles negativos estaban incluidos en todas las amplificaciones por PCR para comprobar los 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).

#### 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 báculo (se detallan las secuencias en la tabla 1).

Para eliminar del esqueleto del báculo 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 báculo. 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 báculo *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-NheI*-F y *gfp-SphI*-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™ (Fermentas) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Posteriormente, el ORF de *egfp* se escindió del pJET1.2-*egfp* sin errores con *NheI* y *SphI* y se subclonó en el pFastBacDUAL (Invitrogen) digerido con *NheI* y *SphI* 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 báculo *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 báculos *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-StuI*-F y *vp80-XbaI*-R (tabla 1) del molde del báculo 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 *StuI* y *XbaI* y, a continuación, se subclonó en el pFB-*egfp* digerido con *Bst*11071 y *XbaI* 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-SacI*-F y *vp80-XbaI*-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* (*SacI/XbaI*) del pJET1.2-*vp80* y se subclonó en el pFB-*egfp* digerido con *SacI* y *XbaI* 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-StuI*-F y *vp80-FLAG*-R1 a partir del báculo 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-XbaI*-R en el báculo molde bMON14272. El

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 verificar la secuencia del ADN, el casete FLAG-vp80 se escindió de pJet1.2-pvp80-FLAG-vp80 mediante la doble digestión con *StuI* y *XbaI* y, a continuación, se subclonó en el pFB-egfp purificado en gel y digerido con *Bst*11071 y *XbaI* 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-*StuI*-F y vp80-FLAG-R a partir del báculo 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.

Los insertos de todos los plásmidos donantes desarrollados se transpusieron en el báculo *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

Los ADN de los báculos se prepararon a partir de cultivos bacterianos de una noche en 1,5 ml inoculados con 2 a 3 colonias independientes que llevan el báculo 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 báculo 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 2000xg 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 báculo bMON14272 de tipo silvestre que lleva el gen indicador *egfp* bajo control del promotor de p10. Un báculo 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

Se realizaron análisis a lo largo del tiempo para comparar la producción de virus de gemación del virus AcMNPV-*vp80*null y las diferentes construcciones de reparación en comparación con el báculo 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 báculo, 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

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 báculo Ac- $\Delta$ vp80, el Ac- $\Delta$ vp80-*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

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 báculo Ac- $\Delta$ vp80, Ac- $\Delta$ vp80-*vp80*, Ac- $\Delta$ vp80-pH-*vp80*, Ac- $\Delta$ vp80-FLAG-*vp80*, Ac- $\Delta$ vp80-*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

Se analizó por microscopía electrónica (EM) la presencia de ODV y estructuras de tipo bastoncillo en las células de insecto infectadas/transfectadas. 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-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 el ORF de *vp80* (*SacI/XbaI*) del 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 *Eco57I* y se purificó en gel. Las células Sf9 se inocularon en placas de seis pocillos ( $1 \times 10^6$  células/pocillo) y se transfectoron 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<sup>TM</sup> (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 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 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 productora de la recombinasa Lambda 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 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

- 35 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 fragmento de 1.073 pb con los cebadores *vp39-SacI-F* y *vp39-XbaI-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 *SacI/XbaI* y, a continuación, se subclonó en el pFB-egfp digerido con *SacI/XbaI* y purificado en gel para 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-StuI-F* y *lef-4-XbaI-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*. 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 *StuI/XbaI* y, a continuación, se subclonó en el pFB-egfp digerido con *StuI/XbaI* y purificado en gel para generar el plásmido donante pFB-egfp-*vp39-lef-4*.

- 50 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 el 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-XbaI-F* y *vp39-XbaI-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 *SacI/XbaI* 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-SacI-R* en vez del cebador *vp39-XbaI-R*.

- 55 Todos los plásmidos donantes contruidos se transpusieron en el bácmido *vp39-null* según el protocolo del kit Bac-to-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 *StuI* y *XbaI* y, a continuación, se subclonó en el pFB-egfp purificado en gel y digerido con *Bst*11071 y *XbaI* 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 (bMON14272) 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.

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* en el pFastBac1 (Invitrogen), del cual se delecionó el promotor de la polihedrina antes de fusionar el sitio *Bst*11071 al *StuI* para obtener el pFB1-*p6.9*. El promotor *p6.9* del pFB1-*p6.9* se volvió a clonar como el fragmento *SnaBI/BamHI* en los sitios *Bst*11071 y *BamHI* del pFastBacDUAL (Invitrogen), con lo que se eliminó el

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.

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

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 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 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 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.

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 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.

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

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 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 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 polihedrina junto al gen *egfp* bajo el promotor de p10 (figura 3A). Para investigar la función del gen *vp80*, las células Sf9 se transfectaron con las construcciones de bácmidos con anulación o de reparación y se les monitorizó la expresión de EGFP por microscopia de fluorescencia. Cuando el Ac-*vp80null* se introdujo en las células Sf9 no se 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-*gp64null* (figura 3B). Los resultados indican que Ac-*vp80null* es capaz de alcanzar la fase muy tardía de infección como se confirmó mediante la 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 transfectaron 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 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 transfectadas 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 transfectadas inicialmente, lo que indica que esta construcción de bácmido es incapaz de replicar el virus (figura 3B). Sin embargo, 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 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 transfectadas 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 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 transfectadas se comparó entre Ac-wt, Ac- $\Delta$ *vp80*, Ac- $\Delta$ *vp80*-*vp80*Rep, Ac- $\Delta$ *vp80*-*polh*-*vp80*Rep, Ac- $\Delta$ *vp80*-FLAG-*vp80*Rep y Ac- $\Delta$ *vp80*-*vp80*-FLAGRep. Los sobrenadantes del cultivo celular 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- $\Delta$ *vp80*-*vp80*Rep, Ac- $\Delta$ *vp80*-*polh*-*vp80*Rep, Ac- $\Delta$ *vp80*-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- $\Delta$ *vp80*-*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 hagan modificaciones génicas (marcación con etiquetas epitópicas). 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.

Se necesita VP80 para la producción de BV y de ODV

Los resultados descritos más arriba indicaban que el mutante Ac-*vp80null* no es capaz de producir ningún virus de gemación infeccioso. 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 transfectaron 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 microscopia 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-*vp80null* (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 microscopia electrónica con cortes ultrafinos generados a partir de células transfectadas con el bácmido. Las células transfectadas con Ac-*vp80null* desarrollaron típicamente el fenotipo de célula infectada con el baculovirus, con un núcleo alargado, una cromatina hospedadora fragmentada, un estroma vírógeno electrodenso, etc. (figura 6A). La ausencia de VP80 no impidió la formación de nucleocápsidas de aspecto normal dentro del estroma vírógeno (figura 6C). Las nucleocápsidas formadas eran fenotípicamente indistinguibles de las producidas por los bácmidos Ac-wt o Ac-*vp80null* reparado. Sin embargo, las nucleocápsidas ensambladas eran quizá menos abundantes que con las células transfectadas con los bácmidos Ac-wt o Ac-*vp80null* 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-*vp80null* (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 vírógeno. 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 vírógeno de las células transfectadas con Ac-*vp80null* 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- $\Delta$ *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-*vp80null* (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 microscopia 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-*vp80null* 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 clon 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 *vp80null(-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 microscopia de fluorescencia. Cuando el Ac-*vp39null* 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-*gp64null* (figura 9B).

Estos resultados indican que la construcción Ac-*vp39null* 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-vp39Rep*) (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-vp39Rep* y Ac- $\Delta$ *vp39-vp39-lef-4Rep* no mostraron ninguna célula positiva para la EGFP. Sin embargo, en las células de insecto incubadas con los sobrenadantes de Ac- $\Delta$ *vp39-vp39-cg30Rep* 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 *vp39null*. 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 *vp1054null*

Para estudiar la funcionalidad del gen *vp1054* de AcMNPV durante la infección del virus, se construyó un bácmido de AcMNPV *vp1054null* 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 *vp1054null* 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 clon 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 *vp1054null(+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 *vp1054null(+cat)* (figura 10B). Cuando la construcción final AcMNPV-*vp1054null(-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 diseñó de tal manera que el ORF de *vp1054* de AcMNPV con su región promotora nativa se insertara 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-vp1054null* 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-gp64null* (figura 11B). Los resultados indican que *Ac-vp1054null* 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 *vp1054null*. 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 transfectaron con las construcciones de reparación (*Ac-Δvp1054-vp1054*). Los resultados 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 sembradas en placas, y a continuación se incubaron 3 días para detectar la infección por el virus generado desde 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 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-vp1054null* anulado no se detectó ninguna expresión de EGFP en ningún punto del tiempo analizado hasta las 72 h (figura 11C).

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 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 transfectadas con el bácmido mutante *Ac-vp1054null* (figura 11B).

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

Para estudiar la funcionalidad del gen *p6.9* de AcMNPV durante la infección del virus, se construyó un bácmido de AcMNPV *vp80null* 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 indicaba que se había producido la delección específica de sitio del gen *p6.9*. En el bácmido de AcMNPV *p6.9null* 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 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 introdujo en la secuencia del bácmido en el caso de la construcción *p6.9null(+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 AcMNPV de tipo silvestre, mientras que se conseguía amplificar un fragmento de ADN de 1.220 pb con el AcMNPV *vp80null(+cat)* de molde (figura 12B). Cuando la construcción final AcMNPV-*vp80null(-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

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 transfectaron 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-p6.9null* 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-gp64null* (figura 13B). Los resultados indican que el *Ac-p6.9null* 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 EGFP en las monocapas de células de insecto que se transfectaron con las dos construcciones de reparación (*Ac-Δp6.9-Acp6.9* y *Ac-Δp6.9-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

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-*p6.9*null 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- $\Delta$ *p6.9*, Ac- $\Delta$ *p6.9*-Acp6.9Rep, Ac- $\Delta$ *p6.9*-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- $\Delta$ *p6.9*-Acp6.9Rep y Ac- $\Delta$ *p6.9*-Sep6.9Rep mostraron una cinética de replicación vírica acorde con la propagación del virus de tipo silvestre (Ac-wt).

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 heterólogo (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-*p6.9*null (figura 15B).

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

## Materiales y Métodos

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

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 *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 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 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).

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 isopropiltiogalactósido (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.

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*-*NheI*-F y *gfp*-*SphI*-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™ (Fermentas) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Posteriormente

se escindió el ORF de *egfp* de pJet1.2-*egfp* sin errores con *NheI* y *SphI*, y se subclonó en el pFastBacDUAL (Invitrogen) digerido con *NheI* 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

5 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

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

10 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-Stul*-F y *vp80-XbaI*-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

15 digestión con *Stul* y *XbaI*, y a continuación se subclonó en el pFB-*egfp* digerido con *Bst*11071 y *XbaI*, 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-SacI*-F y *vp80-XbaI*-R (tabla 1) y se clonó en el pJet1.2/Blunt para generar el pJet1.2-*vp80*. En la última etapa se escindió el

20 ORF de *vp80* (*SacI/XbaI*) de pJet1.2-*vp80* y se subclonó en el pFB-*egfp* digerido con *SacI* y *XbaI* para crear el pFB-*egfp*-*polh*-*vp80*.

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

25 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-Stul*-F y *vp80-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 *vp80-XbaI*-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*-

30 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 *Stul* y *XbaI*, y a continuación se subclonó en el pFB-*egfp* digerido con *Bst*11071 y *XbaI*, 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-Stul*-F y *vp80-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*

35 de un modo similar a como se realizó para las construcciones anteriores.

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).

#### Ensayo de transfección-infección

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

45 utilizó para transfectar  $1 \times 10^6$  células Sf9 en una placa de 6 pocillos mediante el protocolo de transfección con Cellfectin<sup>TM</sup> 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 microscopia 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 microscopia de fluorescencia. En todos los experimentos se

50 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).

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

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

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 transfectaron 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 transfectaron 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 transfectaron 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).
- 20

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

- 25 La presencia de los ODV y de las estructuras de tipo bastoncillo en las células de insecto infectadas/transfectadas 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

- 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

- 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 occlusión víricos tal y como se describió previamente (Braunagel et al., 1994).
- 40 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).

- 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 inmunotransfirieron 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)).
- 45

#### 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 *Eco57I* 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).

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 = (absorbancia problema<sub>nh</sub> – absorbancia de fondo)/(EGFP de Ac-wt<sub>72h</sub> – absorbancia de fondo) × 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.

## Resultados

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

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 transfectaron 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 transfectadas 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 transfectado, 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 transfectadas 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).

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 transfectadas 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 epítipo). 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.

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 transfectaron con las construcciones de bácmidos con anulación, de reparación o de tipo silvestre, y se ultracentrifugaron a los 7 días p.t. los medios de cultivo celular para sedimentar los virus de gemación. Los sedimentos formados se analizaron por microscopia 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 transfectadas 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 transfectadas con la construcción de reparación del gen *vp80* etiquetado con FLAG en el extremo carboxilo.

Para caracterizar aún más la delección del gen *vp80* en el ciclo de vida de los baculovirus, se realizó la microscopia electrónica con cortes ultrafinos generados de las células transfectadas con el bácmido. Las células transfectadas con Ac-*vp80*null desarrollaron típicamente el fenotipo de célula infectada con baculovirus, con un núcleo agrandado, una cromatina hospedadora fragmentada, un estroma virógeno electrodens, 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 indistinguibles 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 transfectadas 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 transfectadas 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 transfectadas 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 transfectadas (figura 6F). La abundancia y la forma de los viriones derivados por oclusión producidos en las células transfectadas 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

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).

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 antisuero 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.

En los ensayos de complementación en *trans*, las células Sf9-*vp80* se transfectaron con el bácmido Ac- $\Delta$ *vp80* y la 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 bácmido Ac-wt (figura 15D). Como control, las células Sf9 no transgénicas mostraron solo infecciones de una sola célula cuando se transfectaron con el bácmido Ac- $\Delta$ *vp80* (figura 15Bc).

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 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 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 bácmido 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).

El virus Ac-*vp80null* incapaz de replicarse, complementado en *trans*, es competente para expresar una gran cantidad de la proteína recombinante

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 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 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.

De igual forma, durante el cultivo de producción no se detectaron genotipos del virus revertiente que lleven el gen *vp80*, ya que no se detectó la proteína Flag.VP80 expresada *de novo* (figura 16A) en las inmunotransferencias. 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 revertientes ni la contaminación del virus de tipo silvestre.

## Resumen

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. Esta 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 microscopia 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'-gcttctaatacgactcactatagggctgatccgtaagcgttct-3'	Directo
3	vp39-R	5'-gcttctaatacgactcactatagggacgcaacgcgttatacacag-3'	Inverso
4	45510	5'-gcttctaatacgactcactatagggacagcgtgtacgagtgcat-3'	Directo
5	46235	5'-gcttctaatacgactcactatagggatctcgagcgtgtagctggt-3'	Inverso
6	90292	5'-gcttctaatacgactcactatagggtaaccgcaacattacacc-3'	Directo
7	90889	5'-gcttctaatacgactcactatagggctattggcacgtttgct-3'	Inverso
8	ec-27-F	5'-gcttctaatacgactcactatagggaaagcagacactcggcagat-3'	Directo
9	ec-27-R	5'-gcttctaatacgactcactataggggttgagtggttcaacctcag-3'	Inverso
10	dbp-F	5'-gcttctaatacgactcactatagggcgctcgctagttttgttct-3'	Directo
11	dbp-R	5'-gcttctaatacgactcactatagggaaagatcgaaggtggtga-3'	Inverso
12	gfp-F	5'-gcttctaatacgactcactatagggctgacctgaagttcatctg-3'	directo
13	gfp-R	5'-gcttctaatacgactcactatagggaaactccagcaggaccatgt-3'	Inverso
14	cat-F	5'-gcttctaatacgactcactatagggacggcatgatgaacctgaat-3'	Directo
15	cat-R	5'-gcttctaatacgactcactatagggatcccaatggcatcgtaaag-3'	Inverso
16	vp80-ko-F	5'-ctgtattgtaactgtgaagcgcacatgggtcattcgatataacctataatgtgt-gctggaatgccct-3'	Directo
17	vp80-ko-R	5'-aaatgtactgaatataataaaaaataaaaaatatttataattttatttaccgtt-cgtatagcatacat-3'	Inverso
18	89507	5'-agcggctgtaaatgttaaacc-3'	Directo
19	91713	5'-tgtataaacaatatgttaatatgtg-3'	Inverso
20	gfp-NheI-F	5'-ccaaaccgctagcaacatggtgagcaagggcgag-3'	Directo
21	gfp-SphI	5'-aggaaagggcatgcttaacgcgtaccggtctgtacagctcgtccatgc-3'	Inverso
22	pvp80-StuI-F	5'-ggaacaaaggcctgagctcaaaagtaagacctttactgtcc-3'	Directo
23	vp80-XbaI-R	5'-ccttctatctagattatataacattgtagtttgcg-3'	Inverso
24	vp80-SacI-F	5'-ttatcttgagctcaatatgaacgattccaattctc-3'	Directo
25	vp80-FLAG-R1	5'-caacagagaattggaatcgttcttatcgtcgtcatccttgtaatc-catattataagggttatatcgaatg-3'	Inverso
26	vp80-FLAG-R	5'-ccttctatctagattacttatcgtcgtcatccttgtaatcataacat-tgtagtttgcgttc-3'	Inverso
27	M13-F	5'-cccagtcacgacgttgtaaaacg-3'	Directo
28	M13-R	5'-agcggataacaatttcacacagg-3'	Inverso
29	GenR	5'-agccacctactcccaacatc-3'	Inverso

# ES 2 542 740 T3

SEQ ID n.º	Nombre del cebador	Secuencia	Orientación
30	vp39-ko-F	<u>5'-cttctatcggtgtgacaac-3'</u>	Directo
31	vp39-ko-R	<u>5'-gcgtatcatgacgatggatg-3'</u>	Inverso
32	vp39-SacI-F	<u>5'-aaggttctctagattagacggctattcctccac-3'</u>	Directo
33	vp39-XbaI-R	<u>5'-ttatcttgagctcaatatggcgctagtgcccg-3'</u>	Inverso
34	vp39-StuI-F	<u>5'-ggaacaaaggcctgagctcttagacggctattcctccac-3'</u>	Directo
35	lef-4-XbaI-R	<u>5'-ccttctatctagattaattggcagcattcggtc-3'</u>	Inverso
36	cg-30-XbaI-F	<u>5'-aaggttctctagattaatctacattattgtaacattg-3'</u>	Directo
37	vp39-FLAG-SacI-R	<u>5'-ttatcttgagctcaatatggattacaaggatgacgacgataaggc-gctagtgcccggtgggt-3'</u>	Inverso
38	vp1054-ko-F	<u>5'-gtactgaaagataattattttgatagataataattacattattttaa-acgtgttcgaccaagaaccgat-3'</u>	Directo
39	vp1054-ko-R1	<u>5'-aggcggaattccagcacactttattacgtggacgcgttactttgc-3'</u>	Inverso
40	vp1054-ko-R2	<u>5'-gataagaatgcttggttaacaaataggtcagctgttaatact-ggcgatgtaccgttcgtatagcatacat-3'</u>	Inverso
41	vp1054-Rep-F	<u>5'-gggtgtttaggcctgagctccttggtacgtgttagagtgt-3'</u>	Directo
42	vp1054-Rep-R	<u>5'-tccttctctagattacacgtgtgtgcgtgcaga-3'</u>	Inverso
43	p6.9-ko-F	<u>5'-gcttcgttcattcgctactgtcggtgtgtggaatgtctggtgtt-aagtgtgctggaattcgccct-3'</u>	Directo
44	p6.9-ko-R	<u>5'-aatattaataaggtaaaaattacagctacataaattacacaattta-aactaccgttcgtatagcatacat-3'</u>	Inverso
45	Ac-p6.9-F	<u>5'-tttgaattcatggttgccgaagctccaagac-3'</u>	Directo
46	Ac-p6.9-R	<u>5'-tttcggtccgcttaatatgtagcgtgttctgtaac-3'</u>	Inverso
47	Se-p6.9-F	<u>5'-tttgaattcatgtatcgtcgttcgtcatc-3'</u>	Directo
48	Se-p6.9-R	<u>5'-tttcggtccgcttaatatgtagcgtcgtctgtatc-3'</u>	Inverso
49	86596	<u>5'-gggcttagtttaaatcttgca-3'</u>	Directo
50	86995	<u>5'-aattcaaacgaccaagacgag-3'</u>	Inverso
51	45122	<u>5'-gcaatcatgacgaacgtatgg-3'</u>	Directo
52	46441	<u>5'-cgataattttccaagcgctac-3'</u>	Inverso
53	pp6.9-F	<u>5'-ggtcgacgtaccaaattcgttttgcgacg-3'</u>	Directo
54	pp6.9-R	<u>5'-ggtcgacggtacgttttaaatgtgtaattatg-3'</u>	Inverso
55	75834	<u>5'-cttctatcggtgtgacaac-3'</u>	Directo
56	76420	<u>5'-gcgtatcatgacgatggatg-3'</u>	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., Rehmann, 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.
- Lebacqz-Verheyden AM, Kasprzyk PG, Raum MG, Van Wyke Coelingh K, Lebacqz 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., Airene, 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. & Olins, 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* **71**, 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, XhoI, 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

<110> GENETHON

<120> Producción de productos biofarmacéuticos a base de baculovirus sin viriones baculovíricos contaminantes

<130> B943PC00

<160> 56

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 133894

<212> ADN

<213> Autographa californica nucleopolyhedrovirus

<400> 1

```

gaattctacc cgtaaagcga gtttagtttt gaaaaacaaa tgacatcatt tgtataatga      60
catcatcccc tgattgtggt ttacaagtag aattctatcc gtaaagcgag ttcagttttg      120
aaaacaaatg agtcatacct aaacacgtta ataactctct gatatcagct tatgactcaa      180
gttatgagcc gtgtgcaaaa catgagataa gtttatgaca tcatccactg atcgtgcggt      240
acaagtagaa ttctactcgt aaagccagtt cggttatgag ccgtgtgcaa aacatgacat      300
cagcttatga etcatacttg attgtgtttt acgcgtagaa ttctactcgt aaagcgagtt      360
cggttatgag ccgtgtgcaa aacatgacat cagcttatga gtcataatta atcgtgcggt      420
acaagtagaa ttctactcgt aaagcgagtt gaaggatcat atttagttgc gtttatgaga      480
taagattgaa agcacgtgta aaatgtttcc cgcgcgttgg cacaactatt tacaatgcgg      540
ccaagttata aaagattcta atctgatatg ttttaaaaca cctttgcggc ccgagttggt      600
tgcgtacgtg actagcgaag aagatgtgtg gaccgcagaa cagatagtaa aacaaaaccc      660
tagtattgga gcaataatcg atttaaccaa cacgtctaaa tattatgatg gtgtgcattt      720
tttgcggggc ggcctgttat acaaaaaaat tcaagtacct ggccagactt tgccgcctga      780
aagcatagtt caagaattta ttgacacggt aaaagaattt acagaaaagt gtcccggcat      840
gttggtgggc gtgcactgca cacacggtat taatcgacc gggtacatgg tgtgcagata      900
tttaatgcac accctgggta ttgcgcgcga ggaagccata gatagattcg aaaaagccag      960
aggtcacaaa attgaaagac aaaattacgt tcaagattta ttaatttaat taatattatt     1020
tgcattcttt aacaaatact ttatcctatt ttcaaattgt tgcgcttctt ccagcgaacc     1080
aaaactatgc ttgcgttgct ccgttttagct tgtagccgat cagtggcggt gttccaatcg     1140
acggtaggat taggccggat attctccacc acaatgttgg caacgttgat gttacgttta     1200
tgcttttggt ttccacgta cgtcttttggt ccggtaatag ccgtaaacgt agtgccgtcg     1260
cgcgtcacgc acaacaccgg atgtttgcgc ttgtccgcgg ggtattgaac cgcgcgatcc     1320
gacaaatcca ccactttggc aactaaatcg gtgacctgcg cgtctttttt ctgcattatt     1380

```

# ES 2 542 740 T3

tcgctctttct tttgcatggt ttctctggaag ccggtgtaca tggggttttag atcagtcacg	1440
acgcgcgtga cctgcaaatc tttggcctcg atctgcttgt ccttgatggc aacgatgcgt	1500
tcaataaaact cttgtttttt aacaagttcc tcggtttttt gcgccaccac cgcttgcagc	1560
gcgtttgtgt gctcggtgaa tgcgcgaatc agcttagtca ccaactgttt gctctcctcc	1620
tcccgttgtt tgatcgcggt atcgtaactg ccggtgcaga gcacttgagg aattacttct	1680
tctaaaagcc attcttgtaa ttctatggcg taaggcaatt tggacttcat aatcagctga	1740
atcacgcggg atttagtaat gagcactgta tgcggctgca aatacagcgg tcgccccctt	1800
ttcacgcagc tgttagaggt agggccccc ttttggtggg tctgctcaaa taacgatttg	1860
tatttattgt ctacatgaac acgtatagct ttatcacaaa ctgtatattt taaactgtta	1920
gcgacgtcct tggccacgaa ccggacctgt tggtcgcgct ctacgacgta ccgcaggttg	1980
aacgtatctt ctccaaattt aaattctcca attttaacgc gagccatttt gatacacgtg	2040
tgtcgatttt gcaacaacta ttgtttttta acgcaaaact aacttattgt ggtaagcaat	2100
aattaaatat gggggaacat gcgcgcgtac aacactcgtc gttatgaacg cagacggcgc	2160
cggctctcgc gcaagcggct aaaacgtgtt gcgcgttcaa cgcggcaaac atcgcaaaag	2220
ccaatagtag agttttgatt tgcataataa cggcgatttt ttaaattatc ttatttaata	2280
aatagttatg acgcctacaa ctccccgcc gcgttgactc gctgcacctc gagcagttcg	2340
ttgacgcctt cctccgtgtg gccgaacacg tcgagcgggt ggtcgatgac cagcggcgtg	2400
ccgcacgcga cgcacaagta tctgtacacc gaatgatcgt cgggcgaagg cacgtcggcc	2460
tccaagtggc aatattggca aattcgaaaa tatatacagt tgggttggtt gcgcatatct	2520
atcgtggcgt tgggcatgta cgtccgaacg ttgatttgca tgcaagccga aattaaatca	2580
ttgcgattag tgcgattaaa acgttgtaaa tcctcgcttt taatcatgcc gtcgattaaa	2640
tcgcgcgaatc gagtcaagtg atcaaagtgt ggaataatgt tttctttgta ttcccagtc	2700
aagcgcagcg cgtattttta caaactagcc atcttgtaag ttagtttcat ttaatgcaac	2760
tttatccaat aatatattat gtatcgcacg tcaagaatta acaatgcgcc cgttgtcgca	2820
tctcaacacg actatgatag agatcaaata aagcgcgaat taaatagctt gcgacgcaac	2880
gtgcacgacg tgtgcacgcg ttccggcacg agctttgatt gtaataagtt tttacgaagc	2940
gatgacatga ccccgtagt gacaacgac acgccccaaa gaactgccga ctacaaaatt	3000
accgagtatg tcggtgacgt taaaactatt aagccatcca atcgaccgtt agtcgaatca	3060
ggaccgctgg tcgcgagaagc cgcgaagtat ggcgaaatgca tcgtataacg tgtggagtcc	3120
gctcattaga gcgtcatgtt tagacaagaa agctacatat ttaattgac ccgatgattt	3180
tattgataaa ttgaccctaa ctccatacac ggtattctac aatggcgggg ttttgggtcaa	3240
aatttccgga ctgcgattgt acatgctgtt aacggctccg cccactatta atgaaattaa	3300
aaattccaat tttaaaaaac gcagcaagag aaacatttgt atgaaagaat gcgtagaagg	3360

# ES 2 542 740 T3

aaagaaaaat gtcgtcgaca tgctgaacaa caagattaat atgcctccgt gtataaaaaa	3420
aataattgaac gatttgaaag aaaacaatgt accgcgcggc ggatatgtaca ggaagagggt	3480
tataactaaac tgttacattg caaacgtggt ttcggtgtgcc aagtgtgaaa accgatgttt	3540
aatcaaggct ctgacgcatt tctacaacca cgactccaag tgtgtgggtg aagtcattgca	3600
tctttttaatc aaatcccaag atgtgtataa accaccaaac tgccaaaaaa tgaaaactgt	3660
cgacaagctc tgtccgtttg ctggcaactg caaggggtctc aatcctatct gtaattattg	3720
aataataaaa caattataaa tgctaaattt gttttttatt aacgatacaa accaaacgca	3780
acaagaacat ttgtagtatt atctataatt gaaaacgcgt agttataatc gctgaggtaa	3840
tattttaaaat cattttcaaa tgattcacag ttaatttgcg acaatataat tttattttca	3900
cataaactag acgccttgtc gtcttcttct tcgtattcct tctctttttc atttttctcc	3960
tcataaaaaat taacatagtt attatcgtat ccatatatgt atctatcgta tagagtaaat	4020
tttttgttgt cataaatata tatgtctttt ttaatggggt gtatagtacc gctgcgcata	4080
gtttttctgt aatttacaac agtgctatct tctggtagtt ctccggagtg tgttgcttta	4140
attattaaat ttatataatc aatgaatttg ggatcgtcgg ttttgtacaa tatgttgccg	4200
gcatagtacg cagcttcttc tagttcaatt acaccatttt ttagcagcac cggattaaca	4260
taactttcca aaatgttgta cgaaccgtta aacaaaaaca gttcacctcc cttttctata	4320
ctattgtctg cgagcagttg tttgttgta aaaataacag ccattgtaat gagacgcaca	4380
aactaatatc acaaactgga aatgtctatc aatatatagt tgctgatatc atggagataa	4440
ttaaaatgat aaccatctcg caaataaata agtatctttac tgttttcgta acagttttgt	4500
aataaaaaaa cctataaata tgccggatta ttcataccgt cccaccatcg ggcgtaccta	4560
cgtgtacgac aacaagtact acaaaaattt aggtgccgtt atcaagaacg ctaagcgcaa	4620
gaagcacttc gccgaacatg agatcgaaga ggctaccctc gacccctag acaactacct	4680
agtggctgag gatcctttcc tgggacccgg caagaaccaa aaactcactc tcttcaagga	4740
aatccgtaat gttaaaccgg acacgatgaa gcttgctcgt ggatggaaag gaaaagagtt	4800
ctacagggaa acttggaacc gttcatgga agacagcttc cccattgtta acgaccaaga	4860
agtgatggat gttttccttg ttgtcaacat gcgtccact agaccaacc gttgttacia	4920
attcctggcc caacacgctc tgcgttgca ccccgactat gtacctcatg acgtgattag	4980
gatcgtcgag ccttcatggg tgggcagcaa caacgagtac cgcacagcc tggctaagaa	5040
gggcggcgcc tgccaataa tgaaccttca ctctgagtac accaactcgt tcgaacagtt	5100
catcgatcgt gtcactcggg agaacttcta caagccctc gtttacatcg gtaccgactc	5160
tgctgaagag gaggaattc tccttgaagt ttccctggtg ttcaaagtaa aggagtttgc	5220
accagacgca cctctgttca ctggtcgggc gtattaaaac acgatacatt gttattagta	5280



# ES 2 542 740 T3

catttattaa gcgctagatt ctgtgcgttg ttgatttaca gacaattggt gtacgtattt 5340  
 taataattca ttaaatttat aatcttttagg gtggtagtgt agagcgaaaa tcaaatgatt 5400  
 ttcagcgtct ttatatctga atttaaatat taaatcctca atagatttgt aaaatagggt 5460  
 tcgattagtt tcaaacaagg gttgtttttc cgaaccgatg gctggactat ctaatggatt 5520  
 ttcgctcaac gccacaaaac ttgccaaatc ttgtagcagc aatctagctt tgtcgatatt 5580  
 cgtttggtgt ttgttttgta ataaagggtc gacgtcgttc aaaatattat gcgcttttgt 5640  
 atttctttca tcaactgtcg tagtgtacaa ttgactcgac gtaaacacgt taaataaagc 5700  
 ttggacatat ttaacatcgg gcgtgttagc tttattaggc cgattatcgt cgtcgtccca 5760  
 accctcgtcg ttagaagttg ctccgaaga cgattttgcc atagccacac gacgcctatt 5820  
 aattgtgtcg gctaacacgt ccgcgatcaa attttagtgt gagctttttg gaattatttc 5880  
 tgattgcggg cgtttttggg cgggtttcaa tetaactgtg cccgatttta attcagacaa 5940  
 cacgttagaa agcgatggtg caggcgggtg taacatttca gacggcaa atactaatgg 6000  
 cggcgggtgt ggagctgatg ataaatctac catcgggtga ggccgaggcg gggctggcgg 6060  
 cggaggcgga ggccggaggtg gtggcgggtg tgcagacggc ggtttaggct caaatgtctc 6120  
 tttaggcaac acagtcggca cctcaactat tgtactggtt tcgggcgcgcg tttttggttt 6180  
 gaccggtctg agacgagtgc gatttttttc gtttctaata gcttccaaca attgttgtct 6240  
 gtcgtctaaa ggtgcagcgg gttgaggttc cgtcggcatt ggtggagcgg gcggcaattc 6300  
 agacatcgat ggtggtggtg gtggtggagg cgctggaatg ttaggcacgg gagaagggtg 6360  
 tggcggcggt gccgcggta taattgttc tggtttagtt tgttcgcgca cgattgtggg 6420  
 caccggcgca gccgcgctg gctgcacaac ggaaggctgt ctgcttcgag gcagcgcttg 6480  
 ggggtggtgc aattcaatat tataattgga atacaaatcg taaaaatctg ctataagcat 6540  
 tgtaatttcg ctatcgttta ccgtgccgat atttaacaac cgctcaatgt aagcaattgt 6600  
 attgtaaaga gattgtctca agctcggatc ccgcacgcgcg ataacaagcc ttttcatttt 6660  
 tactacagca ttgtagtggc gagacacttc gctgtcgtcg acgtacatgt atgctttggt 6720  
 gtcaaaaacg tcgttggtca gctttaaaat atttaaaaga acatctctgt tcagcaccac 6780  
 tgtgttgtcg taaatgttgt ttttgataat ttgcgcttcc gcagtatcga cacgttcaaa 6840  
 aaattgatgc gcatcaattt tgttgttcct attattgaat aaataagatt gtacagattc 6900  
 atatctacga ttcgtcatgg ccaccacaaa tgctacgctg caaacgctgg tacaatttta 6960  
 cgaaaactgc aaaaacgtca aaactcggta taaaataatc aacgggcgct ttggcaaaat 7020  
 atctatttta tcgcacaagc ccactagcaa attgtatttg cagaaaacaa tttcggcgca 7080  
 caattttaac gctgacgaaa taaaagtcca ccagttaatg agcgaccacc caaattttat 7140  
 aaaaatctat ttaaatcagc gttccatcaa caaccaagtg atcgtgatgg actacattga 7200  
 ctgtcccgat ttatttgaaa cactacaaat taaaggcgag ctttcgtacc aacttgtag 7260

caatattatt agacagctgt gtgaagcgct caacgatttg cacaagcaca atttcataca	7320
caacgacata aaactcgaaa atgtcttata tttcgaagca cttgatcgcg tgtatgtttg	7380
cgattacgga ttgtgcaaac acgaaaactc acttagcggtg cagcagcgca cgttgagta	7440
ttttagtccg gaaaaaattc gacacacaac tatgcacggt tegtgttgaet ggtacgccgt	7500
cggcggtgta acatacaagt tgctaaccgg cgcccgacac ccatttgaaa aaagcgaaga	7560
cgaatgttg gacttgaata gcatgaagcg tcgtcagcaa tacaatgaca ttggcgtttt	7620
aaaacacggt cgtaacgta acgctcgtga ctttgtgtac tgccatacaa gatacaacat	7680
agattgtaga ctcacaaatt acaaacaaat tataaaacat gagtttttgt cgtaaaaatg	7740
ccacttgttt tacgagtaga attctacgtg taacacacga tctaaaagat gatgtcattt	7800
tttatcaatg actcatttgt tttaaaacag acttgtttta cgagtagaat tctacgtgta	7860
aagcatgac gtgagtggtg ttaataaaat cataaaaatt attgtaaatg tttattattt	7920
aaaaacgatt caaatatata ataaaaacaa tctacatcta tttcttcaca atccataaca	7980
cacaacaggt ccatcaatga gtttttgtct ttatccgaca tactatgtgc atgtaacaaa	8040
tcaaatacat cttttaaatt tttatacaca tctttacatt gtctaccaa atctttaata	8100
acctataac aaggaaaaga cttttcttct tgogtggttt tgccgcgcag atattgaaat	8160
aaaatgtgca tgcacgacaa cttgtgttta ctaaaatgct ccttgccat accgcaaac	8220
cggccataca tttcggcgat tacacgcgga caattgtacg attcgtctac gtgtaaacga	8280
tcatcataat cactcttgcg caaacgaata aattttttca ccgcttccga caaacgaggc	8340
accaattcgg cgggcacgct tcgatacatt attctgtgca cataagttac cacacaaaat	8400
ttattgtacc accatccgac aacgtcgta ttaggggtga acacgttggc gatgcgcagc	8460
agtttccgt ttctcatgaa atattcaaag cggcccaaaa taatttgcaa gcaatccaac	8520
atgtcttgag aaatttctcg ttcaaaattg ttcaaagaga atatctgcc tccgttttga	8580
acgcgcacgc tgacgggaac caccgcatcg atttgcctca acacttcaog gacgttatcg	8640
tcgatgccca tcgtttcgct ggtgctgaac caatgggaaa ggcctctgat ggaatcgccc	8700
gcgtctatca tcttgaccgc ttcgtcaaag gtgcaactgc cgtcttcaa acgcgcgata	8760
gcggtcacgt cccgctctat gcacgacata ccgtttacgt acgattctga taggtattcc	8820
tgaactatac ggtaaatggtg atacgactcg ccatacacgt cgtgcacctc attgtattta	8880
gcataataat tgtaaaattat taactttgca gcgagagaca tgttgtcagt aaagcgggtgc	8940
taggtcaat aatactgatg tacaggcacg cgtgctatit atatataatt tcgcaaggag	9000
gggagctggt atcggttgct attattaaag aatggccgctc tgtttttatc acaagcttgg	9060
cagcctcaac catgaagcgt cgtcattgta aattaaattc tctgcctcaa gaattatttg	9120
acaagattgt cgagtattta tctttatctg attactgcaa tttgggtgctt gtctgtaaaa	9180

# ES 2 542 740 T3

gacotttctag taaatataac gtgatatttg atagtactaa tcaccaacat ttgaaaggcg 9240  
tgtacaaaaa gacagacgtg caaataacaa gctacaacga atacatcaac tgtatttgca 9300  
acgaactgag acaagacgaa ttctatgcc aatcatcatg gattgcgagt atttgcggtc 9360  
accagagagc gacaattttt agtgaacaa ataaacaagt agaaatgaaa tatcatttgt 9420  
ataatatagc aattgtggaa agtgaagatt gcaacggatt ttaccattt gagccaacgc 9480  
gcgattgttt aatatgcaaa caaaaaaacc aatgtcctcg taattcattt attgtttcgt 9540  
tgtgtaaata tttagaaaaa caaaatgtac aatcaaactt tatatattat ttatacgaaa 9600  
taaatacata ataataacta ttatacatgt ttttatttta caatacttcc tgtataacct 9660  
ctctaactac attaggagta caatccacgt caattacacg tttagctatt tttctaattt 9720  
tgtaatgttt atcgtagagt ttttcgttaa tacattgaat agccaacaag ggatttgggt 9780  
gcacacgcgc atagagtaact tccatgtcgt cttcaaagcg catttttcgc ttgcgaaaat 9840  
gccgctcttg gcccaaaaaca aaagcgagtt tgatgcggtc gtcgatgcgt tccgaaaata 9900  
cggccaaatg ctggtgtttg gtgatgtcgc gcggaaacgt caccgtgcc a tttttgcttt 9960  
ccgccacgac ggcggttttc aatttttcgg ccgactgcag catgttaagt ttggcgctga 10020  
gttcgtgcaa acgcaattca aactgctcaa acctgttgc cacctcgttc ttgaacgtct 10080  
cgtgggtgac cataaatttt tcgctgtttg cattcagttt ctttacatgt tttaaaacag 10140  
attcaatctt gtcgcgcaaa tcatcacgct cgccttcagt ttgaatgtgc agcaacgcgt 10200  
tgcttttggt ggcaaaattt aaccgcatca aaatttccaa caaccgcgtc ttggtcgoga 10260  
acaatgcgcc caacgagttg agatcgctt tggtatctctg tttgtgaaaa acaatttcgt 10320  
ttaaatggta aacttgatcg ccgtcccaat tgcaatcaag tatgtcgtcg tgcgcaattt 10380  
caagaccttt gcaaaaatct atcacattgt agcattttgc gttcgtgtcg ctgtgcacgt 10440  
atctgtactt gaaactgtgc gtgttgcat tgaatgagtc ccatttaacg atgtgcgacc 10500  
attgttgggc gtttatgttg taacttttgt agtcgtctgc attgaaccga tcttcggcgg 10560  
cgatggcgtc gttgtcgttg tcaccggacc acatccacca gttccataac caggatagca 10620  
ttgcttttagc ttgtctagca attcctttgt tatacaacga gaaaatttcg ttcccttata 10680  
attatagctg tacgggtgcgc gtattttgtt gttaacgtta caaaaaatat ccctgtccac 10740  
gtccggccaa tactgcaacg tgagcgcgtc caagtttgaa tcttgcatat gcggaacgta 10800  
caaacgtacg gcctctctca cacaatgcgc aaaactgccc ggctgaatgt aatcactgtc 10860  
caactttgca ggtttctcga aagccttgta ccgatgcacg cgaacatttt gagcggacgt 10920  
gatttttaaac ttgtcgggtga attttaacca caaatgaaat ccacggttgc cggatatacat 10980  
gactcttgac acgttctctt ccgtgtaaaa caacagaaac gccgtggcgc caatgtaaat 11040  
tttcagcatt aaatcgtgtt cgtcaacata atttttgtaa tcggcgtcta cgacccattc 11100  
cctgcgcgcg ccgtcgtcca acggtttgac gtgcacgtcg gacactttgt tttgcacaat 11160

# ES 2 542 740 T3

ataatatatac aattgtgogg aggtatcaaa atatctgtcg gogtgaatcc agcggcgggtt 11220  
 gaccgtcatg aacgggtact tgcggctgtc gttgtacgca atggcgtooc acatcatgtc 11280  
 gacggcgttc tgcgtataat tgcacactaa catgttgccc ttggaacttg acctcgattg 11340  
 tgtaattttt tggctataaa aaggtcaccc tttaaaattt gttacataat caaattacca 11400  
 gtacagttat tgggtttgaa gcaaaatgac tattctctgc tggcttgac tgetgtctac 11460  
 gcttactgct gtaaatgogg ccaatatatt ggccgtgttt cctacgccag cttacagcca 11520  
 ccatatagtg taaaaagtgt atattgaagc ccttgccgaa aaatgtcaca acgttacggg 11580  
 cgtcaagccc aaactgtttg cgtattcaac taaaacttat tgcggtaata tcacggaaat 11640  
 taatgccgac atgtctgttg agcaatacaa aaaactagtg gcgaattcgg caatgtttag 11700  
 aaagcggga gtggtgtccg atacagacac ggtaaccgcc gctaactacc taggcttgat 11760  
 tgaagtgttc aaagaccagt ttgacaatat caacgtgcgc aatctcattg ccaacaacca 11820  
 gacgtttgat ttagtcgtcg tgggaagcgtt tgccgattat gcgttggtgt ttggtcactt 11880  
 gtacgatccg ggcgccgtaa ttcaaatcgc gcctggctac gggttgccgg aaaactttga 11940  
 cacggtcggc gccgtggcgc ggcaccccg cccatccct aacatttgcc gcagcaattt 12000  
 cgacgacacg gaggcaaacg tgatgacgga aatgcgtttg tataaagaat ttaaaatttt 12060  
 ggccaacatg tccaacgcgt tgetcaaaca acagtttgga cccaacacac cgacaattga 12120  
 aaaactacgc aacaaggtgc aattgctttt gctaaacctg catcccatat ttgacaacaa 12180  
 ccgacccgtg ccgcccagcg tgcagtatct tggcggagga atccatcttg taaagagcgc 12240  
 gccgttgacc aaattaagtc cgggtcatcaa cgcgcaaatg aacaagtcaa aaagcgggaa 12300  
 gatttacgta agttttgggt cgagcattga caccaaatcg ttgcaaacg agtttcttta 12360  
 catgttaatc aatacgttca aaacgttgga taattacacc atattatgga aaattgacga 12420  
 cgaagtagta aaaaacataa cgttgccgc caacgtaatc acgcaaaatt ggtttaatca 12480  
 acgcgccgtg ctgcgtcata aaaaaatggc ggcggtttatt acgcaaggcg gactacaatc 12540  
 gagcgacgag gccttggaag cgggataacc catggtgtgt ctgcccatga tgggcgacca 12600  
 gttttaccat ggcacaaaat tacagcaact cggcgtagcc cggcgcttg acactgttac 12660  
 cgtttccagc gatcaactac tagtggcgat aaacgacgtg ttgtttaacg cgctaccta 12720  
 caaaaaacac atggccgagt tatatgcgct catcaatcat gataaagcaa cgtttccgcc 12780  
 tctagataaa gccatcaaat tcacagaacg cgtaatcga tatagacatg acatcagtcg 12840  
 tcaattgtat tcattaaaaa caacagctgc caatgtaccg tattcaaatt actacatgta 12900  
 taaatctgtg tttctatttg taatgaatca cttaacacac ttttaattac gtcaataaat 12960  
 gttattcacc attatttacc tgggtttttt gagaggggt ttgtgcgact gcgcacttcc 13020  
 agcctttata aacgctcacc aaccaagca ggtcattatt gtgccaggac gttcaaaggc 13080

gaaacatcga aatggagtct gttcaaacgc gcttatgtgc cagtagcaat caatttgctc 13140  
 cgttcaaaaa gcgccagctt gccgtgccgg tcggttctgt gaacagtttg acacacacca 13200  
 tcacctccac caccgtcacc agcgtgattc caaaaaatta tcaagaaaaa cgtcagaaaa 13260  
 tatgccacat aatatcttcg ttgcgtaaca cgcacttgaa tttcaataag atacagtctg 13320  
 tacataaaaa gaaactgctg catttgcaaa atttgctaag aaaaaagaac gaaattattg 13380  
 ccgagttggt tagaaaactt gaaagtgcac agaagaagac aacgcacaga aatattagta 13440  
 aaccagctca ttggaaatac tttggagtag tcagatgtga caacacaatt cgcacaatta 13500  
 ttggcaacga aaagtttgta aggagacggt tggccgagct gtgcacattg tacaacgccg 13560  
 agtacgtggt ttgccaagca cgcgccgatg gagacaaaga tcgacaggca ctagcgagtc 13620  
 tgctgacggc gccgtttggt tcgcgagtca tagtttatga aaatagtcgc cggttcgagt 13680  
 ttataaatcc ggacgagatt gctagtggta aacgtttaat aattaacat ttgcaagatg 13740  
 aatctcaaag tgatattaac gcctattaat ttgaaagggt aggaagagcc caattgcgtt 13800  
 gagcgcatta ccataatgcc atgtatttta atagatactg agatctgttt aaatgtcaga 13860  
 tgccgttctc cttttgcaa attcaaagta ttgattattg tagatggctt tgatagcgct 13920  
 tatattcagg ctaccttttg tagcattagc gatagtgtaa caattgttaa caaatctaac 13980  
 gaaaagcatg taacgtttga cgggtttgta aggccggacg atgaaggtag acaatgcct 14040  
 tatgtcattg gaccattata ttctgtcgac gctgctgtcg ccgaccgtaa agtgaaggac 14100  
 gtggtggatt caattcaaaa ccaacagaca atgttaaaag tatttattaa cgaggctaatt 14160  
 gtgtataaca aatggaatat gcttaaagggt ttaatttata ataataacaa tgaatctgtt 14220  
 ttagtaaaat aatgtagtaa aatttataaa ggtagataaa aattataata ttaataaaaa 14280  
 aaataatggt actaaatggg ttccctgcgtt aaattatttt acgggtagac agctattaac 14340  
 tattttattt atttttaaat ttaaataaat gtattgttag aaaattgtgt tgttttatta 14400  
 gtataacgaa aaaatacatg acataaacgg cttccaattt tggtcacaca aactcttggt 14460  
 tggatagttt acgtaatgag ttaaataaggc gggcagttgt ccgctaaacg tgtcggtggt 14520  
 caagtagatg tgcattaatt tacgacaacc caaagcgggg ccgcttatgt caagtatttt 14580  
 tttcacaaaa ttggtaatgg ttctgttttg ttccctgtac aaacacatgt cgggtgtgac 14640  
 gttgacgcac gagttgtacg attccgccgg cagggttgga aacaagcgct tgagatgctt 14700  
 gagtctgcgt tcaattttat aatcaaaact gttagtgaaa atgtctttca gcaagcacat 14760  
 taactggtcg ttcaaaacgc gctgcaacga cgacaccaac acatgatatt cgtttccaaa 14820  
 aagcgaaaaa tttttgatgc agcgggtccgc gttgaagggt cgtttcataa tgcgcacggt 14880  
 gacaaaaaac acgttgaaag acagcggggc tgtggttatt ttaacgccgt tgtcgggtata 14940  
 ctctgcgacg ccgtctgcgc ttgttatgtc aattttagc gcaaatctaa ccaaatcaaa 15000  
 ctcatcggtg tactgtgtct ttatgcattt tatatggcgg ttaagtgcag agttgatttg 15060

gccgtttaat ctataggctc cgttttgata acatttcagc actaccaacg gatccgacat 15120  
 gtaaaacttga cgcgttagca cgtccaattc agcgtaatgt tggtcgacgc atttttgtaa 15180  
 attagtttgc aggttgcaaa acatttttgc gcaaaagccg taatagtcaa aatctatgca 15240  
 ttttaatgcg cttctgtcgt cgtcaatatg gcatgtcacg gctgcgcctc cagttaacac 15300  
 gaataaacgg ccgtttttgc aaactacggc ttcgaaacaa tctttgataa atgccaactt 15360  
 tgcttttagc acaattttat cgcgcaggcg atcttcaata tcctttgtcg taatataagg 15420  
 taggaogcca agatttagtt gattcaacaa acgttccata atgaatagcg gcgacgcaac 15480  
 acgactacac tgttcaaatt cgcacgcaaa acaaacctt gcaactttat ttgccaatcg 15540  
 taatcacagt agtttttacg agtacgccat cgcgtttgta agcacattgc tttttaaaaa 15600  
 taatttaaat ttaatgaccg cgtgcaattt gatcaactcg ttgatcaact ttgaactcaa 15660  
 catgttttgt aaaagtttat tgctaaatgg atttgttaat ttctgcattg ctaacagcga 15720  
 cgggggttac attcaacata aaatgttaac caacgtgtta agttttttgt tggaaaaata 15780  
 ttattaaaaa taaataaata aacttgttca gttctaatta ttgttttatt ttttataaaa 15840  
 taatacaatt ttattttatac attaatactt tggatattat taatacaatt atttacaata 15900  
 ctttatttac actataatac ttattttaca ttagtactaa attaatacta aattacgcta 15960  
 atactaaatt aatactttat ataataaaaa ataatacttt atataatact ttctaactcat 16020  
 cataaacggg taatagtttt ttctcttgaa atttacgctg caactcttcg ctaaaacaca 16080  
 tggggcgttg agtgggagcg ggtggagtag gagtccttac gggtttgatg ggcgacagtt 16140  
 ctctggactt gcggaacagc ttgggcgaaa acgtcggcgt gcgccgacta atgatttctt 16200  
 catcgcacga ggcgtgcac attgtgcacg cgtccggtga ggtacacaaa actttcttgg 16260  
 gcacgctgta caccggcttg ggcacgctat atgtgttgcc aaaactagaa ctggttggtg 16320  
 ttgccgaacg gagacgatgg gtgtgaagac ggcgatggct gtgaagacaa gtccgaaggc 16380  
 gcgataaaag atgaaagtgt ttctgaaacc gaagtgggtg tagaagtggg agaaggcggg 16440  
 tgcgttacgg caaccacgct gctgctattt ctgccttcgg agaccacttc cagcaatcta 16500  
 gagttactct ctggttcttc gggcgatag tcaatgtcgc aataatgttc ataagatgcc 16560  
 ttttcggctt cggcgcgcct ttctcatgat atgttggtgac gcatctcctt taactgcacg 16620  
 tacaaattcc agcattgcac agccagtatc gtaagcacgc ccattatgat tacgggataa 16680  
 ttttgattaa acacggtcgg ctggtgatcg cttacaatcg ctgggcacat gatgcatttt 16740  
 ttgtaaatgt tcacatacac acagtttttg ctcaagggtt cggatatttc gtagtcaatt 16800  
 tccagataca cgatagagtt ccagcacatt gattccaaat cgtagtgcag atataaaaca 16860  
 tctagcgccg gtagatgacc atttttgaac acgtagattt gaaacgcggc aaacagcatc 16920  
 caacacagcc cagtgatcac gtttaccata atacacgtga tagcgacgta aaagttttct 16980

# ES 2 542 740 T3

ttgcgattga aatttacatt tgtgtttgaa gagctgctgc gatttttctg ccacacgata 17040  
 atcttccata taaaataaaa catgtaaaat aatatccaca tgccgaacgc cagcattatc 17100  
 ggtatagata gattgataac cgattgcttt ctttcaattt ccagcaaaaa cgcgtatctg 17160  
 ctgtctatca ctcccattat agataacaca aacactatca gatatgctaa taataatgag 17220  
 gcattaagcc cgaattgtaa aactgcagtg attttattta acattttgaa tatttaattc 17280  
 aacaactaag taatggcaat atgtatcgag tactgatcgt gtttttctctg ttcgtgtttc 17340  
 tttatatagt gtaccagccc ttttatcagg catacttgca tatcggacat gcccaacaag 17400  
 attacaatga caggttgagc gataggatgg attacattga atccgtaatg cgtagaaggc 17460  
 actacgtgcc gattgaagcg ttgcccgcaa tcaggtttga tactaatctc ggacagttgg 17520  
 ccggtgacac gattaatgc atgtcgtgct ctttgtttgt tagtgacatt gacctgccga 17580  
 tgtttgattg tagtcagata tgcgataacc cgtctcgccg gtatttcttt gtcaacgaaa 17640  
 cggatgtgtt tgtggtcaac ggccacagac tgacggtggg cgataactgc tccactaata 17700  
 gtttgccccg caactgtaat cgcgagacga gcgtcatttt aatgagctc aatcagtgga 17760  
 cgtgcatagc cgaggaccgc cgttactatg cgggcacaga taacatgacg caactcgcag 17820  
 gcagacaaca ctttgaccgc attatgcccg gacagagtga taggaacgct ctgtttgacc 17880  
 gattactagg ccgagaggtg aacgtgacca ctaacacgtt tcgccgcagc tgggacgagt 17940  
 tgctggagga cggcactagg cggttcgaaa tgcgctgcaa cggccgagat aacaacaata 18000  
 atctcatgtt tgtaaatccg cttaatcccc tcgagtgtct cccgaacgtg tgcactaacg 18060  
 ttagcaacgt gcacaccagt gttagaccgc tatttgaaac gggagagtgt gactgcggcg 18120  
 acgaagcgtt cagcgtgtt acgcacattg tgccggggga caggacctct atgtgtgcca 18180  
 gcattataga tggcctgat aaaagtacgg catcatatag atatcgcgta gagtgcgtta 18240  
 atctgtacac ctctattcta aattattcta ataacaaatt gttatgtccc agtgacactt 18300  
 ttgatagtaa cacggacgca gcttttgctt ttgaagtgcc cggctcctac cctttatcgc 18360  
 gcaacggcat caacgagcca acttatcgct tttatcttga taccagatct cgagttaatt 18420  
 acaatgacgt cagagggcag ttatcttaat tgtgataaca caaacaataa gtcatttaaa 18480  
 tgttacgtca gtagttagta tataagccgt acatgttggc ttgcaaattc agtcaatatc 18540  
 aggtttttat catggacggt gtaaagctgc tagggacgtg cgcgctaata attttgttat 18600  
 cgacgacgag tacagttgtc gggcgtgacc gtatcacgtt tacgccgata gaagatagcg 18660  
 caggcctcat gtttgaacgc atgtacggct tgcgacatca tacagacgac agatttgtgt 18720  
 ttgtgaaaaa attcaatttt gtttcggtgc tgcaagagct caataatata aaatctaaaa 18780  
 ttgaattata tgaagcgcaa gtttcaactt gcacaaacgt cagacaaata aaacagaaca 18840  
 gatcgagtat catcaaagct cgcattgaaa atcagctgca gtttttgacg caactaaaca 18900  
 aaaatctcat cacatactct gtggaaagca gcattttaag caacgacgtg ctggacaaca 18960

tcgatctgga atatgacgac agcgggtgagt ttgacgttta cgacgaatac gaacagcctt 19020  
cgcatggag caacatgact gtatccgacg cgcaagcttt gctccgaaac ccgcccacaa 19080  
acagagtaat gtttttgac acggttacca ccagcgacgt gagcagcaaa tacgaagaat 19140  
acataaactg cattgtgagc aaccgtaccg ttgaaaacga gtgcatgttt ttagccaaca 19200  
tgatgaacgt gctcaacgac aaattggacg acgcagcagc tttggccaag atgctggagc 19260  
gaatagtaaa acaaacgcga aagaacaaac tcaacatctc caacacgggt atagacgacg 19320  
acacgctgct aacggaaatg aaaaaattaa caaaaacttt atacaaccaa aaccgcgtgt 19380  
gggtagtgga ttttaacaag gacatgaata gttatttcga tttgtcgcaa gcgtataaat 19440  
tgcatttata tgttgattta aacacggtea ttatgtttat taccatgcc a ttgttaaaat 19500  
ccaccgccgt ttcgtttaat ttgtatcgcg tcatgacggg gcctttttgc aggggcaaaa 19560  
tgtgtctgct tatcatttcg ggcaatgaat actttgggat tacagacagc aaaaactatt 19620  
atgtgcccgat atctgataac tttagacaag attgccaaga gtttacgggc tacaatgagt 19680  
ttttgtgtcc cgaaactgag ccgattgcc a ctatgaactc gaaagtgtgc gagattgaaa 19740  
tgtttatggg tcgatatagc gacgacgtgg acaacatgtg cgacattagg gtggccaatt 19800  
ataatcccaa aaaagcttac gtgaacactt taatagacta ccgaaaatgg ttgtacattt 19860  
ttccaaacac gaccgtgtcc gtccactatt attgtcacga cgcgcttgta gaagttgata 19920  
caaaagtttc gcccgcggtt ggtgttatgt tttcgactat ggcgcaaacg tgttcgatta 19980  
gaataacgta tgatgtgacc ataactgtag attcgcgatt ttatgtcagc cattcaacta 20040  
catactggcc taaaaagaaa tttaatTTTA acaactacat cgaccaaatg ttgcttgaaa 20100  
aagcgaccac cagtTTTtata ccgactgttg acaattttac ccggcccggt ttattgcaac 20160  
ttcctcataa atttcacatt aaagattaca catcgacgcc ccatcatttt ttccatcagt 20220  
ctaaaattta caccaacagc gggcgccccg acgaagactc gcaagacgac agtaatacca 20280  
ccgtggttat tatcgctatt gtcgctgcaa tgatcctatt ctgtggatta ttgttatttt 20340  
tgttttgctg tataaaaaaa cgggtgtcatc aatcaaataa cgtgggtgtg caatacaaaa 20400  
ataacaatga atttgcaca atttgcaata atttagaaga caatcgagca tacattaatt 20460  
tacctaataa atacgatagc gatgatagc caaaaccatt gtacccttta cttggcttta 20520  
atgatgattt gttaaaagat gataaacctg tggtgtaccc tatgattata gaaagaataa 20580  
aataaaacat gtataattga aataaatata ttatttaata aaatgttttt tatttatata 20640  
ctattttcta ttacatattc caatgcacac aaatgtttaa tggctatcag ttttaatttt 20700  
actaatcgt ctaaacaaaa attattcact tgetgttttt catccatttg acatatggcg 20760  
tttataaata attcgtgtg ttttatgaac gaatcgtaaa ccgctgcctg ggccttcagc 20820  
acggtcggcg cattgtattt ttgggtaaag tacgcaatat ttttagtcaa acacagagat 20880



tttaaatctt ttccatttat atccaagtcg gaacaatcgt atacaaaatc tagcttttca 20940  
 ctttcgggcg cgcccagata ctggtttacg agttcgagct gctccacttg gcctttgata 21000  
 tcggccgcta tgcacaacat tttgtcgatt gcagtttcat tgtttttaac ataataattt 21060  
 ttaacttttt tattttgcaa tttaatcaaa ctatttaaat tcgcttgacc tttcttacia 21120  
 agcgcagtta atatgcaaga ctttttgact tataataaaa aacaaaactt ttatatattc 21180  
 atttattggt caataataac aaatattcca ggcttaaaaag ctaacgaata gggcttttcg 21240  
 gtaattttct tattattcat gtcogtcato tgcactctct tgcgcactt gacgcggtca 21300  
 atggtgcccc tcatgtacat tttaatctcc tccgaaggtc cgtctatttt gtccatttcg 21360  
 aacaatctat caaaatcttc aacgctcatt ctctgcatat caagaggaac gtttctgata 21420  
 tttccggttg cgtaaatga tccgttggtg tcacggttga ttatgtaaaa ccgacgaatc 21480  
 aacatgtcgc gctcgttagt tttgttctta tccggcaaat gaatgcacac gtttggttcc 21540  
 atcttcaaag gaaaatcgtt ttgcaagtgt ttttgcaaaa tgttgccaaa tatattggtg 21600  
 tgtttgtgaa tgtctccgta ttgaatgcta aaaaactggc caaagttgct tttggcacgt 21660  
 tttatggttc caaagtcgga aaacccaaat ccgcagggtt tgcctgcac tcttggaaccg 21720  
 atggtgtacg tagtcttgcc gttggccggc tccaacacca cgatattttt atcgggctcg 21780  
 ggatacaact tgtcttccca ttcgtgcaaa ctgttcaaat tagacagtcg acaaaattcg 21840  
 tttttcaaaa atctgccttc gaaacaacta caattcagta ttgaaaagtt gcctcgtttc 21900  
 acattaatcg ccatctgctc ctgccacaac atcttcgtca actcgtgtgg ctccaattga 21960  
 atggacgacg gcgtaaaata gcacattacg ccggtttcgt cgtgtttcac gttaaaagcg 22020  
 ccgctgttgt acggcaccag ctgctgttcc tcaccacctt ccgatctttc ccgcttcggc 22080  
 tgggtgtcgt cgtcgtcga atatccatcg ccaatcttgc gtttagttgc catgctaccg 22140  
 acgtgcgctg tctgctgtgg ttcaagtcta attgaagtgt ttacagaat ataagatata 22200  
 taataaatat ggacgactct gttgccagca tgtgcgtaga caacgcgttt gcgtacacta 22260  
 ctgacgattt attgaaaaat attcctttta gtcattccaa atgcgcccct ttcaagctac 22320  
 aaaattacac cgttttgaag cggttgagca acgggtttat cgacaagtat gtggacgtgt 22380  
 gctctatcag cgagttgcaa aagtttaatt ttaagataga tcggctaacc aactacatat 22440  
 caaacatttt cgagtacgag tttgtagttt tagaacacga tttgtccaca gtgcacgtca 22500  
 ttaacgccga aacaaaaacc aaactgggcc atataaacgt gtcgctaacc caaaacgacg 22560  
 caaacgtgct ctttttgacc gtaactttaa cgagctaaaa tgaacgagga cacgcccccg 22620  
 ttttatttta tcagcgtgtg tgacaacttt cgcgacaaca ccgccgaaca cgtattcgac 22680  
 atgttaatag aaagacatag ttcgtttgaa aattatccca ttgaaaacac ggcgtttatt 22740  
 aacagcttga tcgttaacgg gtttaataac aatcaagttg acgatcacgt tgtgtgcgag 22800  
 tattgcgaag cagaaataaa aaattggtcc gaagacgagt gtattgaata tgcacacgta 22860

accttgctgc cgtattgctc gtatgctaac aagatcgccg agcgtgaatc gtttgccgac 22920  
aacattacca tcaacgctgt actagtgaac gaaggcaaac ccaagtgtgt gtacagatgc 22980  
atgtccaatt tacagtcgctg tatggatacg tttgttaact tttggcctgc cgcattgctg 23040  
gacatgatta caaacattgc ggaagcggga cttttttaca cgggtcgcgg agacgaaact 23100  
gtgtgtttct tttgcgactg ttgcgtacgt gattggcata ctaatgaaga cacctggcag 23160  
cgacacgccc ccgaaaaccc gcaatgttat tttgtattgt cggtgaaagg taaagaattt 23220  
tgtcaaaact caattactgt cactcacgtt gataaacgtg acgacgacaa tttaaacgaa 23280  
aacgccgacg acattgagga aaaatatgaa tgcaaatgtc gtctcgaaac ccaacgcgac 23340  
gccgtgctta tgccgtgctg gcatttttgc gtttgcgctc agtggtattt tggattagat 23400  
caaaagtgtc cgacgtgctg tcaggacgtc accgatttta taaaaatatt tgtggtgtaa 23460  
taaaatggtg ttcaacgtgt actacaacgg ctattatgtg gaaaaaaaa tctccaagga 23520  
gtttttaatt catattgctc ctgatttgaa aaacagcgtc gactggaacg gcagcacgctg 23580  
caaacagctg cgcgttctag acaagcgcgc ctacaggcag gtgttgcaat gcaacggcag 23640  
atactactgg ccgcatggca caaagtgtgt ctctcatccg tacaacaaat ctattcgcac 23700  
gcacagcgca acagtcaaac ggaccgacag ctgcctcgca ttaaaaagcc acgtggtcga 23760  
caaacgacgg cgcgcctctt tagattctcc tcgcttggac ggatatgttt tggcatcgtc 23820  
gcccatacca cacagcgact ggaatgaaga actaaagctg tacgcccaga gccacggcta 23880  
cgacgactac gacgacaatt tagaagatgg cgaaatcgac gaacgtgact ctttaaaaag 23940  
tttaataaat catctagacg acttgaatgt attagaaaaa caataaaaca tgtattaaaa 24000  
ataataataa taaaactata ttttgaataa tataatgtat tttatttaaa aattgtctat 24060  
tcgtagttg agaaagtgtt gtcttgactt cataactctc ttctccatat tctgcagctc 24120  
gtttacgttt tttgtgacgc ttttaatttt ctcaaatgc tggtgtcaa tagttatttt 24180  
ttgcttttgt ctattaattt cttccaattg agatttttaa tctcgctgag attgagatgc 24240  
gttgtaattc cttgagaaca tcttgagaaa acatacagat gaggtaaaac agcatctttt 24300  
atccaaatta ggagttaatt attattcatt tgtatcgcca ccatttgcct gtacacatct 24360  
tccataaaat ggttattttt attgcgataa gtgttgccat tgacattttg caaatgtcgt 24420  
aggttaaagg ggcaaatggg ctgcgtggcc gataaaagat tccagttcaa caatccctct 24480  
tcgccccctg ttaacttgaa aatggcgcta cagttttcta cgtatcgtg ttctgttgta 24540  
gtggcgacg gtgcgaccag tatcatcttg tgatatggcg ttttgacatt catgtgcaac 24600  
ggaataactt gcgggtcctc gcattcgtcg gaattaagct ttaaattggc tccgtatgct 24660  
ttccaaagtt tttcgtcgtc gaaccggggc actgcttgca agtcgacgcg gggaaacggc 24720  
gctctgtaca aaacgcctaa attcaaaaac tgattgcatt gttgcagctc tgtccaatcg 24780

acgcgatttt tgtaattttg aaacagcatc aggttgaacg ccgcgctggc ggcacgttt 24840  
 gtaatcactg tgtaattgat cagcttgtgc caatactggg cattgaaatt ttcttcaaac 24900  
 tcattttctaa actctggatg cgcaaacatg tgtctaattg agtacgcggg cggggcggtg 24960  
 aacgcagtc c atttgtcaat acacttccag tctgaatgta acgtgttcac caaacgggga 25020  
 tattcgtcaa acacgagcat gtgatccgac cacgggatgc tgtggcgcat caatttttagt 25080  
 tcttgcacgc ggcttccgct taagcaatac aaaatgagcg cgtcgtgat cttgacacag 25140  
 tcttgcattg acgggacaa attaacgttt tccatacagc tcacattgtt tattagcgcc 25200  
 gtgttcaagt gtttgtattt ggacacataa tcgtagtga tgtactgttt aatgggttct 25260  
 tgaaccatt ctttttagtag tatgtgactg gccactatgc gtttccaatt taatttgtgt 25320  
 gcgtattttt gctgcaccga caacgagagg ttattgtaatt ttttgatat ttcttccatg 25380  
 tccaacaagt ccccaaacgc gagtataaaa tcttgcgtca aaaatttttg ctcagacacc 25440  
 aacgaccaga tcaaatgtga tttaaacctg ttggcgattg ttatcgacaa cggcgaaatt 25500  
 gaaataattt tccaatccaa cttgttgcga aacacgtgaa taaaatcgac gcgtccgtaa 25560  
 cattcgcgctg atatgcgctt ccaaacgtg tcatcttgca aattaagcaa atagacacga 25620  
 ttgttgggag atttgacggc caattcaatt atttttatat attctttttg ctttaaagcg 25680  
 cgttgtagca cttgggttgg agccatgtcg actgaagctc cacgctgttt gaagcaaggt 25740  
 gaccgttttg gtcggcatgt tcaaacgtcg attacatgtt tgctttgcat caaaatggcg 25800  
 taattaatta agaacaaca tgaagccat ctgcatcatt agcggcgatg ttcattggaaa 25860  
 aatttatttt caacaagaat cagcgaatca accgcttaa attagcggct atttgttaa 25920  
 tttgcctcga gtttgcacg gctttcacgt gcacgaatat ggcgacacga gcaacgggtg 25980  
 cacgtcggcc ggtgagcact ttaatccac caatgaggac cacggcgctc ccgatgctga 26040  
 aattaggcat gttggcgact tgggaacat aaaatcggtt ggctacaatt cactgaccga 26100  
 agtaaactg atggacaacg ttatgtctct atatggcccg cataatatta tcggaagaag 26160  
 tttggtcgtg cacacggaca aagacgattt gggccttacc gatcatccgt tgagcaaaac 26220  
 aaccggcaat tctggcggcc gtttgggatg cggaataatt gccatatgta aatgatgtca 26280  
 tcgttctaac tcgctttacg agtagaattc tacgtgtaaa acataatcaa gagatgatgt 26340  
 catttgtttt tcaaaactga actcaagaaa tgatgtcatt tgtttttcaa aactgaactg 26400  
 gctttacgag tagaattcta cttgtaacgc atgatcaagg gatgatgtca tttgtttttc 26460  
 aaaaccgaac tcgctttacg agtagaattc tacttgtaaa acataatcga aagatgatgt 26520  
 catttgtttt ttaaaattga actggcttta cgagtagaat tctacttgta aaacacaatc 26580  
 gagagatgat gtcataattt gcacacggct ctaattaaac tcgctttacg agtaaaatc 26640  
 tacttgtaac gcatgatcaa gggatgatgt attggatgag tcatttgttt ttcaaaacta 26700  
 aactcgcttt acgagtagaa ttctacttgt aacgcacgcc caagggatga tgtcatttat 26760

ttgtgaaaag ctgatgtcat cttttgcaca cgattataaa cacaatcaaa taatgactca 26820  
 tttgtttttc aaaactgaac tcgcttttacg agtagaattc tacttgtaaa acacaatcaa 26880  
 gcgatgatgt cattttaaaa atgatgtcat ttgtttttca aaactaaact cgcttttacga 26940  
 gtagaattct acgtgtaaaa cacaatcaag ggatgatgtc atttactaaa ataaaaataat 27000  
 tattttaata aaaatgtttt tattgtaaaa tacacattga ttacacgtga cattttacgat 27060  
 ggcaacaat aatttcactt tttatattag gacacgacgt gtatatagga aagcttaagc 27120  
 gtttcaataa agccatggcg tacacgctaa gcttgcccag cttgcggctc tttgaaatct 27180  
 gtagttttcg gggagtaccg tcgtttcttca gtgccacata cgtcaacttg cgatcgtaca 27240  
 ctttataata cgtgtttag ttattttttt ccagaaattc cctcataaag caatccttgg 27300  
 ataaagtgtt tgatccgtac agttggccac accggtccat gcacaggta acacacgtga 27360  
 tggcggtttg aatgacgatg cgattttctgt caacggcaac gcgcttgaat atggtgtcga 27420  
 cgttgtccga ttcaatggtt ccgtaaacag ctccgtctgg atttactgcc aaaaactgcc 27480  
 ggttaataaa cagctggccg ggaatagacg tgcccgtgat gtgtgtcagc agagctgagc 27540  
 agtcagccat agaggctaga gctacaagtg ccagcaagcg atacatgatg aactttaagt 27600  
 ccccacagca aactggcgct tttatataaa aatttgggcc atttttggcg attagataat 27660  
 ttttgaagat tagataatat tgagattagt taataatttg tgtgattaga taacttttta 27720  
 gggatttgcg cattataaat caaggctcag ttgtataaac tgctctggcg tgtaaaactg 27780  
 cagacttaag ttttttgcaa acactcggtc tgaatcgcta aaatctttct gaccggtggt 27840  
 tagattaatt cggccagccg cgtcgccac ataaaaagat tgttccttgt caatatgcgt 27900  
 aaactgtttg gccatctcgc gccacattcc cgtgtcgggc tttcgatget catccttgtt 27960  
 gggcgacaca taaaacgata tgggcacgcc agtagctttt ttaattttct ctaattttata 28020  
 taataaatcg ctcgctttga ttttgccgga acctaaatgg gcttggttcg taaaaacaac 28080  
 taaatcgtag cctaattcgt acaaacgctt tagcttgtgt gcgcacggaa ggagctgcca 28140  
 gtcgtctggg ttttttggaa atttggaaccg tgtctttgag ctaattagcg tgccgtccaa 28200  
 atcaaaagcc gcaatttttg ttcttttagc gccgtcatga accgcgtacg catacaaac 28260  
 gggctgctgt aacgtccaca tgggtgaatgc atcttactca aagtcacatc attcgtacgc 28320  
 gtttgtgtcc aggtcgggcg ttgaaaaatt gtagcttgcc attagatcgg atagcgattc 28380  
 aaattttgta agcgtttgta gcgcacgctt ggcaccttgt ttaaaattac acgacgacag 28440  
 acagtaaaaa tattcctcga taagcatgac tacaccata tcaactgtta agtgctcgac 28500  
 gtagttgttg catgttatgt cgcgtgtgcc gcgatacggc tgatttcggt gaaaatcaca 28560  
 ccacaaccag tcggcgtgcg tgtaacaaag tcgacagcga aacaatttat cgttttccaa 28620  
 aaaatttaaa tactcgacag ttttgcagct tagattccgc gtttgattca ccttaaaac 28680

# ES 2 542 740 T3

gtcgtcagcc tctataatct cgggcaacag cttgccttgt tgcccatcg tatcgatcac 28740  
ctccccaag tggcccggtg ttatattaag tcgtttaaaa tcatttattg cttcctgcac 28800  
gtcggcctgg taatTTTTga ccacgggcgt ggaaatcaat tgccgttgaa gggaaataat 28860  
tcgtggtgtg ggtatcgcc gccgttgca caattccacc agcgggtggag gcaagggcgc 28920  
attcacagca accgttgtca ttataagta atagtgtaaa aatgcaaata ttcacaaaa 28980  
cattgacggg caaaaccatt accgccgaaa cggaaccgc agagacgggt gccgatctta 29040  
agcaaaaaat tgcgataaa gaaggtgtgc ccgtagatca acaaagactt atctttgcgg 29100  
gcaaaacaact ggaagattcc aaaactatgg ccgattacaa tattcagaag gaatctaact 29160  
ttcacatggt gttacgatta cgaggagggt attaataata acaataataa aaaccattaa 29220  
atatacataa agtTTTTta ttaatctga catatttga tcttgtgtat tatcgctaac 29280  
cattaaaagt gctggagcca cagtgttgcg gcgagtcttt atagaagatc gttgtttggc 29340  
tggaactgag cttttcttt tctgtctgcc gctaatggga gtgggcacgt actctgtagt 29400  
agacggtgca acgggcaact tgagcgctac cgtcttaaat ttggccatac ttttagtgat 29460  
gaaatcgcg gttaacactt cgtcgtaaatt gttacttagc agaggcgcaa cattgtgatt 29520  
aaatgtctcg ttaacaagc tgtaaaactc cgaataaagc ttatcgcgca tttcgcgct 29580  
ctccttcaat tctgcaaat ttgcgttgg aagcaccaca gtctgtcttt tttgtctgc 29640  
tggaattgct gcgttctcgc ttgaagacga cgatgtcgat cggtcggcca tttttttgcc 29700  
cagcttttca gtgtgatcaa aaatgaacac aaaatctgcc aattcgggct tgtttttcac 29760  
caaatccac atggcgggc tactaggcca ctggggtgc ttgatcttag tgtaccaact 29820  
gttaaaaaa atgtatttat tgtgttaaat cactttcttc ttgcgtttgg acattttgcg 29880  
ttcgtcttgc atgacaggca ccacgttaag gatatagtta atgttcttcc tttccaagaa 29940  
atttacaata acggccagct ggtccatggt ggatttgttg taagagctcg attccagttt 30000  
attcaacagc ttttcatttt tgcacacggc cgcagtctcc ggagattggt gctccggcac 30060  
gtttaccatg tttgcttctt gtaaaccctt gaaacaaccc gtttgtattc ttgatgatat 30120  
atTTTTta tgccaacaa cctggcaatt cgtttgtgat gaagacacac cttacgcttc 30180  
gaacatttgt cggtgattac tgtgaaatgg cctaaattag ctcttatata ttcttttata 30240  
cgctcaaacg acacgatgtc caacatgtgc gcgcagacgt tttctgtgtt catcgtgtgc 30300  
ttgagcgtgt tgatggcttc cctgaacagc gcttgatatt cgctgcgagt caagcagtc 30360  
gaatcacacc cgcctaagt cgtgcaattt ttggggggca tcgttgtcta tctttttcag 30420  
agtggcgtag aaaaagtcct gcaattgcct attatcaaaa cgcgccttga cgctgcgcac 30480  
aaaatcaaaa aattcaatgt aattgctgta atcgtacgtg atcagttggt tgcgttcat 30540  
ataattaaag tatttgttga gcggcacgat ggccaggctg cgcgctattt cgcaattgaa 30600  
gcgtcgcggt ttaacatta tacggtagtc attgcaaac gtgccggca acaacttcac 30660

ggtgtacgtg ttgggttttg cgttcacgtt aatcaagttg cgcgcacga cgcctacgta 30720  
 tatcaaatac ttgtaggtga cgcgcgcac tttccattgt aacgtaaatg gcaacttgta 30780  
 gatgaacgcg ctgtcaaaaa accggccagt ttcttccaca aactcgcga cggtgtctc 30840  
 gtaaaactttt gcgtcgcaac aatcgcgatg acctcgtggt atggaaattt tttctaaaaa 30900  
 agtgcgttc atgtcggcgg cgggcgcgtt cgcgtccgg tacgcgcgac gggeacacag 30960  
 caggacagcc ttgtccggct cgattatcat aaacaatcct gcagcgtttc gcattttaca 31020  
 tatttgacac ttaaaaaatt gcgcacacga gcaccatcgt ttgataccta attgcaacta 31080  
 tttacaattt atcagtttac gttgaacccg ttttaatttt ttagatccgt ccttgttcag 31140  
 ttgcaagttg actaaatgac aaaatttttc ggttctgcaa aaccgccctt gtctgttcca 31200  
 cccgttgat ttgaaaaaac tttttttcac gcggcgacaa ctgcttgat aatattgcc 31260  
 aatgtaaca tgcaaaattt tgttactctc gtcaaaacag cggttggcgt tccattccat 31320  
 aattttttta ttatttatca acgatggcca ttgtaaatg tcgtcattta tacgcacat 31380  
 atgatttaac aaaagctttt cgtatagcgg aacttcaatt cccttggaac atttttcaaa 31440  
 cgataattta atttgtttct cggttggcag catttcatgc ttgattaaca atcgccctgac 31500  
 ttttatagcc acgtttatgt ctttgccacg caaatgtggg ttgtcgacaa tgtaatagtg 31560  
 caaagcattt gttacggcaa atgcgtagtt tgatttgacg acgccctttt tcttgacggg 31620  
 cattggggct tttaaaatta cttgcaagca ttgtacgaat acctctttgt gtttaaaaaa 31680  
 taatatggac aaacatcggc gaaacaattt gtaataatta tgaaatccca aattgcaggt 31740  
 tttaaacttc tttgttactt gttttataat aaataaaatt tgcgtaccca tgtctgcgcc 31800  
 cacaacttta attaaccatt tgtgcgcata ttgattgtct cgttggtccc aaccggaaaa 31860  
 ttgattgatc tcgagccacc ggcattggtc gtttgatacc gtcgttaacg ccgacgctcc 31920  
 tgcctgtttg attacgggtt ctaaaagacg aaacagcagc gtaaatttgt ttttgcgtcg 31980  
 gtagtatttt ggcaggcaat aatcaaaaaa atccgtaagc aattctctgc atctattaat 32040  
 attcgttgcg tacgaatcga gtttttcaaa aattactttg tttgtatgaa aataacgttt 32100  
 gggcttctca caataataat cttcgttgta gaacagaaac ggtttgcgag aattggcacg 32160  
 tttgtccatg attggtcag tgtaacgatt gattcaaatc aaaattgaca acacgtttgc 32220  
 cgtaatgtgc accggttcgc acacgtttgc cgcgtatgta atccatgtt atttcgctgt 32280  
 cgcaattgat tacacgattg tgttggcggc cgcgttttat tgaatttagg cgacgcgtcg 32340  
 acaactccaa aggattgtaa agcgcagatt tttccagagt aaacgagttt aagtggccac 32400  
 cgttgaacca ttccagagcc acgattgtgt acagcaaaaa gaatattttt ttgtcgacgt 32460  
 tttcaaacgc aaacttggtt tttaggaat agtagtaaaa ttttaacgaa ttgtataaat 32520  
 aaaacataaa attgccattt ttaaagtaaa attctacatc cgtgacgaac aaaaggttta 32580

ctattttgtt ctccaacaag tgtgccaatt ttcttaagta caccattgaa tttttgtcgt 32640  
cgtccatctc gatcaacaac acgtacggcg ttttggaatt taaaattatt ctaaaatfff 32700  
cctgttgcaa cgattccaca gcgtccgacc aatatgacgc tgccacctct agacagatgt 32760  
atttcttgga aaacacgtgt cgtttgataa cctcgctgat ggacgtgatc gattgtaaat 32820  
acttttcaaa cgtcgcgtct tccaaccac gcaccgaaac gggcgcgtgc gtgtcgggct 32880  
gatgtttgaa atccaaacca ctctgaatta acttggttgt gattcgtatg ctcaactgtt 32940  
gacccaacgt gtagtgatct tcgtaggcgc gctcccatc cacttacac acaaatttga 33000  
cgagatcatc aacgtcttct tgttgcaaaa tcgcgcgcaa acgcgccaca tggcccttgt 33060  
accaccgatc tcggcacaca agctgtagca tttttaaatc gtgatcgtc aagctattaa 33120  
ttctggttag atttatatag tcgtcaatat cctcgggcgt ggtttgcgtc atgtctgtaa 33180  
aacgtgcaaa atcaaacatt tttatgttgt agtcgaatct aacaaatcca tcggcggttca 33240  
cttgcacttc gcgctttaca aaacgaggtg gcgtgtaatc gaaccggtt aaatagattg 33300  
cgtacaaaaa cagcaacttc tcttcagtt tgcacgcttg cggcaaaaat tgtgtggtgt 33360  
gctccaacgc ggtgacaaac atgactatgg aaaataacgc ggaattcaac agacgactag 33420  
agtacgtggg cagcatcgcc acaatgatga aacgaacatt gaacgtttta cgacagcagg 33480  
gctattgcac gcaacaggat gcggattctt tgtcgcgtgc agacgacacg gcggcctggt 33540  
tatggggccg tttgccgacc tgcaattttg tatcgttccg cgtgcacatc gaccagtttg 33600  
agcatccaaa tcgggcgttg gaatatftta aatttgaaga aagtctggcg caacgccaac 33660  
acgtggggcc gcgttacacg tacatgaatt acacgctttt taaaaacgtc gtggccctca 33720  
aattggtcgt gtacacgcgc acgctacaag ctaacatgta cggcgacggg ttgccgtatt 33780  
ttgtgcaaaa tttttcagaa acaagctaca aacatgttcg tgtgtatgtt agaaaaactg 33840  
gtgcgataca agtagcgaca ttatcagttt acgaacaaat tattgaagat acaataaatg 33900  
aactcgtcgt caatcacgtt gattagataa tgtccgtgtt aaatgtgata tcttagatta 33960  
cgagcgcgca ataaccatag tttaatcgaa gagaatagcc gtccgccaaa tggataatta 34020  
caaattgcaa ttgcaagaat tttttgacca agcgcgccgac aacgacgatc ccaactttga 34080  
acatcaaacg cccaatctat tggcgcacat gaaaaaaggc atacagtggg tgattaacag 34140  
agaaaaaac ggccggccca acggcggcgt gcttgccgac gacatgggac tcggcaaac 34200  
gctctctgtg ctaatgttaa tcgcaaaaaa caactctcta caattgaaa ctctaatagt 34260  
gtgtcctttg tctttaatca atcattgggt aaccgaaaaa aagaagcatg atttaaatft 34320  
taacatttta agtattaca aatctttgga tgccgacacg gttgagcatt accacattgt 34380  
ggtgaccacg tacgacgttt tattggcaca ttcaaattg atcaaacaaa ataaacagtc 34440  
aagtctgttt tcaaccgcgt ggcatcgagt tgttctagat gaagcgcata ttatcaaaaa 34500  
ctgcaagacg ggcgtgcaca acgcgcgtg cgttttgacc gcaacaaacc gatggtgcat 34560

taccggcaca ccgatccaca acaagcattg ggacatgtac togatgatta attttttgc 34620  
atgtcgtcct ttttaacaatc caagagtgtg gaaaatgtta aataaaaaa acgactctac 34680  
aatcgcata aaaagtatta ttaaaaaaat tgttttataa cgcgacaaat ctgaaatttc 34740  
ttctaacatt cctaaacaca cggttgagta tgtacatgtt aatttttaatg aagaagaaaa 34800  
aacgttgtac gataaattaa agtgtgaatc ggaagaggcg tatgtgaagg ctgtggcagc 34860  
gcgtgaaaac gaaaacgcac taagccgatt gcagcaaatg cagcacgtgt tatggctaata 34920  
actgaaattg aggcaaatct gctgccaccc gtattttggc atgcacggta aaaatatattt 34980  
ggaaacaaac gactgtttta aaatggatta tatgagcagc aagtgcacac gagggtctga 35040  
cttggttagac gacattttga acacaagcaa cgacaagata atatttggtt cgcaatgggt 35100  
ggaatatatta aaaatatattg aaaacttttt taaacaaaa aacattgcta cgtaaatgta 35160  
cacgggcca ttaaaagtgg aagacaggat tttggccgag acgacattca atgatgctgc 35220  
caataactcaa catcgaattt tgctgctttc cattaagtgc ggccggcgtcg ggttaaactt 35280  
aataggcgga aaccacattg taatgttgga gctcattgg aaccgcgcaa ttgaattgca 35340  
ggcgcaagac cgaatcagtc gtatgggaca aacaaaaaac acgtacgtgt acaagatgct 35400  
aaatgtggaa gacaacagca tcgaaaaata cattaacaa cgccaagaca aaaagattgc 35460  
gtttgtcaac acggtctttg aagagactct gctcaattac gaagacatta aaaaattttt 35520  
caactttag ctggttaagtc gtcattgaaca cccgatatgc tacttgctat gtttgcgacg 35580  
agttggtgta cttgtttaag aaaacgttta gtaacatgtc cccttcggcc gctgcgtttt 35640  
accaacggcg catggccatt gttaaaaacg gtatcgtgct gtgccacgt tgttcgtcgg 35700  
aactaaaaat tggcaacggc gtttcgattc caatttacc ccaccgcgt caacaacatg 35760  
cacgacggtc gcgttaagac gcaagcgctt cgagtttttg cccgctcgt acctccgctg 35820  
tacgactcga ccgtcgatcg acacggctgc aaggtgttca cggtgccggc ctacaacaga 35880  
cgcgtaatcg actttgcggg cattcgcaac aaaacgctgg aaatcattaa aacggataga 35940  
aacttgccgc tcaacacaga atgcaatgtg aaagttgtcg acagtgcacg catgcgttgc 36000  
agaaaaagtt tcgcagttta ccccgccgtt acctatctgc attgcccaga ttcgtgtctg 36060  
tgcaccgact gcgacgaaac ggtaaacgtg gacaacacgt gtcctaaatg taaaagcggc 36120  
attagatata aattaaaata caaaactttg taacatgttg ccctacgaaa tggtgattgc 36180  
cgtgttggtt tacttgctgc cggcgagat totaaattta aaccttcctt ttgcatacca 36240  
aaaaagtgtg ctgtttgcca gcaactctgc aaaagttaac gaacgcacga ggccggcagc 36300  
gcgtgacgac aacgacgacg accttatatt ttactacaaa cagttcataa agattaattt 36360  
tttaactaaa aaaataataa atgtttataa taaaactgaa aagtgtatta gagcgacgtt 36420  
tgatggtcgg tatgtggtta caccgacgt tttaatgtgc tttgtaaaca agagttatat 36480



# ES 2 542 740 T3

gaagcaattg ctgcgcgagg ttgacactcg cattacacta cagcaacttg ttaaaatgta 36540  
 tagtccagaa tttgggtttt atgtaaatac caaaattatg tttgtgttaa ctgaatcggg 36600  
 gttggcgctc atttggttaa aacactcggt cggcaaatgc gagggttggtg acaaaaatat 36660  
 aaaaactgtg tgtttacaat taagaaaaat ttgtattaat aataagcaac attcgacatg 36720  
 tctatcgtat tgattattgt catagttgta atatttttaa tatgtttttt gtacctatca 36780  
 aatagcaata ataaaaatga tgccaataaa aacaatgctt ttattgatct caatcccttg 36840  
 ccgctcaatg ctacaaccgc tactactacc actgcggttg ctaccaccac taccaacaac 36900  
 aacaacagca tagtggcctt tcggcaaaaac aacattcaag aactacaaa ctttgaacga 36960  
 tgggtcaaaa ataactcttc atattcggtt agccaaaaag ctgaaaaggt ggtaaatccc 37020  
 aatagaaatt ggaacgacaa cagggtatct gacaatttga gtccgtggac aagcggtccg 37080  
 gactttggta ccgtgtgcca cagctcataa ggggtattgcg tacgctacaa caacaccagc 37140  
 gacacgttat accagaaccc tgaattggct tacaatctca ttaacgggct gcgcacatt 37200  
 tgcagcaaac tgcccgatcc gccgcgcac caacaagcgc cctggggccc ggtcgccgat 37260  
 tgggtaccatt tcacaatcac aatgcccgag gtgtttatga acattaccat tgtgctaaac 37320  
 gaaacgcagc attacgacga agctgcgtcc ctacgcgtt actggctcgg cttgtatctg 37380  
 cccacggcgc tcaactcgat gggctggcac cggacggcag gcaactcaat gcgcattggg 37440  
 gtgccctaca cgtacagtca aatcttgccg ggatattcat tggcgcaaat taggcaagag 37500  
 cagggaatac aagaaatcct aaacacgac gcgtttccgt acgtgactca aggcaacggc 37560  
 ttgcacgtcg attogatata catgatcac attgacgtgc gcgcttacgg ctatttgata 37620  
 aattcatact ttacgtttgc ctattacag tactattttg gagacgaggt aatcaacacg 37680  
 gtgggtttga cgagagccat cgaacacgtg ggcagtcagg agggagttgt ggtgccaggc 37740  
 gtcacgtctc gaaacggcac gttgtactct aacgtgatag gcaactttat tacgtatccg 37800  
 ttggccgtcc attcggccga ttactccaaa gtgttgacca aactttcaaa aacatattac 37860  
 ggttcggttg tgggcgtaac gaataggttg gcttactacg aatccgatcc cacaacaac 37920  
 attcaagcgc ccctgtggac catggcgagg cgcatttgga atcggcgagg cagaattatc 37980  
 aactataatg ccaacacggg gtcgtttgag tcgggtatta ttttgcaaag tttgaacgga 38040  
 atcatgcgca tcccgctcggg caccacgtcc acgcagtcgt tcagaccgac cattggccaa 38100  
 acggctatag ccaaaaccga caggccgggc gccatttttg tgtacgcaa gtttgcgga 38160  
 atgaacaatt tgcaatttaa atcgtgcacg ttgttctacg atcagggcat gttccagcta 38220  
 tattacaaca ttggcggtga accaaactcg ctcaacaaca caaacgggag ggtgattgtg 38280  
 ctaagcagag acacgtcggg caacaccaac gatttgcac ttgaagcgca aagaattaac 38340  
 aacaacaact cgtcggaagg caccacgttc aacgggtgtg tctgtcatcg cggttcctatc 38400  
 acaaacatca acgtgccttc tctgaccgtt cgaagtccca attctagcgt cgaactagtc 38460

gagcagataa ttagttttca aacaatgtac acggccacgg cttcggcctg ttacaaatta 38520  
aacgtcgaag gtcattcggga ttccctgaga gcttttagag ttaattccga cgaaaacatt 38580  
tatgtaaacg tgggcaacgg cgttaaagcc ctgtttaatt atccctgggt aatggtcaaa 38640  
gaaaataaca aagtgtcttt catgtcggct aacgaagaca ctactatacc atttagcggt 38700  
ataatgaatt ccttcacctc tatcggcgaa ccagctttgc aatactctcc atcaaattgc 38760  
tttgtgtatg gaaacgggtt caaattgaac aacagcacgt ttgatttaca atttattttt 38820  
gaaattgtgt aattatattt agggagaatg tgatattcaa aagactgact gttaacacaa 38880  
aagactgata ttgttgttgt tacaaaatag ataataaac aaaaaataaa ttaaataatta 38940  
tttatttatt aaactgttta attttaatgc taacgcgtac aaatcacgt gttccgacgt 39000  
ggacatggaa ttgcgcagaa aagtcttgat agtgcgatt tcttcgcgt catccacttc 39060  
catatatttg atttcttctc cgatttgcac ttccaagttt gcgatttctt gcaaataata 39120  
atctagtcgt tgggcgcacct cgccaatttt aaataatata ttatccgaca ccaaagcca 39180  
gcgagtgact gtgcgctcca tcatcctggc actttttaat gtgaatatta aaaggttgtt 39240  
gcatatatat cgttaaacgt ttatgtttac ttccacgtta gctcgtttca ttgatgtaaa 39300  
catttagttt tataacacgc tcggtaattt tattttttaa agtaaacaga ccaaatacaa 39360  
agggtgtctc gacaggtacg attattttcc cattgacact gttttcgtgc acagatataa 39420  
ttttatcacc gtttattatt ttgccccaac acacgtactc gtttcttctc aagccaacta 39480  
tttctaaaca attcactttt ctattatcgt gtacgcaatt aaaagtaaac gaagcgctac 39540  
aattgtcgta ttctattaca attctcgggc atttataaaa ttattaatg ttgacgcaaa 39600  
ttccatgcag cgcattccatt tcgtactgca aatgcggcgc aattaaaaaa tttctcgtc 39660  
gttgtaaca atcttgggcg ctaaaaagca cgccaaacag cccacgtctt taatgcaata 39720  
ttccaatttg aacggcagtt cctcggacat gtatattgtc acggtgggcg ccaaaggagc 39780  
ggcttttagca aaatgacaca agtaatcgcc cgcaaaaagtg tgcgttacgg tttgctttgc 39840  
tttgagaacg gaaaagtttt cgttgtcgcg gctcatctgc acgtccgcgc agccaatgtc 39900  
gccatttgct ctaaaactgca gaccttctt ggaacacgac acaataatat cgtggtcgaa 39960  
ttgcgtcatg tctttgcaca cctgcgcaaa ctgcacgctc gacatgtgga cgacgcaatc 40020  
gtaatcgcta tccggaattc ccaaagtctc cacgtcgatg cacatcaact tgagcgtgta 40080  
cgtgcagatt ctattgtcgt tgttgaacac gaacgccatc acatcgccct gatcttcgcg 40140  
tttcatcagt acagagctgc gctcgtaaac gcatttgaca attttactta aactgtttat 40200  
ggacacgttg agcggcacgt tgcggtcaca tctatatattt ttgaaacct cggcgtgtag 40260  
ttgcaacgac acgagcgcga catgcgaggt gtccataaac tgcattgctta cgctcgtatt 40320  
atcacaatca aaagtagcgt gggcgagcag atccttaaaa gtttccacca gcctcttcaa 40380

aactgcgccg gttttaaatt ccgcttcgaa catTTTTtagc agtgattcta attgcagctg 40440  
ctcttttgata caactaattt tacgacgacg atgcgagctt ttattcaacc gagcgtgcat 40500  
gtttgcaatc gtgcaagcgt tatcaatttt tcattatcgt attgttgcaac atcaacaggc 40560  
tggacaccac gttgaactcg ccgcagtttt ggggcaagtt ggaccgcgcg cgcattccaat 40620  
gcaaaactttc cgacattctg ttgcctacga acgattgatt ctttgtccat tgatcgaagc 40680  
gagtgccttc gacttttttcg tgtccagtgt ggcttgTTTT aataaattct ttgaaaatat 40740  
tgtcgggtgt attattaaat agcatgtatg gtatgttgaa gatgggataa cgcttggcgt 40800  
gcggtgctgc atgatttcca ccgcgcacca catatttgcg ctcaatttta tcaaaattgg 40860  
actggcgaga caaaaacgag acgggcgaca ggcatttttg ggcgtgcgta ccatcttcgg 40920  
ccatccactc ggtcaggtct tcgctgcggt taaacacacc tttctgaccg tgaatgccac 40980  
atatttttat tccttccaaa tcgttggttg acgtgactat gactatttta agcataacgt 41040  
tgtcgcggtt aaccaccatg ctggcgctga gtttttcaat tttttgattt ttaatttgtc 41100  
taaagtaaac gtacactttg taaacgttaa aattgccgtt ggtgcacggt tcaattttgt 41160  
accgtcggcc gtctgacacc caattaatct ttgcgttgct caccaacaca ccggccatgt 41220  
acagcacaag tccgtcgtct agcgcaacgt aatttttgtc gctactattc gtaaacttta 41280  
ctaaacacga ctgcttgggg ccgaccacaa gcttgccctt caatttgctc actttgttgt 41340  
tgtataaaca aatgggcagc gcaatgtgcg gaatgtacgg atcttcggcg gtcattgagt 41400  
tattgtctcg caccaacgtc cacaatttaa acattttatt gttgagcaaa atggacttgt 41460  
ttaccgccac agagtagcca ttgggtaaac ccgatacgca attttctctt ttgtactcaa 41520  
acacgggcat ggcatctttt agattgggta gggacacaat caatttgggt acgggcgtgg 41580  
tatgaaataa atgtataaaa ttacgataat aatactgctc caacttggac atgagcgatt 41640  
tgacgtcacc gttttctacg atcgtacact gaataatggg attatagtat atagaatgtt 41700  
tatagtggta ttcgtagggt gtcaacaata cgttaatgtc ggcttcgttg ttcaccgca 41760  
actttttttt gatgcataac attccttcgt gatgattaac gtaaagtatt ctgtctgtaa 41820  
tcttcaattc gatgggcgcc atgtttcttt tcatagtgtc cagcataaac gacgtgtttg 41880  
attttaaaca ttttaaattt gtgggtctat cattaaacgc gatcagcaac gagtctctt 41940  
gaacgtcgtt gaggtcgtcc acgaacgcga ccagattgtg ttttagcaaa tattgaaatt 42000  
tttgcgcaac catctcgtag tccacgttg gcaaacatgc gttgcggcaa aggaaaaact 42060  
ttttgcccgc cacggtcatt tcgccgtgaa aaaaactgcc aataaatttc aaaaaatcct 42120  
ttttttgctt caacattttc tggcgcatgc tgtcgttggg gattcgcgcc acctcgttgc 42180  
cgacgcgata ttttaacacg ggcaacgaaa tttcaatatt gttattgctg ctgttgcct 42240  
gttgattggg aaagactttg cgttgcttgc taaaagttt cgatacgcaa tatatgagac 42300  
gcccgttgac tatacaatcg acaatctttt tcgactcttt gttgtacaag acgctttgaa 42360

ttttaacgacg ettgttccgc accgtgtacg cgtcgtcgtc ggccgtcttg tcgagaactc 42420  
 gttgatagtt ttgcaaaatt gtcgaagtta ataacagttc tatcaaatag gcgtgcttgt 42480  
 atacaatttt gttggccaaa ctgtctatag aatagtttat gtcgtgattc ataataattt 42540  
 ttatgtgttc caccgagttgt tgcttgtgaa gcgtgttgta ttcgaagaga aaatcgagcg 42600  
 gtttccattt gccgtggtg gccagatatg tttccagcac agaattttaa tcttccgtca 42660  
 ctacgtaatc gctagcgtac acgtctcgag caaacaggac gtcgtcttgt ttgtcgtaaa 42720  
 ctagtgggat tgcgcgattg atgtgcttct cttgatccac gttgccgtac aaaaacatgc 42780  
 gtttgcaatg tttggcgtat agcttgtcgt agaaattgtg caccaaaacg ttgttgttca 42840  
 tcattatggt gggaaaactc aaaaatctgc cgtccagcat aaaagttccg ttaatatgtg 42900  
 tgtttgctc gacatcgtcc gtttctctaa attgcttgtc taagcgcgtg ccgaatataa 42960  
 cgggcacaca tttatgcatt acgcaactga gctgttcatt aagagcgcaa cacaaataag 43020  
 acttgcgttc ttgaatagcg caaaaaagca tacgttcatt gctgtttgta gcgcaatcaa 43080  
 aagtatatat taatttgtat ttattttcaa ttctatcgta caactcgttg aaatcttgaa 43140  
 ccacgtccgt catcgtgaag cgattactgc gcaactaatta tgtctaaacg tgttcgtgaa 43200  
 cggtcggttg tttcggatga aacggccaaa cgcattcgac aaaacgaaca ctgtcatgcc 43260  
 aaaaatgaat cttttttggg gttttgcaac ttggaagaaa ttgattatta tcaatgttta 43320  
 aaaatgcaat acgttccgga ccaaaagttt gacaacgatt ttattttaac agtgtacaga 43380  
 atggccaacg tggtgacgaa acaagttaga ccgtataaca gtatcgacga aaagcaccat 43440  
 tacaacacgg tgcgtaacgt gttgatttta ataaaaatg cgcgtttagt gcttagtaat 43500  
 agtgtcaaaa agcaatacta tgacgatgtg ttaaaattga aaaaaatac agacttgga 43560  
 tcgtacgac cattgattac ggtcttttta caaattggcg aatctgtaa tgaagaaata 43620  
 caaaaactca gaaaagcttt ggtcaatatt ttactaata aaccgcgaca gtcggatata 43680  
 aacaacccag atgtagtttc gtatcaattt atttttggca gagtacaaa attgtataac 43740  
 agggcaatta aacaaaaaac taaaactata attgtaaaac gtcctacaac tatgaacaga 43800  
 attcaaatag attggaagac tctttccgaa gacgaacaaa aaatgactag acaagaaatt 43860  
 gccgaaaaaa ttgtaaagcc ttgttttgag caatttgga ctatattaca catatacgta 43920  
 tgtcctttaa aacacaaccg aattattgtc gagtatgcaa actcagagtc ggtacaaaa 43980  
 gccatgactg taaatgacga cactcgattt acagttacag agttttccgt ggttcagtac 44040  
 tacaacgtgg ccaaaacaga aatggtgaac cagcgaattg acataataag caaggacatt 44100  
 gaggatttaa gaaacgcttt aaaatcttac acataaatta aaatatcgaa caaaggaaaa 44160  
 aaacaattgt aacaaaaata atttacatta aaatttacia gtttttttct agtgtcgtac 44220  
 ttttttacia tgcgtctgtt gtccgtcgag cattgcaaac atattgtgga cggcgcaaaa 44280

tagcaaacaa aaggcagtc cgcgctctcc cacgctattc taaaacgatg aatccatatt 44340  
 aatttttcat tgcgcgcaaa cgtcgctccg ctgcctcctt ccaataacaa atactcagaa 44400  
 acacaaacat gtacaattgc tgcgcggcg ttaattgtcg ctgtttttcc aaatagtcta 44460  
 ttatgggaaa caaacacttg tcacaacaca aatactcgtt aattgtcaca accgacaagc 44520  
 acatttgga aaatgcgtcg caatttttgt acggacgaga ttctatgca agttcgttgt 44580  
 ccatgacgtc ttgggtccac tttttcaaca agacactttt atatttgtga tttgtacaac 44640  
 tttggtacgt gttagagtgt ttttgataag ctttgataag tttaaaactg ttggagtaag 44700  
 gccacgtcat tatgttctgc accttttgtt taaaagacag aaattactat atgttcaaac 44760  
 tatttaaaga ttattggcca acgtgcacga cagaatgccg gatatgtctt gagaaaattg 44820  
 acgataacgg gggcatagtg gcaatgcccg aactggcat gttaaacttg gaaaagatgt 44880  
 ttcacgaaca atgtattcag cgttggcgtc gcgaacatac tcgagatccc ttaatcgtg 44940  
 ttataaaata ttattttaac tttcccccac aaacactaga ggagtgcac gtgatgcttc 45000  
 gagaaactaa agggctctata ggcgatcacg aaattgatcg cgtttacaaa cgcgtttatc 45060  
 aacgcgttac acaggaagac gccctggaca ttgaactcga ttttaggcat ttttttaaaa 45120  
 tgcaatcatg acgaacgtat ggttcgcgac ggacgtcaac ctgatcaatt gtgtactgaa 45180  
 agataattta tttttgatag ataataatta cattatttta aatgtgttcg accaagaaac 45240  
 cgatcaagtt agacctctgt gcctcgggtga aattaacgcc cttcaaaccg atgcggccgc 45300  
 ccaagccgat gcaatgctgg atacatcttc gacgagcgaa ttgcaaagta acgcgtccac 45360  
 gtaacaatta ttcagatccc gataacgaaa acgacatggt gcacatgacc gtgttaaaaa 45420  
 gcgtgttttt gaacgagcac gcgaaattgt attatcggca cttgttgccg aacgatcaag 45480  
 ccgaggcgag aaaaacaatt ctcaacgccg acagcgtgta cgagtgcag ttaattagac 45540  
 caattcgtac ggaacathtt agaagcgtcg acgaggctgg cgaacacaa atgagcgttt 45600  
 taaagatcat catcgatgcg gtcacatcaagt acattggcaa actggccgac gacgagtaca 45660  
 ttttgatagc ggaccgcatg tatgtcgatt taatctattc cgaatttagg gccattatht 45720  
 tgcctcaaag cgcgtacatt atcaaaggag attacgcaga aagcgatagt gaaagcgggc 45780  
 aaagtgtcga cgtttgtaat gaactcgaat atccttggaa attaattacg gcgaacaatt 45840  
 gtattgtttc tacggacgag tcacgtcagt cgcaatacat ttatcgcaact tttcttttgt 45900  
 acaatacagt cttgaccgca attcttaaac aaaacaatcc attcgacgta attgccgaaa 45960  
 atacttctat ttcaattata gtcaggaatt tgggcagctg tccaaacaat aaagatcggg 46020  
 taaagtgtcg cgatcttaat tacggcgggc tcccgccggg acatgtcatg tgcccgccgc 46080  
 gtgagatcac caaaaaatht tttcattacg caaagtgggt tcgaaatccc aacaagtaca 46140  
 aacgatacag cgagttaac gcgcgccaat cagaaaccgg cggcgatct gcgagtttac 46200  
 gcgaaaacgt aaacaaccag ctacacgtc gagatgtgtc tcaattacat ttattggatt 46260

gggaaaaactt tatgggtgaa ttcagcagtt attttggtct gcacgcacac aacgtgtagc 46320  
 atcgccagta ttttaacagct gacctatittg ttaaacaagc attcttatct caataattgg 46380  
 tccgacgtgg tgacaattgt atccacaatc atgaaaaaag tagcgcttgg aaaaattatc 46440  
 gaaaaacacag tagaaagcaa atataaaaagc aacagtggtg cgtcgtcatt gtcaacgggc 46500  
 gccagtgcaa aattgagttt aagcgaatat taaaaaactt ttgaagcaa taaagtgggc 46560  
 cagcacacta cgtacgacgt ggtcggcaag cgagattaca cgaaatttga caaattggtg 46620  
 aaaaaatatt gacatgctgc gatcaatcat gcgacgtttc aagagtacaa acaatctcag 46680  
 caaaaaacc tccgattatt atgtagtgtt atgtccaaag tgttattttg tgacgtcggc 46740  
 cgaagtgagc gtggctgaat acatagaaat gcataaaaaat ttttaacacga aattcgccga 46800  
 tcggtgccct aacgatttta ttgtgaccaa ctctaaaagt tggaataatc atgaaaattg 46860  
 ttctgcccta ttttaccctc tgtgttaata aagtttggtg tttgtatttt gtggttttat 46920  
 ttatttacgc tagatattgg gtttaagggt cttagaaata gagttgtatt ttccctacca 46980  
 aaagggtatt gagcttcata taaatacaat attcgctcga caagcgggtt atttcaactc 47040  
 gaggtattat atcaggcagc cgaacgtgcg cgatgaaaca tcccgtttac gctagatatt 47100  
 tggagtttga tgatgtagtg ttagatttga ctagtttaat attttttagag tttgataacg 47160  
 ctcaaaatga agagtacatt atttttatga atgtaaaaa ggcgttttac aaaaactttc 47220  
 acattacttg tgatctgtcg cttgaaacgc tgaccgtgtt ggtgtacgaa aaagctcgcc 47280  
 taattgtgaa acaaattggag tttgagcagc cgccaaactt tgttaatttt atcagtttca 47340  
 acgcgaccga caacgacaac tccatgataa tagacttggtg ttccgacggc cgcataatcg 47400  
 tggccaagaa gctgacgccc gacgaaacgt atcatcagcg cgtgtccgga tttttggatt 47460  
 ttcaaaaacg taactgcata cctcgcccc caatcgagtc ggacccaaaa gtgcgagacg 47520  
 ccttggtatcg tgaactagaa ataaaactat acaagtagaa aaaaattaat ttattaatag 47580  
 ttgtaataat tatcttcgtc ctcatcttcg ctggtgtcat aatgcggtgg tgtgtttgtg 47640  
 ttttgtttta atcgtttgcg cgtcgacacc acttcgccga taggaaattt tttggatttc 47700  
 gcattaaatg cctcttagc gacgcgcgtt ttacgactac taaacatgtt gacgcgctcg 47760  
 tcgtcttcag tgtcataatc cgtgctagtg ttttcgttgt tattttctat gagacgatcg 47820  
 tttgatattg ttttcgtaga attgtccgcg ttatcgtcgc tttcgtcgat gtcgtcccta 47880  
 actatctcgt aggcgggttt gcgcggaatc caagattttg caatgtatct attttaacgt 47940  
 acttttcttc gagcggtttt ctagtcttat gcatagcaat gtcttcgtcg ccgcggttca 48000  
 ttttatgata ctttgtaaac gtctcgacga ataaactttt ggcgcgagga ggcatttttt 48060  
 cattgtataa catatcgggg atttgataga ttgtaattag aattaagcaa gttcgtcttc 48120  
 ggttgtagctg tattcggttt ctgtatctgt agtggaatcc tctgtactag tagtagtgtc 48180

# ES 2 542 740 T3

gctattgttg gcgtagggc ttggtgcca ttaccgtct atcaacatgt attttttct 48240  
aacagcacia catgctagct tggtagctat ctgtgtcgac ttatatTTTT gtaaaactacg 48300  
atcgtagaat ttttcaaata tctcttacc gttatagga aggttttgat aatatttagg 48360  
caacatatca ataaaagaca atataaaaac tttgtgttg tgttttattt atcacataaa 48420  
atggacgtct ggcaagaatc acaaccaata ttagtgTTTT ttttcttaca ttacgagatt 48480  
caacttgata ctaaaattaa ttattaatta aattaaatta aattttgaag ctttttttcg 48540  
ctatcgTTTT cagactcaaa attatcgacg ctatcgctat gaaaagcgta atatttggtg 48600  
gctttgagat attctatat ttgctcattt ttaacaataa acacgcgact cttttcgtcg 48660  
cgtctcacca taacaccgtt ttacaaaatg gaaatgtatt tgtaaaacgg caacagagcg 48720  
tcgcgagttt ttttaagtaa cagcttttgc tccgctgtgg cggccacaaa tttttttacg 48780  
ggcccgctcg aattaatgtt taaattaaaa tttttaagtc gacgctcgcg cgacttggtt 48840  
tgccattctt tagcgcgcggt cgcgtcacac agcttgcca caatgtggtt tttgtcaaac 48900  
gaagattcta tgacgtgttt aaagttagg tcgagtaaag cgcaaatctt ttttaataaa 48960  
tagtttctaa tttttttatt attcagcctg ctgtcgtgaa taccgtatat ctcaacgctg 49020  
tctgtgagat tgcgtattc tagccttttt agtttttcgc tcatcgactt gatattgtcc 49080  
gacacatttt cgtcgatttg cgttttgatc aacgacttga gcagagacac gttaatcaac 49140  
tgttcaaatt gatccatatt aactatatca acccgatgcg tatatggtgc gtaaaatata 49200  
ttttttaacc ctcttatact ttgcactctg cgtaataacg cgttcgtgta cagacgtaat 49260  
catgttttct tttttggata aaactcctac tgagtgtgac ctcatattag accctcacia 49320  
gttgcaaaaac gtggcatttt ttaccaatga agaattttaa gttattttta aaaatttcat 49380  
cacagattta aagaagaacc aaaaattaaa ttatttcaac agtttaatcg accaattaat 49440  
caacgtgtac acagacgctg cgttgaaaaa cagcgagccc gacgtgttg ctaaaattat 49500  
caaatcaact tgtgttatag tcacagattt gccgtccaac gtgtttctca aaaagttgaa 49560  
gaccaacaag tttacagaca ctattaatta tttaattttg cccacttta ttttgtggga 49620  
tcacaatttt gttatatatt taaacaaagc tttcaattct aaacatgaaa acgatctggt 49680  
tgacatttcg ggcgctctgc agaaaatcaa acttacacac ggtgtcatca aagatcagtt 49740  
gcagagcaaa aacgggtacg cgttccaata ctgtacgag acgtttctca acacggcctc 49800  
gttctacgcc aacgtgcaat gtttaaatgg tgtcaacgaa attatgccgc cgcggagcag 49860  
cgtaaagcgc tattatggac gtgatgtgga caacgtgctg gcatggacca cgcgtcatcc 49920  
caacattagc cagctgagta cgcaagtctc ggacgtccac attaacgagt catctaccga 49980  
ctggaatgta aaagtgggtc tgggaatatt tcccgcgct aacacagact gcgacggtga 50040  
caaaaaaatt attacatttt taccacaaac taattcccta atcgactcgg aatgcctttt 50100  
gtacggcgac cctcggttta atttcatttg ctttgacaaa aaccgtttgt cgtttgtgtc 50160

acaacaaatt tattatattgt acaaaaaatat tgacgcaatg gaggcgttgt tttaatctac 50220  
 accattgggt tacgcgctgt ggcaaaaaca taaacatgag cagtttgac agaggctaga 50280  
 gatgttggtt cgtgatTTTT gcttaattgc cagttcaaac gctagttatt tactttttaa 50340  
 acagcttaca cagctcatag ctaacgaaga aatgggtgtgc ggagatgaag aaatattcaa 50400  
 ttttagcggc caatttgtag acatgattaa aagcgggtgt aaaggcagtc aaaatctgat 50460  
 taaaagcacg caacaatacc gacagacttt aaatacagat attgaaactg tgtcttcacg 50520  
 agccaccacc agtttaaata gttacatata ttctcacaat aaggtaaaag tgtgtggcgc 50580  
 cgacatatata cataaacacgg ttgtgttaca gagcgtgttt attaaaaata actatgtttg 50640  
 ttacaaaaac gacgaacgta caatcatgaa tatttgcgct ttgccctctg agtttctgtt 50700  
 tccagaacat ttgctcgaca tgttcattga atgataatat aaatagagcg catttgattg 50760  
 catgcaatca gtgttttatt aatttttagag caacatgtac gataaattta tgatctatct 50820  
 tcacttgaat gggctgcacg gagaagcaaa atactacaaa tatttaaatgt ctcaaagtga 50880  
 ttttgaaaat caagtagccg atgaaatcaa gcgggtttgt gaaactcgtc tgaaaccggc 50940  
 aatcagttgc aacactttta ctgcggaaag tctcaatacg ctcgtagaca gcgtagtctg 51000  
 caaaaatgga ctgttaaata cttacgcaa agaagtacag tttgctttgc aatatctttt 51060  
 tgacgatgac gaaatatcca aacgagatca agatggcttt aaactatttt tattacataa 51120  
 ttatgacagg tgtgaaaata tggaagaata ttttttaatt aacaatttta gcatagcaga 51180  
 ctacgaattt gaagacatgt ttgaaattgt tcgtattgat tgtagagatc tgttattact 51240  
 tcttgctaaa tataatatgt aattaaaatt ttgtttgttt tattaaaatc ctggattaaa 51300  
 aatgacgaa taatttgatt tgctgcacg ccaacaagat tottcgtcat tatgatcaat 51360  
 gcgtgcatca agtttatgct ttgttaattg gcttctgacc acttttagcca tttgagcgta 51420  
 tctgcattcg tcgtctagag ttccaacac cagatcggcg caattataaa atccttcacc 51480  
 cacgggatct atgcgctgcc aacgcacata cattacaaat tgatttgacc tgtacgggat 51540  
 tactacgggt atagaataga ctagactgtt gtcacataat gaatcgcccg gatttggaat 51600  
 taaatttgaa tcgttaccac ctatgtattc taattcgttc caagttattg gattgcgacg 51660  
 atcccagttt gatttagtaa taaacacttc aaaataactg ggctcgtgta tggtgtttgg 51720  
 acaaaaatga acattcatct gataaacggg ttgatagcga tttaaatata gcgtatttgg 51780  
 cctccagttg ttaaaagggt cgtccattcc gcttttatca ccaaacacag aattgcgac 51840  
 gtttgaaccg gcaccgcaaa gtgtgtgcgg cacaaccott tgtttgatta ggtcaaaatc 51900  
 gtcataatta ggaccggcca cagccgcgta ttccatatac tgttgaaaca tgtattgcgc 51960  
 tgtggaagcg gccgccccg attctaaatc gagagctoga tatttataat agactgattt 52020  
 gtaagcattg cggcacgcgg cgtcgggaat gttatcgcca ttgtcgggcc aataaaagtt 52080



tccatcttta aaacatttat attgacgggc cgtcggcacg gacaaatagc cgtgagagcg 52140  
 cactgccggc gcgtgaatcg cagcaaacaa tgcaattaat aatgcaatca ttatgattat 52200  
 acttatagaa cactaatcgg aataataacc gctgtcgtaa tcttgggtcaa aaacgttatg 52260  
 ttgaaacata ataacacctt acagtaacat acaataaaac aacatagtat cgtatataat 52320  
 tataaacttt attttttcat ttatatacaa caaaatttat acgtattggt agcacattga 52380  
 gtgtcatttt cgctgtctga actatcacia tcatcgtcat catcatcatc attgtcatcg 52440  
 tcgtcgtcac gtttgcgttt gacactgcat tttttttggt taattttcac taacactggt 52500  
 tcttttcgat cgtacaattg attctgcatg tacttttgca tgatcgcggg aaaacacttt 52560  
 gcaattttat ccttttggtc gtgcgcaaat atttcacgca actcgttcat aaatgtgcac 52620  
 aaaatgccca tgtgttttat ccagctgatt cgcattttca ctggatcgaa caaacgcaag 52680  
 gggtagcgtt tttctgttac cttgccttcg atgtctatca aaaggtagcg gatacgatct 52740  
 ccgttgccgg gcacaaaatc cgtgcctttg ttaacaaaaa tttctctaca atgcctagcc 52800  
 accgtaatca cgcgtctttt gggtagcgga ccttcattat cgtcagttga tttgcgtttt 52860  
 ttgcccggtt tatcgttata ggtcatacta aagctgtagt cggtaacga ttttgatttg 52920  
 gcaaactcat catagtattc ataaaaacta gtctgtaaac tttgcaaaca tttgtccatg 52980  
 tccaatgac gcaatatttg ttccactgcc gtccataacg cgattctcat aaaaacgggc 53040  
 atatcctttt taactaacca acccttgtat acgattttat tctcactggt gagatagcaa 53100  
 tattttttct tttttaatag tattaanaact ttcattaaat tttcaaatgc cttttgttaa 53160  
 ccgtccgtga atgagttatt aacgcgtgtc tcaacatgtg tgcataattg ttttaatgtg 53220  
 tcggtttcgt tggatatttc gttatagtta aatgtgggca aaacaaatgt agaactctgtg 53280  
 tcgccgtaca caactttaaa agtgatgtcg cccagattga atttttctaa aatctcaggg 53340  
 tcgttgctca aacottcaat cagagaaatg gccagccgca actgattgag accaactcta 53400  
 gtgatgtagt ttgcaagcac tttgtaaaaa atgccataat aaccgtatat gctattggcg 53460  
 gtgcgcttca cggaattttg tttttgatcg tacagatcgt acaagaatgc cgattcgctt 53520  
 tgattgtcgc gattcttttt aaatttgac ctttcgctta acaattttaa tagcaattta 53580  
 acaactattg cacgcgaatt gtggttcaaa tacacgttgc cgtcttcgca taaaattaaa 53640  
 ttggacaaac aagcacaaat ggctatcatt atagtcaagt acaagaatt aaaaatcgaga 53700  
 gaaaacgcgt tcttgtaaat gcctgcacga ggttttaaca ctttgccgcc tttgtacttg 53760  
 accgtttgat tggcgggtcc caaattgatg gcatccttag gtatgttttt tagaggatatc 53820  
 aattttcttt tgagattaga aatacccgct gcggccttgt cggccttgaa ttggcccgat 53880  
 attattgaca gatcgttttt gttaaaaaaa tacgggtcag gtcctctttt gccggtgctc 53940  
 tcgttaatgc gcgtgtttgt gatggctgag taaaagcacg ccacgctaata caaatcgcaa 54000  
 atattacata tcacgtcgtc tgtacacaaa cgatgcaata tacattgcga atatacagaa 54060

# ES 2 542 740 T3

tcggccattt tcaatttgac aaacaatttt atcggcaaca tgcaatcctg cacgttgtag 54120  
 ttggcaatca cgtccagccg tcgagtgttg tacatcttga ccatttcggt ccaaggcaaa 54180  
 tcgattttgt tttcacccaa atagtaacta ctgatttgtt tcaattgaaa gttttcaact 54240  
 ttatgctgat tagaatcgct gctgaaaaat ttatacaaat caatgtgaat gtaatagtta 54300  
 aaataatacg tgtccacttt gttgccaac ttgtttataa acagctttgt cgtcggcgcc 54360  
 gcagccggca aatcgtaacg ctttaatagc attttggttt tattcaatcg tccaagtata 54420  
 tagggcagat caaatacgtc tccgttaaaa tccaaaatca catcgggatt tgtaattttt 54480  
 atcatgtcaa aaaacgctgt aatcatgtcg atttcatitt gaaacatgac cacatacgtg 54540  
 tcacgtcat aggtctctgg aatctgggtc ggcagcttgt gatacataaa acaaaatttt 54600  
 gcatactcgt cgtttttgta caccacaaat cctatagaca ttatgcaatc aaccgatgct 54660  
 ttcgacatgt tgtggcgtc cgaatgagtc tcaatgtcat agcacgaaa aacgggcatg 54720  
 atgccgctgg ttaaagtcac ttcacgacc aactcaaagt cttcattaaa atgttgcaaa 54780  
 ttaaacatgc gcgtcgtcga tccacgaca tagttatttt ggcagcgttg tgtttcttg 54840  
 aatcgcatat aggcgccttc cacaacggc gtttgcatgt gtacgcgatt aacgttgtga 54900  
 agaaacttgt ccaaacacgc cgcgttgtcc gatggcgtg ctttgtttct ttcgtattta 54960  
 atcacgttta tcttgttcaa ataatttctt tccacgccc ggcacacaaa cgtggtgtag 55020  
 ctgatgcact tgttgccgca agacggaaat atgtgcttgt cgtagcattg tttgtaagaa 55080  
 taaaaattta gttttacttt aaagtaaaac tgcagcactc gttctttgat atttgattta 55140  
 caaaatgcaa acaagcaacc ttgtttttca tcgtaatgca aacgaatgat acgaaacgta 55200  
 tcggctgaag taatattgaa ttctcctggt tttgcatatt ctgcaaagcg cgttttgagt 55260  
 tcattgtaag gatatttttt cattttttaa tatgcagcga tggcccaaat atggaggcac 55320  
 agacgtcaac acgcgcactg tacacgattt gttaaacacc ataaacacca tgagtgcctg 55380  
 aatcaaaact ctggagcggc atgagcacgc tttgcgagag attcacaaag tcgttgtaat 55440  
 tttgaaaccg tccgcgaaca cacatagctt tgaacccgac gctctgccgg cgttgattat 55500  
 gcaattttta tcggatttcg ccggccgaga tatcaacacg ttgacgcaca acatcaacta 55560  
 caagtacgat tacaattatc cgcgcgcgcc cgtgcccgcg atgcaaccac cgcaccgcc 55620  
 tcctcaacc cccgcgccac ctcaaccacc gtattacaac aattatccgt attatccgcc 55680  
 gtatccgttt tcgacaccgc cgcacaacaca gccgccagaa tcgaacgtcg cgggcgtcgg 55740  
 cggctcgcaa agtttgaatc aaatcacgtt gactaacgag gaggagtctg aactggcggc 55800  
 tttattttaa aacatgcaaa cgaacatgac ttgggaactt gttcaaaatt tcgttgaaat 55860  
 gttaatcagg atcgtacgcg tgcacgtagt aaacaacgtg accatgatta acgttatatc 55920  
 gtctataact tccgttcgaa cattaattga ttacaatttt acagaattta ttagatgcgt 55980

# ES 2 542 740 T3

ataccaaaaa acaaacatac gttttgcaat agatcagtat ctgtgcacta acatagttac 56040  
 gtttatagat ttttttacta gagtctttta tttggtgatg cgaacaaatt ttcagttcac 56100  
 cacttttgac caattgaccc aatactctaa cgaactttac acaagaattc aaacgagcat 56160  
 acttcaaagc gcggctcctc tttctcctcc gaccgtggaa acgggtcaaca gcgatatcgt 56220  
 catttcaa at ttgcaagaac aattaaaaag agaacgcgct ttgatgcaac aaatcagcga 56280  
 gcaacataga attgcaaacg aaagagtggg aactctgcaa tcgcaatacg acgagtggg 56340  
 tttaaagtat aaagagatat ttgaagacaa aagtgaattc gcacaacaaa aaagtgaaaa 56400  
 cgtgcgaaaa attaaacaat tagagagatc caacaaagaa ctcaacgaca ccgtacagaa 56460  
 attgagagat gaaaatgccc aaagattgtc tgaaatacaa ttgcaaaaag gcgatttgga 56520  
 cgaatataaa aacatgaatc gccagttgaa cgaggacatt tataaactca aaagaagaat 56580  
 agaatcgaca ttgataaaag attacgtcga aaccttgaa gataaaattg aatcgttgga 56640  
 aaagcaattg gatgataaac aaaattttaa ccgggaacta agaagcagca tttcaaaaat 56700  
 agacgaaact acacagaggt acaaacttga cgccaaagat attatggaac tcaaacagtc 56760  
 ggtatcgatt aaagatcaag aaattgccat gaaaaacgct caatatttag aattgagtgc 56820  
 tatatatcaa caaactgtaa atgaattaac tgcaactaaa aatgaattgt ctcaagtcgc 56880  
 gacaaccaat caagtttat ttgcagaaaa tgaagaatct aaagtgcctt tagaaggcac 56940  
 gttggcgctt atagatagct tttatcaaat aattatgcag attgaaaaac ctgattacgt 57000  
 gccgatttct aaaccacagc ttacagcaca agaaagtata tatcaaacgg attatatcaa 57060  
 agattgggtg caaaaattga ggtctaaact gtcaaacgcc gacgttgcca atttgcaatc 57120  
 agtttccgaa ttgagtatt taaaaagtca aataatttct attgtaccac gaaatattgt 57180  
 aaatcgaatt ttaaagaaa attataaagt aaaagtagaa aatgtcaatg cagaattact 57240  
 ggaaagtgtt gctgtcacia gtgctgtaag cgcttttagta cagcaatatg aacgatcaga 57300  
 aaagcaaaac gttaaactta gacaagaatt cgaaataaaa ttaaacgatt tacaagatt 57360  
 attggagcaa aatcagactg attttgagtc aatatcagag tttatctcac gagatccggc 57420  
 tttcaacaga aatttaa atg acgagcgatt ccaaaacttg aggcaacaat acgacgaaat 57480  
 gtctagtaaa tattcagcct tggaacgac taaaattaaa gagatggagt ctattgcaga 57540  
 tcaggctgtc aaatctgaaa tgagtaaatt aaacacacaa ctagatgaat taaactctt 57600  
 atttgtaaaa tataatcgta aagctcaaga catatttgag tggaaaacta gcatgcttaa 57660  
 aaggtacgaa acgttggtgc gaacaacagc ggccagcgtt caaccaaacg tgaatagaa 57720  
 ttacaaaaat ttatattcat tttcatcttc gtcatacttc aacagtccca acacgttcat 57780  
 gttgtgattc tcgccgttct cgacagttac gtaaatagtt actttgatta aattatcttc 57840  
 cagcagcatt gagatttgat tgaatccgc acatagcttt tgtagcgaat ccgcttcggt 57900  
 ttttttattt gtgttgacgt agaaaacaga tttgttccat ttgcccaagt cggaagaggt 57960

agaacagtca tccgaatcgg caatgttcaa ctcgctcgtt ttaaactgea caataaactt 58020  
 gttatcgccc atgtcatttt cttccaattc gctttttaac acatttacat tgtacgaagc 58080  
 aacgtgtttg ttcgatcgac taatgttgat ctttgcgttt gtgcaatttt gcaaatttga 58140  
 atatgcttcg ctttcttttag cctcgacaaa ttcgatgcgc gtagagttga ccacgttcca 58200  
 attcatgtac acgtttgatc cattaataat ttgttgacac tttatactgt aaatggtaaa 58260  
 gatttggttt tcattgtctt ttaaataatt aaacacctca ttgatgtcgt cagacccctt 58320  
 tatattgttc ttgaatagat ttattagtgt tttcgcatcg acagaacatt ccaattgaac 58380  
 cacgtcggga tcgtcgttga gatttttgta cacaacctca aaaacaactt tgtacaaaacc 58440  
 gctgttgatt ttcttgtaga taaatttgta ctttacaata atattgacgc catcttcatt 58500  
 ttcaaaatgt ttgttagtca aatagtcgct catgggggtt gcagtttcaa tttccatttc 58560  
 acattctttg tattcgttga tctgaatcat ttgactaaac tttgttttca cataatttaa 58620  
 actaatgtca tagcaacttc cttcttccat gtctttgaaa gattgcgaat cgcgtagta 58680  
 ttcttggaatt ttgttgctcg acattattcg aaaagtgtaa tgggtattcat tatcgatact 58740  
 caacgtcatt ttgctcatca atttaccact aatccttttg taattttctc taatcttctt 58800  
 ggggctactg gccatagcca tgcgttttat aagcggctca ccgctacttt ctccagacaa 58860  
 agatcttttg gtcgccatat tgctgttgtc gatatgtggg aatctatccg atggcaaata 58920  
 ctgaatggcg acgaaatcga agtgcgccga gagcacggtt cgttagcgtg gagggagtgt 58980  
 attataaacg tggccagcaa caccgcgctc gacaacacgt tcagaacaat gtttcaaaaa 59040  
 gccgattttg aaaatttcga ctacaacacg ccgatttgtt acaattttaa aacaaaaact 59100  
 ttaacaatgt acaacgagag aataagagcg gctctgaaca gaccgcgccg atttaacgat 59160  
 caaacgggtc atgttaatat tgcgtacgta tttttgttct ttatttgtat agttttgtgt 59220  
 agcgtgttgg ccgtcttttt cgacacaaac attgcgaccg acacgaagag taaaaatgtt 59280  
 gcagcaaaaa ttaaataaac tcaaagatgg tttgaacacg ttcagcagca agtcgggtggt 59340  
 ttgcgctcgc tcaaaattat ttgacaaacg cccaacgcgc agacctagat gttggcgaaa 59400  
 actatcagag atcgacaaaa agtttcacgt ttgccgacac gttgacacgt ttttgattt 59460  
 gtgcggcgga ccgggcgagt ttgccaaacta taccatgtcg ttgaaccgcg tttgcaaagc 59520  
 gtatggcgctc acgttgacaa acaactcgtt gtgcgtgtac aaaccgacag tgcgcaaacg 59580  
 caaaaatttc acaaccatta cggggcccca caagtcaggc gacgtgtttg ataaaaatgt 59640  
 tgtatttgag attagcatca agtgtggcaa ccgctgcgat ctggtgttgg cagatggctc 59700  
 ggttgacgtt aatggacgcg aaaacgaaca agaacgtctc aactttgatt tgatcatgtg 59760  
 cgagacgcag ctaattttta tttgcctgcg tcccgcgggc aattgcgttt taaaagtttt 59820  
 cgacgcgttt gaacacgaaa cgatccaaat gctaaacaag tttgttaacc atttcgaaaa 59880

atgggtttta tacaaaccgc cttcttctcg gcctgccaat tccgaacgct atttaatttg 59940  
 tttcaataaa ttagttagac cgtattgtaa caattatgtc aacgagttgg aaaaacagtt 60000  
 tgaaaaatat tatcgcatac aattaaaaaa cttaacaag tgataaact tgttgaaaat 60060  
 ataacgtgtg tataaaaaagc cagcggcttc aaatcaggca tcattcaaca tggattcgct 60120  
 agccaatttg tgcttgaaaa ccttcgctta caagtttgag ccgcctaagt ttttacgaac 60180  
 aaaatattgc gacgcatgtc gctacagatt ttaccaaaa ttttctgatg aaaaattttg 60240  
 tggacaatgc atatgcaaca tatgcaacaa tccaaaaaat atagattgtc catcatcata 60300  
 tatatcgaaa attaaaccga agaagaaaa caaagaaata tatattacca gcaacaagtt 60360  
 taataaaacg tgcaaaaacg aatgtaatca acaatcaaac cggagatggt taatttccta 60420  
 ttttacaat gaaagttgta aagagctcaa ttgttgttg ttaataaaa actgttacat 60480  
 gtgtttgtaa tataaaaaaga atttatacaa tgtaaatttg tatacgattg atggtcattg 60540  
 tccttcgttt aaagcgttt gtttttcatg tataaaaaaga atcaaaacgt gccagtttg 60600  
 caatcaacct ttattgaaaa tgtacaaaga gaagcaagaa gagcgttga agatgcagtc 60660  
 gctgtacgca acgttgccg atgtagattt aaaaatatta gacatttacg atgtcgacaa 60720  
 ttattctaga aaaatgatat tgtgtgtcga atgtcatata ttgacagct gttttgtac 60780  
 caataccatg caatgttttt gtctcgaca gggttataag tgtgaatgta tatgccgacg 60840  
 atctaatat tttaaaaata atgtattgtg tgtaaaagt aaagcggctt gttttaataa 60900  
 aatgaaaata aaacgtgttc caaaatggaa gcatagtgtg gattatactt tcaaaagtat 60960  
 atacaagta ataaatgttt aattttaagg atattgttat ggaataaact ataaatgaa 61020  
 tttgatgcaa ttaattttt tgatacttcc cacagacggt agattcagaa cgatggcaaa 61080  
 catgtcgcta gacaatgagt acaaacttga attggccaaa acggggctgt tttctcaca 61140  
 taacctgatt aaatgtatag gctgtcgac gattttggac aagattaacg ccaagcaaat 61200  
 taaacgacac acgtattcga attattgcat atcgtcaacc aacgcgttga tgttcaatga 61260  
 atcgatgaga aaaaaatcat ttacgagttt taaaagctct cggcgtcagt ttgcatcaca 61320  
 atccgtggtc gttgacatgt tggctcgtcg cggttctat tattttgga aagccggcca 61380  
 tttgcgttgt tccggatgcc atatagtttt taaatataaa agcgtagacg acgccaacg 61440  
 ccggcacaaa caaaattgca agtttctcaa cgcaatagaa gactattccg tcaatgaaca 61500  
 atttgcaaaa ctcgatgttg cggaaaaaga aatactggct gccgatttga ttcctccgcg 61560  
 gctaagcgtt aaaccttcg cgcgcgccgc cgaaccgcta actcaacagg tctccgaatg 61620  
 caaagtttgt tttgatagag aaaaatcggt gtgtttcatg ccgtgccgtc acctggctgt 61680  
 gtgcacggaa tgttcgctc ggtgcaagcg ttgttgtgtg tgcaacgcaa aaattatgca 61740  
 gcgcacgaa acattacctc agtaaacatt gcaaacgact acgacattct ttaaaaaata 61800  
 gctatatata aatattgcat tgtatgacaa aaaaattatt aacctactgc aaagtaaac 61860

ttgtaaaagg cttttcaaaa aaatttgoga gtttattttg togtgcgtc gtgtgcgcatc 61920  
 taagcgacga agacgacagc gacgggtgac gctattatca gtataataac aattgtaatt 61980  
 tcatatacat aaatattgta aaataaaaga catattattg tacataatgt tttattgtaa 62040  
 ttaaattaat acaccaattt aaacacatgt tgatgttggt gtgaataatt tttaaatttt 62100  
 tacttttttc gtcaaacact atggcgttgc tttcgattag ttttttcgtt agcatttcat 62160  
 ctaaaaaatc aaactgtttg cccggcgogt ttagggattc tatgggtgtag tcgggcgtgt 62220  
 cgctgtttag atattgggtcc acttcgcgca ttatgtccaa gacgttggtc tgcaaatgaa 62280  
 tgagctttgt caccacgtcc acggacgtgt tcatgtttct tttttgaaa ctaaattgca 62340  
 acaattgtac gtgtccacta tacaattcgg cttaatatatc tcgtcggcgc aatcgtattt 62400  
 gcaatccaat ttcgtgttca acaaattggg gatgatattc ttgaacgtgc acgttttcaa 62460  
 tttgtcctta tcggccaacg caagtttcaa ttcgctctgt aaagtttcta aaattttgtc 62520  
 tttattgttg tcaaattcgt gogtgttgcg ttccaaccac aatttgaaag gctcgtcgac 62580  
 aaaaaatgctg cgcaaacact cgtacaactg tctgcctaac gtgtacactt gctcgtattc 62640  
 tttcatgctg acctctttgc taacgtacat tactaaaaaa tctacaagta ttttcaaaca 62700  
 tttgtaatag ggcagctatt ttgatttaag ttttaaacgg tccaccgtgt attcgtccac 62760  
 gttcgcacgc accacttttc gattattatc gccgcttggt gccggcgcgt cggcctgttc 62820  
 ggttttaact atatccggtt caatatttaa agtttcaaaa gatttaatgg cattcataaa 62880  
 atcatctttt tgctttggcg tgggtcaatgg taaatctatc gaggagtgtg cgtccgtgtg 62940  
 ctcttcgggc acgtgttca gacgtaacgt aatctttttg ggatcgtctt catcgggtat 63000  
 caaatcggct ttaattttat tagaattgag caacgacatg gtggtcgctt gtaaatttaa 63060  
 taaattaatt aaagactgaa attgtatatt gcacaaattt attttcattt ttattgatct 63120  
 tactattaat acgctggcag ttggtatgct tcatccattt ttgtgactag aaaatttget 63180  
 aaaaaactga gctcgtcctg tgttaaaacg ttgtcgtcca cgaatctatg caatgtaaat 63240  
 gttacactga cattgtttta caatgcattg attaaaaaat caacctgtcg cctactgagt 63300  
 ttattagaag agtcgacgct ttctactagt ttgtagattt tgttattttc aatttcattg 63360  
 tttaaaaaca tgttaaactac tcgtttgagt ttaagcgaaa aatccttgtc cggatagact 63420  
 tgttcgcaca gccaatgct aagagtgggt ttgaccacgg acaccttggt ggtgaacgtc 63480  
 gtcgatttga ccagttcggg gaaaaagttt ttcattaaat tggacatttt aacaaacact 63540  
 tatcaatcta ttgagctggg atttttgttt agaatcgcat caagcgttg ctcgatctcc 63600  
 aatttttttc ggacgtctct agctttatga ctcggtatgt cttctacggt agactcgggtg 63660  
 ttcttactta taatggcggg gctgacgata ataaacacga gaaacaatat gagcagatac 63720  
 aaaaagatgc tgttttcctt tttgtcatac actaggetaa atatggccag tgcgcccaac 63780

aacaatatata aattcatittt tattccctta ctctattcgt tgcgatagta caacaacgat 63840  
tctcccgcagc aaccggacga attgcgatta tgctgcgcgt cgctcgtcgtc gttgttggttc 63900  
tcctcttcgc tgctcgtttc gtctaaacct atattgtatt tgttcaagta atgtttgggtg 63960  
cttgccggagg attcgtgggt cattaatttg gccacttttt gtaaaggcac gccgctattg 64020  
tataggttac tgctcaaata atgtcttata atgttgctgc gcggccgttc catctcgacg 64080  
cccgaactctt caaggagtcg cctgaaatct ttgaagggcg tcgagggtgtt tttagatatt 64140  
tgcaaaatgg tcgggtttcg tgaataaata tcgcgtgccaa attccaacgg tttcattttg 64200  
atgttggtga gtgtgttatt acgactgcgt ttctgcctta aattaatcgt gtcgctgtgc 64260  
agttttcttc ttttaattag cacgttgaga tcgtccacgc tgagttggcg cgcttcgttg 64320  
attcgcatac cgtccctaa catgatgcaa aacactatcg cgcccctaatt tagaccggcg 64380  
tcgtgaacat aatcgtgtgt gagcatttta attttatcat taataaaatt taatatggta 64440  
tctattacgt ttttaagcat taaattcttt tccttttccc tgatattttt gagctccttg 64500  
tcgcgcggca gcataaccat gcggggaatt ttgtattcgg gcaagttcat catgttggtg 64560  
taaaagttta tagtcaactg tagtgtttct ttggtgaccg agcgaagttc gagcatgcgc 64620  
ctgcacagtt cttggggatc aatgagaagt gtttggtttt ctatcgagtc aaactccttg 64680  
tccaacgagt acgacatgtc ttccaggtga acatcgtcta ccgagcagta cacaatttta 64740  
atgaatcgag acttgtaact ttttaaagtg gtgggcgcaa acggtttggg gaacatgtac 64800  
ttgctccaca gactgttgtt tttcacctcg tcgggcgtgc atcgttgccg atcggtggcc 64860  
aaatcgaaca cggactcgaa ccgggggagcg gattgaattt ttattttcca agaattaaaa 64920  
ttgttttcgt tcggaacatt aaaaccgttc attgtgggta atcaaattta ttaaaaacaa 64980  
aaggagaatc ggtgtcaata ctatccgaat attgttggtg ttctcttaatt attacgaaat 65040  
aatatattac atacagcagt aagaataaag ctataaaaagc gactacacta attaaaatta 65100  
taattcccgc cgacacgttg ctgcgtcgtg tgcatagacc caccatgtcg tttattggca 65160  
ttttgtgaac gggctcgtc aattgttgcg gttcgtggc agtatcgtcg ttgagcgcca 65220  
atttcaacgg gatgtattcc accttttcgt ggttgcccaa ccgatagtag ggcacgtcca 65280  
aattcatgtt tacaacttat ttgctaacag gaatttatgc aacaaaagtg gtttggtttt 65340  
gatgagacgc aatttgaaat acttgctgca ttacgctta agattgtatt ccatgcgggc 65400  
ggcgggtgtg tagtcgtacg cgctcgcgt gtgatacacg agccgtaaat tgggtgcgtt 65460  
gcgcaaacac ttggcgctt gtttgctcga atgctgtttt atgcgtctgt taagattgct 65520  
cgtgatgccc gtgtacaatt ttccattgtc ttgccgcaga atgtacacgc accacacctt 65580  
gttggtgtac agagtcgtcg ccatgattat gcagtgcgcc ctttcgtgtt cggccgagtg 65640  
gcgttaggcg cagccgcggc aataatcgcg ttggcgctct tgttgtaatt tatttggtga 65700  
aaaataaaac gtcttagagt ttcggttttg aacgcccaatt cggtaagct ctctggcaa 65760

gcgccttttg tcaaatgagc ggccggcgaa ttgaccggt tggcgccga cgttaagaag 65820  
gtggcggttct ggaacatgct gggctgcttg ccggctcgcg tcgccagctc ggccatgtaa 65880  
ttgaatatgt tggcagacgc agatagcggc gccaaaaacg caacgttctc ttttaaactc 65940  
atgaactcgcg ccctgttttt ttcgttcagc acgtagtggg agtaatcgcc gccgcggca 66000  
aacagatcgt caatcacggc gttgatcaga tcgttgatca tgttgatgtg cggaaagcga 66060  
cgcgaactga ctgcgctctg tatgtttggc ggcagagtgg cgtgcttgag caacagagtc 66120  
atgtaattgt tggccagctg ctgattgaaa ggtaacggaa tgggaatggt gcacgtcacc 66180  
gcttcggcca ccatgtactg gacggccaga ctgagttggt tggcgccctc ggccaaagcg 66240  
tctttgccca acatatcagc gccaccgttg taaaactttt gcgcgtacgc cggcagcgaa 66300  
tttagcacia acgatggctg aaatatattt gaatcgctcg acagggactc ggccgcgttg 66360  
ctctgtccca actctttttg caaccgaatc aggtggcgta tcattggttc ctccgattca 66420  
aaccgcttta ccacgtttac gctgattggg ttcgtgtcga tgcacatgct acgaatagtg 66480  
tttataaaaa gaatcatgag aggactaagt totgacatgt cattgcacct gtaatatcta 66540  
ataatctttt gaacaaaatc cacacatttg ttgtaccaa tagattcacc ggcgtcgagc 66600  
gtcgggttctt tgcctttgtt gtacggtgca atcgctaccg agtttgtgct gttgctgcgg 66660  
ctcgtgtaat ccattctgtt gtcgcgcgtg gcgacggctg taggcaccgt cgcggcgggc 66720  
acgtaccggg gcgcgttgta agtttgcgcg ctggtgaata tggccgttgc cggattagag 66780  
ggatacctca gcggcgagg ggtgttgtaa taaaaattgc cacgttcacg tgcatactt 66840  
tttatattga ctcttatgat tacaaaactc aatatacgga ttacttataa tatagttggt 66900  
gtgacaaaaa agcgataata aaattaacaa aattatcaac aagttaatca tggaaaattt 66960  
ttcaacgttg aataacaaca acaaaatggc gcaggtcaac agcaccgtt gaaaactgac 67020  
gcgccgacac aaaatgcttt cgcaatttct aaaagccaca ttaaacgaat tttcaccttt 67080  
gatataatca cgcagttctt ttttacaaca ttcgtcgcac aaaattaaca cttttataat 67140  
gaggccgtcg gtgtgtatcg tttgaaatgt ccgcggttga ctgcctggat gaaattcaaa 67200  
cgagtaccca gtggacacgt gtatctgtgc aaaataatgg gctaatatcg aggcgcccgt 67260  
ttttttaacc tttacttttg atattttaat aacattaatg ttgttatttg cgtaatcaga 67320  
gtttttattg tggatgatcat cgtacaaata atgaagcaac agttcactat cgtatttaat 67380  
cttgtttagc gttgtcaagt ttttgtttct taggcgttgg agcgtctccg tcgtcgatat 67440  
tttcttcgaa atcgagtcca acaacgtcgg cgtttccttc ttgctcatcg atagcggcgg 67500  
cggagggcgc ctctccgtcg tcgtcattcg cggtttctac agtgcgtttg ggcgacgacg 67560  
tgtgtacagc agcgtccgtc ttactattat cggaccgcca aatttttgtt tgaataaaca 67620  
tttggccctt gttcaacttt atttcggcgc agttaaacat tattgcatta agatcatatt 67680



cgccggttttg caccaaattg cacaaaacac catagttgcc gcacgacact gtagaatagg 67740  
 cgtttttgta caacaatctg agttgcggcg agctagccac cttgataata tgggcgccaa 67800  
 cgccccgttt ttttaagtaa tattcgtctt caattataaa atctagtaag ttttcacctt 67860  
 cactgttgat ttgggcgttc acgatgatgt ctggcgtaat gttgctcatg cttgccattt 67920  
 ttcttataat agcgtttact ttaatgtatt tggcaattta ttttgaattt gacgaaacga 67980  
 ctttcaccaa gcggctccaa gtgatgactg aatatgtgaa gcgcaccaac gcagacgaac 68040  
 ccacacccga cgtaataggc tacgtgtcgg atattatgca aaacacttat attgtaacgt 68100  
 ggttcaacac cgtcgacctt tccacctatc acgaaagcgt gcatgatgac cggattgaaa 68160  
 tttttgattt cttaaatcaa aaatttcaac ctggtgatcg aatcgtaac gatcgcgtta 68220  
 gagcaaatga tgaaaatccc aacgagtta ttttgagcgg cgacaaggcc gacgtgacca 68280  
 tgaaatgccc cgcatatttt aactttgatt acgcacaact aaaatgtgtt cccgtgccgc 68340  
 cgtgcgacaa caagtctgcc ggtctttatc ccatggacga gcgtttgctg gacacgttgg 68400  
 tgttgaacca acacttggaac aaagattatt ctaccaacgc gcacttgat catcccacgt 68460  
 tctatcttag gtgttttgca aacggagcgc acgcagtcga agaatgtcca gataattaca 68520  
 cgtttgacgc ggaaaccggc cagtgtaaag ttaacgaatt gtgtgaaaac aggccagacg 68580  
 gctatatact atcatacttt cctccaatt tgctcgtcaa ccagtttatg cagtgcgtaa 68640  
 atgggcgcca cgtggtgggc gaatgccccg cgaataaaat atttgatcgc aacttaatgt 68700  
 cgtgcgtgga agcgcacccg tgcgcgttta acggcgccgg acacacgtac ataacggccg 68760  
 atatcggcga caccgaatat ttcaaagtgt tgaataataa cgagtcacaa ctgataacgt 68820  
 gcatcaaccg gatcagaaac tctgacaacc agtacgagtg ttccggcgac tccagatgca 68880  
 tagatttacc caacggtacg ggccaacatg tattcaaaca cgttgacgac gatatttcgt 68940  
 acaacagtgg ccaattggtg tgcgataatt ttgaagtat ttccgacatc gaatgtgatc 69000  
 aatcaaacgt gtttgaaaac gcgttggtta tggacaaatt tagattaaac atgcaattcc 69060  
 caactgaggt gtttgacggc accgcgtgcg tgccagccac cggcgacaat gtcaactttt 69120  
 tacgttccac gtttgccatt gaaaatattc caaaccatta tggcatcgac atgcaaacct 69180  
 ccatgttggg caccgaccga atggttaaac agttggtttc caaagatttg tcgttaaaaa 69240  
 acgacgccat ctttgcctca tggcttttgt atgcgagaga caaagacgcc atcgggctta 69300  
 acccgttcac cggcgagcct atcgactgtt ttggagacaa cttgtacgat gtgtttgacg 69360  
 ctagacgcgc aaacatttgt aacgattcgg gaacgagcgt tttaaaaacg ctcaattttg 69420  
 gcgatggcga gtttttaaac gtattgagca gcacgctgac cggaaaagat gaggattatc 69480  
 gccaattttg tgctatatcc tacgaaaacg gccaaaaaat cgtagaaaaac gaacattttc 69540  
 agcgacgtat attgacaaat atactacagt cggacgtttg tgccgacctata taaactacac 69600  
 tttaacaaaa atatactaca ctaaactcta aatatactac aactccactt caatataacc 69660

acactctcgt aaaacggccc aaaaatatcg aaatatatgg ggcaaataca cgtttaaaaa 69720  
 acgctacgat tccaaaaaac gctgcaacta ttccgcccgt gtttaatccc tttgaaaacc 69780  
 agccaaataa caggcaaaac gattctattc taccctgtt taaccctttt caaacgaccg 69840  
 acgccgtatg gtacagcgaa ccaggtggcg acgacgacca ttgggtagtg gcgcgcccaa 69900  
 ccgcaaccacc tccaccgccc gagccagaac cagagccaga acccgagcca gaacccgagc 69960  
 cagagttacc gtcaccgcta atattagaca acaaagattt attttattea tgccactact 70020  
 cggttccggt tttcaagcta accagttgtc atgcggaata tgacgtcatt attgatgctt 70080  
 taaacgagtt acgcaacaac gttaaagtgg acgctgattg cgaattggcc aaagacctat 70140  
 cgcacgtttt gaacgcgtac gcttatgtgg gcaatgggat tggttgtaga tccgcgtacg 70200  
 acggagatgc gatagtggta aaaaaagaag ccgtgcctag tcacgtgtac gccaacctga 70260  
 acacgcaatc caacgacggc gtcaaataca accgttggtt gcacgtcaaa aacggccaat 70320  
 acatggcggtg tccgaagaa ttgtacgata acaacgaatt taaatgtaac atagaatcgg 70380  
 ataaattata ctatttggat aatttacaag aagattccat tgtataaaca ttttatgtcg 70440  
 aaaacaaatg acatcattcc ggatcatgat ttacgcgtag aattctactt gtaaagcaag 70500  
 ttaaaataag ccgtgtgcaa aaatgacatc agacaaatga catcatctac ctatcatgat 70560  
 catgttaata atcatgtttt aaaatgacat cagcttatga ctaataattg atcgtgcgtt 70620  
 acaagtagaa ttctactcgt aaagcgagtt tagttttgaa aaacaaatga gtcatcatta 70680  
 aacatgttaa taatcgtgta taaaggatga catcatccac taatcgtgcg ttacaagtag 70740  
 aattctactc gtaaagcgag ttccggtttt aaaaacaaat gacatcattt cttgattgtg 70800  
 ttttacacgt agaattctac tcgtaaagta tgttcagttt aaaaaacaaa tgacatcatt 70860  
 ttacagatga catcatttct tgattatggt ttacaagtag aattctactc gtaaagcaag 70920  
 tttagtttta aaaaacaaat gacatcatct cttgattatg ttttacaagt agaattctac 70980  
 tcgtaaagcg agtttagttt tgaaaaacaa atgacatcat ctottgatta tgttttacia 71040  
 gtagaattct actcgtaaag cgagtttagt tttcaaaaac aaatgacatc atcccttgat 71100  
 catgcgttac aagtagaatt ctactcgtaa agcgagttga attttgatta caaatatttt 71160  
 gtttatgata gcaagtataa ataaccgcac aaagttaaatt ttttttcatt tacttgtcac 71220  
 catgtttcga atatacccta ataacacaac tgtgcccggg tgttttagtg gtgacattat 71280  
 tcaagttcgt tataaagatg tatcacatat tcgctttttg tcagattatt tatctttgat 71340  
 gcctaacggt gcgattgtaa acgaatatgg acctaacaa cagtttagtaa taaaacgcaa 71400  
 aaacaaatcg ctgaaaagct tgcaagattt gtgtctggac aaaatagccg tttcgctcaa 71460  
 gaaacotttt cgtcagttaa aatcgttaaa tgctgtttgt ttgatgcgag acattatatt 71520  
 ttcgctgggt ttaccaatta tttttaatcc ggctttgcta caaagaaaag tgccgcagcg 71580

cagcgtggga tatttcatga attcaaaatt ggaaagggtt gccaatgtg atcggggtca 71640  
 tgtcgttgaa gagaaacaat tgcagagtaa tttgtatata gattattttt gtatgatttg 71700  
 tggtttaaat gtttttaaaa taaaagaata acaatttaca cattgtttta ttacatggat 71760  
 aatgttgttt gtttgacatt aaaggttatc atggtgcaat gattaataat aaaacaatat 71820  
 tatgacatta ttttcctgtt attttacaat ataaaatcac accaatgtg caaagtttta 71880  
 ttatttgttt gtcgacggtc gaggggtcag cggcgtgtgc aacaataaaa aacatgaagc 71940  
 tgtaacaat tttgatttta ttttattcat tttttatgaa tttgcaagcg ctaccagatt 72000  
 accatcaagc aaataggtgt gtgttgctgg gaactcgcat tggatggaac gatgacaata 72060  
 gccagatcc caacgtatat tggaaatggt gttaaataaa agtgaatata ttttttataa 72120  
 aattttttat ttaaaattcc aagtaatccc tgcacacatt aaacactgta ggtattttta 72180  
 aatcttgcca catgcgaaca acgcacggcc tgtcgtcgaa caccgctatt acattatatt 72240  
 ttctctctgat atagttgtta aacaatttta attttaataa ataactttta caagtatcgt 72300  
 ctgaaggcct cataaacaat ttatatgatt taatatcaaa atacttttca atccagtttc 72360  
 gagtgggctg ttcacaaatt acgcttctcc cgtcataaa cagcataatt gcgtcgtggc 72420  
 aatttgcaa atacttaacg caagtaataa cgtctaagcg ggcttcatct tgagcaactc 72480  
 tattatcaaa atcataaaac gatctatttg tgggcaaagc tactgtaccg tctaaatcac 72540  
 ataatacagc gcggggaaat ttgtcgccga caggaaacgt atattcgaaa ttatttacct 72600  
 ttagaaactt tttatattgc tttttaatag tttctggatt taatggaaat ttatcagagc 72660  
 gtttataatt gcgttcaaga gccgtttcca aagaaacgtc catcaaagc gttaaaaaat 72720  
 ggtaattatg cgttgccggc attttttgcc acatgtccac cgattgagtg ttcaaattag 72780  
 tgtcgtgac aaccacgttg gcaccacatt ttgcggcttt taaaaactgt tcaatgcaca 72840  
 ttttggtaat ttgttcttct ttagtttgtc tacatttccg cgattggtta tagaaagcgt 72900  
 tcagttttgt ataatcgccg tttaaaaaca acttaacgcg cagctcgtct ctggttgattt 72960  
 ctgtatagcc ttttaaaactt ttggcatacg tgcttttgcc cgaacccgaa atgcctatca 73020  
 acaccaacaa ttgttttgaa gaaggcaatt taattgttgg agcaagtta ttatttaatg 73080  
 cctgcttagt cgatacaaat tttataatat ttttgatcat tttaattttt tcaggctcgg 73140  
 ttaattttta aaattcgctc tccacatcga tcgtttgtgc ttacgacat ctgtacgcta 73200  
 aacatttcca cggcaaagtt tgcaccagtt cgttgaaacg ctgttgattc aaagtcaaac 73260  
 ccgacaccat aatatttatt gtagactcgt tggatgaacgt gtttctagca tcaacgtacg 73320  
 gtttaatgac acttttttaa tgcgggaaaa gagctagaaa gtcacgtgt togccattta 73380  
 taacaagctg cgccaattta gtaggatttt cagcacggct ctgatttttg tgcattttca 73440  
 aatacacgtc gcttttaatc ttgcatagtg gcgcgttggt tttatcgtaa actacaaatc 73500  
 cttcttccaa atttttcaac tgggcccgtt gttcgacaca ttcttgcaca gacgtaaact 73560

# ES 2 542 740 T3

cgtaacattt ggggtatttg caaaacggca aattggaaca gtaaaaataa tcgcccgttt 73620  
 cgttgtttct gcttgccaaa taccacaacg ttggctgttc atcgtaaacg gttacaattc 73680  
 tgttgtgttt gcttggttaac tcaaacatgt gagtcgacgc gcagtcctaaa tattcgttac 73740  
 acaacgcttg aaattgattg tgggcctcgt caagttgaag agcttgcaaa actaaacggt 73800  
 taaacgtcac gtctgacacg caaagggttt ctgcaaaagc acttcctcgg gtgctggcat 73860  
 gccattcgcc gttgtacttg tagattttta ttaaacttcc gtcgattttt tcgtaaaact 73920  
 taaaattctc ctctgatttg aacagtttgt gatgagcatc ttgcccgccg atattttgt 73980  
 gcaattcttg aaaattaaag aaacgatcga aagaacgcga cacaacggcg tacgtgcggc 74040  
 tgttaagaat taaacgcgca cattccacga ccacaggatg atctcgatcg cgttcaaacg 74100  
 attcgtaatt aagaaccatc aaatcgtgtt cgggtataatt ttttaatttg actttaaact 74160  
 tgtcaciaag atttttcact ccgccgtttg caagtagacg cgaaacgtgc aacatgattg 74220  
 ctgtttaata atgcatacca atgctaaact gtctattata taaagtgcag tgataacttt 74280  
 gttatcaacg cgttcgatgc cgacatatat aaacgcaatg taacagtttt tgctagtacc 74340  
 atcgcataca acattatgaa tacaaggggt tgtgttaata ataataaaat gatattttatg 74400  
 aatgcttttg gcttgcaacc tcaaagtaaa ttgaaaatta ttgcacataa aataactagaa 74460  
 aatgtaaac gtgacgcgta cacgcgtttc aagggcgtaa aggcgatcaa gaatgaacta 74520  
 aaaacataca atcttacgtt gcaacaatac aacgagggcg tcaatcagtg cgttttaaac 74580  
 gatagccgat ggcgcgacac aaataattgg catcacgata ttgaagaagg tgtgaaaata 74640  
 aacaagagac atatatatag agttaatttt aattctaaaa cccaagaaat tgaagaatat 74700  
 tattacatta aagtagaatg ttatgtaaac agttaattaa totacattta ttgtaacatt 74760  
 tgtggtaata gtggcggttg ttatacattt atatgattgt aatgttgtgt actcgttttg 74820  
 taataaattt ttgtgtttta tcaattcaat atttttattt gataaaacct tattttcgct 74880  
 actcaatttg gcgttttttag acgcaagttt tgcgtaatcg tcattgagcg attttagcgc 74940  
 cttttcagtt gtaattcggt tcagttgcaa ttctttaaaa gatttatgca tgttggttga 75000  
 gtcgctttta attttgtcta acttttcttg catagaaacg cttgtttgtt gtaatttgtc 75060  
 taaatcta atgtgtttta tgttgagctg cgtttgttcg gcaatgtcta cctgtagtgt 75120  
 ttttagtata gcttggtgct cagacagcat agtgtcgtcg gcatttgctg tgttgtcttc 75180  
 tgcgctgctc aacagacttt tttcaaaca cactcggcc aaagagggcg catcaaaatt 75240  
 agcgtttatt ttattccatt gtgcgacact cgacgcgctg catttaatca catccacaac 75300  
 gtttcgggtt acgctgtaaa cgttgaaatg caaactttca accctacaca agggacatgg 75360  
 tacttttttt cgttttctaa tcttcgctat acacattgag cataattgat gtttgcacgt 75420  
 gtctagttct aatacgggta ttatagtcaa totgtctatt ggttgcagaa aataattttt 75480

aatttctgca accgaaaaac aaatgttgca ttgcaattta acaaactcca ttttttagacg 75540  
gctattcctc cacctgcttc gcctgcaaca ccaggcgcag gacctgccac tgcgccgccg 75600  
cccagagtag cgttaggatt tgctcttggt ataaagtcgt tgcgcaaaaa gttgttttct 75660  
gaattgatta tttggtatcc caaaaacagc ggaacgtacg tcgggtattc ttcgtatccg 75720  
ctaagcgttc tgtccagctc acgtgtgtcg ctttcaaatt tcaaacggtt tctaatttgc 75780  
aaacgattgg gttgacttct cataatgtca ctgcttctta tcgggttgta caactcgggg 75840  
ccgtcgggca cagacgcgac cagaccggtt tcgtcaatta tacacgtggc gcaatttcta 75900  
aacctcaatt cctccgtgtc gatttgcaag tactcggggc ctactgcgcg tcgaatcaaa 75960  
ttttgcaaaa atccactgta attgttaaat aattgatcgc cagcacccgc tcgaagcgct 76020  
cgggcgttgg tcacgtcaaa gaaacgcaat tcgtctcgcg acaccgcgga acaaacggtg 76080  
ttcgggtttg tgggtgccag aatgcttttt gtagttgcgt aaacgctgtg tataacgcgt 76140  
tgcgtgttgc ttgtgaaacc ttcggtatat tttagattgt cgeatatagt gtttaactgcg 76200  
ttttcgttgt tatatatcaa atgaaagatt agctgttcgg cttgcatcat actgtttaga 76260  
ttaaacacgt cttggttaatt ggttgcgctt ggaattaaaa ttcgcttgat acctctttct 76320  
ttatttccaa ctaaatgcct agcgatcgtc attttgaatt gattgtcgtc ttcgtcgaaa 76380  
atgggcacaaa ccatttttga catttttaaaa cgttttatga ggtggttgtt gcaaataaac 76440  
catccatcgt catgatacgc gtcgggcgaa cacggcgatt tgtatgttat gcacgcgtcg 76500  
aacgacacga tggacgcgaa aatgcagcga ttaactctca tttgtcgcgg cgccataccc 76560  
acgggcacta gcgccatatt gttgccgtta taaatatgga ctacggcgat tttgtgattg 76620  
agaagaaat ctcttattca ataaatttta gccaaagatt gttgtataaa attttaaat 76680  
cttatattgt tcctaattat tcgctggcac aacaatattt cgatttgtac gacgaaaacg 76740  
gctttcgcac tcgtatacct attcagagcg cttgcaataa cataatatca agcgtgaaaa 76800  
agactaatc caaacacaaa aaatttgttt attggcctaa agataccaac gcgttggtgc 76860  
cgttggtgtg gagagaaagc aaagaaatca aactgcctta caagactctt tcgcacaact 76920  
tgagtaaaat aattaaagtg tacgtttacc aacacgataa aattgaaatc aaatttgaac 76980  
atgtatattt ttcgaaaagt gacattgatc tatttgattc cacgatggcg aacaagatat 77040  
ccaaaactgt gactttgttg gaaaatgggg acgcttcaga gacgctgcaa aactcgcaag 77100  
tgggcagcga tgaaattttg gcccgcatat gtctcgaata tgaatttgac gacgacgcgc 77160  
ccgacgacgc gcagctaaac gtgatgtgca acataattgc ggacatggaa gcgttaaccg 77220  
acgcgcacaaa catatcaccg ttcgtgccgt tgaccacggt gattgacaag atggccctc 77280  
gaaaatttga acgggaacaa aaaatagtgt acggcgacga cgcgttcgac aacgcgtccg 77340  
taaaaaaatg ggcgctcaaa ttggacggtg tcgggggcag aggtctgttt atgcgcaatt 77400  
tttgcattat tcaaacgcac gatatgcaat tctacaaaac caaaatggcc aatctgtttg 77460

cgctaatacaa cattgtggcc ttccaatgcg aggttatgga caaacaaaag atttacatta 77520  
cagatttgct gcaagtgttt aaatacaaat acaacaatcg aacacagtac gaatgcggcg 77580  
tgaacgcgtc atacgctata gatccggtga cggccatcga atgtataaac tacatgaaca 77640  
acaacgtgca aagcgtcacg ttgaccgaca cttgccccgc aattgaattg cggtttcagc 77700  
aattttttga tccaccgcta cagcagagca attacatgac cgtgtccgtg gacgggtatg 77760  
tcgtgctcga caccgagttg agatacgtca aatataaatg gatgccaaac accgagttag 77820  
agtatgacgc cgtgaataag tcgtttaaca cactcaatgg gccattgaac ggtctcatga 77880  
ttttaaccga cttgccggag ttactgcacg aaaacattta cgaatgtgta atcacggaca 77940  
cgacaataaa cgtgttgaaa catcgtcgcg accgaatcgt gccaaattaa agcacgttaa 78000  
gcggatacaa cgggcagtcg gagctgttaa agtcaataga accatcgtta acaaacgaat 78060  
acgcattgtt gtgacagctg aggatataaa aaggaataga gaagtaattg caatgaaata 78120  
tcccgttaca attccacggc acagcgtatg ttgctcgagt tctatcagtt gcacacaacg 78180  
gcctaagaaa atttattaat gcttcatttg tatctatatt agaaggataa tacataggtt 78240  
cgcccaaagg actgggagaa ggccggcgcg aaggtgtagg tgtaggagga ataggagaag 78300  
gcggcggcga aggtgtagggt gttggaggaa taggagaagg cggcggcgaa ggtgtagggtg 78360  
taggaggaat aggagaagggt ggaggtgtag gtgtagggtg tgagggtata ggtgttgagg 78420  
gaggtgtagg tgtaggtgtt ggaggtatag gtgttgagg aggtgtaggc gaagggtggag 78480  
aaggtgtagg agtaggtgga ggtgtaggta acggtacaat tgggtggagat gtaggtggtg 78540  
gtacaattgg tggatttgga tacaattcct gaatgtcgtc taatattttt aaagttaata 78600  
aaattattat aaataaattt aatattatta ttattattat taccacaata atgtaccaca 78660  
tgttgcttaa atataaaaaat taaacaaaga atgttgtatt attgcaaatt taacaatttt 78720  
ttgtattctc cccatgtcat gcgttcgtaa tgagcggcg gttttttatt tctttgtatc 78780  
cacttgtaat cgttaatgtg gttgtgaaaa gtcatactga cgtaggccat taaatttttc 78840  
atgagcatat tatttgacac aactgcaaca tctgcgcctg ccgtttcttg ctggtacgaa 78900  
tcgacaaaacg taatgtctgt gccgtatttt tctttgtcaa gtgcaatttc tataagctca 78960  
atgtggtaaa tgatgaaacc tttgacgttc atataatgat cgcggcacat ggcgcactgt 79020  
agtatgaaaa atacgttgta aaatagcacc ttcatgtttt tcaactgctg catgacaaaa 79080  
tctaaactgc ttttgtctcg cgtatacacc atatcgtcga tgatgagact gagaaagtgc 79140  
atggtgtccc atatggtagt aaacgtgtaa gtaaaactct tgggctggca cgaacgcaaa 79200  
ttgagttctg tggttttgtc cataaattct atgcgaaact gttgcaagtc catgtcgggg 79260  
gatgcgttaa tggcccatc gatcaactgc tgcacctcgt acttttgaat gtctttgtat 79320  
ttcatcaaac acgcaaatg gtataagtaa gttgcttgcg aagacaacag tttggtgagg 79380

# ES 2 542 740 T3

tgcgtcgatt tagaggctcg caaaaggtct atgagacgaa acgaatacaa cagatagctg 79440  
 tctttgtaac gagaaaaaag cggcgtcagc ggtatcatgg cgactagcaa aacgatcgtg 79500  
 ctgtacttgt gtcaggcgcc ggccacagcg tcgttgtacg ttagcgcaga caggacgccc 79560  
 gacgagccta ttattttatt cgaaaatatt acagaatgtc ttacggacga ccaatgcgac 79620  
 aagtttactt attttgctga actcaaacag gagcaagcct tatttatgaa aaaagtatac 79680  
 aaacacttgg tgcttaaaaa cgagggtgct ttaacaaac accacgtatt gttcgaatga 79740  
 atgattatgt ataagacata tgtgcatttg gtgcagcagc ctgcgttcgg aagcaacgtt 79800  
 atcaactatt gcgaacagtt tatcacggcc atttttgaaa tttttacgct cagcagtaaa 79860  
 atcgtcgtgg ccgtgcccgt caattgggaa aacgataatt taagtgtact tttgaaacat 79920  
 ttgcacaacc taaatctcat tggaattgaa attgtaaatt aaaacaaatc atgtggggaa 79980  
 tcgtgttact tatcgttttg ctcatactgt tttatcttta ttggacgaat gcattaaatt 80040  
 tcaattcctt aaccgagtcg tcgccagtt tagggcagag cagcgactcg gtggaattag 80100  
 acgagaacaa acaattaaac gtaaagctga ataacggccg ggtggccaac ttgcgcacatcg 80160  
 cacacggcga taataaattg agccaagtgt atattgccga aaaaccgcta tctatagacg 80220  
 acatagtcaa agagggctcc aacaaggtgg gcactaacag cgtttttctg ggcaccgtat 80280  
 acgactatgg aatcaaatca ccaaacgcgg ccagcacatc tagtaatgta accatgacgc 80340  
 gcggcgccgc aaactttgat atcaaggaat tcaagtcctt gtttatcgta ttcaaggggtg 80400  
 tgacgcccac taaaactgta gaggacaatg gcatgttgcg attcgaagtc gacaacatga 80460  
 ttgtgtgttt gatcgacccc aacacggcgc cgctgtccga acgagagggtg cgcgaaattgc 80520  
 gcaaatctaa ttgcactttg gtgtacacaa gaaacgcggc agctcagcaa gttttatttg 80580  
 aaaataactt taccgtcatt aatgtgaac aaaccgccta tctcaaaaac tataaatcat 80640  
 acagagaaat gaattaataa aacaaaaagt ctatttatat aatatattat ttattaacat 80700  
 acaaaatttg gtacactagt gttcaaatcg tttctgttca acgccattgt catgttataa 80760  
 aacacatttg tagttttatt gtaattattt ttaaatttat ttttaatttg ctgtaataaa 80820  
 acttgttcat taaatacaaa agactttgaa ctacttgcgt ttatattctt tttataattg 80880  
 tactgaacaa acgaggggtg caaaaagttt ttgaaatgct gcacggcaat acctatcatc 80940  
 tcctccattt tgcctctcc tattgtaata gtggcactgc gcaccgtttt aatgtttaga 81000  
 atgtaaatga gcgcatacag cggactattg ttggtgctca agcacattag gttgtgctta 81060  
 tgcatagggt cgttgctcag cagcgttttg tatactacaa agcccgtttt ggggtcgcgt 81120  
 ctgtacatta gtacgtgcga caaaaacaaa cgcaccggcg tcacaagcga ctcgtaatac 81180  
 atgctttcta tcggaaactg tttggacttg atgtgttcgt acacggagcc ggcaaacttg 81240  
 acgctgtcta caaacttatg gttcgtgtaa acaatcaaaa atctgtcttg tacaccgtcg 81300  
 tcataatcgt ccacgtacag cggcttgttg ttaacaatta acattttgta gttggcttca 81360

tacttttagca gcccttggtgta ttttctgctc ttggaatcgc tottgctoga atcgggcatgc 81420  
 ttctttaaagt acgactcgct gcattgtttc aactcgttga tagtgtacaa ctgcgagttg 81480  
 agtttgctca cttccttgctc gctcgtttcc ttgttggaact ctccgctgtg gttgtcatcg 81540  
 tcaaaacttgt gcacaaacac caaatagtc c aacagctcaa aaaacgacga cttgcccgaa 81600  
 cccgggttcgc cgggcatgta aatagccttc tttccgtaat ctacgggaat ggccaaacta 81660  
 gcggcgaaat gcacaaacat aatcgcgttc gcgtgattaa aattggtgaa gcgttttaaag 81720  
 tacaaatagc cttcgacaat ctttttcaaa taattgtacg agtactcctt caagtccact 81780  
 ttggacatga tgatgcgcac gtagaatcga gtcagccaag tgggcaaata gtcggtgctg 81840  
 cgcgcccaata tgattttgtc ccaccacaca ttgtacttct tcaagatcat taacgcgtcg 81900  
 gcgtggtgcg tgtaaaattt ggaaatgtta tccgattctt caaactgaac atcggggttca 81960  
 cgtgcaacat catcgcgcaa ttcggttaaa aacaaacggt tatcattaaa cttgtccatc 82020  
 aacatgtcga catattcgat tttgtgaatt gttcgataga agtactgaat aattttgttg 82080  
 tgtttctttg aaaaaaactc tccgtgttg ttaacaaatt cgctgttcgt gcgaatcaac 82140  
 gtggtcgaca cgtacgtttt gttagtaaaa attagcatcc aaatcaattc gctcaattct 82200  
 gcacgtttac cgaacatgtc cgcacatcag cagactttta gcgtttttct attgatcttt 82260  
 attttcttgt agcatttgca ttttggctga gatcccgata ccgttgaccg acacgggttg 82320  
 catttttaggt tgtgcaacat gtcggaaacc ctgttcttgt ttacgtacag agcgagcgta 82380  
 atcagatttt catcgtccaa attccacaaa tcgcgaaaca gggtgtttta cgcgactcgc 82440  
 atatcggtt ggcattgtgtt gcaattgcc atgtagttaa ctatggcgt gttagttttt 82500  
 agcattttta catctcggca cattttggcg atgtgataag ttctataaat gctgagctcg 82560  
 tcggcgctag tagatagcat gtaattaaac gcgtcctcgg gcaaataact ttcgtcgtg 82620  
 ggcttcttga atgtctgctg caacgtggtg cccaacaaaa atggacagct cgaatgaaag 82680  
 ctgttgggtga acacgttgta cacacgtgc gttgtcaagt acaagtattt ccaattgtta 82740  
 aattttatgt tgctcaactt gtaacaattg cttttggctca atttgaatag gtcacctct 82800  
 ttctttacaa tttgataatg tttgcccgtt aaaaccaaatt tgactccggt cactacgttt 82860  
 tccaattttc taaagaatcc tttacacaca atgtcaggcg gcaagttag cgcacacaca 82920  
 ttctcgtacg tgtacgcca caattcatcg tgatccaaaa tttcgttttt agccgactga 82980  
 gtcaaatata tcatgtagt gtagccaaaa taatagccca acgatacga caatttggt 83040  
 tcgtcaaagt caaaccaatg attgcaggcc ctattaaaca ctattttctc ttgttttttg 83100  
 taaggctcac atcgtttcaa agcttcattc aaagcttctt tgtcgcaggc aaataatgat 83160  
 tcacacaaaa gttccaaaaa cagtttgatg tcgggtttct tgtacgagaa attttcgttc 83220  
 ttggtcaata tcttccacag tacatagatt aaaaaatcaa aattttttaa tttgcttttt 83280



tcaaagtatt gttgtagaag gtttggatcg ttggctcggt cgtgggtcgc caaaacttta 83340  
accatgttct cgtgaattgc tataagcccc aaattgattt gcgtttgaat gtagtctgca 83400  
tttctgctgc tcgccgatat aatgggtacg atgcgcggtt ttctggaacg cgtgtcgctc 83460  
aagtccacgt cgtttttgtc aaaattgttg ttctcgaaca ctctgaggct tttgaggttg 83520  
acgttgacga tatgcttgta ctgggcacc gtaatgcatt cctccaaatt aatgtcgtcc 83580  
ctaattgaat tgaaaaaatt tttatccgaa ttgaccagct cgccattaac tttgcacgtg 83640  
gccacagtgc cgtgggccat tttgagtata aacaagtctt cgtgagaatc gtcaaacttg 83700  
gtttttccat ttacaaacag cgtttgcggc ggatcgtgat tcgtgcgcag gctgagctcg 83760  
acgttgagaa aacatttagg gtcaaacaca acaaatcca cagggcctag tttttgttg 83820  
tgtatgattg gtatcgtggg ttcatgaca attccaaatt ttatatatta aaacagctgc 83880  
catccgttaa aagagaaagc ttgctttttg ggccagttgg gccataata gtaatcgccc 83940  
gcttgacgc atttgttaat gtatccaggg tcggtgctct tgaaaaaatc ttcaaaatta 84000  
atatactttt gtatgatgtc atagtgttc ttcaaatga aaggttttac aaaaatgcaa 84060  
aaatcgttac ttccaacac ccagtcgtgg ccgtctaatt tttgagctgc gtgtttctct 84120  
gcaggttctt cgggtgtctc gcaagatgcg cccatgtcgt gtttcgcgca cggaccgtta 84180  
aagttgttct taattgtgtt taagaactgt tgaaagtgt tgacgtactc aaacaatcta 84240  
cgtgttcctg ttccgctgtt tctaattgatt aaatgatttg catcttgcaa gttgttaatc 84300  
tcgtacgttt tgtcttgagg caggttttcc aaaaaaatt gtaaatgtt gtcaatcatg 84360  
ttggctatcg tgtttgtact ttctgtgta atttatatta taatttcgat caaaaatcac 84420  
catccattct tacatagaat agaaacgcta atacaagatt tcaacaacac attgttgttt 84480  
ggcgcgtatg tacagattta cgatttaagc acgcccgcgc gcaccgaacg attgtttatt 84540  
attgcgcccg aaaatgtggt gttgtataat ttaacaaaa cgtcttatta ttacttgga 84600  
tcggcggaacg tgttttgtcc caacgagttt agcgtgacca cgttcacgca atccactatt 84660  
aaaacgatca acgagacggg aatatatgcc accgcatgca cgccggtcag cagcttgacg 84720  
ctaattgaac attttgcaac attaaaaaat aacgtgcccg atcacacgct cgttctcgat 84780  
gtggctgacc aacagattca gttttcaata ctgcacatta tcaattattt gatttacaat 84840  
ggctacgtgg atttggtggc cgaataacgc gtatatagac gcttgtagct tcatcgtagt 84900  
aatcatttta atacatttga ttgaactaaa catacatctg caatgggtga aagagtcact 84960  
aaattttgca atggaaaacg gcgataaaga agacagcgac aatgaataga gtttatattt 85020  
ttattttaata aaatattgtt cgtaatccat aatgttttgt attatttcat tgtgataatg 85080  
ttcccaatct tgcacggggg tggggcatcg ttgacttg acgtagaaat cgtacgcgta 85140  
gttattagtt ggcagatcgt cgacaagtgt gatcgacttg aaaaagttaa catttttacc 85200  
gctcaaatat ttaattacaa tttttgcca tttgggtata ttgttgctcg atcgatgatt 85260

gtgaatgtca aaaacaaatt ttttttcaat gaaacgcttt tttaaattgt aatctacaat 85320  
 agcgttgtgt gaattttgaa ctaaatacaga gcgttcttct tgaacggtgg aaccttcgct 85380  
 gataatgata tcaaaaatagc cttccaaatc gacgtctcgc atcgagtgtg ctacatgac 85440  
 tctactgcc aacgcatctc gaatctcaac ttgctcctct tcggttatga gagtgtgtgc 85500  
 gtcatacaca aacggatctc gaatctcaac ttgctcctct tcggttatga gagtgtgtgc 85560  
 caaatcaaac acgaccacgt ggggaaatcc ccacgtcaaa gattcgtctt tgagagagac 85620  
 cactttgtag tgttggaata gaaaccattc ttttaagaaac gaatacattg gcggtttgtt 85680  
 gctaagcacg cacatgtggc ccaacactgg cgttttgaat gcgcgtttaa tattgtgcct 85740  
 gatgtcgcgc atgtcgtcgg cgggcgcttt gaatatattgc atacagtaat tgtaattgtt 85800  
 ttctatgac ttgcacagct ggggtcgtt gcaaaattga aatattacat attcaaaaaa 85860  
 tttatacttt tcaaaagcaa ggtatttgag gtcggcggtac tcgcttaaaa cgagaacatg 85920  
 tcgtttgatg atggcgtcgt taaggcgcaa acagatccat ttgctttgaa gcgaggaggc 85980  
 cataatgtac aaaaatggac cagttacgcc ttattttaaac tgtttaaaaga gtttcgtata 86040  
 aacaaaaact actctaaact aatagatttc ttaacagaaa attttcccaa caacgtcaaa 86100  
 aacaaaacgt tcaacttttc gtctaccggc catctgtttc actcgttgca cgcgtacgtg 86160  
 cccagcgtca gtgatttggg gaaagagcgc aaacaaattc gattgcagac agaataattg 86220  
 gcaaagctgt tcaacaacac aataaacgat ttcaaacgtg aactgagct gtacgagttt 86280  
 atcgaacgga ccgaaggcgt cgattgctgt tgtccgtgcc agctattgca caagagtcta 86340  
 ctcaaacacca aaaattacgt ggaaaactta aattgcaaac tgtttgacat aaagccgccc 86400  
 aaatttaaaa aggaaccttt tgacaacatt ctttacaagt attccctaaa ttacaaaagt 86460  
 ttgttgttga aaaaaaagga aaacataacc agcactgggt gtacacgcaa aaagaaaatc 86520  
 aaacacaggc aaatattgaa tgataaagtt atttatttac aaaacagtaa taaaaataaa 86580  
 ctatttgagc ttagcgggct tagtttaaaa tcttgacagc atgattttgt aacagtcgaa 86640  
 agccaaacga gggcaggcga cgaaatcgtc tcgttcattc gctactgtcg gctgtgtgga 86700  
 atgtctgggt gttaatagta gcgtgttctg taacttcggc gacctgtcga tgaacggctc 86760  
 ctggatcttc tgtatgtgcg gggctctacc gggcggcgct tgtaaccoga gcttctgcgc 86820  
 ctgcgtgtcg aaccatatgt ggtaccggtt gaagaacggc gacggcgacg ataaaccatg 86880  
 tttaaattgt gtaatttatg tagctgtaat ttttacctta ttaatatatt ttacgctttg 86940  
 cattcgacga ctgaactccc aaatatatgt ttaactcgtc ttggctcgtt gaatttttgt 87000  
 tgctgtgttt cctaataatt tccatcacct taaatatgtt attgtaatcc tcaatgttga 87060  
 acttgcaatt ggacacggca tagttttcca tagtcgtgta aaacatggta ttggctgcat 87120  
 tgtaatacat ccgactgagc gggtagcgat ctatgtgttt gagcagcctg ttcaaaaaact 87180

ctgcatcgtc gcaaaacgga atttcggtac cgctgttgat gtattgttgc ggctgcaaca 87240  
 tttgtatctt ttgcgcgcgc tcgatcaaca attcttcaag agtggtgcgt ttgtcgcgct 87300  
 gtaaagccac gttttgtaac agcactatct tcgcatatct cataatcgga ctggtgaaac 87360  
 agcgtgcaaa cgacgaccgc ataatatcga cggctcgtaa gtcgattgtg gtcgaaggca 87420  
 tctccaacag agatcgcacg gcgtccaaca gcgtgtccgt ttgaacctgc gtcatttgcg 87480  
 gtctgcacgt gtagtcgtca aacgtgggtt cgagcagttt gaacaacgaa tgatactttt 87540  
 ccgatcgag caaaaatato atgggtcatga ccacgtcgct gattttgtat tctgtagaac 87600  
 tgggtgctgt caacgaatag tgatggatta gtttgcgagc agcatttctg tatcggcgca 87660  
 tgttgatcaa ctcttcggaa ggctgcgcgg gcgcggcgcc gttggctcgc gcaaacaaat 87720  
 ttattacggg acgcggcgta ggctgcgcgg acgctggcgc ggcgacgacg tccgcgttcc 87780  
 ccgcgcgta ctgagacgct atggcagcgt tgttatttaa aattgtgttt tgcgatttgc 87840  
 gagccacgtg catcataaaa tttatcaaca cgtcgggtgt caactgcacg ctttgatgtt 87900  
 cgtcgcagag caaaggaaat agctggggcc atatcgccaa ttgcataggc tcgtctatct 87960  
 ttaaccgcaa tttgtttatt tccaaatata acgcgatagc gtcctcgtg accgacgacg 88020  
 cacacttact ctgtaactat cacttggatc gtgttgcgt aaacgcttcc caaaaagtct 88080  
 aacacgttga ccgtttcgat tctattcaac ttaattgtgg acgcgttggc ttgcatcggc 88140  
 tccaacagac tgcgcgctcc gacagattga gtagacaaaa tttttaaaact ttccgtctta 88200  
 ttgggcgtaa tgtcgttgat taacaacgac gcagccgttt gagaggccgc agtgttgatg 88260  
 gtttgcaaca tgtogacggc cgcatttgc gtttgcgcgc aaggctcttc tggcggcctg 88320  
 ttgcggcggt ttcttcgtgc ttgcgacatg ttgtcgtcag tgtccatata ggtatcattt 88380  
 attgaagcaa tcatggttga gttcgataag cagagatatt tcgttgtcca attggtactt 88440  
 ggtaatgatg tgcottataa atgtttcggg cacaatcatt tctgtcatta gcacgttaca 88500  
 aatatctatt ttgatcaatt tcaatttatg aattaacaga ttaatgtttt cgtccgagta 88560  
 cttgctcatg atgaaacgac aaacgttgcg gagttccaac tccgctaccg gatacgtttt 88620  
 gttgggcaaa ctctctaaat agtgtctcaa ataaaagccg atcaatacgg tggacgctat 88680  
 tttgttaacc tttttcattt tagtattgcg gccatttct atcatgaagt ttttaaacgg 88740  
 tagcaacagc ctgtctccgt tagcaacagt ggagcagccg ttgcattgcg cgctcaaaat 88800  
 actcaacacg cgctcgtgat cttcttggcg caatccgacg gttgcttttt tgcattcttt 88860  
 gacaaatggc acgcacatgt cgcgtttcgt gtacaaaagaa tacgctttgt cgcaaatcaa 88920  
 gttatagaaa aattgcacaa atatctgcgt aatcaagttg ttttcgttaa taatgtcact 88980  
 ttcgtttttg taatcgggtc gaagcaacac gtacaacatc agaggcatgc cgaacatggg 89040  
 tcttaaaaaa atgtcccaac cattttgcaa gccgcgctcg aggggtgctca gcgaggacgc 89100  
 caagtatttg catttgcact caaaacattg aattttgttt gcgggcttgc acgactgaca 89160

catgatcgca tccacgtcgg gtgccggcgt cggattgtaa tttttttgca agtattgcat 89220  
aatgggccta aaatggggta cctgtttgat aaactcgtcg cgcaaaaaata tcgaaaaaat 89280  
gttttttaca ttgtgtatgt tgtctgtgtt gttggcttga ttctcaaaac tactctttat 89340  
ggaaacaata cttttgttaa attctgtgaa aaaagtaaga cttttactgt ccacgatcaa 89400  
gcttttggtt aaatatattt aaataaaaa acacaacgaa tcgatttcac cttgtaacaa 89460  
ttgcgcttca aaacacacgt tttcaaagcg gtgcgtaaatg tttaacctta aactgtattg 89520  
taatctgtaa gcgcacatgg tgcattcgat ataaccttat aatatgaacg attccaattc 89580  
tctgttgatt acgcgttttg cagcgcaaat actgtccaga aacatgcaaa cggtggtatg 89640  
gattgttgac gacaaaaacg tcagtttggg agaaaaaata gacacgttga ccagcatggt 89700  
gttggtgtga aatagcccg cgcacatgcc gccgcgggta acatccagcg acctggccgc 89760  
atcgatcatt aaaaataaca gcaaaatggt gggcaacgat tttgaaatgc gatacaacgt 89820  
gttgcgatg gccgctggtt ttgttaagca ttatcccaag tattacaacg agacgaccgc 89880  
cggtttagtt gccgaaatag aaagtaatct gttgcaatat caaaattatg taaaccaagg 89940  
caattatcag aacattgagg gttacgatag tttattaaat aaggcggag agtggttatg 90000  
taaaattgat agactattta aagagagcat taaaaaaatc atggacgaca cggaagcgtt 90060  
cgaaagagaa caggaagcgg agagattgag ggccgaacaa actgccgcaa acgctcttct 90120  
ggagagggca gcgcagacgt ccgcagacga tgcgttaat cgtgccgacg ccaatatctc 90180  
cacggcattt agcgatccgc ttccaggccc cagcgccgcg cggtagatgt acgaaagtcc 90240  
agagtcggac acgtacatgg aaaccgccc acgtaccgcc gaacattaca ccgatcagga 90300  
caaagactac aacgcggcgt aactgccga cgagtacaat tccctggtca agacggttct 90360  
tttgcgttta atcgaaaagg cgctggccac tctaaaaaat cggttgcaca taacaactat 90420  
tgatcaattg aaaaagttaa gagattatct gaatagcgat gctgatgctg gagaatttca 90480  
aatattttta aaccaggaag attgtgtgat actgaaaaat ttgtcaaatt tagcgtcaaa 90540  
gtttttcaac gttcgttgcg tggccgacac gtttagagga atgttggaag cgcttcgcaa 90600  
taatattgag ttggtgcagc ctgaaagcga tgccgtacgg cgaatagtca taaaaatgac 90660  
gcaagaaatt aaagattcga gcacgccgct gtacaacatt gccatgtaca aaagcgatta 90720  
tgacgccata aaaaacaaaa acattaaaac cttgttcgac ttgtacaacg acaggctgcc 90780  
aatcaatttc ttggacacgt ccgcaaccag tccagttcgc aaaacttccg gcaagagatc 90840  
tgccggaagac gacttggtgc cgactcgcag cagcaaacgt gccaatagac ccgaaattaa 90900  
tgtaatatcg tcagaagacg agcaggaaga tgatgacggt gaagatgtcg actacgaaaa 90960  
agaaagtaaa cgcagaaaaat tagaagacga agattttctc aaattaaaag cattagaatt 91020  
tagcaaggac attgtcaacg aaaagcttca aaaaattatt gtggtcaccg acggtatgaa 91080

# ES 2 542 740 T3

acggctgtac gaatactgca actgcaaaaa ttcttttagag actttaccga gcgcccgttaa 91140  
ctatggcagc ttgctcaaaa ggctaaacct gtacaatctc gatcatatcg aaatgaatgt 91200  
aaatttttac gagttgctgt ttccattgac actgtacaat gacaatgata acagtgacaa 91260  
aacgctttct catcaattgg taaattacat atttttggcc agtaactatt ttcaaaactg 91320  
cgctaaaaac ttcaactata tgcgcgaaac ttttaacgtg ttgggcccggt ttaacaaaat 91380  
cgactttatg gtcatgtttg ttataaaaatt taacttttta tgcgacatgc gtaattttgc 91440  
caaattaate gaggagctgg tgcccaacaa acagcccaac atgagaattc acagcgtggt 91500  
ggctcatgcgg gataaaattg ttaaaactagc ttttagtaat ttacaatttc aaaccttttc 91560  
aaagaaagac aagtcgcgca acacaaaaca ttgcaaaga ctaataatgt tgatgaacgc 91620  
aaactacaat gttatataat aaaaaattat aaaatatttt taatttttat ttatattcag 91680  
tacatttaca catattaaca tattgtttat acaaattctt ataatcatta tgattttaat 91740  
tgaattgttg tctaaacaaa ttaaacactt tattaacaaa taacttttcg ttgtaatttt 91800  
ttactttgca catgttataa caaaaaatta aaattttcat catgtctgat ttgtctatgg 91860  
cgtcacagtt gcttttaatg taatcgcaag ttaaccactc aaaaggaccc ttttctattt 91920  
ttaatttggt taaatcttta taatcagact tcagtttgta aattagattt ccacatcgaa 91980  
taataaatcc ttccagcggg ctttggggaa acattaaaga cttgaaattt aacctttcta 92040  
caaaatcggt gtacaaatat ttgtgacacg gaatagtatt aaacccacg ttagtcaaca 92100  
actcttgcc ctcacaaaag ggcacaaaact ccccgccgta taattgaatt tcgtaagcgt 92160  
agtatttcaa actctctttc tggccacgt agttaattac gttaatgggt gtcgtttttg 92220  
cgtcgtcttt ccaacccatt aattcgccgt agacaataaa accgtcattg aaccgcgcct 92280  
gaagcgatcg catgcacgtt tctaaatctt ttcgaatgcg gtaataattc ataaaattgc 92340  
cgtccggtct gtaagtgttt cttgaccgt acgtaatttt attttggttg caaatgattc 92400  
tgaaattaca accgtccaac ttttcttgaa caataatttc tttgtcggcc aacgtacctt 92460  
ttttaccttg atctagatgc gacacagatg gataaatttg atacacaatt ttattctcat 92520  
cttcgggcat tacgggtccg cgttcattta acgcgtacat gacaatgttg tggcgaatgt 92580  
cggtgcgctc cggcgggtctt ggcacgtggt gcagtctgtc ctgcaattgt tgcttccatt 92640  
gttgaaaata ttcgggtccat tcttggtgat actcgccgcg ttgcatgagt ttacgtaca 92700  
gtttttaaag ttgacattc tttaaaaata acgttagagt ttcgtcgatt ttgtatctc 92760  
cattattttt gtttaaatec aatacattta aatcggtcac taccagttga ttgtttttat 92820  
ccatcgtaat ttttatctca tcgcccacgt tgaacaacat gttttaaatt ttggtggatt 92880  
tcggcgcacg tttataatct aaataatatt caacgtacac gtaattgaac atgagctgca 92940  
acaatccttt ggcattgttc aaaattttgt atctcatcaa agtataaata attttcacca 93000  
tcgacaccgt catcaacttg gttacaaaact cgtacaattg caagttttca ataccgtatt 93060

tgtcttttaa atcttcacgt ttactgaaca tgcttaattc gggagatttt ccagtcaaaa 93120  
 tgccaattaa tcccggtgtac aagtcaacgt atttgacatc gttgcccgat tcatcttttg 93180  
 catgtcgatt tttcaaaagc tctttattgt cgataaattt ttcaaaggtc tctcgatcac 93240  
 atttagtgta aatatggttag tcagtggtgc tgctttcgac cgcgtatccc ttggcatggc 93300  
 tgcccgtatc aatgcaaatg tacaccatgt tagaatgtgc tgcttactgt gcctgtatca 93360  
 agccttatat acctcaaaat atttcacatt tttgcatcat cgtaaaatat acatgcatat 93420  
 aattgtgtac aaaatatgac tcattaatcg atcgtgcgtt acaagtagaa ttctactggt 93480  
 aaagcaagtt cggttgtgag ccgtgtgcaa aacatgacat cataactaat catgtttata 93540  
 atcatgtgca aaatatgaca tcatccgacg attgtgtttt acaagtagaa ttctactcgt 93600  
 aaagcgagtt taaaaatttt gtgacgtcaa tgaaacaacg tgtaaatatt tttacaatat 93660  
 ttaagtgaat cattatgact tccaataatt ttgtggatgt ggatacgttt gcaagacaat 93720  
 tgattacaga taaatgtagt gctctaataa aagtgcggat ctggtgcccg caaacatttt 93780  
 agagattgta gagaaggcca gagacaagta ttttgagggc caactcaaaa aaactatgaa 93840  
 tacattaaaa aattattttt acgaaaaaat atatggacga ttcgatagat tataaagatt 93900  
 ttaacagacg catcctattg atagttttta aattcgtttt aaacaagagc acaatacttt 93960  
 ccatcgtaca aagagatcat cgagtggcca ttaaacgttt aaacaaaatt aaccccgatt 94020  
 taaagagttc tccgcgcaat gcttcagcat tacaatgaat gtttggaata tctagacaat 94080  
 ccagtcacgg acgaacatca tttgttgaca aaagagttgc tacaaaaata tttatcgaag 94140  
 cgtttgaata cagttacacc aacactaatg ccacacgat ggacaaaaca gatgaatttg 94200  
 attttattaa accggcattg aaacctttgc cagatgcaag accgccatcg cttttggcca 94260  
 acgtgatgaa cgaacgtaaa agaaaattac aaaacaccaa ctcaacggca aaatgtttgc 94320  
 taccagcacc accgccacaa ttgcgtaaac ttgaaaaaaa gaatcattta ttgcctttgt 94380  
 tttctttgta attatattgt tgcatttcta tttctaatat catagttttc taataaagta 94440  
 gtttcatatt tttgtttttg tacagtaatt gtttcttggg ttaacaagat cacaaccaat 94500  
 aacataaaga ataacacaat cataacaaaa attaaaaagc cgcatactac tagaacaat 94560  
 tctttaatta gcgatcgggt tctatttaca aattggccga gctgatcgcc ttcagtcggc 94620  
 gagttgtggg cttggatgat gtcgacgata ttgttgccgg cgcgaccgcc tgcgctctc 94680  
 gatataatgt cggccgcggt cggtttcatg atgtgcttaa ctacaaataa tagttgtact 94740  
 tgacggggcg caccgtgatg ccgctgctaa aacctcgtc cgtaagacg cgttgcttta 94800  
 caaaaattaat gtttgctcga ttagcgtagt cggaataatc aaacgtgttg ggccgactaa 94860  
 aatcgggcgt gttgatgggc acaatgcgcg tggagctgat agcaatgctg tcgttcttgc 94920  
 aaaacagccg aatttttttg tagggctctg ctttattcgg cgcagacgac accatctggt 94980

# ES 2 542 740 T3

caaagttggt caattttatg attacgttgg gtaccaattg ataggggaaa attattttct 95040  
 ggaacatttt gacaaagtcc acaaccgttt ggctatagtc gggaatgccg agcaaagact 95100  
 gcgcctgttt aatgtatttg agactggagc ggtttactgt agegcaattg gatggcacgt 95160  
 cgcccttcat aagccggcgc gttctctccc aattcaattt gttgtacaaa ttatcaatct 95220  
 cctcgtgcgg cagattgatt acatagcgcg cgggctgttt gcgatattga aagatgcaaa 95280  
 aaatgcgttt caacgacaat atcttcacca tgggtggacgt ttccagattg aaacataaca 95340  
 aaaagtcatt gctttccacc aattctttaa aatgagacag cggaatttca caagcgatcg 95400  
 gtcgcaaat gctttttatt ggaggcggaa cgctttgacc gttgcggttt tttagtaacg 95460  
 cgctgcacgc agattgcatg tccgtttcgg gatacgtaaa ctcgatggga catttggggt 95520  
 tttcatggtg aacgatcata gtgttgcaat aaaacaagtt gttggtcagg agcacgctaa 95580  
 aaacacgcgt ttcccccga cggatttcgg tgatgggtac caacgggttc cagtagacta 95640  
 tgggtggcga cgctgttttt tttggcgatc gactgtctat gttaacatca tgctcgtgcc 95700  
 tgtacactag cacagaattg aattttggaa attgtttttt gtcaatgtac aaccggtcgt 95760  
 cgtctgtggg cactgacacg atcaagtttt cgattaattt gttgcctacg tcgctttgcg 95820  
 gttccaccaa attgtgaggg aacgcaaaaa agcgatcgct aatacaaaact tgaatctgaa 95880  
 acgggcactc catcgtgatg tatatgtctt acttcattag actttagatt attttaattt 95940  
 gtgaactcgt accgtattca atagggtgtc gggcacgtaa ttgtaatggt aaaacagatc 96000  
 ctgttgaaaca cgtgcgttgt tcaactacgat tgaaatgcaa aaatacatca agtacataaa 96060  
 cactatgatt agaaaggtag cagacagaaa atatttcac tttaaatctt atgctagtgtg 96120  
 aataaaatag atagtacttt tatacgttta tttatatttg ttttctttgt tataaccgta 96180  
 attgtaaaac ttgtgatcgt gctcgccagg cataatttct ttgcacatca gcttgcgaaat 96240  
 atatgtgaca tcttcgtaca cggatttctt gatgttacca tcgtgaagcg ttgtcggcgtt 96300  
 gagaggtttg cggtcgttgt tgtaaaaatt ttgcaccgaa taattatcca tagtgcagca 96360  
 caggcaatgt cactgatgca tatgctttaa ttttttattg cattcagtta ttatatgatt 96420  
 taataaacgt acacaatagc acgttttatc gttaaagata actttcaata tataaaagtg 96480  
 tttgaattgc gagaccgtca acataacggt tatcaacgcg atgactaaac gacaatttgc 96540  
 tttgctgttt gtgtggcacc acgacaacca atttgtttgc aacacggacg aatacccggtt 96600  
 ttggcacaac attgaatacc atgcacggcg ctataaatgc atcgttttgt actgtgtgga 96660  
 aaacgacgga tcgctacaac tgcccgtttg caaaaacata aatctcataa attataaaaa 96720  
 agcgtatcct cattattatg gaaactgtgt tgacagtata gtgaaacgtg ctggcaaaaa 96780  
 ttgattatat gaaagtaact gcaatgttaa acccccacct gtgggacgtc gcgtacaatt 96840  
 atttgctgtt gatggacatg gattgtgtgg tgcaaagcgt gcaatggaaa caattgtcaa 96900  
 ccgacacgta ttgttttgag ccgttttacg actctcaaat taaatggttg tacgcgcca 96960

aaagcggaca aagttttgat agttatcttg aaaactatgc aactctaatt cgagtcaaac 97020  
 aagtgcagca acatcgaaaa gaattaatac tgcatttgtt ggattttctt acaatgaaag 97080  
 caaatgacaa ttttatggtg ttcaaaaatt atattaacat gattataaaa gtgtatttgc 97140  
 aattttacaa ttacagattt cccatcaatt ttgaggacaa cacgatgaa ccttgtgtaa 97200  
 atttaacttt tagacgtggc ggcagttgga aaactcaact gcaaccgta tgcaattatg 97260  
 ttacaaaag taaaaatatg ccaaaattta ttaaataaaa caaattaatt taaacaagcg 97320  
 tttttattga caatactcac atttgatatt atttataatc aagaaatgat gtcatttgtt 97380  
 ttcaaaaattg aactggcctt acgagtagaa ttttacttgt aaaacacaat caagaaatga 97440  
 tgtcattttt gtacgtgatt ataaacatgt ttaaacatgg tacattgaac ttaatttttg 97500  
 caagttgata aacatgatta atgtacgact catttgcttg tgcaagttga taaacgtgat 97560  
 taatatatga ctcatatgtt tgtgcaaaaa tgatgtcatc gtacaaaact gctttacgag 97620  
 tagaattcta cttgtaacgc atgatcaagg gatgatgtca tttgtttttt taaaattcaa 97680  
 ctgcgtttac gagtagaatt ctacttgtaa aacacaatcg agggatgatg tcattttagt 97740  
 aatgatgtca tttgtttttc aaaaccgaac tcgctttacg agtagaattc tacttgtaac 97800  
 gcaagatcgg tggatgatgt catttttaaaa atgatgtcat cgtacaaact cgttttacga 97860  
 gtagaattct acgtgtaaaa cacgattaca gcacttcgta gttgtatcga aaattgttca 97920  
 atggctcttt gttaatgtcg taattgatta atatgtcgta caatttggcg gcgttgtgtt 97980  
 tgcacacgac cgtttttagt tcttgaaaca ttttttcgtg tatgttttagc atgttgtatt 98040  
 tcagagtgcg atgtgtaatg ctgggtgacga gcatcaaaat gataaaatct aaagcggcta 98100  
 atttgtaatc ccgttcatac gctctgtaat cgccaacaac tctgtggcca gatcttttta 98160  
 gattttgaca ggcgttatgg tacgaattga taatatttac tatagtttct cttgttatcg 98220  
 gtttgtcgat taaactgtta acaaacatca cgttgcccaa gcgcgacggt ttagacaccg 98280  
 acttgttttt tgtctgttca aatttgtaaa aattaaaaac gctcatagac tggctgtcag 98340  
 gcagtggtgc gttatacaaa caaatggta aaacgtttaa ttcgacaaac gacgagcaca 98400  
 ttaaagtttg ttggtgttga acgtcctggg gatgtaaact gttattcata acgtaacaca 98460  
 cttcaatgtc ggaatgcttg ttttcaaatt tgtccttgtc tacagtttca atggtgattg 98520  
 agcagaggtt gagtttattt tctaaattca tttggatatt ttcaatatgg tataccaccg 98580  
 acacgttgtg agccagcgat ccttgatttg ttttaatoat attcaaaata ttcatgatat 98640  
 ggttgaaaaa agagtctgtc aaaacgtttg tgtcgttgtt aaatatcgct ttccagggtt 98700  
 tactgttgcg tgactcaacg acggccgtgt aacataacaa gcgcgccagt tgeatgtgcg 98760  
 acaacttaat gttatcaatg tcgggtgatgt ttggcaccag attttcattg ccgtcttcca 98820  
 gtagcgtgct cagttcggtc gagtagttat tcaacgatcg attgtgcgat tcaaacaagt 98880



ttactatcgc aggttgtaga tagtttttta tgtcgtcaaa ttgaattata togatcttgt 98940  
 ccttgttctc cagcataaac gacaaathtt ttaggtcgaa tttaatatht ggccgctttt 99000  
 cgttggaactt tttgtaatht aacaacatcg ccaacagtht gtgtaactcg ccgttagctt 99060  
 gatctttgct aaacagthta ttggtagcgt aattcacgth gtcgthcaaa aacagcaact 99120  
 cgttgatgat catthtttgt aaaagcgcgt acttgctcat gttgacagaa tctcttacat 99180  
 ttcagttgta aacgcgtctg tacaaattgg ccatgcgatt cggaatgcac acggggatcg 99240  
 tgcgagccag tgcgthttgg cgaatatgca ttttttcata gccgctcgaa caatcgcacg 99300  
 cgtccggcga aaattgcacc gtgttcaaat tcatattcaa ccggccgctg ttgcatagat 99360  
 aaggcctcgg tgttcccgta tcgtccacca agtctctgta cgtgctcacg catgtttgag 99420  
 acacgacaaa atctccgccc gccggagaaa cgtgaaccaa gccagtgccg ggatcgcaat 99480  
 ctatcaagtc cggagcctgc gcgtttacca aagcgtcgga ggcgttgcaa aagccatcct 99540  
 ggcaggtcaa ctgthttgca gcgctggaga tcacgcagth gtctctacac tgctgatccg 99600  
 tcacgcacgg taaccggttc aatgaacaat ctacgcctcg attgcgctga aacgtaaaat 99660  
 ttaacggcgg cgtttccaac tcgttaatgt gcatgtatgc atcttgcaaa ataaatthtt 99720  
 gaacaaatht aaacgtgtac atgtacacga ttagtataat taccagtaga ataagthtt 99780  
 gccaaaagth caacatgatc gtccttaactg agtgtgaaaa gcgtggtgtg acgcacgaaa 99840  
 tgactggttg cgcaaaaaat aaaccggggt ctatataact cggcgtcgac cgcgttcatt 99900  
 tttaccgtca tgcatctgac ggctaattga ttgctcgthc ctaacgcgct caaaaagcgg 99960  
 gacgtgaaat acatthataa tacctatthg aaaaattaca gtgtaattga aggtgtgatg 100020  
 tgttgcaatg gcgattgtht ggccgtggtg gtgttgacc gaaatcagct gcaaacacg 100080  
 gacatggaag tgttgagag tttagaatac actagtgaac acattgaact gttatgcgaa 100140  
 aaaatatgtg tgatagthga taattacgac aagtattacc aaaaaatthg tgtataaata 100200  
 aaataccaaa tthttattata tcattthgtt ttattthaata attaaagaat acaacgccac 100260  
 atctattcct agtacaacaa ataatttgat tattatthtt gagtgcacat taaaaataa 100320  
 caaacagtht aaaaatacta cagaataata caatacataa atattatagt aaatagctgc 100380  
 aatthtgata gcgtaathta tactthgata tthttcaacg tacaacgtht aatgthgata 100440  
 cgcattatth acaataaaca aaatthttct aatatgccat ttgtccgcaa ttgtthttgc 100500  
 gatataaaag cthttthcaa acaattgaaa aattgcaaac aaaaccacgt acatgacgth 100560  
 atacatagth ttaaagthtt tacataaaca thctataatg aagaaaatth ctaaacacgg 100620  
 catgagcgcg cacataatcg cgttgccgcg aaatatctcg tacgtacaaa aatactcgga 100680  
 cattctccaa taagtaaaat gcattthgct attatactgt tgtthttct agtgattatt 100740  
 gcaatagtht acacgtatgt agacttgata gatgtgcacc atgaagaggt gcgttatcct 100800  
 attacgtht ttgacaacac acgcgcgcgg ctthattgaac cgcgctccga aatagthaat 100860

gaaggcaatg cacacgaatg tcacaaaact ttgacgccgt gottcacaca cggcgattgc 100920  
 gatctgtgcc gcgaaggatt agccaactgc cagttgtttg acgaagatac aatagtcaag 100980  
 atgcgtggag atgacggcca agaacacgag acgcttattc gagcgggaga agcgtactgc 101040  
 ttggcttttg atcgagaacg cggccgatcg tgtaacccca acacgggtgt gtggttgttg 101100  
 gccgaaactg aaactggttt cgctcttttg tgcaactgct tacggcccggt acttgttacg 101160  
 cagctcaaca tgtacgaaga ctgcaacgtg cccgtgggct gcgcgcctca cggccgtatc 101220  
 gacaatatca acagcgcttc gatccggtgc gtgtgcgacg acgggtacgt gagcgactat 101280  
 aacgccgaca ccgaaactcc gtattgccgt ccgcgcaccg tgcgcgacgt aatgtacgac 101340  
 gagagttttt ttcccggggc gccatgcgca gacggccaag ttctgtctga tcatccggcg 101400  
 ctcaatgatt tttaccgcag acactttaga ctggaagaca tttgcgtgat cgacccttgc 101460  
 tcggtggacc cgattagcgg gcaacgcaca tcgggacgct tatttcacca accaaccgta 101520  
 aatggtgtgg gaatcaacgg atgcaattgt ccggccgatg acgggttact gcccggtgtt 101580  
 aatcgacaca ccgccgacac gggcatggtt agacaaagcg accgcaccgt cgcgaacgct 101640  
 tgcttgacgc cgtttaacgt gcacatgta tcgttgcgtc atgtggatta caaatttttc 101700  
 tggggccgca gcgaccacac cgagtttgcc gacgcggaca tgggtgttca agcgaatgtc 101760  
 aaccaactca gtcacgaacg gtatcgagcg attttgtact cgttgctcga gtcgcaccgc 101820  
 gacgtaacag aaatcgtaac agtcaacatg ggtgtcatga aaatttcggt gtcatacgat 101880  
 accacattga aaaatatact attaccatct tctgttttta ggctatttag atttaaagaa 101940  
 agtggcaactg ctacgccggt atgcttcttt ccaggcgtag gacgggtgcat aaccgtcaat 102000  
 tccgattcgt gcacagggcg acacgctggt ggtcaagtgt ggaccgcaga aacgttcacc 102060  
 aactcgtggt gtgtactgag tcgtgaaggc acgcatataa aagtttggag tcgcgcgtca 102120  
 cgatatccac gcggagacgc gcctgcagcg ttaagattgc gcggcttctt tctgaacaac 102180  
 gatcgcgaac gaaacacaaat aagagcggtc actacagggc acatgaccca agggcaacaa 102240  
 atagacgcat taacccaaat acttgaaact taccccaact actctgtata acaacatgag 102300  
 cattttaaaa gttgtagaag cgtgcaattt ggcacacact tttttaaaat tgggttattt 102360  
 atttagggcc aagacttggt tggatatcgc tttagataat ttggaactat tgcgtcgaaa 102420  
 gactaacata aaagaagtgg cagtcatggt aaacaagaaa actacagagt gtttgcaatt 102480  
 gaaacgaaaa atagataaaa aaattgcaca acgtgtttta ataaaaattt acactatcaa 102540  
 atgatgacat cataacgggt tcaatattct gtgtgcaaaa ataaatgaca tcatatttca 102600  
 aacttgtttt acgcgtaaaa ttctactggt aaaacaagtt tgagatatga tgtcatcatc 102660  
 acaaataata gtatgtaata aaataaacat atttgtgtgt aaatataatt tattacaaat 102720  
 aaattttaca ttgaatcaat ctgtcttcgt gtttgttgta aggtcttcga atcttgtggt 102780

tcagccccctc gggatgggtca aaatgcgcgc tagtaattgt taatggatct ttcaacgatt 102840  
 ttttgcccat ggcgagtgtg acaaacgcgg ccacgacaaa cagcaggata atcagtttca 102900  
 tgggtgttcta tattcgacaa tatatgggtc gcttctaaat caccctgtcc ccaaaagcct 102960  
 cttttatagt tttttagaac acgttgtgta ttccaacagt aattgttcca tctctttcaa 103020  
 cagccattca gcatccggtc gttgactgta atcatgctga attaatttac aaacaatttc 103080  
 ggtcaattta ggatggcctt gggataaaact tgccggcatt tgctgtacat tgtttctaaa 103140  
 gttagttagc gtagtttcgc gttocaaaagc agtcttgaag ggcattatca attcgaataa 103200  
 aacaatgccc aaactataca tgtcattttt ggggggtgtac acttttttga tttgttctgg 103260  
 tgcagcgtac aaagtatat tttgagggtt gtttttgata aacgttttgt atagactgcc 103320  
 aaacatgccg cccacatata aatcaaagtc gggcccagtc atgaaaatat cttcgggatt 103380  
 aatattgtgg tgcacgatat ttacggaatg aatcgctttc acggcgctca ccaaataaac 103440  
 aaacttgcta atataaaaagc caaaatccgc cggaacttta atgttggtct ttgcaaaagt 103500  
 ttgcaaattg cgttgtttca aatagtcgct caacatgtac tcgttttagag gcgacgcaat 103560  
 atatatgcgg tgctgccgcg gattcaaata aaccaattgt tcgggtttca tggatatagc 103620  
 ttaagtgtta acgcgtcact aaattcagac acgagcgcac gccctatata catacaattt 103680  
 atcgcacaaag atgcttaacg cgatctgttt ataaactaaa acgcaactgca ataaatttta 103740  
 gcaagcattt gtatttaatc aatcgaaccg tgcactgata taagaattaa aaatgggttt 103800  
 gtttgcggtg tgcaaaaaat acacaaggct gtcgaccgac acaaaaatga agtttcccta 103860  
 tgttgcggtg tcgtacatca acgtgacgct gtgcacctac accgccatgt tgggtgggata 103920  
 catggtaaca ttcaatgact ccagcgaatt gaaatattta caatactggg tgctgttgct 103980  
 gtttttgatg tccgtgggtc taaacgctcc gactctgtgg acgatgctca aaaccacaga 104040  
 agcccatgaa gtaatttacg aaatgaagct gttccacgcc atgtacttta gtaacgtgct 104100  
 gttgaattat gtggtgtttt tggacaatca aatgggtaca aattttgttt ttgttaacaa 104160  
 ttttaattcac tgttgtgtac tttttatgat atttgttgaa ttgcttatcc tgttgggcca 104220  
 cacaatgggc acgtacacg attatcaata tgtcaaatcg tgttatatgg ttatatgtt 104280  
 tgtttcagtt atgagtgtta ctattgttat gggtttagag tgtttgaaaa cgaaactaat 104340  
 tgataacagt ttgatgttta acgcgtttgt gtgcgctttg tacattgtga ttgcaataat 104400  
 gtggtcttta aaaaataatt tgactagtta ttacgtttca aatttataaa gtattcaagt 104460  
 tgttccgttt tcatacaacg atccgccgcc accgttctct aacattgtaa tggatgacat 104520  
 aaaaaataaa aaataattta taaaaatggt ttttattctt tcacaattct gttaaattcta 104580  
 aacaaaaaat ataaatacaa acttattatg ttgtcgtcta aataaacatc aatttgtaaa 104640  
 tctggacacc tattcatatc attgatatta cagtctacta tacaacaatt aaaactaacc 104700  
 aaattatctt tacaacaatt aaagcaatta aaacaattta aataatcttc attgtcgtcg 104760

tataagttta tttgcaactgt agacgggtgtt acacagcgat ccattcgacg ttcgtgttcg 104820  
atcaactttc tcgccaactt gtaccataaa aattgttttg aaaaaagtt ttccaacaat 104880  
ggtaacggcc aattcaacgt gacgatggc acgtcctcgg gtatgcattt gttaaaaaac 104940  
acacagctcg ctttacccaa cgaaagcaaa ggtactaaat atggcgccat tggetgattt 105000  
gttattccaa gataattaca aataaactga tccgtcgtgg ggtgataact ggcaggtgtc 105060  
agctttaaat aatcttcaac gttgttgctg cgcaaaagtc tgcattttac acggtttgtt 105120  
aatccacga cttttgcatg taaaatcgga tccaaatact gcagaatcgt gtctataatt 105180  
tctaattgga aacgtatgcg ttttgcctgt gggcgctttg taacgctcga catcctaata 105240  
acaactaaca caaaactaaa atgataactca atatattgct tttacagtgc atcttttaggt 105300  
ttaaactgtg cgtttatcgc gttgagcaag tcgccgttat cggcatcaat ctcccaagca 105360  
aacaggccgc ccaattttatt tcggtcgaca tatttaactt ttcttaacac agagtcgacg 105420  
ctgtcaaacg aaatcaaata acctttactt ttatcgaaaa cgtacgacgc ttgagcggcg 105480  
ctgtcaaacg tgtacacata attgttgaga tctttttgaa tttgacgata atctacaaca 105540  
ccgtcctccc acgtgcccg ccccgcccg tttgccagtgc cggaataa gttgtcattc 105600  
gtataatttg ttacgccggt ccagccggcg ccgtacatgg cgacgccac aattattttg 105660  
ttgggatcga cgccttggtt cagtaacgca tcgacagcgt agtgtgtagt gtatagctct 105720  
tccgagttcc aacttggcgc gtagactggt gtttggtagc ccaaaccgt gtttgaccaa 105780  
gcccctttaa aatcgtaact catgagaaat attttgccca atgacttttg cgttcggcg 105840  
tagtttacca cggcaatctt gtcgtaaccc gcgcttatag cgttggttaa ttcgtaaacc 105900  
ctgccggttt gcgcttcgag gtcgtctagc attgcgcgca gtcctccaa caacaaaatg 105960  
tatgttttgg cgtcacgcgc cgcacgcgcc aacgacgggt tagccccctt gccgcccgga 106020  
aactcccaat cgatgtctac accgtcaaag aatttccaca cttgcagaaa ttccttaacc 106080  
gaatctacaa aaacgtttct tttttcaaca tcgtgcataa aataaaatgg gtctgataga 106140  
gtccagcctc ctattgaagg aagaatttt aaatgggggt ttgctaattt tgccgccatc 106200  
aactgtccaa aattgccttt atacggctcg ttccaagcgg acacaccttt ttgggggttt 106260  
tgtacggcgg ccacaggatc gtgaatggca actttgaaat cttcgcgtcc cttgcacgat 106320  
ctttgcaaag attcaaagct tccgggtatc gttttgaggg cgtcgtttat tccatcgccg 106380  
ccgcagatgg gtatgaaacc atacaacaag tgtgataaat ttggcaaggg aactttgtct 106440  
acgggaaagt tgcgccgta cacacccac tcaacaaagt acgcagcgac aattttatcc 106500  
tctctcctgc caggtttgtt gttttccagc catgtgtatt cgagcgggtc cagatggccg 106560  
ccgtcgggtg ctgcgacttt gaccaacacg ggatcgtcga cggaacagcc gtctcattg 106620  
caaagtttga cagcatgtt aaattgccg ctcacaagaa ctttaatggt agccctttta 106680

ctttcggcgt cgcctttcca tacctgctgc tcgtcaaaaca acacgtacgc tatgtcgcca 106740  
 atgtcgccgt tccagacgtt ccaactgact tgaacgtcga cttgttcttt aggcctttatt 106800  
 aaattttcgt aagcgggtggc ctcgtaattt atttctacga gcgcataatt gcgatcggcc 106860  
 caatcgatca ccggcgtgcc gggaatcgcg ttagaaacgg cgaccaacca caaaacgttt 106920  
 aacaatttgt acaacatttt aatttatctt aattttaagt tgtaattatt ttatgtaaaa 106980  
 aaatgaacaa aattttgttt tatttgtttg tgtacggcgt tgtaaacagc gcggcgtacg 107040  
 accttttgaa agcgcctaata tattttgaag aatttggtca tcgattcaac aaagattatg 107100  
 gtagcgaagt tgaaaaattg cgaagattca aaattttcca acacaattta aatgaaatta 107160  
 ttaataaaaa ccaaaacgat tcggcccaat atgaaataaa caaattctcg gatttgtcca 107220  
 aagacgaaac tatcgcaaaa tacacaggtt tgtctttgcc tattcagact caaaattttt 107280  
 gcaaagtaat agtcctagac cagccaccgg gcaaagggcc cettgaattc gactggcgtc 107340  
 gtctcaacaa agtcactagc gtaaaaaatc agggcatgtg tggcgctgc tgggcgtttg 107400  
 ccactctggc tagtttgaa agtcaatttg caatcaaaaca taaccagttg attaactctgt 107460  
 cggagcagca aatgatcgat tgtgattttg tcgacgtcgg ctgtaacggc ggcttgttgc 107520  
 acacagcgtt cgaagccatc attaaaatgg gcggcgtaca gctggaaagc gactatccat 107580  
 acgaagcaga caataacaat tgcggtatga actccaataa gtttctagtt caagtaaaag 107640  
 attgttatag atacattacc gtgtacgagg aaaaacttaa agatttgta cgccttgctc 107700  
 gccctattcc tatggccata gacgctgccg acattgttaa ctataaacag ggtattataa 107760  
 aatattgttt caacagcggc ctaaaccatg cggttctttt agtgggttat ggtgttgaaa 107820  
 acaacattcc atattggacc tttaaaaaca ctgggggcac ggattgggga gaggacggat 107880  
 ttttcagggt acaacaaaac ataaacgcct gtggtatgag aaacgaactt gcgtctactg 107940  
 cagtcattta ttaatctcaa cacactcgtt atttgaaca taatcatatc gtctcagtag 108000  
 ctcaaggtag agcgtagcgc tctggatcgt atagatcttg ctaaggttgt gagttcaagt 108060  
 ctgcctgag atattaaaaa actttgtaat tttaaaaatt ttattttata atatacaatt 108120  
 aaaaactata caatttttta ttattacatt aataatgata caatttttat tattacattt 108180  
 aatattgtct attacggttt ctaatcatat agtacaaaaa taaatcaca attaatataa 108240  
 ttacaaagtt aactacatga ccaaacatga acgaagtcaa tttagcggcc aattcgcctt 108300  
 cagccatgga agtgatgtcg ctccagactgg tgccgacgcc gccaaacttg gtgttctcca 108360  
 tgggtggttat gaggttgctt ttttggtggg caataaacga ccagccgctg gcattcttcc 108420  
 aactgtcgtg ataggctcgt ttgccgatgg tcgggatcca aaactcgacg tcgtcgtcaa 108480  
 ttgctagttc cttgtagttg ctaaaatcta tgcattgcga cgagtcctgt ttggccaccc 108540  
 aacgcccttc tttgtagatg ctgttggtgt agcaattact ggtgtgtgcc ggcggttgg 108600  
 tgcacggcat cagcaaaaac gtgtcgtccg acaaaaatgt tgaagaaaca gagttgttca 108660

tgagattgcc aatcaaacgc tegtccacct tggccaacgga gactatcagg tcgtgcagca 108720  
 tattgttttag cttgtttagt tgcccatgca tcagctcaat gttcattttc agcaaatcgt 108780  
 ttctgtacat cagctcctct tgaatatgca tcaggtcgcc ttgggtggca gtgtctccct 108840  
 ctgtgtactt ggctctaacg ttgtggcgcc aagtggggcg ccgcttcttg actcgggtgt 108900  
 cgactttgcg tttaatgcat ctgttaaact tgcagttcca cgtgttttta gaaagatcat 108960  
 atatatcatt gtcaatcaaa cagtgttcgc gtgtcaccca ctgggggtta tttttgtcat 109020  
 ctttaagtga cagacacgca gcttttattt ggccgctggg gaacgtagac ttttgtttga 109080  
 gaatcact cagcccgctc cgatgaagca cagtgtccac ggtcacgttg atgggggtgc 109140  
 cctcagcgtc caaaatgtat acctggcact cgtccgtgtc gtcctggcac tcgagcctgc 109200  
 tgtacatttt cgaagtggaa atgccgcac gccacgattt gttgcacgtg tggtgcgcaa 109260  
 agtgattgtt attctgcgcg ttcaccaact ctttgccttt gacccactgg ccggggccct 109320  
 cgttgtcgcg aaaacagtcg tcgctgtcac tgccccaacg ttcgatcagc tcttcgcccc 109380  
 cctcgcactg ctgcctgatg ctccacataa gcaaatcctc ttgcccaca ttcagcgttt 109440  
 tcattgtttc ttcgacgcgt gtgttgggat ccagcgagcc gccgttgtac gcatacgcct 109500  
 ggtagtacct cttgtagcgg ataatcagct ttctgttcta gtcctctcc acgatggtga 109560  
 tttccacgtc cttttgcagc gtttccttgg ggggggtaat gtccaagttt ttaatcttgt 109620  
 acggaccctt cttcatttgc gcgttgcaat gctccgcgcg aaaggcagaa tgcgcgcgcg 109680  
 ccgcaaaaag cacatataaa acaatagcgc ttaccatctt gcttgttgtt tccttattga 109740  
 agccttgggt tgactgattt actagtagca ttgaggcatc ttatataccc gaccgttacc 109800  
 tggcctacgt gacacaaggc acgttgttag attaataatc ttatcttttt atcttaattg 109860  
 ataagattat ttttatctgg ctgttataaa aacgggatca tgaacacgga cgtcagtcg 109920  
 acatcgaaca cgcgcaactt catgtactct cccgacagca gtctggaggt ggtcatcatt 109980  
 accaattcgg acggcgatca cgatggctat ctggaaacta ccgcccgcgc caaagtcatt 110040  
 tcaccttttc ttagcaacgg cagttcggcc gtgtggacca acgcccgcgc ctgcacaaa 110100  
 ttgattaaaa acaataaaaa ttatatcat gtgtttggtt tatttaata tctgtcaaat 110160  
 tacaatttaa ataataaaaa gcgtcctaaa gagtattaca cccttaaatc gattattagc 110220  
 gacttgctta tgggcgctca aggcaaagta ttgatccgc tttgcgaagt aaaaacgcaa 110280  
 ctgtgtgcga ttcaggagag tctcaacgag gctatttoga ttttgaacgt tcatagcaac 110340  
 gatgcggcgc ccaaccgcgc tgcgcagac attacaagt tgcaagaact gatacaagat 110400  
 ttgcagtcgt aatacaataa aaaaattacc tttaccactg atacaatttt ggagaattta 110460  
 aaaaatataa aggatttaat gtgcctgaat aaataataat aagggttttg tacgatttca 110520  
 acaatgaact tttgggccac gtttagcatt tgtctggtgg gttatttggg gtacgcggga 110580

# ES 2 542 740 T3

cacttgaata acgagctaca agaaataaaa tcaatattag tggatcatgta cgaatctatg 110640  
 gaaaagcatt ttccaatgt ggtagacgaa attgattctc ttaaacgga cacgtttatg 110700  
 atgttgagca acttgcaaaa taacacgatt cgaacgtggg acgcagttgt aaaaaatggc 110760  
 aaaaaatat ccaatctcga cgaaaaaatt aacgtgttat taacaaaaaa cggggtagtt 110820  
 aacaacgtgc taaacgttca ataacgcctt atcactaagt taatatacta aaaatcacat 110880  
 agtcactaca atatttcaaa atatgaagcc gacgaataac gttatgttcg acgacgcgtc 110940  
 ggtccttttg atcgacacgg actacattta tcaaaattta aaaatgcctt tgcaggcgtt 111000  
 tcaacaactt ttgttcacca ttccatctaa acatagaaaa atgatcaacg atgcggggcg 111060  
 atcgtgtcat aacacgggtca aatacatggt ggacatttac ggagcgggcg ttctggtttt 111120  
 gcgaacgcct tgctcggtcg ccgaccagtt gttgagcaca ttatttgcaa acaattattt 111180  
 gtgetacttt taccgtcgtc gccgatcacg atcacgtca cgatcacgtc cgcgatcacg 111240  
 ttctctcat tgcagacctc gttcgcgtc tcctcattgc agacctcgtt cgcgatctcg 111300  
 gtcccggtct agatcgcggt cacgttcacg gtctcccagg cgaggcggtc gacaaatatt 111360  
 cgacgcgctg gaaaagattc gtcacaaaa cgacatgttg atgagcaacg tcaaccaaatt 111420  
 aaatctcaac caaactaatc aatttttaga attgtccaac atgatgacgg gcgtgcgcaa 111480  
 tcaaacgtg cagctcctcg cggcgttggg aaccgctaaa gatgttattt tgaccagatt 111540  
 aaacacattg cttgccgaga ttacagactc gttacccgac ttgacgtcca tgtagataa 111600  
 attagctgaa caattgttgg acgccatcaa cacgggtgcg caaacctgcg caacgagttg 111660  
 aacaacacca actctatttt gaccaattta gcgtcaagcg tcacaaacat caacggtacg 111720  
 ctcaacaatt tgctagccgc tatcgaaaac ttagtaggag gcggcgggcg tggcaatttt 111780  
 aacgaagcgg acagacaaaa actggacctc gtgtacactt tggttaacga aatcaaaaat 111840  
 atactcacgg gaacgtgac aaaaaataa gcatgtccga caaacacca acaaaaaagg 111900  
 gtggcagcca tgccatgacg ttgcgagagc gcggcgtaac aaaaccccca aaaaagtctg 111960  
 aaaaagttgca gcaatacaag aaagccatcg ctgccgagca aacgctgcgc accacagcag 112020  
 atgtttcttc ttgacgaac ccgggggaga gtgccgtttt tcaagagttg gaaagattag 112080  
 agaatgcagt tgtagtatta gaaaatgaac aaaaacgatt gtatcccata ttagatacgc 112140  
 ctcttgataa ttttattgtc gcattcgtga atccgacgta tcccatggcc tattttgtca 112200  
 ataccgatta caaatataaa ctagaatgtg ccagaatcag aagcgattta ctttacaaaa 112260  
 acaaaaacga agtcgctatc aacaggccta agatatcgtc ttttaaattg caattgaaca 112320  
 acgtaatttt agacactata gaaactattg aatacgattt acaaaaataa gttctcaca 112380  
 ttactgcacc tgttcaagat caagaactaa gaaaatccat tatttatttt aatattttta 112440  
 atagtacag ttgggaagta ccaaagtata tgaaaaaatt gtttgatgaa atgcaattgg 112500  
 aacctccgt cattttacca ttaggtcttt agatttggtg aggctagcac gtcgacatca 112560

tgtttgcgtc gttgacctca gagcaaaagc tgttattaaa aaaatataaa tttaacaatt 112620  
 atgtgaaaac gatcgagttg agtcaagcgc agttggctca ttggcggtca aacaaagata 112680  
 ttcagccaaa acctttggat cgtgcagaaa ttttacgtgt cgaaaaggcc accaggggac 112740  
 aaagcaaaaa tgagctgttg acgctattgc gtttggatcg caacacagcg tctgcatcgt 112800  
 ccaactcgtc cggcaacatg ttacaacgac cagcgctttt gtttggaac gcgcaagaaa 112860  
 gtcacgtcaa agaaaaccaac ggcacatcatg tagaccacat gcgcgaaatc atagaaagta 112920  
 aaattatgag cgcggtcgtt gaaacggttt tggattgagg catgttcttt agccccttgg 112980  
 gtttgacgc cgcttcgccc gatgcgtatt tttctctcgc cgacggaacg tggatcccag 113040  
 tggaaataaa atgtccgtac aattaccgag acacgaccgt ggagcagatg cgtgtcagat 113100  
 tggggaacgg caatcgcaag tatcgcgtga aacacaccgc gctgttggtt aacaagaaa 113160  
 gcacgcccc gttcgaaatg gtcaaaacgg atgcgcatta caagcaaatg caacggcaga 113220  
 tgtatgtgat gaacgcgcct atgggctttt acgtggtcaa attcaaaca aatttggtgg 113280  
 tggtttctgt gccgcgcgac gaaacgttct gcaacaaaga actgtctacg gaaaacaacg 113340  
 cgtacgtggc gtttgccgtg gaaaactcca actgcgcgcg ctaccaatgc gccgacaagc 113400  
 gacggctttc attcaaaacg cacagctgca atcacaacta tagtgggtcaa gaaatcgatg 113460  
 ctatggtcga tcgcggaata tatttagatt atggacattt aaaatgtgcg tactgtgatt 113520  
 ttagctcaga cagtcgggaa acgtgcgatt ctgtttttaa acgcgagcac accaactgca 113580  
 aaagttttaa cttgaacat aaaaactttg acaatcctac atactttgat tatgttaaaa 113640  
 gattgcaaag tttgctaaag agtcaccact ttagaaacga cgctaaaaca cttgcctatt 113700  
 ttggttacta tttaactcat acaggaaccc tgaagacctt ttgctgcgga tcgcaaaact 113760  
 cgtgcgccac caaacacgat cttttaaacg actgtgtata ttatttggaa ataaaaataa 113820  
 cctttatatt atatataatt cttttattta tacatttggt tatacaattt tatttacgac 113880  
 aaatattgac tcgttggtca gaaagttaa taagcttgtc aatttcttgc gcttgcaaag 113940  
 ggctgccaac gcgttcgttt tgaatgcgcg taatccggtt tacgggtattg ttggcgcgaa 114000  
 caataaaact ctcaactggc aaattaacaa ttttgtttgc gtactcattg tgcactgcgg 114060  
 ccagggtttg tagaatgttt tcgggaaaaa tggcaattct attaaatttg acatgttttt 114120  
 gattgtatac atagtgttga tattcttcca gcgtaggata tttgtttaa ctcttgacgc 114180  
 attcaatgta caatttgtgc agtgacaaaa ttctgtttaa atocaaacga gaacatttct 114240  
 caaaagttaa ttcttgaccg ttgaaatgta cactttgcaa ttgtttcaat aaactgtcgt 114300  
 aaaaagttaa tccttcttca agcacaacgc cggggcgcgt cgtgttatct acaacgctta 114360  
 tgtactgtgc aaaatottca attatatgat agaaatacaa atatctctcc gcgtttatgg 114420  
 acgtgtcgtt taaaacatgt tcgtcaacaa ctccgttatg atttacttcc aaaaatttca 114480



aatottgcaa agcgtccgog ttggtcaact tgttgataat aaatttgtct ttgcattcaa 114540  
acgctctggt tgcaatccac tccacagcgt ccaaaacgga catgcgttta aacatgttga 114600  
tacgttttag acaatacget cgttttttta cgcctcaac gttcacgtcc gtgtagtcgc 114660  
accattgcag gatttgcaac atgtcctcgg caaaatgcgc gaactgccgc agcttttctc 114720  
ttccaaaatg ttgattgtcg tgtttaaaaa gcaacgttga aatttccgag acataccaca 114780  
aagccgtggg caattttact ttgatcagcg gtcctatagc cagggttgctg aaccgatca 114840  
tgcatccogt gttgttaatg cgttaaatga catagcgttt aaagtagtcc tttacattat 114900  
cgtcaatgta ttctgcgtcg tttatgtgct gtacagcaa atagtacata aggcccgct 114960  
taaacgcgac ctttttagcg tcaaaatagc tgacgcca cagtaatcg ttgtattcgt 115020  
cgaattgtc gttgggcaact atggcgcccg taaaaggcg tctgctgcgc ggtgacaaac 115080  
gcggtccatg ctgaatcaac tgettcaaac tttccaaatt ataacaatat tcaattgaat 115140  
ttttaatctc tttattttgg ctccataaaa gaggaactc gagtcggctt ttaaacttgg 115200  
tcaaactgcc ctgaattgtt tcaacaagt tgtaatgtgt taacaatatg gccggcacac 115260  
cgctatcggt ggctaaaata caatcgggga atcgaatatt ttctacgttg ctgtaatcgt 115320  
acgcttcgtc gtcgtcgttg gcaacaacat cgtcggtttc ggcgttaacg ctcgctaact 115380  
tgttctgata gtgtaaattt ttcattacat caaagcgta tgacttggtg cgattgtgca 115440  
aataatttat ggccgtgcta atgggtgctgt cgataatttt atcaaaattg agaacatcgg 115500  
cgttatacaa cgttttataa aattctgttg acttgaacgt gtttacaac tcatttttat 115560  
ttttaatctg gtcaaaattc atactagaat tgtagtttg tttgatttcg ctgaatagcc 115620  
gctggcgag acgcttcagc ttgtccacct cgtttaacac gttggcgctc gtcggcatgg 115680  
aattgataaa ttgaaaccga aaaaagaca gcagttcatc ttttttcgat ataaaatttt 115740  
cggttgtaat gatatcgtag ttaaattctt tgggtaaatt gaccattcg accatttcat 115800  
cgttgcgata aatcttgca gtcgagttgt tgacaaacgc cgaggcaacg gacaaatcaa 115860  
tctgttccgt gttattattg atggcataaa acacaatgcg ttcgaaacta aacggttttt 115920  
cgtttagcaa atttttgcaa acgtttgcct catttttgga aatttgccg tcggtcacca 115980  
tgtacaaaag tttcaacttg ccgtcgagca agtttatatt cttgtgaatc cactttatga 116040  
attecgtggg cctgggtgca gtaccctcgc cattgcggcg caaataacga ctcttgacgt 116100  
ctccgatttc tttttggcg caataagcac tccaatgcaa atacaaaact ttgtcgcaac 116160  
tactgatggt ttcgatttca ttctgaaatt gttctaaagt ttgtaacgcg ttcttggtta 116220  
agtaatagtc cgagtttgtc gacaaggaaat cgtcggtggc gtacacgtag tagttaatca 116280  
tcttggtgat tgatatttaa ttttggcgac ggatttttat atacacgagc ggagcggta 116340  
cgttctgtaa catgagtgat cgtgtgtgtg ttatctctgg cagcgcgata gtggtcgcga 116400  
aaattacag cgcgtcgtaa cgtgaacgtt tatattataa atattcaacg ttgcttgat 116460

taagttagca tttgagcttt accattgcaa aatgtgtgta atttttccgg tagaaatcga 116520  
 cgtgtccag acgattattc gagattgtca ggtggacaaa caaaccagag agttggtgta 116580  
 cattaacaag attatgaaca cgcaattgac aaaacccggt ctcattgatgt ttaacatttc 116640  
 gggtcctata cgaagcgtta cgcgcaagaa caacaatttg cgcgacagaa taaaatcaaa 116700  
 agtcgatgaa caatttgatc aactagaacg cgattacagc gatcaaatgg atggattcca 116760  
 cgatagcadc aagtatttta aagatgaaca ctattcggtta agttgccaaa atggcagcgt 116820  
 gttgaaaagc aagtttgcta aaattttaaa gagtcattgat tataccgata aaaagtctat 116880  
 tgaagcttac gagaaatact gtttgcccaa attggtcgac gaacgcaacg actactacgt 116940  
 ggcggtatgc gtgttgaagc cgggatttga gaacggcagc aaccaagtgc tatctttcga 117000  
 gtacaacccg attggttaaca aagttattgt gccgtttgct cacgaaatta acgacacggg 117060  
 actttacgag tacgacgtcg tagcttacgt ggacagtgtg cagtttgatg gcgaacaatt 117120  
 tgaagagttt gtgcagagtt taatattgcc gtgcgtcgttc aaaaattcgg aaaaggtttt 117180  
 atattacaac gaagcgtcga aaaacaaaag catgatctac aaggctttag agtttactac 117240  
 agaatcgagc tggggcaaat ccgaaaagta taattggaaa attttttgta acggttttat 117300  
 ttatgataaa aaatcaaaag tgttgtatgt taaattgcac aatgtaacta gtgcactcaa 117360  
 caaaaatgta atattaaaca caattaaata aatgttaaaa tttattgcct aatattattt 117420  
 tgtcattgct tgtcatttat taatttggat gatgtcattt gtttttaaaa ttgaactggc 117480  
 tttacgagta gaattctacg cgtaaaacac aatcaagtat gagtcataat ctgatgtcat 117540  
 gttttgtaca cggctcataa ccgaactggc tttacgagta gaattctact tgtaatgcac 117600  
 gatcagtgga tgatgtcatt tgtttttcaa atcgagatga tgtcatgttt tgcacacggc 117660  
 tcataaaactc gctttacgag tagaattcta cgtgtaacgc acgatcgatt gatgagtcac 117720  
 ttgttttgca atatgatatc atacaatatg actcatttgt ttttcaaaac cgaacttgat 117780  
 ttacgggtag aattctactt gttaaagcaca atcaaaaaga tgatgtcatt tgtttttcaa 117840  
 aactgaactc gctttacgag tagaattcta cgtgtaaaaac acaatcaaga aatgatgtca 117900  
 tttgttataa aaataaaagc tgatgtcatg ttttgacat ggctcataac taaactcgct 117960  
 ttacgggtag aattctacgc gttaaactatg attgataatt aaataattca tttgcaagct 118020  
 atacgttaaa tcaaacggac gttatggaat tgtataatat taaatatgca attgatccaa 118080  
 caaataaaat tgtaatagag caagtcgaca atgtggacgc gtttgtgcat attttagaac 118140  
 cgggtcaaga agtggtcgac gaaacgctaa gccagtacca ccaatttcct ggctcgtta 118200  
 gttcgattat tttcccgcaa ctcgtgttaa acacaataat tagcgttttg agcgaagacg 118260  
 gcagtttgct cacgttgaaa ctcgaaaaca cttgttttaa ttttcacgtg tgcaataaac 118320  
 gctttgtgtt tggcaatttg ccagcggcgg tcgtgaataa tgaaacgaag caaaaactgc 118380

gcattggagc tccaattttt gccggcaaaa agctggtttc ggtcgtgacg gcgtttcatc 118440  
gtgttggcga aaacgaatgg ctgttaccgg tgacgggaat tcgagaggcg tcccagctgt 118500  
cgggacatat gaaggtgctg aacggcgctc gtgttgaaaa atggcgaccc aacatgtccg 118560  
tctacgggac tgtgcaattg ccgtacgata aaattaaaca gcatgcgctc gagcaagaaa 118620  
ataaaacgcc aaacgcgttg gagtcttgtg tgctatttta caaagattca gaaatacgca 118680  
tcacttacia caagggggac tatgaaatta tgcatttgag gatgccggga cctttaattc 118740  
aaccacaac aatataattat agttaataa gaattattat caaatcattt gtatattaat 118800  
taaaatacta tactgtaaat tacattttat ttacaatcat gtcaaagcct aacgttttga 118860  
cgcaaatttt agacgcggtt acggaaacta acacaaaggt tgacagtgtt caaactcagt 118920  
taaacgggct ggaagaatca ttccagcttt tggacggttt gcccgctcaa ttgaccgac 118980  
ttaacactaa gatctcagaa attcaatcca tattgaccgg cgacattgtt ccgcatcttc 119040  
cagactcact aaagcctaag ctgaaaaccc aagcttttga actcgattca gacgctcgtc 119100  
gtggtaaacg cagttccaag taaatgaatc gtttttaaaa taacaaatca attgttttat 119160  
aatattcgta cgattctttg attatgtaat aaaatgtgat cattaggaag attacgaaaa 119220  
atataaaaaa tatgagttct gtgtgtataa caaatgctgt aaacgccaca attgtgtttg 119280  
ttgcaataa acccagtatt atttgattaa aattgttgtt ttctttgttc atagacaata 119340  
gtgtgttttg cctaaacgtg tactgcataa actccatgag agtgatatag gagctagtgg 119400  
ctaacgcttg cccacacaaa gtgagattcgt caaaatcctc aatttcatca cctcctoca 119460  
agtttaacat ttggcgcgtg gaattaactt ctaaagatgc cacataatct aataaatgaa 119520  
atagagattc aaacgtggcg tcatcgctcg ttctgacat ttccgaaaag aactcgggca 119580  
taaactctat gatttctctg gacgtggtgt tgcgaaact ctcaaagtac gcagtcagga 119640  
acgtgcgcga catgtcgtcg ggaaactcgc gcggaaacat gttgttgtaa ccgaacgggt 119700  
cccatagcgc caaaacaaa tctgccagcg tcaatagaat gagcacgatg ccgacaatgg 119760  
agctggcttg gatagcgatt cgagttaacg ctttggcagt caccgtcagc gttttgatgg 119820  
cgatcacgtt gagcgagtgc actaacgcgg ctttgtaagt ctctcccaac atgcgcacgg 119880  
tcacgcgccg agtcgtgcta agcaacatgt gtttcatggc cggaaatgaga gaagtgttaa 119940  
tttttttcaa catgctttta aaccgggaca ttagcatatc aaagccaatg tccgtagcaa 120000  
taccgaaaac gagcgcgtaa tcttccaaa acgatgttat aattgactcc aagtcttgg 120060  
cgctgattga acggtcgagc gcctcgaaat gtccgacacg tgcacgttcg ttaccgcgg 120120  
aattgtatgc gatcggagtt ttagtaaagc cggtttcggc cgtgtacgtg atctggacgg 120180  
gcgaccggtt gacgatcatg cccaaatcgt ttagtgttg atttttgtta aaaagtttt 120240  
caaattccaa gtctgtggcg ttatcgcgca cgctgcgcca ttgcgctagt attgcgttg 120300  
agtcacggtt gggtcgtggc ggtagtatgc tggaaggcgc tttgtaatca aaatcgcgca 120360

gttcgctaaa aatgttgttg gccagcattt tgaaagtgc aaagatcgtg tcgccagca 120420  
cgaatccgat gagcgattcc caccatctaa acgaacaacc gccgttgaat agctctctgc 120480  
cgaaacgtcg acagtaggct tcgttgaatt cgcctttaa gcgttcggga aacaaggggt 120540  
cgggatcggg ccgaacgtta aaagccggca catcgccac gcccatgac gtgtgttctt 120600  
cggtagcgca gtatgggctg ttaaagtaca ttttgacag cgagtccact aagatgcatt 120660  
tgttgctgag cgtgtatcta aactcggcag actgaaacttg ggtttcggcg ccttcacgca 120720  
tgcccgccgc cctgtccagg tggtagcacg cgggctgcgc gtaaccacg ctagtctcgg 120780  
aggtctgcat gtacatgaac ggcgtcgtgt tggacacgac gccggtttcg tgaaacggat 120840  
agcagctcat gcttacacac ccgccttgc tgaaagccag tttgacggc agcgttttgc 120900  
cggccaattt cggcggcaca taataatcgt cgtcacttga cgcgggacgc agcgtgtagt 120960  
cgattagtat atgcggaaac ctggtgcgc atctcgaaat aaactcgaga cgatgcata 121020  
gtatggcata cctactggca ttagttaaat cgacggctgt taaaaccgcc atgttatata 121080  
ggacttaaaa taaacaacaa tatataatga aatatttatt agattatatt atagcaatac 121140  
atttacattt attataacaa tactttttat ttaatctgat tatattataa cgatacattt 121200  
ttatttagac attgttattht acaatattaa ttaacttttt atacattttt aaatcataat 121260  
atataatcat ttcgttgtgc atttcaaagc ttttgatagc ttcaaagtaa tacatgaatt 121320  
tagagtattc aggaatatga taaacgttg taaaccgcga tttggtacaa tataacacgg 121380  
gatttttata atacagttta gtttttttac acaatttgca atagttgtta gttgtaggtt 121440  
tcaaaggaaa cgtgattgcg ccgtccaata cctgggtaaa ctttttgact ttaacagtgg 121500  
caaacacggc tcctttgata cccgaaaatc gggtgtcttg cagagcggcc atcatttcgc 121560  
ttggctcttg aagtataaaa cagttgacgt catccaccac gtcgggtctg gtgcacatgc 121620  
ttcggtagcg ctgcaacact atattgggtgt atgtttccct gagaacgaga ccgcgggtgg 121680  
tgctaagatc gattgtttga atgcgctcgt tgggctcttt gtgatttcga attatgcgcc 121740  
gaattatttc aaacactttg cagttgtgat cgtcaattct caattcttta acttccgtcg 121800  
tgtgtctctaa acttacaggg aaaatgtatt ggtaaaaaaa cctctctctg gctaaatagc 121860  
tgaggtcgac caaattgata gaaggatata tttcgtacga ggtttttgga acgttgtgat 121920  
atagatagca tttttgacag cagatgtcta tggggtcagg atcgtccaac ggcttttcga 121980  
tgtgaaccac aacatacaaa aaccattcgc gcgtgttgc tttgaatcta taattgcaag 122040  
tggtgcacgc cgaatcgctc atgtgtcca tagtctctt gtatttcaca ggctgtcttg 122100  
caaatttgcc cgtcatgcgc atatctttgc tgtttatgta gcccataatg taattggtgg 122160  
aaaattttag cgtggcttcc atgatgtgc gttctaaatc gctcatgaaa tgcatacgta 122220  
gatcgcgctc ttgtttgaaa tccagtttgt cgtgtacgc gggaacacct tcaaacttgt 122280

tcccaaaactc gggcgggcaca aaatatccat cttttctgtt gacgactggt tttttactta 122340  
 caatgctgct gtgctccaac ggcttggccg gagaggtgca cataggctgt ttaggcggag 122400  
 agatgcgcgt aggtggtttg atgttagatt ttggcgccgg acgaacaggc gacggcgggc 122460  
 agttggcggc aggcgctggc aaagatttgg cagcaccctt gcccccggtc cttggcgcg 122520  
 caaaaatggt attctctcga aaaaaacggt tcattgtaac tgttagttag cactcagaaa 122580  
 tcaacacgat actgtgcacg ttcagccatc gagaggcttt atatatggaa accttatcta 122640  
 tagagataag attgtatatg cgtaggagag cctggtcacg taggcacttt gcgcacggca 122700  
 ctagggtctgt ggaggggaca ggctatataa agcccgtttg cccaactcgt aaatcagtat 122760  
 caattgtgct cggcggcaca cgctcgcttg cgcgcgggat agtataagta attgataacg 122820  
 ggcaacgcaa catgataaga accagcagtc acgtgctgaa cgtccaggaa aatataatga 122880  
 cgtcaaaactg tgcgtcatcg ccatattcgt gcgaggcaac gtccgcttgc gcagaagctc 122940  
 agcaggtaat gatcgataac tttgttttct ttcacatgta caacgcgcac atacaaattg 123000  
 acgcaaagct gcaatgcggc gtgcgctcgg ccgcgcttgc aatgatcgac gataaacatt 123060  
 tggaaatgta caagcataga atagagaata aattttttta ttactatgat caatgtgccg 123120  
 acattgccaa acccgaccgt ctgccgatg acgacggcgc gtgctgtcac cattttat 123180  
 ttgatgccc acgtattatt caatgtatta aagagattga aagcgcgtac ggcggtgcgtg 123240  
 atcgcggcaa tgtaatagt ttttatccgt acttgaaaca gttgcgagac gcgttgaagc 123300  
 taattaaaaa ctcttttgcg tgttgtttta aaattataaa ttctatgcaa atgtacgtga 123360  
 acgagttaat atcaaatgct ctgttgttta ttgaaaagct ggaaactatt aataaaactg 123420  
 ttaaagttaa gaatttggtt gtagacaatt tgggtttgta cgaatgcaat gtttgtaaag 123480  
 aaatatctac ggatgaaaga tttttaaagc caaaagaatg ttgcgaatac gctatatgca 123540  
 acgcgtgctg cgttaacatg tgaagacgg ccaccacgca cgcaaatgt ccagcgtgca 123600  
 ggacatcgta taaataagca cgcaacgcaa aatgagtggg ggccggcaact tgttgactct 123660  
 ggaaagagat cattttaaat atttattttt gaccagctat tttgatttaa aagataatga 123720  
 acatgttcct tcagagccta tggcatttat tcgcaattac ttgaattgca cgtttgat 123780  
 gctagacgat gccgtgctca tgaactat 123840  
 caattacttg caaagcatgc aattgaaaca 123900  
 tttggtgggc agcagctcga caaacatttt caagtttgta aagccacaat ttagatttgt 123960  
 gtgcgatcgc acaactgtgg acattttaga atttgacacg cgcatgtaca taaaacccgg 124020  
 cagcccgctg tacgccacga acctgttcac gtccaatccc cgcaagatga tggctttcct 124080  
 gtacgctgaa tttggcaagg tgtttaaaaa taaaatattc gtaaacatca acaactacgg 124140  
 ctgcgtgttg gcgggcagtg ccggtttctt gtgcgacgat gcgtacgtgg attggaatgg 124200  
 tgtgcgaatg tgtcgggcgc cgcgattaga taacaacatg catccgttcc gactgtatct 124260  
 actgggcgag gacatggcta agcactttgt cgataataat atactaccgc cgcacccttc

taacgaaaag actcgcaaaa tcaacaattc aatgtttatg ctgaaaaact tttacaaaagg 124320  
 tctgcccgtg ttcaaatcaa agtacacggt ggtgaacagc actaaaatcg tgacccgaaa 124380  
 acccaacgat atatttaatg agatagataa agaattaaat ggcaactgtc cgtttatcaa 124440  
 gtttattcag cgcgactaca tattcgacgc ccagtttccg ccagatttgc ttgatttget 124500  
 aaacgaatac atgacaaaaa gctcgatcat gaaaataatt accaagtttg tgattgaaga 124560  
 aaaccccgtc atgagcgggtg aaatgtctcg cgagattatt cttgatcget actcagtaga 124620  
 caattatcgc aagctgtaca taaaaatgga aataaccaac cagtttcctg tcatgtacga 124680  
 tcatgaatcg tcgtacattt ttgtgagcaa agactttttg caattgaaag gcactatgaa 124740  
 cgcgtttctac gcgcccgaagc agcgtatatt aagtattttg gcggtgaatc gtttgtttg 124800  
 cgccacggaa acgatcgact ttcaccccaa cctgctcgtg tacccgcaga gttcgccgcc 124860  
 ggtccgtttg acggggcgacg tgtatgttgt tgataagaac gaaaaagttt ttttggtcaa 124920  
 acacgtgttc tcaaacacgg tgcttcgata tcttttaata agaggtgatt acgaaagtgc 124980  
 gtctgacttg aaatcccttc gcgatttgaa tccgtgggtt cagaacacgc ttctcaaatt 125040  
 attaatcccc gactcggtag aataatatga tttacactga tcccactact ggcgctacga 125100  
 ctgacacaga cgtcgtccgt ccacaaaacta tttaaacagg ctaactccaa acatgttctt 125160  
 gaccatcttg gctgtagtag taattattgc tttataaatt atatttgttc aatctagcag 125220  
 taatggaaac agctcggggg gtaatgtacc tccaaacgcc ctgggggggtt ttgtaaatcc 125280  
 tttaaacgct accatgcgag ctaatccctt tatgaacacg cctcaaaggc aaatgttgta 125340  
 gataagtgtg taaaaaatga aacgtatcaa atgcaacaaa gttcgaaagg tcaccgagat 125400  
 tgtaaacagc gatgaaaaaa tccaaaagac ctacgaattg gctgaatttg atttaaaaaa 125460  
 tctaagcagt ttagaaagct atgaaactct aaaaattaaa ttggcgtca gcaaatacat 125520  
 ggctatgctc agcaccctgg aaatgactca accgctgttg gaaatattta gaaacaaagc 125580  
 agacactcgg cagattgccg ccgtggtggt tagcacatta gcttttatac acaatagatt 125640  
 ccatccctt gttactaatt ttactaacia aatggagttt gtggtcactg aaaccaacga 125700  
 cacaagcatt cccggagaac ccattttgtt tacggaaaac gaagggtgtc tgctgtgttc 125760  
 cgtggacaga ccgtctatcg ttaaaatgct aagccgcgag tttgacaccg aggccttagt 125820  
 aaactttgaa aacgacaact gcaacgtgcg gatagccaag acgtttggcg cctctaagcg 125880  
 caaaaacacg acgcgcagcg atgattacga gtcaaataaa caaccaatt acgatatgga 125940  
 tttgagcgat tttagcataa ctgaggttga agccactcaa tatttaactc tgttgctgac 126000  
 cgtcgaacat gcctattttac attattatat ttttaaaaat tacgggggtg ttgaatattg 126060  
 caaatcgcta acggaccatt cgctttttac caacaaattg cgatcgacaa tgagcacaaa 126120  
 aacgtotaat ttactgttaa gcaaattcaa atttaccatt gaagattttg acaaaaataa 126180

ctcaaattct gtaacatcag ggtttaatat atataatattt aataaataat taaataatat 126240  
 acaatgtttt tattaattat atttttaata ttaattaaaa gtattaatat ttaaaaaaat 126300  
 gaatcaaatt catctaaagt gtcacagcga taaaatttgt cctaaagggt attttggcct 126360  
 caacgcgat ccctatgatt gcacggcgta ttatctgtgt ccgcataaag tgcaaatggt 126420  
 ttgcgaatta aatcacgaat ttgacttga ctcgccagc tgcaagccta tcgtgtacga 126480  
 tcacacgggc agcgggtgta cggctcgcat gtatagaaac ttgttactat gaagagcggg 126540  
 tttccagttg cacaacacta ttatcgattt gcagttcggg acataaatgt ttaaataatat 126600  
 cgatgtcttt gtgatgcgag cgacattttt gtaggttatt gataaaatga acggatacgt 126660  
 tgcccgacat tatcattaaa tccttggcgt agaatttgtc gggtcattg tccgtgtgcg 126720  
 ctacgatgcc cgtaacggac ctgcgtacttt tggcttcaaa ggttttgcgc acagacaaaa 126780  
 tgtgccacac ttgcagctct gcatgtgtgc gcgttaccac aaatcccaac ggcgcagttg 126840  
 acttgttgta tgcaataaaa tctcgataaa ggcgcggcgc gcgaatgcag ctgatcacgt 126900  
 acgctcctcg tgttccgttc aaggacggtg ttatcgacct cagattaatg tttatcggcc 126960  
 gactgttttc gtatccgctc accaaacgcg tttttgcatt aacattgtat gtcggcggat 127020  
 gttctatata taatttgaat aaataaacga taaccgcgtt ggttttagag ggcataataa 127080  
 aagaaatatt gttatcgtgt tcgccattag ggcagtataa attgacgttc atgttggata 127140  
 ttgtttcagt tgcaagttga cactggcggc gacaagatcg tgaacaacca agtgactatg 127200  
 acgcaaatta attttaacgc gtcgtacacc agcgttcga cgcgcgtccg agcgtcgttc 127260  
 gacaacagct attcagagtt ttgtgataaa caaccaacg actatttaag ttattataac 127320  
 catcccaccc cggatggagc cgacacggtg atatctgaca gcgagactgc ggcagcttca 127380  
 aactttttgg caagcgtcaa ctgcgttaact gataatgatt tagtggaatg tttgctcaag 127440  
 accactgata atctogaaga agcagttagt tctgcttatt attcggaatc ccttgagcag 127500  
 cctgttgtgg agcaaccatc gccagttct gcttatcatg cggaatcttt tgagcattct 127560  
 gctggtgtga accaaccatc ggcaactgga actaaacgga agctggacga atacttggac 127620  
 aattcacaag gtgtggtggg ccagtttaac aaaattaaat tgaggcctaa atacaagaaa 127680  
 agcacaatc aaagctgtgc aacccttgaa cagacaatta atcacaacac gaacatttgc 127740  
 acggtcgtt caactcaaga aattacgcat tattttacta atgattttgc gccgtattta 127800  
 atgcgtttcg acgacaacga ctacaattcc aacaggttct ccgaccatat gtccgaaact 127860  
 ggttattaca tgtttgtggt taaaaaaagt gaagtgaagc cgtttgaaat tatatttgc 127920  
 aagtacgtga gcaatgtggt ttacgaatat acaacaatt attacatggt agataatcgc 127980  
 gtgtttgtgg taacttttga taaaattagg tttatgattt cgtacaattt ggttaaagaa 128040  
 accggcatag aaattcctca ttctcaagat gtgtgcaacg acgagacggc tgacaaaaat 128100  
 tgtaaaaaat gccatttcgt cgatgtgcac cacacgttta aagctgctct gacttcatat 128160

ttttaatttag atatgtatta cgcgcaaacc acatttgtga ctttggttaca atcgttgggc 128220  
 gaaagaaaat gtgggtttct tttgagcaag ttgtacgaaa tgtatcaaga taaaaattta 128280  
 tttactttgc ctattatgct tagtcgtaaa gagagtaatg aaattgagac tgcactaat 128340  
 aatttccttg tatcgccgta tgtgagtcaa atattaaagt attcggaaag tgtgcagttt 128400  
 cccgacaatc ccccaaacia atatgtggtg gacaatttaa atttaattgt taacaaaaaa 128460  
 agtacgctca cgtacaaata cagcagcgtc gctaactttt tgtttaataa ttataaatat 128520  
 catgacaata ttgcgagtaa taataacgca gaaaatttaa aaaagggtta gaaggaggac 128580  
 ggcagcatgc acattgtcga acagtatttg actcagaatg tagataatgt aaagggtcac 128640  
 aattttatag tattgtcttt caaaaacgag gagcgattga ctatagctaa gaaaaacaaa 128700  
 gagttttatt ggatttcttg cgaaattaaa gatgtagacg ttagtcaagt aattcaaaaa 128760  
 tataatagat ttaagcatca catgtttgta atcggtaaag tgaaccgaag agagagcact 128820  
 acattgcaca ataatttggt aaaattgtta gctttaatat tacagggtct ggttccgttg 128880  
 tccgacgcta taacgtttgc ggaacaaaaa ctaattgta aatataaaaa attcgaattt 128940  
 aattaattat acatatattt tgaatttaat taattatata tatattttat attatttttg 129000  
 tcttttatta tcgagggggc gttgttggtg tgggggtttg catagaaata acaatgggag 129060  
 ttggcgacgt tgctgcgcca acaccacctc ctctcctcc tttcatcatg tatctgtaga 129120  
 taaaataaaa tattaacact aaaaacaaga ccgcgcctat caacaaaatg ataggcatta 129180  
 acttgccgct gacgctgtca ctaacgttgg acgatttgcc gactaaacct tcatcgccca 129240  
 gtaaccaatc tagaccaag tcgccaacta aatcaccaaa cgagtaaggt tcgatgcaca 129300  
 tgagtgttg gcccgagga agatcgctaa tatctacgta ttgaggcgaa tctgggtcgg 129360  
 cggacggatc gctgcgcgca caaactgttt tttctaactc atagttgaat ccttggcaca 129420  
 tgttggttag ttcgggcgga ttgttaggca acaaggggtc gaatgggcaa atggtaacat 129480  
 ccgactgatt tagattgggg tcttgacgac aagtgcgctg caataacaag caggcctcgg 129540  
 cgatttctcc ggcgtcttta ccttgacacat aataacttcc gccggtgtta ttgatggcgt 129600  
 tgattatata ttgtactagt gtggcgggcg taaacaagaa atagccgccg gtggccaaga 129660  
 gtatgcccg tctcctact tttaaacttt gcatgtaact atgtagacgg gggttttgct 129720  
 gcagtgcgtt ttgaacacct tcgggcgtgc gcacgttggg ttccgggaag ttttgtttga 129780  
 ctgcattgga tcgcgtctgc ttggtgtggt aattaaagtc tggcacgttg tccacgcgcc 129840  
 gcaattggct caatgagttt atttgagggg ctgaaatgcc ctgaaatact ccgcgtatgt 129900  
 tggggacatc attgttacga gtaattctgt ttatgtctga agtgctcaca aactgggtgt 129960  
 tagatagttg atagccggc tgaaatctgt tgtttccaat gttgcgtaca ctgggcgcgt 130020  
 tgagcacatt tgtgaaaccg gggggagtgc ttgttaaaag acgcgtatta tcagtaataa 130080



aactggcctg attaggatac aattttattga ctgcgcgaag atttgaaaaa aaactcattt 130140  
taaagcaaac ttattttaata aatatacac agtaaagggt ttgcaaaact gccgtcgtca 130200  
atacaacacg gcagcggcgt catgttggtta aaatctaata ttctccttgc tttagattct 130260  
ggcgagagaag gcgcatttgt tgtgtaagtt atttcgacgt ctgcattatt tgttgtgtaa 130320  
ggtatctcga cgtatgaagc aactttaaca ttgttataat tttttttaa tttgatgcg 130380  
ctccacggcg cgcgttgata cggatgatat ctctccattg tatgatcgct aaatttatat 130440  
accgtttcaa taaatatgtt aaaacccaac atgttaatta taatattcat aatagtttgt 130500  
ttgttttcaa taattatttt tactgttttg aaatctaaa gaggtgacga tgacgaatca 130560  
gacgacgggt tcagttgcta taacaaacca attggagtaa attttcgcga tcctactaga 130620  
tgtgacgctt tctacatgtg tgtcgggtta aatcaaaaat tagagttaat ctgcctgaa 130680  
ggatttgaat ttgatccaga tgttaaaaat tgtgttccta tatcagatta tggatgtacc 130740  
gctaaccaaa actaaaaata aaataaaatt tatatagatt aatgaaataa aatttatata 130800  
gattaataaa ataaaaatta tttaatatat tatactattt atattattta caacacttaa 130860  
cgtctagaca taacagtttg taacttagaa actaaatcag agttactgcg ctcaaactct 130920  
gaaaatttgg cttgagactc gccacactgc ttacgcaatt gttcttgcag attattcaca 130980  
gtcgaattga actcttctga tttcttggtta gattcttga agtcatagtt tgccttttgt 131040  
aaatctaatt cggcgacagc atgcttgtgt ttaagcataa tgtagtcgct gtttaacatg 131100  
gtcattttat gttcaacttg gctgggtctg gctcgcagct cggacagttc tttttgcaat 131160  
tgctccacat agttcaagtc cgtggtgtga ttgttgaccg tgttattttc taaaagctcg 131220  
cgccaatgct gtttgatgga atcctggtta cgagtgcgt taatgggcat aaattctaca 131280  
taccctgctt tattgtacac gcgacaatct gatgaagtag cgetgcaaaa acatttgtac 131340  
acagaattgt ccataattat cttgacataa caottgaaac acacagcatg gttacaatga 131400  
atcgaagtca caaacgagga atttacgttt ttagtgtctt taaaagtagt aaaacaaata 131460  
ttacacgaaa cctctacttc ttcttcgggt tctgattgct gctgctgctg ctgctgcggc 131520  
tgcggagact gcggcgaggc aaacaaatct gccgactgtg gtattacgta attcggcgaa 131580  
taagatggac tataagtggg agaccttggg gcaatctcat tcatcagctg agcctcaaga 131640  
tctaaacctc gttgcagagc cctctgcgca gctgtctccg acgcaatgtt atcctggtac 131700  
tgctgggcag tgatgtcggg aaaccgttca cgatccacat ttctactatt aattagtatg 131760  
acgtcatcct cttgacttaa tagcggatcg tcattgctaa tgtaacctg accgtgcacg 131820  
taatcgtga caccctgacg atggtaggtg cgcgtcaacg gctcgttgac gttcccgata 131880  
atctgcacgt tttcttctgt gacacgctgc tectgacgcc gctcctgacg gcgatggctg 131940  
cgactgcttg aagacggctg gctgcgactg cttgaagacg gctgggcttc gggagatgtt 132000  
gtaaagtga tgcggcgacg gctgagagac agcctgtggc ggcggctgct gctgggagtg 132060

gcggcgttga tttggcgact catggctggg ctggtaggat actgttcact aggctgtgag 132120  
gcttgaactg tgcttacgag tagaacggca gctgtattta tactgtttat cagtactgca 132180  
cgactgataa gacaatagtg gtgggggaac ttgccaggca aaaatgaact tttttgtaat 132240  
gcaaaaaagt tgatagtgtg gtagtatatt gggagcgtat cgtacagtg agactattct 132300  
aataaaatag tctacgattt gtagagattg tactgtatat ggagtgtcag gcaaaagtga 132360  
acttttttgc attgcaaaaa aattcatttt aaatttatca tatcacaggc tgcagtttct 132420  
gttatctgtc cccactcag gcgtgcagct ataaaagcag gcactcacca actcgtaac 132480  
acagttcgtt gtgaagtga cacggagagc ctgccataa gcaaaatgcc aaggacacc 132540  
aacaatcgcc accggtctac gccatatgaa cgtcctacgc ttgaagatct ccgcagacag 132600  
ttgcaagaca atttgacag cataaaccgc cgagacagaa tgcaagaaga acaagaaga 132660  
aacctgcgct atcaagtgcg tagaaggcag cgtcaaaacc agctccgctc catacaaatg 132720  
gaacagcagc gaatgatggc ggaattaaac aacgagccgg tgattaattt taaatttgag 132780  
tgtagtgtgt gtttagaaac atattcccaa caatctaacg atacttgtcc ttttttgatt 132840  
ccgactacgt gcgaccacgg tttttgtttc aaatgcgtca tcaatctgca aagcaacgag 132900  
atgaatatcc cgcattccac tgtgtgctgt ccattgtgca ataccaggt aaaaatgtgg 132960  
cgttccttaa agcctaacgc tggtgtgacg tgtaagtttt acaagaaaac tcaagaaaga 133020  
gttccgcccc tgcagcagta taaaacatt attaaagtgc tacaagaacg gagcgtgatt 133080  
agtgtcgaag acaacgacaa taattgtgac ataaatatgg agaatacagg aaagatagct 133140  
gctttggaag ctgaattgga agaagaaaaa aatcacagt atcaagtagc ttctgaaaac 133200  
cgacagctga tagaagaaaa tactcgtctc aatgaacaga ttcaagagtt gcagcatcag 133260  
gtgaggacat tgggtgccga acgtggcatt acggttaatc agcaaattgg ccgtgacgac 133320  
agtgcgccag ccgagctgaa cgagcgtttt cgctcacttg tctattcgac tatttcagag 133380  
ctgtttattg aaaatggcgt tcatagtatt caaaattatg tttatgccgg aacttctgct 133440  
gctagttcat gtgatgtaa tgttactgtt aattttgggt ttgaaaatta atgtgatag 133500  
aaatgtatat ataaaaatga tggaataaat aataaacatt tttatacttt ttatgttttt 133560  
tttatttcat gtgattaaga aacttttaag atggatagta gtaattgtat taaaatagat 133620  
gtaaaatacg atatgccgtt acattatcaa tgtgacaata acgcagataa agacgttgta 133680  
aatgcgtatg acaactatga tggtgacccc aacaaaagat ttataattaa tcataatcac 133740  
gaacaacaac aagtcaatga aacaaataaa caagttgtcg ataaaacatt cataaatgac 133800  
acagcaacat acaattcttg cataataaaa atttaaatga catcatattt gagaataaca 133860  
aatgacatta tccctcgatt gtgttttaca agta 133894

<210> 2  
<211> 45  
5 <212> ADN  
<213> artificial

<220>  
<223> cebador directo vp39-F

<400> 2  
 gcttctaata cgactcacta tagggtcgta tccgctaagc gttct 45  
 <210> 3  
 5 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 <220>  
 10 <223> cebador inverso vp39-R  
 <400> 3  
 gcttctaata cgactcacta tagggacgca acgcgttata cacag 45  
 15 <210> 4  
 <211> 43  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 20 <220>  
 <223> cebador directo 45510  
 <400> 4  
 25 ctcttaatac gactcactat agggacagcg tgtacgagtg cat 43  
 <210> 5  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 30 <220>  
 <223> cebador inverso 46235  
 <400> 5  
 35 gcttctaata cgactcacta tagggatctc gagcgtgtag ctggt 45  
 <210> 6  
 <211> 44  
 <212> ADN  
 40 <213> artificial  
 <220>  
 <223> cebador directo 90292  
 45 <400> 6  
 gcttctaata cgactcacta tagggatccg ccgaacatta cacc 44  
 <210> 7  
 <211> 43  
 50 <212> ADN  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> cebador inverso 90889  
 55 <400> 7  
 gcttctaata cgactcacta tagggctctat tggcacgttt get 43  
 <210> 8  
 60 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> artificial

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

5 <400> 8  
gcttctaata cgactcacta tagggaaagc agacactcgg cagat 45

<210> 9  
<211> 45  
<212> ADN  
10 <213> artificial

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

15 <400> 9  
gcttctaata cgactcacta taggggtgag tggcttcaac ctgag 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  
30 <211> 44  
<212> ADN  
<213> artificial

<220>  
35 <223> cebador inverso dbp-R

<400> 11  
gcttctaata cgactcacta tagggaaaga tcggaaggtg gtga 44

40 <210> 12  
<211> 45  
<212> ADN  
<213> artificial

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

<400> 12  
50 gcttctaata cgactcacta tagggctgac cctgaagtc atctg 45

<210> 13  
<211> 44  
<212> ADN  
<213> artificial

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

<400> 13  
60 gcttctaata cgactcacta tagggaactc 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  
 ctgtattgta atctgtaagc gcacatgggtg cattcgatat aaccttataa tgtgtgctgg 60

30 aatgccct 68

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

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

40 <400> 17  
 aaatgtactg aatataaata aaaattaaaa atatattata attttttatt taccgttcgt 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

<400> 19  
 5 tgtataaaca atatgttaat atgtg 25

<210> 20  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> artificial

10 <220>  
 <223> cebador directo gfp-NheI-F

<400> 20  
 15 ccaaaccgct agcaacatgg tgagcaaggg cgag 34

<210> 21  
 <211> 49  
 <212> ADN  
 20 <213> artificial

<220>  
 <223> cebador inverso gfp-SphI

25 <400> 21  
 aggaaagggc 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  
 ccttctatct 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 ctcaatatga acgattccaa ttctc 35

<210> 25  
 <211> 69  
 <212> ADN

<213> artificial  
 <220>  
 <223> cebador inverso vp80-FLAG-R1  
 5  
 <400> 25  
 caacagagaa ttggaatcgt tcttatcgtc gtcacacctg taatccatat tataagggtta 60  
 tctcgaatg 69  
 <210> 26  
 10 <211> 62  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> cebador inverso vp80-FLAG-R  
 15  
 <400> 26  
 ccttctatct agattactta tcgtcgtcat ccttgtaatc tataacattg tagtttgcgt 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  
 agcggataac aatttcacac agg 23  
 40  
 <210> 29  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 45  
 <220>  
 <223> cebador inverso GenR  
 <400> 29  
 50 agccacctac tccaacatc 20  
 <210> 30  
 <211> 71  
 <212> ADN  
 55 <213> artificial  
 <220>  
 <223> cebador directo vp39-KO-F  
 60 <400> 30

tcgggcacag acgcgaccag acccgtttcg tcaattatac acgtggcgca taccgttcgt 60  
ataatgtatg c 71

<210> 31  
<211> 70  
5 <212> ADN  
<213> artificial

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

<400> 31  
gtttatttgc aacaaccacc tcataaaacg ttttaaaatg tcaaaaatgt accgttcgta 60  
tagcatacat 70

<210> 32  
15 <211> 33  
<212> ADN  
<213> artificial

<220>  
20 <223> cebador directo vp39-SacI-F

<400> 32  
aaggttctct agattagacg gctattcctc cac 33

<210> 33  
25 <211> 32  
<212> ADN  
<213> artificial

<220>  
30 <223> cebador inverso vp39-XbaI-R

<400> 33  
35 ttatcttgag ctcaatatgg cgctagtgcc cg 32

<210> 34  
<211> 39  
<212> ADN  
40 <213> artificial

<220>  
<223> cebador directo vp39-StuI-F

<400> 34  
45 ggaacaaagg cctgagctct tagacggcta ttctccac 39

<210> 35  
<211> 34  
<212> ADN  
50 <213> artificial

<220>  
<223> cebador inverso lef-4-XbaI-R

<400> 35  
55 cttctatct agattaattt ggcacgattc ggtc 34

<210> 36  
<211> 39



<212> ADN  
 <213> artificial  
  
 <220>  
 5 <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 tgcccgtagg 60  
 t 61  
 20 <210> 38  
 <211> 72  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
  
 25 <220>  
 <223> cebador directo vp1054-KO-F  
  
 <400> 38  
 30 gtactgaaag ataatttatt tttagatagat aataattaca ttattttaaa cgtgttcgac 60  
 caagaaaccg at 72  
  
 <210> 39  
 35 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
  
 <220>  
 40 <223> cebador inverso vp1054-KO-R1  
  
 <400> 39  
 agggcgaatt ccagcacact ttattacgtg gacgcgttac ttgc 45  
  
 45 <210> 40  
 <211> 71  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
  
 50 <220>  
 <223> cebador inverso vp1054-KO-R2  
  
 <400> 40  
 gataagaatg cttgtttaac aaataggtea gctgttaaact actggcgatg taccgttcgt 60  
 atagcatata t 71  
 55 <210> 41  
 <211> 41  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 60

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

5 <400> 41  
 ggttgtag gcctgagctc cttgtgtacg tgtagagtg t 41

<210> 42  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 10 <213> artificial

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

15 <400> 42  
 tccttcctc tagattacac gttgtgtcgc tgcaga 36

<210> 43  
 <211> 67  
 20 <212> ADN  
 <213> artificial

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

25 <400> 43  
 gcttcgttca ttgcgtactg tcggctgtgt ggaatgtctg gttgttaagt gtgctggaat 60

30 tcgccct 67

<210> 44  
 <211> 70  
 <212> ADN  
 <213> artificial

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

<400> 44  
 aatattaata aggtaaaaat tacagctaca taaattacac aatttaaact accgttcgta 60

40 tagcatacat 70

<210> 45  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 45 <213> artificial

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

50 <400> 45  
 ttgaattca tgggtgcccg aagctccaag ac 32

<210> 46  
 <211> 34  
 55 <212> ADN  
 <213> artificial

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

60 <400> 46

tttgcggccg cttaatagta gcgtgttctg taac 34

<210> 47  
<211> 29  
5 <212> ADN  
<213> artificial

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

10 <400> 47  
tttgaattca tgtatcgctg tcgttcac 29

<210> 48  
15 <211> 34  
<212> ADN  
<213> artificial

<220>  
20 <223> cebador inverso Se-p6.9-R

<400> 48  
25 tttgcggccg cttaatagtg gcgacgtctg tatc 34

<210> 49  
<211> 22  
<212> ADN  
30 <213> artificial

<220>  
<223> cebador directo 86596

<400> 49  
35 gggcttagtt taaaatcttg ca 22

<210> 50  
<211> 21  
40 <212> ADN  
<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  
  
 <400> 52  
 5 cgataatttt tccaagcgct ac 22  
  
 <210> 53  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 10 <213> artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador directo pp6.9-F  
  
 15 <400> 53  
 ggtcgcgta ccaaattccg tttgcgacg 30  
  
 <210> 54  
 <211> 34  
 20 <212> ADN  
 <213> artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador inverso pp6.9-R  
 25  
 <400> 54  
 ggtcgcgga tccgtttaa ttgtgaatt tatg 34  
  
 <210> 55  
 30 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
  
 <220>  
 35 <223> cebador directo 75834  
  
 <400> 55  
 cttctatcg ggtgtacaa c 21  
  
 40 <210> 56  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
  
 45 <220>  
 <223> cebador inverso 76420  
  
 <400> 56  
 50 gcgtatcatg acgatgatg 20

## 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
  - 5 (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
  - 15 dsRNA se expresa opcionalmente bajo un promotor inducible.
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.
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
- 20 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.

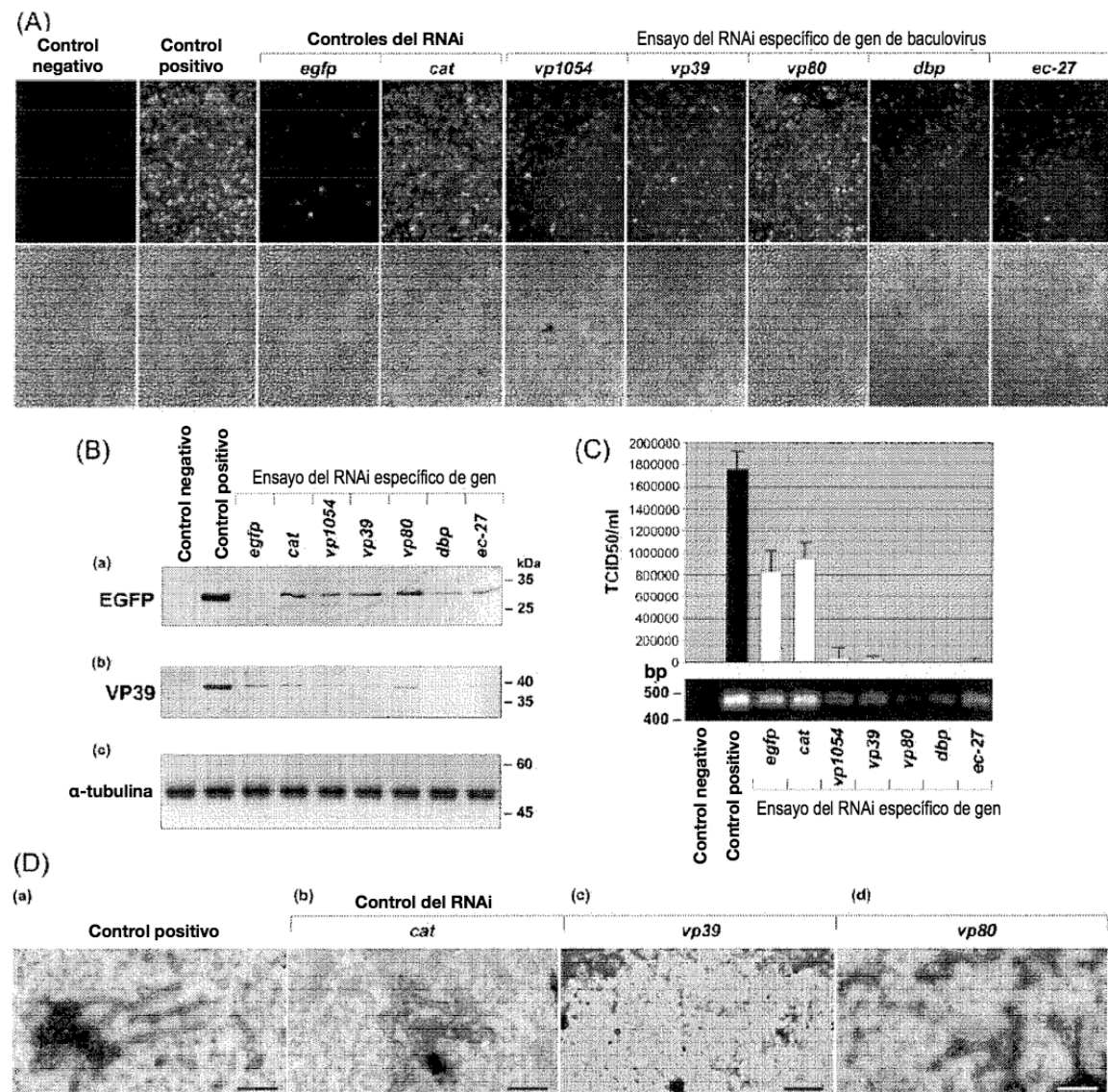
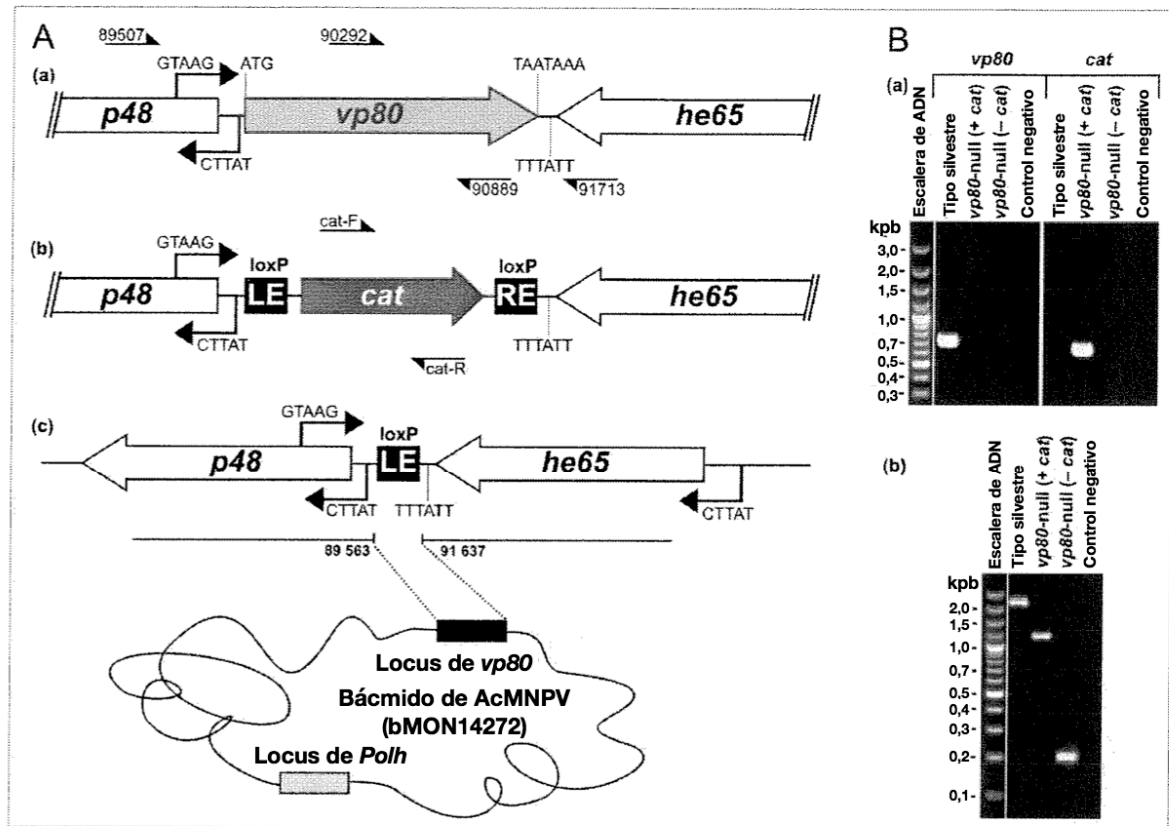


Fig 1



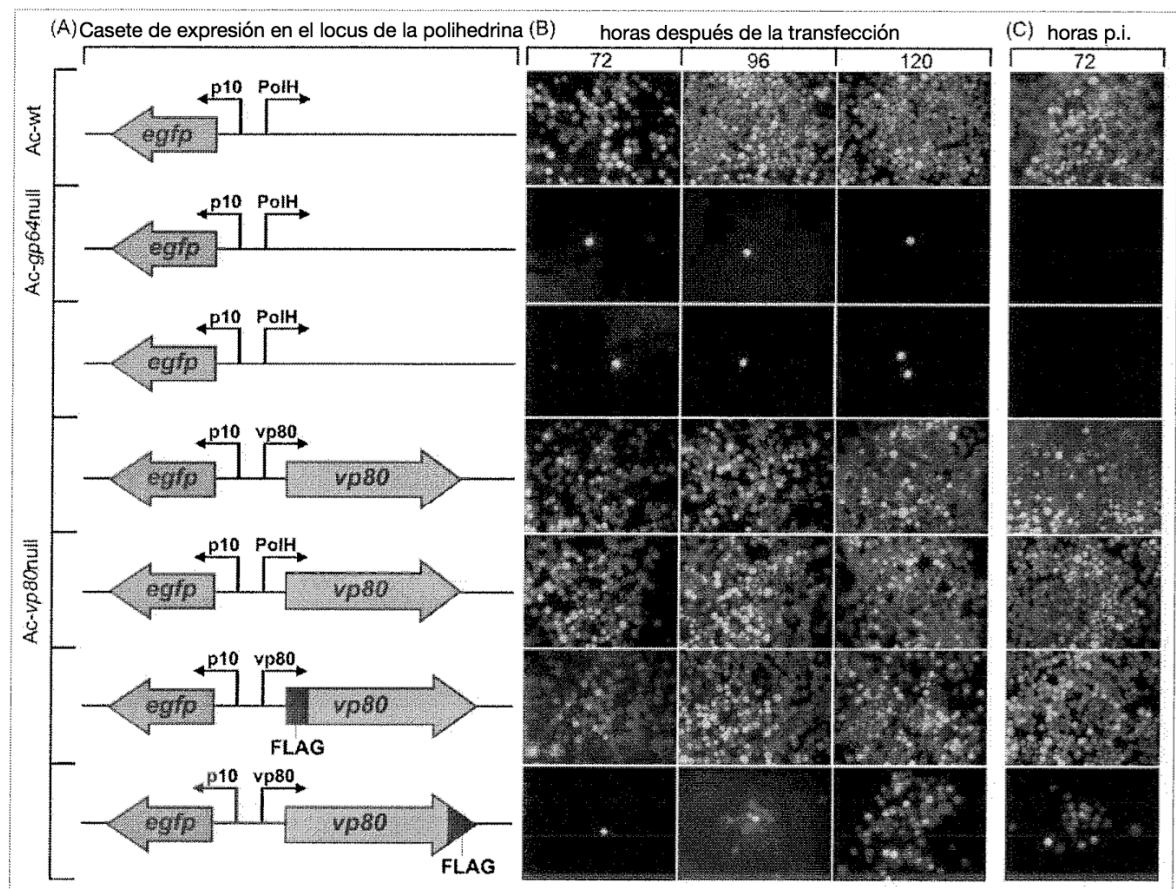


Fig 3



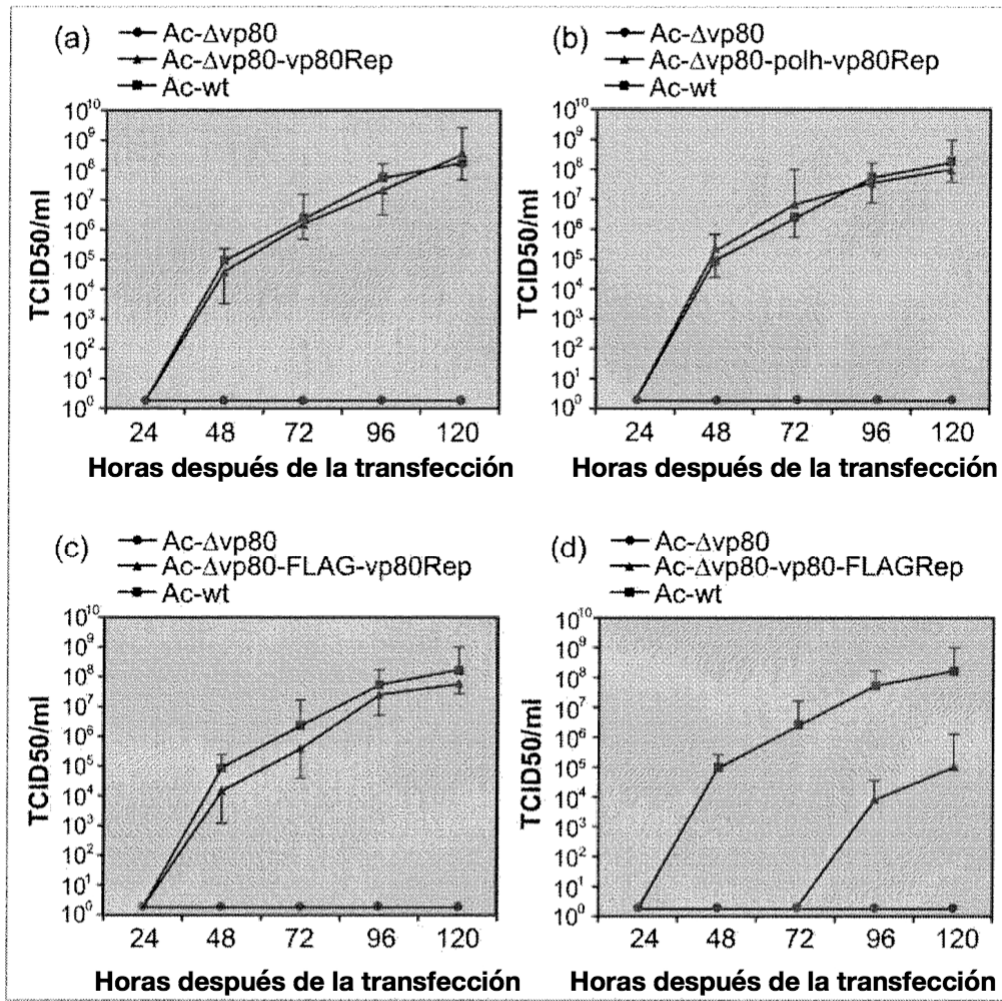
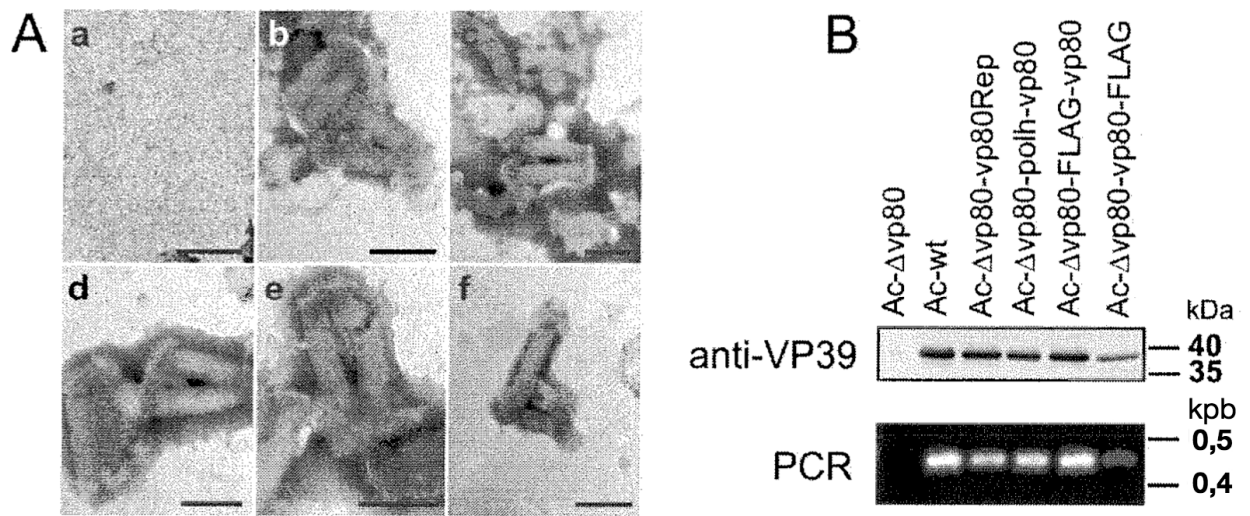
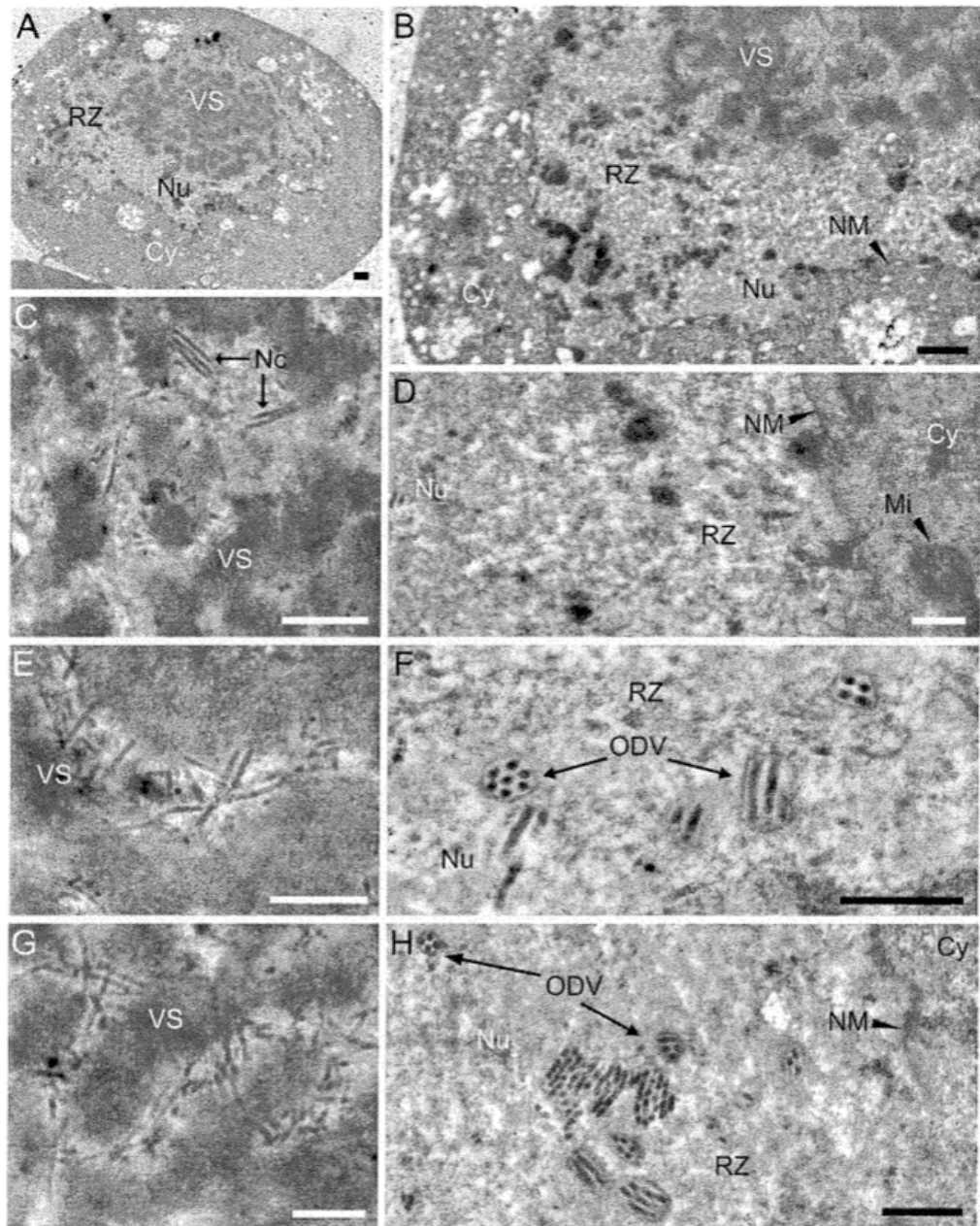


Fig 4



**Fig 5**



**Fig 6**

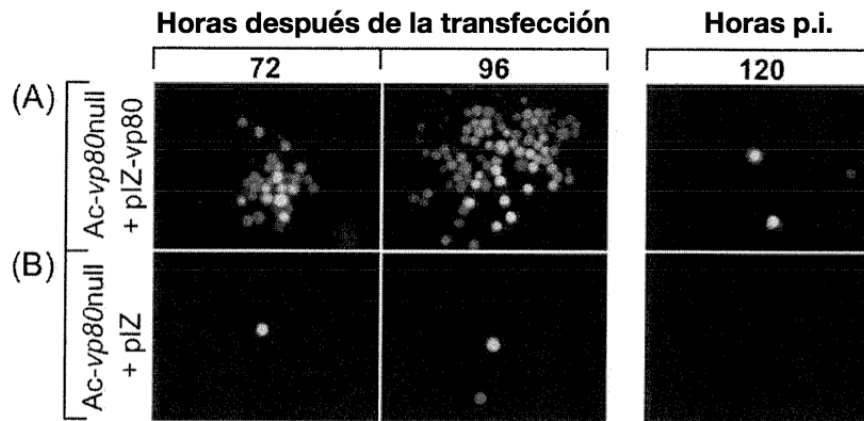


Fig 7

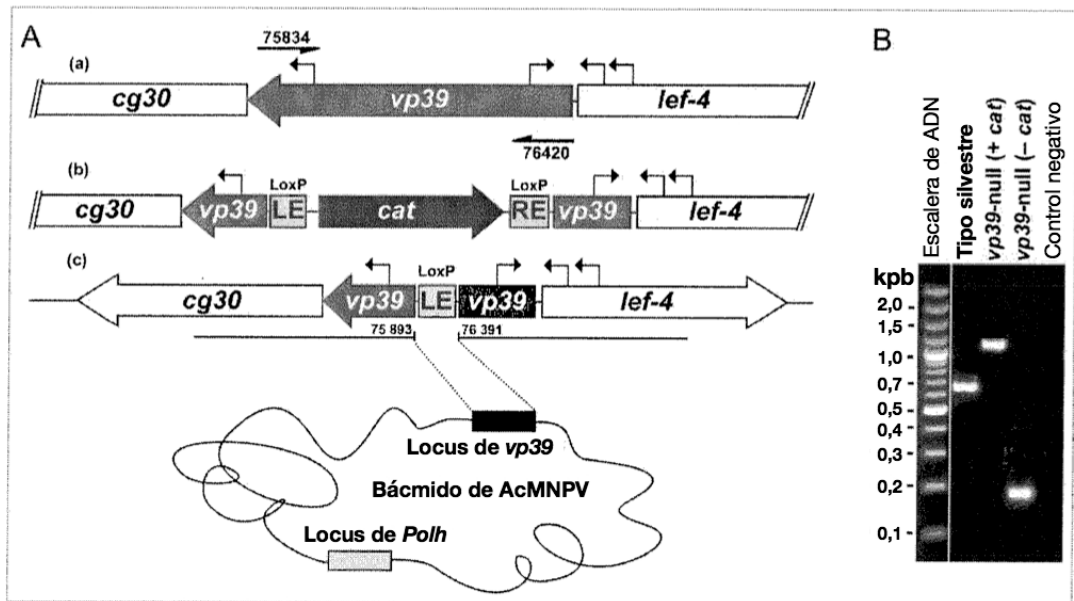


Fig 8

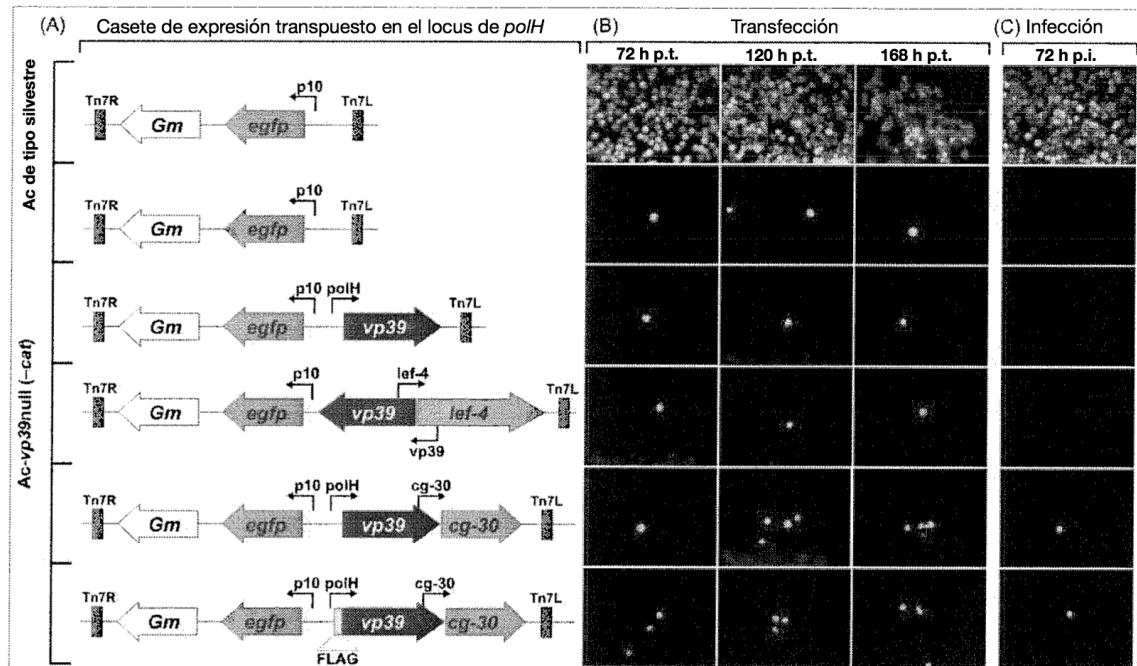
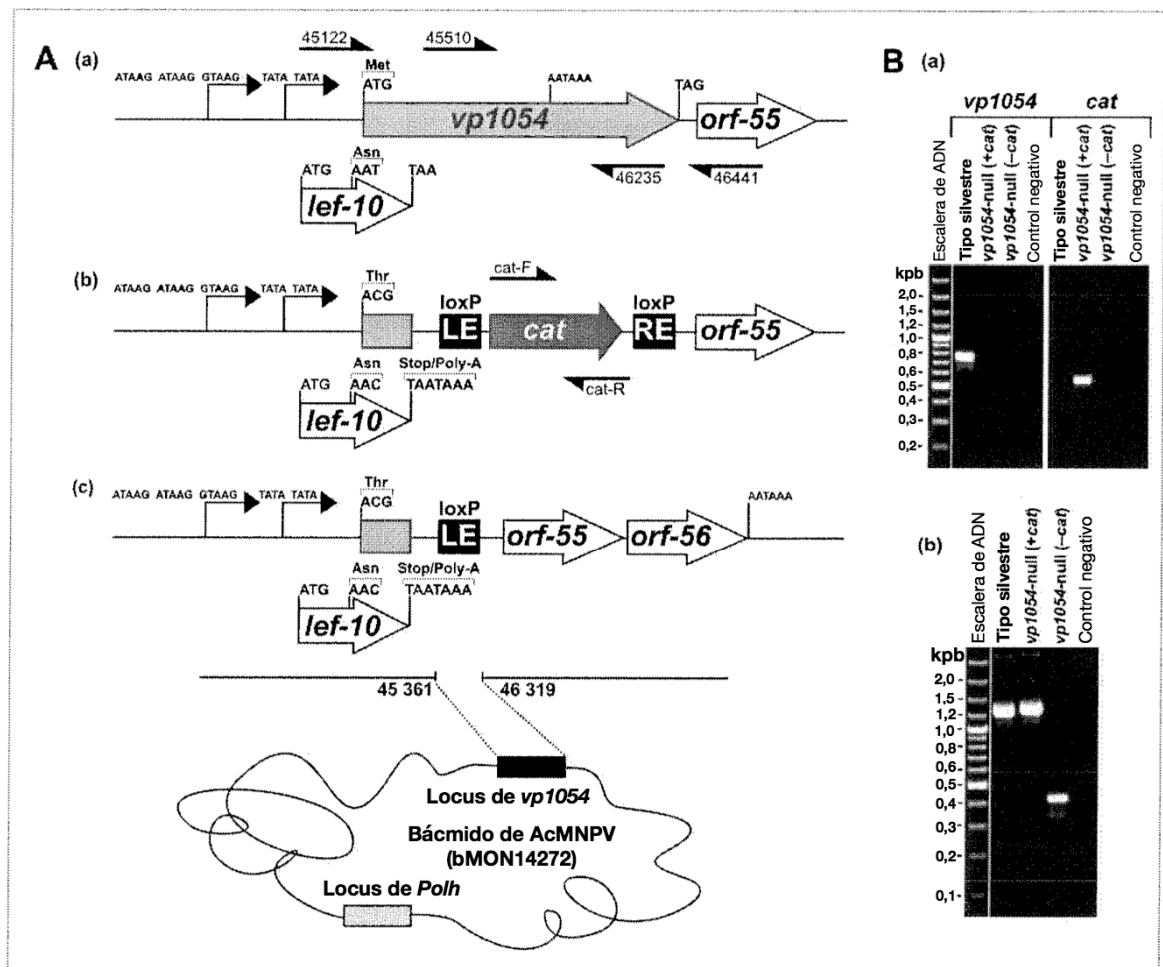


Fig 9



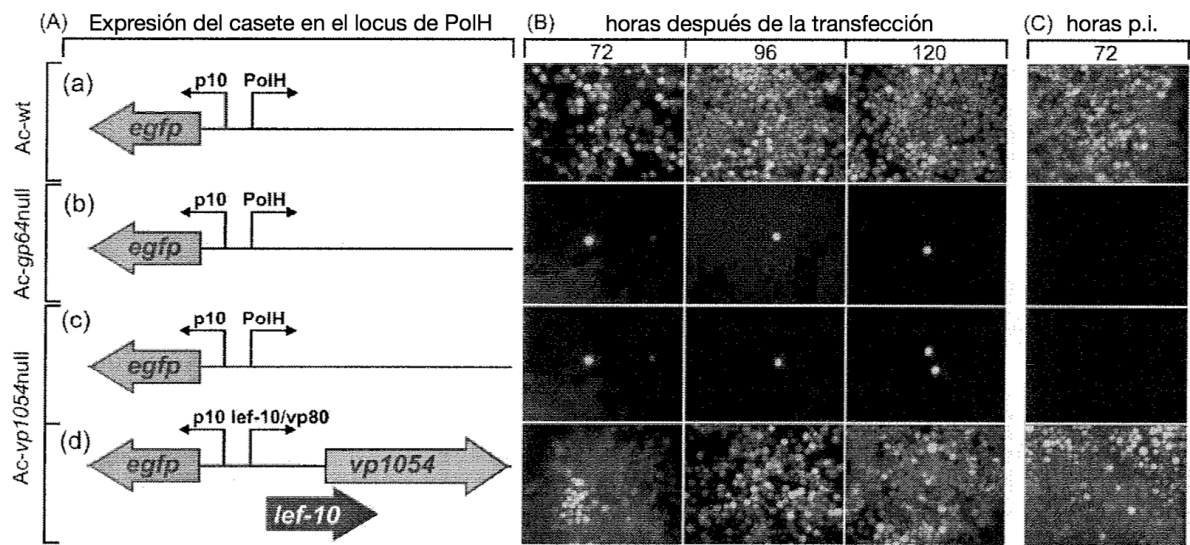
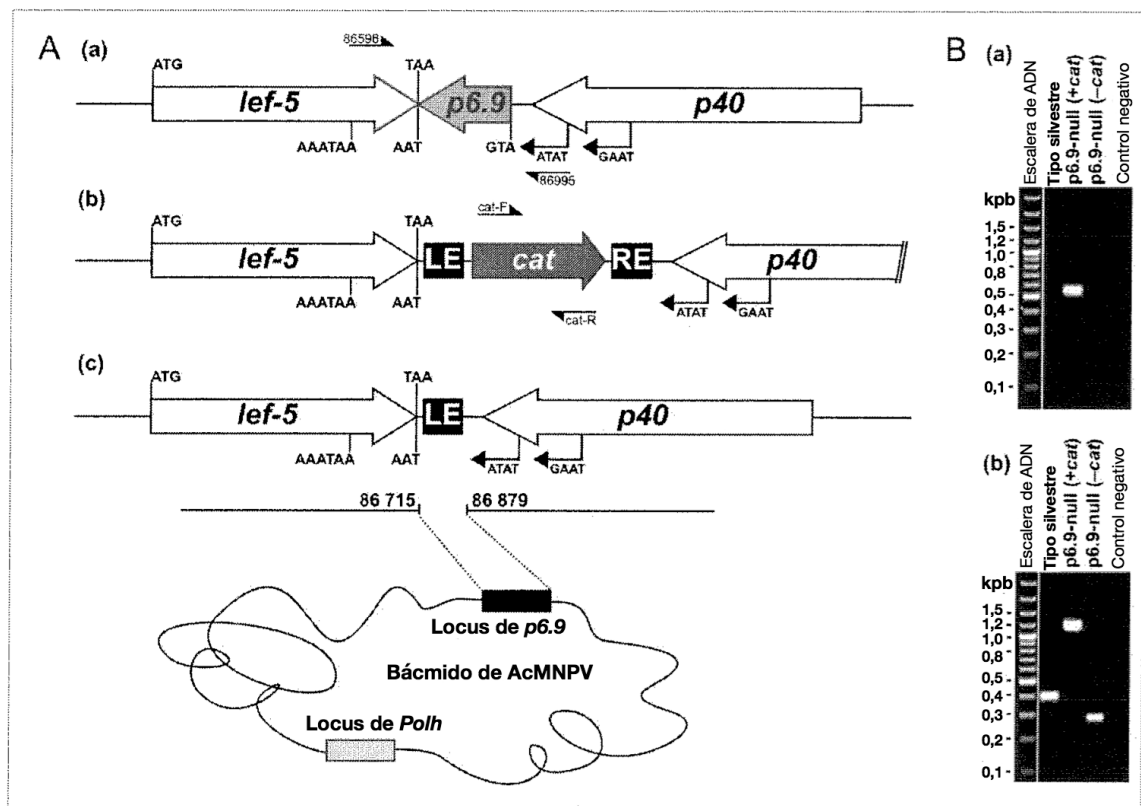


Fig 11





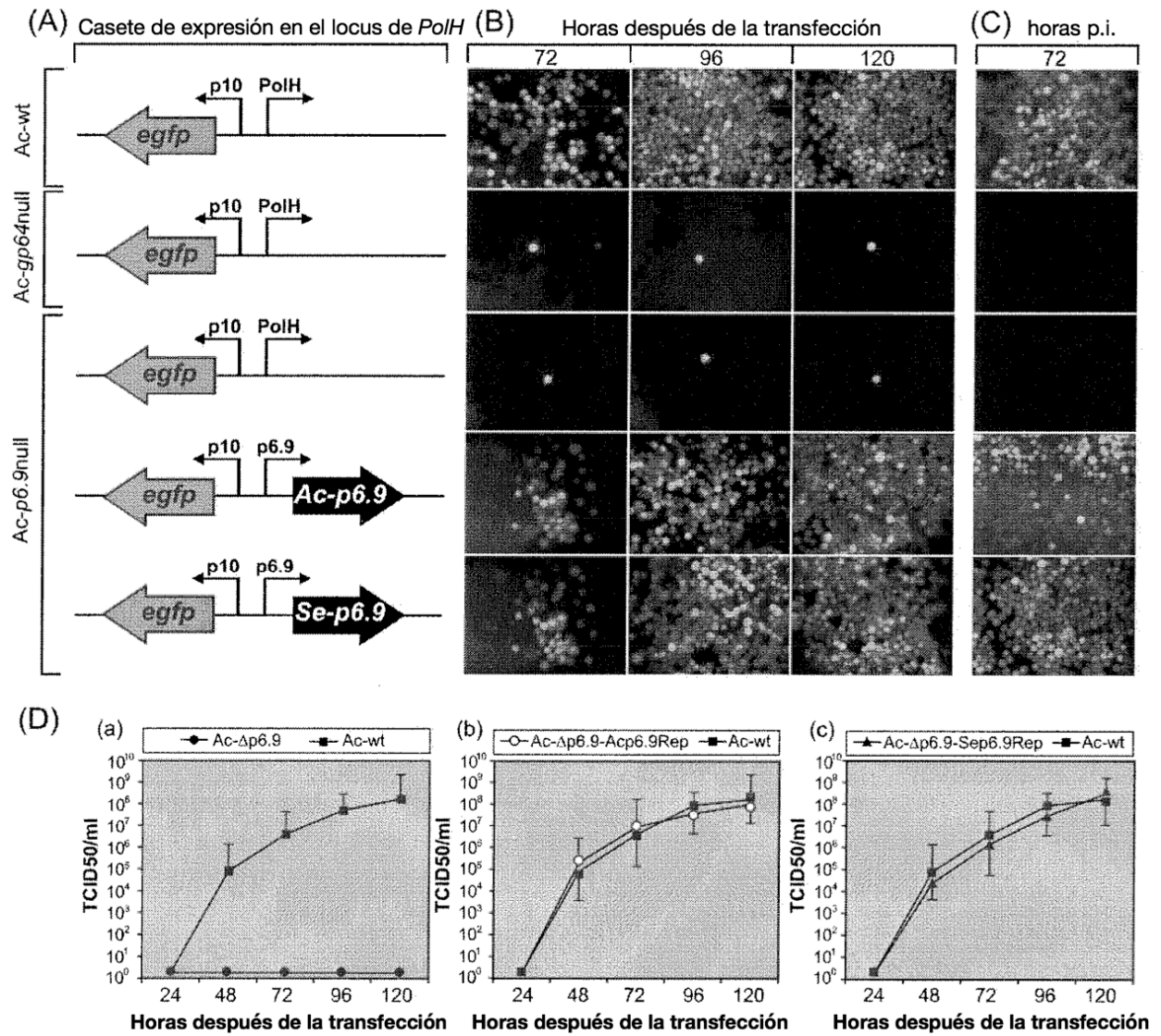
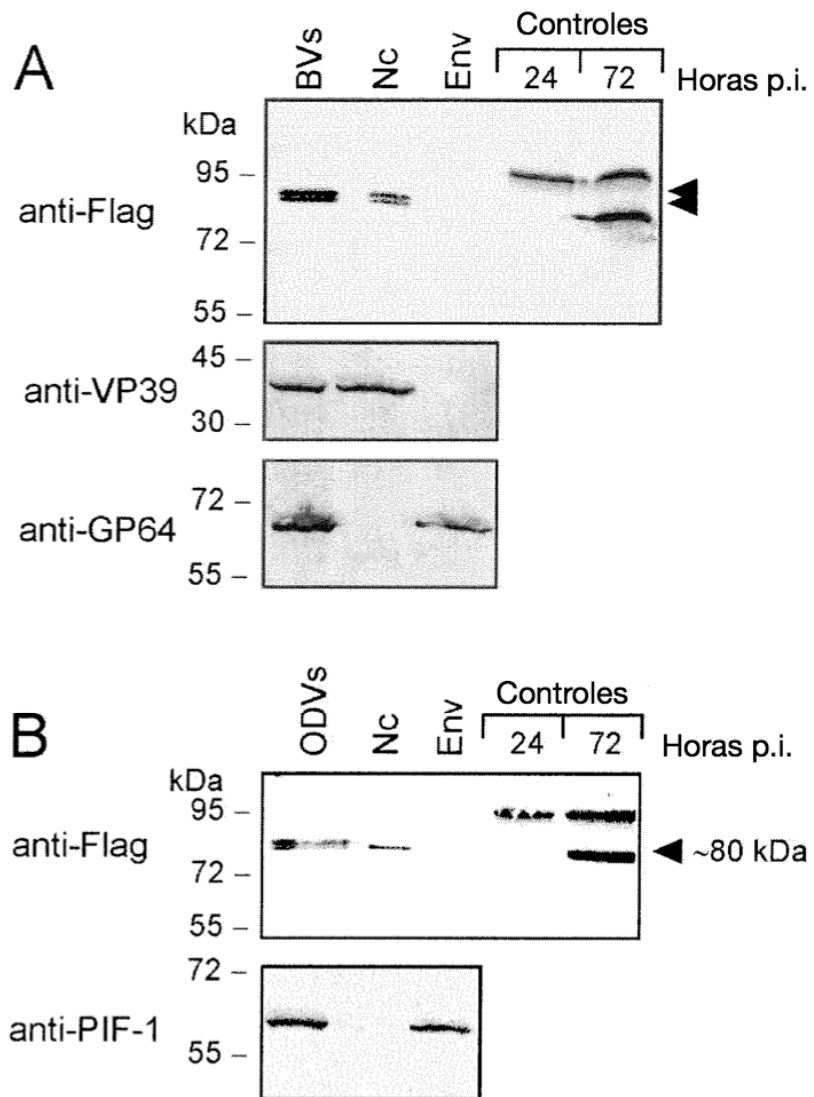
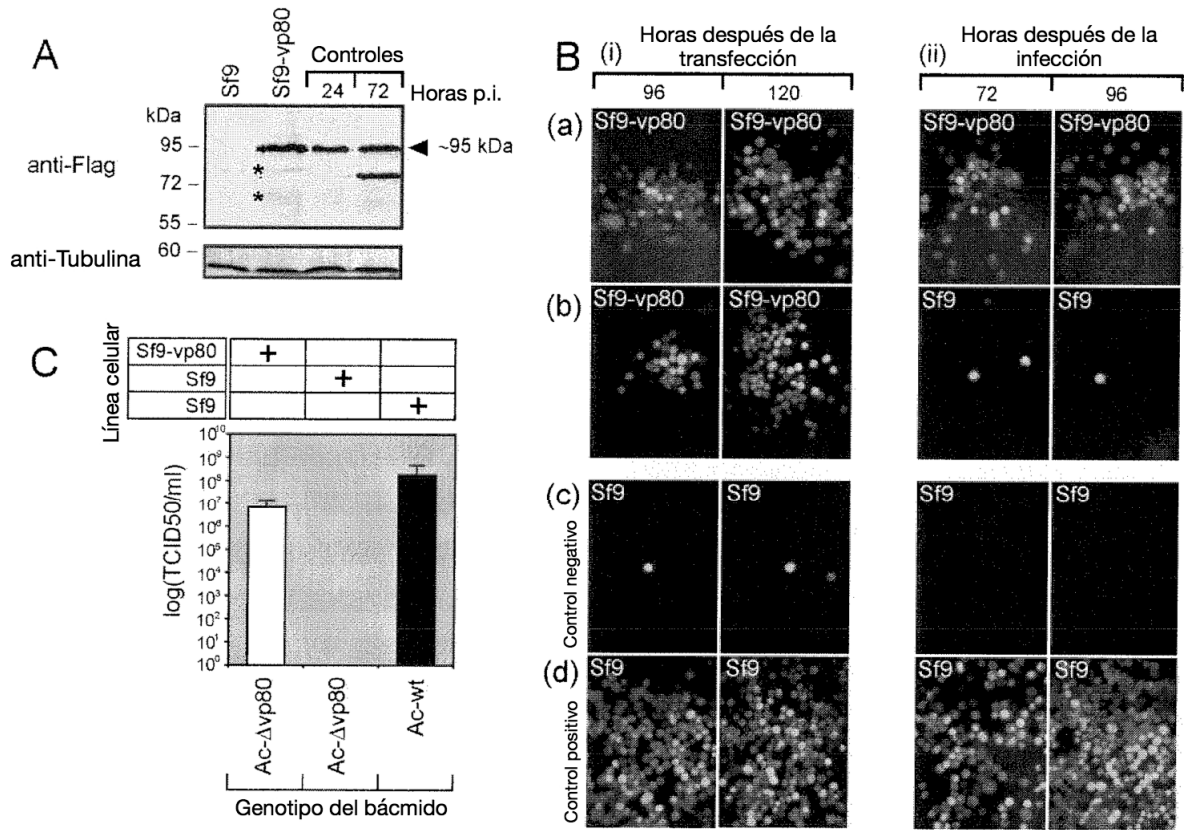


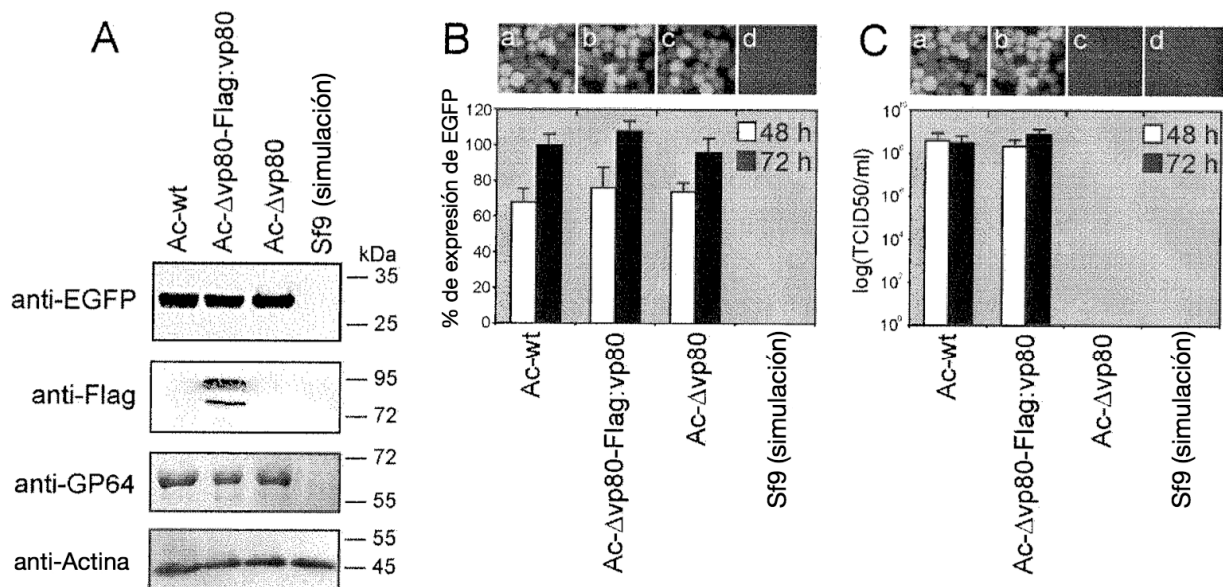
Fig 13



**Fig. 14**



**Fig. 15**



**Fig. 16**

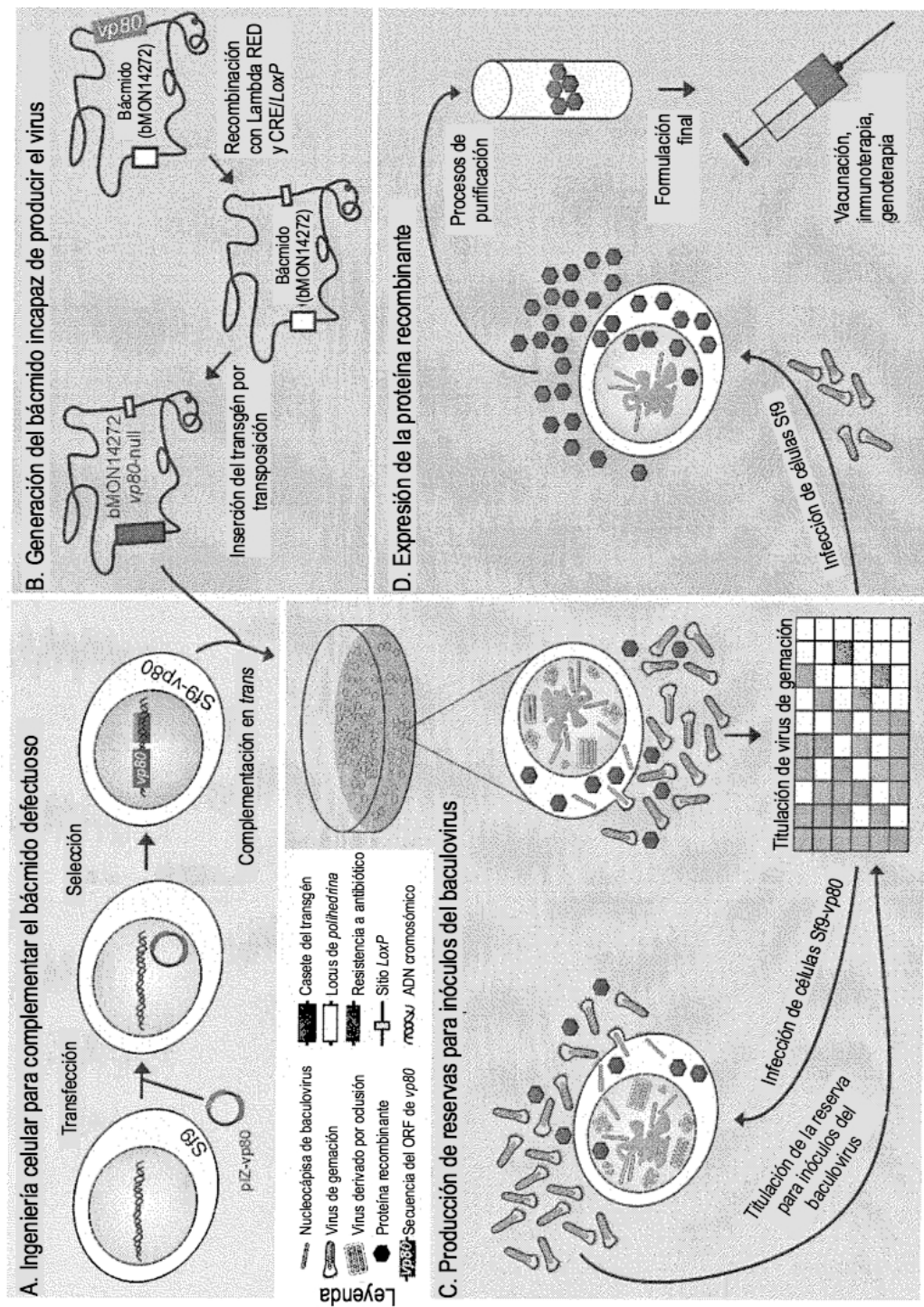


Fig. 17