

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 702**

51 Int. Cl.:

C12N 15/65 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.07.2009 E 09798313 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2015 EP 2310510**

54 Título: **Vacunas en forma de ADN*i* y métodos para utilizarlas**

30 Prioridad:

17.07.2008 US 81482 P

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

02.09.2015

73 Titular/es:

**MEDIGEN, INC. (100.0%)
8420 Gas House Pike, Suite S
Frederick MD 21701, US**

72 Inventor/es:

**PUSHKO, PETER y
LUKASHEVICH, IGOR**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 544 702 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

Vacunas en forma de ADN y métodos para utilizarlas

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 Varias realizaciones descritas en la presente se refieren a vacunas víricas atenuadas vivas y sistemas y métodos para producir y administrar tales vacunas.

ANTECEDENTES

10 En la siguiente discusión, se hace referencia a ciertas estructuras y/o métodos. Sin embargo, las siguientes referencias no se deben interpretar como una admisión de que esas estructuras y/o métodos constituyen la técnica anterior. Los solicitantes se reservan expresamente el derecho de demostrar que tales estructuras y/o métodos no se consideran la técnica anterior.

Muchos virus con ARN, incluidos el virus de la fiebre amarilla (YF, por sus siglas en inglés), el virus de la encefalitis equina venezolana (VEE, por sus siglas en inglés) son peligrosos patógenos humanos. VEE es un patógeno con prioridad de la categoría B e YF es un patógeno con prioridad de la categoría C, según la clasificación de NIH/NIAID.

15 El virus VEE es un arbovirus con ARN monocatenario positivo que pertenece al género *Alphavirus* de la familia *Togaviridae*. El virus se transmite principalmente mediante los mosquitos, que pican a un animal infectado y posteriormente pican a otro animal o ser humano y se alimentan de este. El VEE es raro en los EE. UU. En Texas tuvo lugar una epizootia en caballos importante, pero tan solo se han documentado aproximadamente 100 casos confirmados por laboratorio en seres humanos. Sin embargo, el cambio climático puede favorecer el establecimiento del virus en áreas más cálidas de los EE. UU. Además, el VEE es un arma biológica y un agente de bioterrorismo potencial.

20 El virus YF también es un arbovirus con ARN monocatenario positivo. Sin embargo, a diferencia del VEE, el virus YF pertenece a la familia *Flaviviridae*. La enfermedad de YF ocurre principalmente en África y Sudamérica. La infección en seres humanos comienza tras el depósito de partículas víricas por parte de un mosquito infectado a través de la piel. A menudo la enfermedad es grave. Pueden ocurrir casos más moderados como resultado de una infección previa por parte de otro flavivirus. Existe una diferencia entre brotes de la enfermedad en áreas rurales o forestales y en áreas urbanas (Barnett, 2007). Los brotes de la enfermedad en pueblos y con gente no nativa pueden ser más serios debido a unas densidades de los mosquitos vectores más elevadas y densidades de población más elevadas. Con fecha de 2001, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que el virus YF causa 200 000 manifestaciones clínicas y 30 000 fallecimientos cada año en las poblaciones no vacunadas. En la mayoría de los casos, los pacientes con YF requieren un tratamiento sintomático. En los casos graves se utilizan la reposición de fluidos, transfusión de derivados sanguíneos y otras medidas.

35 Se han desarrollado virus atenuados vivos para su utilización como vacunas con muchos virus con ARN tales como los virus VEE, YF, de la poliomielitis, de la gripe, del sarampión, de la rabia y de la rubeola. Las vacunas con virus con ARN atenuados vivos tradicionales comprenden virus con ARN atenuados vivos que se inyectan en el receptor de la vacuna. El virus inyectado suministra su genoma de ARN al interior de las células, lo que da lugar a la producción de antígenos víricos así como también de una progenie de virus atenuados en los tejidos del receptor de la vacuna. Esto conlleva la generación de una respuesta inmunitaria que protege contra los virus no atenuados homólogos.

40 La técnica anterior incluye el artículo *J. Experimental Medicine*, 203(2), 413-424, 2006, que divulga una vacuna contra el virus de la fiebre amarilla basada en la cepa YF17D atenuada viva.

COMPENDIO

La materia en cuestión para la que se busca protección es tal y como se define en las reivindicaciones. En particular, la presente invención proporciona un vector plasmídico que comprende:

- 45 (a) un promotor de la ARN polimerasa, ligado operablemente a un ADN que codifica una molécula de ARN infeccioso; y
- (b) una cola de poli-A en dirección 3' respecto a dicho ADN
- donde:
- (i) la molécula de ARN codifica un virus de la fiebre amarilla (YF) atenuado; y

(ii) el promotor de la ARN polimerasa es adecuado para la expresión en células de mamífero.

5 Esta solicitud proporciona vectores que comprenden ADN que codifica una molécula de ARN infeccioso y un promotor de la ARN polimerasa, donde el ADN que codifica una molécula de ARN infeccioso está ligado operablemente al promotor de la ARN polimerasa y la molécula de ARN infeccioso codifica un virus de la fiebre amarilla (YF). En ciertas realizaciones, el virus YF no es patógeno. También se describen vacunas contra la fiebre amarilla (YF) que comprenden los vectores descritos anteriormente y los métodos para utilizar las vacunas para inmunizar contra un virus de YF. También se divulgan virus atenuados vivos purificados clonalmente homogéneos preparados a partir de células cultivadas transfectadas con el vector, vacunas contra YF que los comprenden y métodos para utilizar las vacunas para inmunizar contra un virus YF.

10 Aunque no es parte de la invención reivindicada, esta solicitud divulga vectores que comprenden ADN que codifica una molécula de ARN infeccioso y un promotor de la ARN polimerasa, donde el ADN que codifica una molécula de ARN infeccioso está ligado operablemente al promotor de la ARN polimerasa y la molécula de ARN infeccioso codifica un virus de la encefalitis equina venezolana (VEE). El virus de la VEE podrá no ser patógeno. También se describen vacunas contra la encefalitis equina venezolana (VEE) que comprenden los vectores descritos anteriormente y métodos para utilizar las vacunas para inmunizar contra un virus VEE. También se describen virus atenuados vivos purificados clonalmente homogéneos preparados a partir de células cultivadas transfectadas con el vector, vacunas contra VEE que los comprenden y métodos para utilizar las vacunas para inmunizar contra un virus VEE.

20 Aunque no es parte de la invención reivindicada, esta solicitud divulga vectores que comprenden un ADN que codifica una molécula de ARN infeccioso y un promotor de la ARN polimerasa de citomegalovirus (CMV), donde el ADN que codifica una molécula de ARN infeccioso está ligada operablemente al promotor de la ARN polimerasa de CMV, el promotor de la ARN polimerasa de CMV está ubicado entre aproximadamente 12 y aproximadamente 18 residuos de ácido nucleico en dirección 5' respecto al extremo 5' de dicho ADN que codifica una molécula de ARN infeccioso, y la molécula de ARN infeccioso codifica un virus con ARN atenuado. El virus con ARN atenuado podrá ser un alfavirus o un flavivirus.

Aunque no es parte de la invención reivindicada, esta solicitud divulga métodos para atenuar un virus con ARN, que comprende insertar dos promotores de ARN dependientes de ARN en el ADNc que codifica el virus con ARN, con lo que la nucleocápside y las glucoproteínas se expresan por separado a partir de promotores independientes.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

30 Figura 1. Representación esquemática de vacunas TC-83 contra VEE basadas en un ADNi. (A) El ADNc completo que corresponde al genoma de ARN de TC-83 se clona en el ADN que contiene un promotor de la ARN polimerasa dependiente de ADN, por ejemplo, un promotor CMV. Se muestra la ubicación de las secuencias del promotor CMV, promotor 26S, poliA, terminación de la transcripción y ribozima (opcional). (B) Ejemplo de la vacuna con TC-83 basadas en ADNi, en la que se expresan los genes de la cápside y glucoproteína de TC-83 a partir de promotores independientes. Se muestra la ubicación de los promotores. Se puede modificar el sitio de inicio de la transcripción variando la distancia entre el extremo 3' del promotor CMV y el extremo 5' de la secuencia codificante de TC-83.

40 Figura 2. Administración de la vacuna en forma de ADNi de TC-83 al interior de células *in vitro* o *in vivo*. Se muestra la inyección de la vacuna en forma de ADN de TC-83 controlado por promotor de la ARN polimerasa dependiente de ADN (remítase a la Figura 1) al interior de las células *in vitro* o *in vivo*. Como consecuencia de la administración de la vacuna en forma de ADNi de TC-83, se genera una vacuna TC-83 con un virus atenuado vivo. Si se administra *in vivo*, la producción de la vacuna TC-83 en los tejidos del paciente provoca una respuesta inmunitaria contra la vacuna TC-83.

45 Figura 3. Representación esquemática de una vacuna con YF17D basada en ADNi. Se clona el ADNc completo correspondiente al genoma de ARN de 17D en el ADN que contiene el promotor de la polimerasa de ARN funcional, por ejemplo, el promotor CMV. Se muestran la ubicación de las secuencias de promotor CMV, poliA, terminación de la transcripción y ribozima.

50 Figura 4. Administración de la vacuna en forma de ADNi de YF17D recombinante al interior de células *in vitro* o *in vivo*. Se muestra la inyección de la vacuna en forma de ADNi de 17D que contiene ADNc de YF17D controlado por el promotor de la ARN polimerasa dependiente de ADN al interior de las células *in vivo* o *in vitro*. Como consecuencia de la administración de la vacuna en forma de ADNi de 17D, se genera una vacuna con el virus atenuado vivo 17D. Si se administra *in vivo* a los tejidos del receptor de la vacuna, la producción de la vacuna YF17D en los tejidos del paciente conlleva la generación de una respuesta inmunitaria a la vacuna 17D.

- Figura 5. Ensayo de inmunofluorescencia (IFA, por sus siglas en inglés) de células CHO transfectadas con (A) una vacuna en forma de ADN_i de TC-83 contra VEE, clon 13-2 (Figura 6); y (B) ADN p3-10 que expresa las proteínas estructurales de TC-83 (control). En el cuadro (A) es visible un concentrado de células positivas para TC-83, mientras que el cuadro (B) muestra células positivas para TC-83 individuales. Se transfectan las células con una vacuna en forma de ADN utilizando el reactivo de transfección Fugene 6 o un método de transferencia génica similar. Se incuban las células transfectadas a 37 °C en un incubador con un 5% de CO₂. Tras una incubación de 24 h, se fijan las células con acetona fría y se realiza un IFA utilizando un anticuerpo de conejo específico para el antígeno de TC-83. Se incuban las células a continuación utilizando un anticuerpo conjugado con rodamina para la IgG de ratón y se observan utilizando la microscopía fluorescente.
- Figura 6. Fragmento de la secuencia de ADN_i del plásmido pAA_TC83 (clones n.º 13-1; 13-2) que contiene el ADN_c de TC-83 en dirección 3' respecto al promotor CMV (SEQ ID NO:1). Se indican las ubicaciones del promotor CMV, promotor 26S y sitio poliA.
- Figura 7. Fragmento de la secuencia de ADN_i del plásmido pAA_TC-83_C_GP modificado (clon n.º 12) que contiene dos promotores 26S de TC-83 (SEQ ID NO:2). Se indican las ubicaciones del promotor CMV, promotor 26S y sitio poliA.
- Figura 8. Fragmento de la secuencia de ADN_i de pCMV_YF17D que contiene el ADN_c de YF17D en dirección 3' respecto al promotor CMV y la terminación de la transcripción del ribozima σ y de BGH y casetes de poliadenilación en dirección 3' respecto al extremo 3' de la secuencia YF17D (SEQ ID NO: 3).
- Figura 9. Optimización de la distancia entre el extremo 3' del promotor CMV y el extremo 5' del ADN_c de TC-83 mediante un ensayo de encapsidación que utiliza vectores HA o N y auxiliares para el ADN_c.
- Figura 10. Transfección de células CHO con ADN_i de TC-83 n.º 13-1 (natural) da lugar a una expresión rápida del antígeno TC-83 en células CHO.
- Figura 11. Transfección de células CHO con ADN_i de TC-83 n.º 12 (promotor 26S doble) da lugar a una expresión retardada del antígeno de TC-83 en células CHO.
- Figura 12. Los virus TC-83 generados *in vitro* a partir de clones infecciosos son avirulentos en ratones BALB/c. Los virus TC-83 clonados se generaron mediante la transfección de células CHO utilizando electroporación con los clones infecciosos de ADN_c de la vacuna TC-83 n.º 12 y n.º 13-1. Se inoculan los virus en ratones según el protocolo USAMRIID estándar (Dr. Michael Parker, USAMRIID, Ft. Detrick, MD).
- Figura 13. Oligonucleótidos sintéticos de longitudes variables (SEQ ID NOS: 4-14, desde la parte superior a la inferior) para crear una serie de plásmidos de "ADN_i de la cápside" en los que la distancia entre el promotor y el ADN_i varía entre 8 y 25 pares de bases (remítase al Ejemplo 8). La A en mayúsculas y negrita muestra el extremo 5' de la secuencia de VEE (en TC-38, el codón de inicio es ATA en lugar de ATG; fíjese en los nucleótidos ATA en las posiciones 704-706 en la SEQ ID NO:1).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

- En la presente se describen composiciones para provocar una respuesta inmunitaria o una inmunidad protectora contra la fiebre amarilla (YF). En una realización, las composiciones comprenden vacunas para prevenir y/o tratar enfermedades asociadas con el virus YF. También se describen métodos para producir, evaluar y probar estas.
- En el pasado se desarrolló una vacuna TC-83 atenuada viva, obtenida a partir de células contra VEE. TC-83 contiene mutaciones atenuadoras (Kinney *et al.*, 1993). La vacuna TC-83 actual está totalmente aprobada para su uso veterinario en caballos y se utilizó con éxito durante la epizootia en Texas en 1970-1971. También se ha aprobado la vacuna para su uso en personas como un producto en fase de investigación clínica (PEI). La vacuna TC-83 proporciona protección contra muchas cepas epizoóticas. Se ha utilizado la vacuna TC-83 como parte de programas de seguridad y ha sido importante para proteger a los individuos que trabajan con animales infectados y preparados víricos. Hasta la fecha la vacuna se ha administrado a -9000 personas. Se ha preparado otra vacuna PEI, C-84, a partir de la vacuna TC-83 inactivada con formalina. Debido a los antecedentes del uso como vacuna en personas con éxito, la vacuna TC-83 también es un vector de vacuna prometedor, que se puede utilizar como un portador de genes relevantes para la vacuna o terapéuticos (Pushko P., solicitud de patente de los EE. UU. N.º 2006/0198854, Vector platforms derived from the alphavirus vaccines).
- Debido a que se carece de una terapia específica para la YF, la vacuna es la única medida médica efectiva para combatirla. La vacuna contra YF actual es un preparado con un virus atenuado, vivo producido a partir de la cepa vírica 17D YF (Smithburn *et al.*, 1956). Las vacunas con virus vivos 17D se han considerado seguras y eficaces

(Monath, 2001). El virus vacuna 17D YF es la base para los linajes 17D-204 y 17DD. La vacuna 17D-204 se utiliza en los EE. UU. y Australia, mientras que la vacuna 17DD se utiliza en Brasil. La secuenciación ha revelado que los tipos de vacuna 17D-204 y 17DD no son idénticos, lo que refleja la acumulación de mutaciones genéticas durante múltiples pases de siembras de virus. Con sus antecedentes de seguridad en seres humanos, YF17D también es un vector prometedor para el desarrollo de vacunas contra patógenos relacionados con flavivirus (p. ej., vacunas basadas en YF17D quimérico contra el virus del Nilo occidental, del dengue y de la encefalitis japonesa (Pugachev *et al.*, 2005) así como también patógenos que no pertenecen al género flavivirus tales como el virus de la malaria (Tao *et al.*, 2005) y de Lassa (Bredenbeek *et al.*, 2006).

En la presente se describen moléculas de ADN_i que expresan el genoma de ARN de virus atenuados vivos y métodos para utilizarlas. Cuando se inyecta ADN_i en las células cultivadas *in vitro*, se podrá generar el ARN de virus atenuados vivos en las células mediante transcripción *in vivo*. Esto inicia la producción de una progenie de virus atenuados en el medio a partir de células cultivadas. Tales virus atenuados clonalmente puros y homogéneos se pueden utilizar para la vacunación como una vacuna atenuada viva homogénea mejorada. Cuando se inyecta ADN_i en las células del receptor de la vacuna, el ARN de virus atenuados vivos se podrá generar mediante la transcripción *in vivo* en los tejidos. Esto inicia la producción de una progenie de virus atenuados en los tejidos del receptor de la vacuna, así como también la generación de una respuesta inmunitaria eficaz contra los virus atenuados vivos. De manera similar a cualquier ADN, el ADN_i puede estar compuesto de células bacterianas y representa una molécula estable.

En las realizaciones de la invención, las moléculas de ADN_i son vectores que comprenden ADN que codifica una molécula de ARN infeccioso, donde la molécula de ARN infeccioso a su vez codifica un virus YF. El ADN que codifica una molécula de ARN infeccioso puede estar ligado operablemente a un promotor de la ARN polimerasa y, en general, se modifica para que codifique un virus YF no patógeno (atenuado).

En ciertas realizaciones, las moléculas de ADN_i (ADN infeccioso) comprenden el ADN_c de YF YF17D. Aunque no es parte de la invención reivindicada, la vacuna contra VEE basada en ADN_i podrá comprender una molécula de ADN que contiene la copia de ADN_c completa del genoma de ARN del virus atenuado vivo TC-83. En esta molécula de ADN_i, se coloca el ADN_c de TC-83 en dirección 3' respecto a un promotor de la ARN polimerasa, tal como el promotor CMV. Cuando se introduce una molécula de ADN_i de este tipo en las células *in vitro*, se genera el ARN vírico de TC-83 en las células. El ARN de TC-83 resultante es "infeccioso" e inicia la producción de una vacuna con virus atenuados vivos TC-83 en las células. Una vacuna con virus TC-83 de este tipo se puede recolectar a partir de células cultivadas y utilizar para la vacunación según las prácticas actuales. La vacuna que se genera a partir del ADN_i de TC-83 representa una progenie de virus homogénea generada a partir del mismo ADN estable, bien caracterizado. Debido a que se utiliza el mismo ADN_i clonalmente purificado para la producción de los lotes de la vacuna, tal vacuna podrá tener una uniformidad y una regularidad entre lotes mayores en comparación con las vacunas actuales que pueden acumular mutaciones durante los pases de virus.

Como alternativa, la vacuna en forma de ADN_i que contiene el ADN_c de TC-83 se puede administrar directamente al receptor de la vacuna. Una administración de ADN_i de este tipo al receptor de la vacuna inicia la producción de la vacuna con virus TC-83 en los tejidos del paciente *in vivo*, lo que proporciona una vacunación eficaz contra VEE.

Las vacunas contra YF basadas en el ADN_i de la invención pueden comprender una molécula de ADN que contenga una copia de ADN_c del genoma de ARN del virus atenuado vivo YF 17D. En esta molécula de ADN_i, la copia de ADN_c de YF17D se puede colocar en dirección 3' desde un promotor de la ARN polimerasa, por ejemplo, el promotor de citomegalovirus (CMV). Cuando se introduce una molécula de ADN_i de este tipo en las células *in vitro* o se administra directamente a los tejidos del receptor de la vacuna *in vivo*, se genera el ARN vírico de 17D mediante transcripción a partir del promotor de la ARN polimerasa. El ARN de YF17D resultante es infeccioso e inicia la producción de la vacuna atenuada viva YF17D. Cuando se inyecta en los tejidos de un receptor de la vacuna *in vivo*, tal ADN_i basado en YF17D proporciona una vacunación con éxito del paciente contra la YF.

El ADN_c de YF17D se puede modificar para garantizar una atenuación suficiente y/o para introducir otras características a la vez que se mantiene la infectividad y el efecto terapéutico deseado. En ciertas realizaciones, se modifica el ADN_c mediante la inserción, delección y/o sustitución de uno o más de los nucleótidos en la secuencia de ADN_c de YF17D. Por ejemplo, el ADN_c modificado puede tener una identidad secuencial de al menos un 50%, 60%, 70%, 80% o 90% con la secuencia YF17D, tal como una identidad secuencial de al menos un 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%.

Los ejemplos de ADN_c modificado incluyen un ADN que tiene un promotor 26S adicional en el clon 12 del ADN_i de TC-83 modificado (remítase al ejemplo de referencia 3, Tabla I). Esta modificación ralentiza el desarrollo de focos positivos para TC-83, lo que es un signo de una atenuación adicional provocada por la inserción del promotor 26S adicional en este constructo (Figura 1, B). Tal atenuación adicional puede mejorar la vacuna con TC-83 y reducir los

efectos adversos asociados con esta vacuna. Un promotor 26S adicional se podrá insertar de modo que la nucleocápside y glucoproteínas de TC-83 se generen a partir de promotores independientes (Figura 1B). Por lo tanto, el promotor de 26S de TC83 está duplicado y la cápside y glucoproteínas se generan a partir de los dos promotores 26S. Se pueden realizar otras modificaciones para incrementar la estabilidad del ADN_i en *E. coli* o en las células diana o para incrementar la estabilidad del ADN_i en células de *E. coli*.

Además, en el ADN_i se pueden insertar otros genes o fragmentos de genes, incluido material genético de otros alfavirus o de fuentes no relacionadas tal como otros virus, bacterias, microorganismos, otros organismos, plantas, animales y/o seres humanos. En tales casos, el ADN_i de YF17D o TC-83 modificado podría servir como vector para la expresión de genes heterólogos *in vitro* o *in vivo*.

En la presente se describen vectores especializados para la preparación de vacunas en forma de ADN_i. Sin embargo, los expertos en la técnica apreciarán que el ADN_i descrito en la presente se puede formar utilizando cualquier vector adecuado. En general, un vector es una molécula de ácido nucleico (normalmente ADN o ARN) que sirve para transferir una secuencia de ácido nucleico pasajera transportada por el vector (es decir, ADN o ARN) a una célula hospedadora. Los tres tipos comunes de vectores incluyen plásmidos, fagos y virus. En la invención, el vector es un plásmido. Las vacunas en forma de ADN_i de la presente comprenden ADN que se produce en forma de plásmido que se puede introducir en un tejido animal y es expresado ahí por parte de células animales para producir una molécula de ácido ribonucleico mensajero (ARN_m) que tiene aproximadamente el tamaño del genoma YF, que se traduce para producir poliproteínas víricas. Las poliproteínas víricas son procesadas a su vez por parte de la maquinaria celular para proporcionar un conjunto de proteínas YF completo que son capaces de iniciar la replicación del transcrito de ARN primario anterior e iniciar de esta manera el ciclo de replicación vírica en un tejido animal en el cual se ha introducido el plásmido de ADN anterior.

Los vectores plasmídicos ilustrativos y adecuados que se han utilizado en vacunas en forma de ADN convencionales incluyen, sin carácter limitante, pBR322 (ATCC n.º 31344); pUC19 (ATCC n.º 37254); pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad Calif. 92008; n.º de Cat. V385-20); pNGVL (National Gene Vector Laboratory, Universidad de Michigan, Mich.); p414cyc (ATCC n.º 87380), p414GALS (ATCC n.º 87344), pBAD18 (ATCC n.º 87393), pBLCAT5 (ATCC n.º 77412), pBluescriptIIKS, (ATCC n.º 87047), pBSL130 (ATCC n.º 87145), pCM182 (ATCC n.º 87656), pCMVtkLUC (ATCC n.º 87633), pECV25 (ATCC n.º 77187), pGEM-7zf (ATCC n.º 87048), pGEX-KN (ATCC n.º 77332), pJC20 (ATCC n.º 87113, pUB110 (ATCC n.º 37015), pUB18 (ATCC n.º 37253).

El ADN_i descrito en la presente también está controlado por un promotor adecuado. Para la expresión en eucariotas los ejemplos de promotores adecuados incluyen el promotor temprano del citomegalovirus ("CMV"), el promotor LTR del virus del sarcoma de Rous ("RSV") y el promotor de SV40.

A continuación se describen métodos para producir vectores de ADN_i y vacunas en forma de ADN_i:

Se obtiene el fragmento del ADN_c correspondiente al ARN de TC-83 completo mediante la reacción en cadena de la polimerasa por transcripción inversa (RT-PCR) utilizando el ARN vírico de TC-83 y cebadores oligonucleotídicos específicos de la secuencia de TC-83. Se extrae el ARN vírico de TC-83 a partir de la vacuna con TC-83 utilizando extracción con fenol u otros métodos. Los cebadores oligonucleotídicos específicos de TC-83 pueden contener elementos funcionales adicionales que incluyen, sin carácter limitante, sitios de enzimas de restricción, terminadores de la transcripción, señales de poliadenilación, ribozimas, etc.

Como alternativa, se generan dos o más fragmentos de ADN_c que engloban la totalidad del ARN de TC-83 utilizando RT-PCR. A continuación se ensamblan tales fragmentos de ADN_c dentro de un único plásmido de manera que comprendan el ADN_c completo correspondiente al ARN de TC-83 completo, tal y como se ha descrito en el párrafo anterior.

Como alternativa, se genera el ADN_c de TC-83, tal y como se ha descrito en los párrafos anteriores, mediante síntesis química o una combinación de síntesis química y/o PCR y/o RT-PCR.

El fragmento de ADN_c correspondiente al ARN completo se clona en el ADN que contiene un promotor de la ARN polimerasa funcional, por ejemplo, un promotor CMV (Figura 1A). Se muestra un ejemplo de una secuencia de ADN_i recombinante resultante de este tipo (Figura 6). Como resultado de la transcripción *in vitro* o *in vivo* de un ADN_i de este tipo, se genera ARN de TC-83 funcional infeccioso que contiene una o más mutaciones atenuadoras. La distancia entre el promotor y el ADN_c de TC-83 se puede optimizar para garantizar el nivel deseado de expresión de ARN. En ciertas realizaciones, la distancia entre el extremo 3' GAGCTC del promotor CMV (indicado en el nucleótido (nt) 687 con una flecha en la Figura 6) y el extremo 5' del ADN_c de TC-83 (indicado en el nucleótido 703 con otra flecha en la Figura 6), es de 15(±3) pares de bases (pb). Esto permite una transcripción y producción del ARN de TC-83 eficaces. Para comparar, de acuerdo con Invitrogen, el sitio de inicio de la transcripción de CMV se ubicaría en el nt 697, que está a 9 nt del extremo 3' GAGCTC del promotor CMV dentro del plásmido (-) pADNc3.1. De

manera similar, el extremo 3' del ADNc de TC-83 puede estar seguido por ribozimas, secuencias de terminación de la transcripción, poliA, así como también por otros nucleótidos y señales para garantizar una producción óptima de ARN funcionalmente activo. En una realización preferida, la distancia entre el extremo 3' del ADNc de TC-82 (nt 12170, Figura 6) y el sitio poliA es de 184 pb y puede variar entre 0 y aproximadamente 500 pb.

5 Como alternativa, la nucleocápside y glucoproteínas de TC-83 se expresan a partir de promotores independientes (Figura 1B).

El ADNi plasmídico recombinante resultante que contiene el ADNc de TC-83 controlado por el promotor de la ARN polimerasa (Figura 1A, B) se genera y purifica a partir de células de *E. coli*. A continuación se introduce el ADNi purificado en células eucariotas cultivadas, por ejemplo, en células de ovario de hámster chino (CHO), células renales de cría de hámster (BHK-21) u otras células susceptibles (Figura 2). Se administra el ADN a las células mediante inyección, cañón de genes, electroporación, transfección con liposomas u otro método de transferencia génica. En las células, se genera el ARN de TC-83 infeccioso completo mediante transcripción, que inicia la producción de virus TC-83 atenuados vivos en células cultivadas y la liberación de virus TC-83 en el medio (Figura 2). Se recolecta el virus TC-83 a partir de los cultivos celulares, se formulan y se utilizan como una vacuna contra VEE de acuerdo con las prácticas actuales.

Como alternativa, el ADNi recombinante que contiene el ADNc de TC-83 (Figura 1) se introduce en el receptor de la vacuna directamente *in vivo*. Se administra el ADNi a los tejidos del receptor de la vacuna mediante inyección, electroporación, transfección con liposomas, cañón de genes u otro método de transferencia genética. En los tejidos del receptor de la vacuna, se genera el ARN de TC-83 infeccioso completo mediante la transcripción, que inicia la producción *in vivo* de virus TC-83 atenuados vivos. Se liberan los antígenos del virus TC-83 desde las células *in vivo* en los tejidos, lo que inicia la inducción de una respuesta inmunitaria eficaz contra la vacuna contra TC-83.

De manera similar al ADNi de TC-83 descrito anteriormente, un ADNi de YF17D incluye el ADNc de YF17D. Se obtiene el ADNc de YF17D completo a partir del ARN vírico completo o se ensambla a partir de dos o más fragmentos o se sintetiza por medios químicos tal y como se ha descrito anteriormente para TC-83. Se controla el ADNc de YF17D completo mediante un promotor de la ARN polimerasa funcional, tal y como se muestra en la Figura 4A. La distancia entre el extremo 3' GAGCTC del promotor CMV y el extremo 5' del ADNc de TC-83 podrá ser de 15(±3) pb tal y como se ha descrito anteriormente para TC-83. Esto permite una transcripción y producción de ARN de YF 17D eficaces. Se colocan el ribozima, la terminación de la transcripción y los casetes de poli(A) según se requiera en dirección 3' desde el extremo 3' del ADNc de YF17D para garantizar una transcripción y poliadenilación correctas de los transcritos de ARN de YF17D funcionales. Como resultado de la transcripción de ADNi de YF17D *in vitro* o *in vivo*, se genera ARN de YF17D infeccioso funcional (que contiene opcionalmente una o más mutaciones atenuadoras adicionales). Como se aprecia en la Figura 4, la transfección de células BHK-21 con un ADNi de YF17D completo que contiene ADNc de YF17D controlado por el promotor CMV da como resultado la transcripción de ARN infeccioso, traducción, corrección y procesamiento postraduccional de la poliproteína, ensamblaje y liberación de partículas de YF17D infecciosas.

Como se ha señalado anteriormente, se pueden realizar modificaciones en el YF17D completo así como también en los constructos de ADNc de TC-83. La optimización de la atenuación podrá mejorar adicionalmente la vacuna en forma de ADNi de YF17D y reducir los efectos adversos, incluida la enfermedad viscerotrópica asociada con la vacunación con YF17D (Monath, 2007).

40 Los métodos descritos en la presente comprenden administrar a un sujeto que lo necesite una composición o vacuna en forma de ADN que comprende ADNi que codifica un virus YF o VEE atenuado en un portador farmacéuticamente aceptable.

La cantidad de ADNi presente en las composiciones o en las vacunas en forma de ADN descritas en la presente es preferentemente una cantidad terapéutica o farmacéuticamente eficaz. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de ADNi es la cantidad necesaria para que la secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido YF ejecute su función inmunológica sin causar demasiados efectos negativos en el hospedador al que se administra la composición. La cantidad exacta de plásmido que se va a utilizar y la composición/vacuna que se va a administrar variará en función de factores tales como la potencia de los promotores transcripcionales y traduccionales utilizados, el tipo de afección que se está tratando, el modo de administración, así como también otros ingredientes de la composición. En una realización, la composición o la formulación de la vacuna comprende desde aproximadamente 1 ng hasta aproximadamente 1 mg de plásmido.

Se puede modificar la inmunogenicidad de las vacunas en forma de ADN y las composiciones farmacéuticas formulándolas con uno o más adyuvantes o inmunoestimulantes farmacéuticamente aceptables tales como interferón alfa, interferón beta, interferón gamma, el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos

(“GM-CSF”, por sus siglas en inglés), factor estimulador de colonias de macrófagos (“M-CSF”, por sus siglas en inglés), interleucina 2 (“IL-2”), interleucina 12 (“IL-12”) y oligonucleótidos CpG. Para preparar este tipo de composiciones, se pueden utilizar métodos muy conocidos en la técnica. En ciertas realizaciones, se genera ADNi en células de *E. coli* en forma de un plásmido de ADN, que contiene motivos de CpG no metilados y por si mismo constituye una molécula inmunoestimulante que activa el sistema inmunitario mediante los receptores de tipo toll.

La inyección subcutánea, la introducción intradérmica, la impresión a través de la piel y otros modos de administración tales como el suministro intraperitoneal, intravenoso, oral o por inhalación también son adecuados. Por ejemplo, se pueden introducir los vectores que contienen el ADNi en el hospedador deseado mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, transfección, electroporación, microinyección, micropartículas, microcápsulas, transducción, fusión celular, DEAE dextrano, precipitación con fosfato de calcio, lipofección (fusión con liposomas), uso de un cañón de genes (bombardeo de partículas) o un transportador vectorial de ADN (remítase a, p. ej., Wu *et al.*, 1992, *J. Biol. Chem.* 267:963-967; Wu y Wu, 1988, *J. Biol. Chem.* 263:14621-14624).

Tal y como se utilizan en la presente, los términos “que trata”, “tratamiento” y similares se utilizan en la presente generalmente para referirse a un medio para obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado y se refieren a un proceso mediante el cual los síntomas de una enfermedad asociada a YF se eliminan completamente o mejoran en cualquier grado medible cuantitativa y/o clínicamente. El término “prevenir” se refiere a un proceso mediante el cual se dificulta y/o retrasa una enfermedad asociada con YF. Las composiciones y las vacunas descritas en la presente comprenden ADNi (ADNi) capaz de producir virus vivos atenuados. Se podrá producir *in vivo* el virus atenuado vivo.

Tal y como se utiliza en la presente, la expresión “respuesta inmunitaria” incluye una respuesta en forma de linfocitos T, niveles séricos elevados de anticuerpos contra un antígeno, la presencia de anticuerpos neutralizantes contra un antígeno (tal como un polipéptido YF) o combinaciones de estos. El término “protección” o la expresión “inmunidad protectora” incluye la capacidad de los anticuerpos séricos o la respuesta de linfocitos T inducidos durante la inmunización para proteger (parcial o totalmente) contra la enfermedad o muerte provocada por virus YF.

El “sujeto” es un vertebrado, tal como un mamífero. Los mamíferos incluyen, sin carácter limitante, seres humanos, otros primates, roedores, animales de granja, animales de deporte (caballos, etc.) y mascotas. En ciertas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En otras realizaciones, los métodos son útiles en animales de laboratorio (tales como todas las especies de monos) en la aplicación veterinaria y/o en el desarrollo de modelos en animales para una enfermedad. Un “sujeto que lo necesite” se refiere a cualquier sujeto, paciente o individuo que se podría beneficiar de los métodos descritos en la presente.

Las expresiones “dosis terapéutica (o farmacéuticamente) eficaz” o “cantidad terapéutica (o farmacéuticamente) eficaz” se refieren a una dosis o cantidad que produce el efecto deseado por el cual se administra. La dosis exacta dependerá del objetivo del tratamiento y podrá ser determinada por un experto en la técnica utilizando técnicas conocidas.

La expresión “farmacéuticamente aceptable” significa que está aprobada por una agencia reguladora de un gobierno federal o estatal o que está enumerada en la Farmacopea de los EE. UU. u otra farmacopea con reconocimiento general para su uso en animales y, más concretamente, seres humanos.

El término “portador” se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el ADNi. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles tales como agua y aceites, incluidos aquellos que se obtienen a partir del petróleo, de animales, de vegetales o mediante métodos sintéticos, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo o combinaciones de estos y similares. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol, combinaciones de estos y similares. Si se desea, la composición también puede contener cantidades minoritarias de agentes humectantes o emulsionantes o agentes tamponantes del pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, pastillas, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación prolongada, combinaciones de estos y similares. La composición se puede formular como un supositorio, con aglutinantes y portadores tradicionales tales como triglicéridos. Las formulaciones orales pueden incluir portadores estándar tales como manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio de calidad farmacéutica, combinaciones de estos, etc. En “Remington’s Pharmaceutical Sciences” de E.W. Martin se describen ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados.

Por lo tanto, tal y como se aprecia en la presente, la expresión “portador farmacéuticamente aceptable” se refiere, sin carácter limitante, a un vehículo que contiene el ADNi que se puede inyectar en un mamífero hospedador sin efectos adversos. Los portadores farmacéuticamente aceptables adecuados conocidos en la técnica incluyen, sin

carácter limitante, partículas de oro, agua estéril, solución salina, glucosa, dextrosa, o soluciones tamponadas, combinaciones de estos y similares. Los portadores podrán incluir agentes auxiliares que incluyen, sin carácter limitante, diluyentes, estabilizantes (es decir, azúcares y aminoácidos), conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes tamponantes del pH, aditivos para potenciar la viscosidad, colorantes, combinaciones de estos y similares.

Tal y como se utilizan en la presente, las formas singulares “un”, “uno/a” y “el/la” incluyen los referentes en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a la “vacuna” incluye varias de tales vacunas y la referencia a “la dosificación” incluye la referencia a una o más “dosificaciones” y sus equivalentes conocidas por los expertos en la técnica y así sucesivamente.

Aunque se ha descrito la divulgación detalladamente haciendo referencia a ciertas realizaciones de esta, será evidente para el experto en la técnica que se pueden realizar varios cambios, y que se pueden emplear equivalentes, sin alejarse del alcance de la divulgación. Además, los siguientes ejemplos son ilustrativos de los métodos descritos en la presente y no deben considerarse limitantes de la divulgación anterior de ninguna manera.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 (Ejemplo de referencia). Preparación de ADN_i de TC-83. Se extrae el ARN total de la vacuna con TC-83 utilizando una extracción con fenol. El ADN_c correspondiente a la longitud completa del ARN de TC-83 se obtiene por transcripción inversa y la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) utilizando ARN vírico TC-83 extraído y los cebadores oligonucleotídicos específicos de la secuencia de TC-83.

Se clona el fragmento de ADN_c correspondiente al ARN de TC-83 completo en el vector plasmídico pASP5 que contiene un promotor de CMV funcional (Figura 1A, Figura 6), lo que genera el clon 13-1 y 13-2 del ADN_i de TC-83. La distancia entre el extremo 3' del promotor CMV y el extremo 5' del ADN_c de TC-83 es de 15 pb tal y como se muestra en la Figura 6. Tras la transcripción de un ADN_i de TC-83 de este tipo *in vitro* o *in vivo* mediante la maquinaria de transcripción celular, se generan ARN de TC-83 y virus TC-83 infecciosos funcionales.

El ADN_i de TC-83 se puede modificar fácilmente para optimizar las características funcionales, por ejemplo, el nivel de atenuación. Por ejemplo, se genera el clon 12 de ADN_c de TC-83 modificado duplicando el promotor 26S y colocando el segundo promotor 26S en dirección 5' desde los genes de la glucoproteína de TC-83 (Figura 1B, Figura 7). En tal constructo, el ARN que se genera a partir del promotor CMV expresa la cápside y glucoproteínas de TC-83 a partir de promotores 26S independientes. Con el fin de garantizar la expresión de las proteínas TC-83 a partir de tal ARN de TC-83 modificado, se pueden realizar cambios apropiados, por ejemplo, se introduce el codón ATG en el extremo 5' de los genes de la glucoproteína. El ARN completo que codifica el ADN_c del TC-83 modificado (clon 12) se introduce en el vector plasmídico reivindicado pASP5 que contiene el promotor de CMV funcional (Figura 1B, Figura 7). La distancia entre el extremo 3' del promotor CMV y el extremo 5' del ADN_c de TC-83 modificado es de 15 pb tal y como se muestra en la Figura 7.

Ejemplo 2. Preparación de ADN_i de YF17D. Se extrae el ARN total de la vacuna con YF17D utilizando la extracción con fenol o un método similar. Los ADN_c correspondientes al ARN 17D completo se obtienen mediante transcripción inversa y la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) utilizando el ARN vírico de 17D extraído y los cebadores oligonucleotídicos específicos de la secuencia 17D. Como alternativa, se ensambla el ADN_c de YF17D completo procedente de dos o más plásmidos.

Se transfiere el fragmento de ADN_c correspondiente al ARN completo en el vector plasmídico reivindicado pASP5 que contiene el promotor CMV funcional (Figura 3), que da lugar a ADN_i de YF17D (Figura 8). La distancia entre el extremo 3' del promotor CMV y el extremo 5' del ADN_c de YF17D es de 15 pb tal y como se muestra en la Figura 8 y como se describe anteriormente para los constructos de TC-83. Tras la transcripción del ADN_i de YF17D en las células *in vitro* o *in vivo*, se generan ARN de YF17D y virus YF17D infecciosos funcionales.

Ejemplo 3. (Ejemplo de referencia) Transfección de células CHO con una vacuna en forma de ADN_i de TC-83. Se transfectan células CHO con ADN plasmídico que contiene ADN_i de TC-83 utilizando el reactivo de transfección Fugene 6 (Roche Applied Sciences). Resumiendo, se cultivan las células CHO en matraces de 75 cm², a continuación se lavan con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se tripsinizan. Se transfiere una alícuota de la suspensión de células CHO a placas de cultivo de 6 pocillos. A continuación, se añade una mezcla de ADN plasmídico y reactivo Fugene 6 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Como ADN plasmídico, se utilizan los siguientes constructos:

- (1) ADN_i modificado de TC-83 contra VEE, clon 12 (Figura 1B, Figura 7);
- (2) ADN_i de TC-83 contra VEE, clon 13-1 (Figura 1A, Figura 6);
- (3) ADN_i de TC-83 contra VEE, clon 13-2 (Figura 1A, Figura 6);

(4) Como control, se utiliza ADN p3-10 que expresa únicamente proteínas estructurales de TC-83.

Como control adicional, se utilizan células CHO no transfectadas (5). Se espera que los ADNi de (1) a (3) que contienen el ADNc de TC-83 completo generen los virus TC-83 vivos. Tal y como se ha descrito anteriormente, el ADNi del clon 12 (1) contiene el promotor 26S duplicado para expresar la cápside y glucoproteínas de TC-83 a partir de dos promotores 26S independientes (Figura 1B). Por el contrario, el ADN (4) contiene únicamente un fragmento de TC-83 correspondiente únicamente a los genes estructurales de TC-83 y no se espera que genere virus TC-83 vivos.

Se siembra una alícuota (0.3 mL) de células CHO transfectadas de las placas de 6 pocillos en portaobjetos con 8 pocillos. Se incuban las células CHO transfectadas a 37 °C en CO₂ al 5%. Se determina la mortalidad celular en placas de 6 pocillos diariamente mediante microscopía visual. Se realiza un ensayo de inmunofluorescencia (IFA) 24 h después de la transfección utilizando portaobjetos con 8 pocillos con antisuero que reconoce los antígenos de TC-83, de acuerdo con el método descrito por Pushko *et al.* (1997). Los resultados se muestran en la Tabla I. Las células transfectadas con ADNi de (1) a (3), mueren en los 5 días posteriores a la transfección, mientras que las células CHO con transfecciones de control (4) y (5) permanecen vivas. Asimismo, se detectan mediante IFA focos de células que expresan los antígenos de TC-83 24 h después de la transfección en las células transfectadas con los ADN (2) y (3), lo que indica la presencia de virus TC-83 vivos (Figura 5). El resultado indica que la introducción de vacunas con TC-83 basadas en ADNi en células cultivadas dio lugar a la producción de virus TC-83 vivos.

Tabla I. Transfección de células CHO con la vacuna en forma de ADNi de TC-83

	Vacuna en forma de ADNi*	Mortalidad de las células CHO tras la transfección con ADN **	Focos de células infectadas, por IFA***
1.	ADNi modificado de TC-83 contra VEE, clon 12 (Figura 7)	Sí	Ninguno, únicamente células individuales positivas
2.	ADNi de TC-83 contra VEE, clon 13-1 (Figura 6)	Sí	Sí
3.	ADNi de TC-83 contra VEE, clon 13-2 (Figura 6)	Sí	Sí
4.	ADN p3-10 que expresa únicamente proteínas estructurales de TC-83 (control)	No	Ninguno, únicamente células individuales positivas
5.	Células CHO no transfectadas (control)	No	No

* La transfección de células CHO con ADN se realiza en placas de 6 pocillos utilizando el reactivo de transfección Fugene 6 (Roche Applied Sciences)
 ** Observado el día 5 tras la transfección.
 *** IFA, ensayo de inmunofluorescencia, utilizando antisuero para las proteínas estructurales de TC-83.

Ejemplo 4. Transfección de células BHK-12 con la vacuna en forma de ADNi de YF17D. Resumiendo, se transfectaron células cultivadas (CHO, BHK-21 o líneas celulares similares) con ADN plasmídico que contenía ADNi de YF17D y se sometió a ensayo utilizando métodos estándar tal y como se describe en el Ejemplo 3. Los resultados se muestran en la Tabla II. Se utilizan ensayos en placa para determinar el título de los virus de YF17D vivos generados en las células transfectadas con el ADNi plasmídico. Estos resultados indican que la introducción de la vacuna con 17D basada en ADNi en células cultivadas da lugar a la síntesis de ARN específico del virus y la producción del virus YF17D vivo (Tabla II).

Tabla II. Transfección de células BHK-21 con ADN plasmídico que contiene ADNi de YF17D

	Vacuna en forma de ADNi*	Mortalidad de las células BHK tras la transfección con ADN <i>in vitro</i> **	Título de YF17D, mediante ensayo en placas***
1.	ADNi de YF17D	Sí	10 ⁸ pfu/mL
6.	Células BHK-21 no transfectadas (control)	No	No detectado

* La transfección de las células BHK con ADN se realiza en placas de 6 pocillos utilizando el reactivo de transfección Fugene 6 (Roche Applied Sciences)
 ** Observado el día 5 tras la transfección

Vacuna en forma de ADN [*]	Mortalidad de las células BHK tras la transfección con ADN <i>in vitro</i> ^{**}	Título de YF17D, mediante ensayo en placas ^{***}
*** Ensayo realizado en medio recogido a partir de las células transfectadas 5 días después de la transfección.		

5 Ejemplo 5. (Ejemplo de referencia) Infección de células CHO con virus TC-83 obtenidos a partir de células transfectadas con ADNⁱ. Con el fin de confirmar que se generan virus TC-83 vivos en las células transfectadas con ADN plasmídico que contienen el ADN^c de TC-83 completo, se recolecta el medio a partir de células transfectadas (remítase al ejemplo 3) y se utiliza para infectar células CHO frescas. Se infectan células CHO frescas en portaobjetos con 8 pocillos con medio diluido 100 veces recolectado a partir de las células transfectadas, y se detecta la expresión de antígenos de TC-83 mediante IFA 24 h después de la infección (Tabla III). Los resultados indican que el medio procedente de las células transfectadas con vacunas con TC-83 basadas en que ADNⁱ contienen virus TC-83 infecciosos vivos.

10 Tabla III. Infección de células CHO frescas con medio recogido a partir de las células CHO transfectadas con ADNⁱ que contiene el ADN^c completo de la vacuna TC-83 en dirección 8' respecto al promotor CMV^{*}

	Transfección con vacuna en forma de ADN	% de células positivas para el antígeno de TC-83, por IFA
1.	ADN ⁱ modificado de TC-83 contra VEE, clon 12	100
2.	ADN ⁱ de TC-83 contra VEE, clon 13-1	80
3.	ADN ⁱ de TC-83 contra VEE, clon 13-2	100
4.	ADN p3-10 que expresa únicamente proteínas estructurales de TC-83 (control)	0
5.	Células CHO no transfectadas (control)	0

* Se diluye 100 veces el medio recogido a partir de las células transfectadas 5 días después de la transfección (Tabla I), a continuación se utilizan 100 mL para infectar células CHO frescas en portaobjetos con 8 pocillos durante 1 h a 37°C, 5% de CO₂. A continuación, se añaden 300 mL de medio completo y se prolonga la incubación 24 h.

** IFA 24 h después de la infección, utilizando antisuero para proteínas estructurales de TC-83.

Ejemplo 6. (Ejemplo de referencia) Vacunación de ratones con la vacuna en forma de ADNⁱ de TC-83.

15 Se inyecta una dosis de cada vacuna en forma de ADNⁱ de TC-83 (clones 12, 13-1, 13-2, tal y como se indica en la Tabla I) comprendida entre 1 ng y 1 mg por vía intramuscular, subcutánea e intradérmica a ratones de laboratorio (BALB/c, C57BL/6, Swiss Webster exógamos, u otra cepa susceptible). Se aíslan las vacunas en forma de ADNⁱ de TC-83 a partir de *E. coli* en forma de ADN plasmídico utilizando el método de aislamiento de ADN Endo-free de Promega. En 30 días, los animales reciben una segunda dosis idéntica del seno retroorbital en los días 0, 30 y 60.

20 Se determina la respuesta inmunitaria mediante métodos inmunológicos estándar incluida la determinación de anticuerpos séricos contra los antígenos de TC-83 en el suero de animales vacunados mediante ELISA. Se detectan anticuerpos séricos contra los antígenos de TC-83 lo que sugiere una vacunación con éxito con la vacuna en forma de ADNⁱ de TC-83.

Ejemplo 7. Vacunación de ratones con la vacuna en forma de ADNⁱ de YF17D.

25 Se inyecta una dosis de cada vacuna en forma de ADNⁱ de 17D (remítase a la secuencia de ADN en la Figura 7) comprendida entre 1 ng y 1 mg por vía intramuscular, subcutánea e intradérmica a ratones de laboratorio (BALB/c, C57BL/6, Swiss Webster exógamos u otra cepa susceptible). Se aísla la vacuna en forma de ADNⁱ de 17D a partir de *E. coli* en forma de ADN plasmídico utilizando el método de aislamiento de ADN Endo-free de Promega. En 30 días, los animales reciben una segunda dosis idéntica de la vacuna en forma de ADNⁱ de 17D. Se toman muestras séricas del seno retroorbital de animales anestesiados en los días 0, 30 y 60. Se determina la respuesta inmunitaria

30 mediante métodos inmunológicos estándar que incluyen la determinación de anticuerpos séricos contra los antígenos de YF 17D en el suero de animales vacunados mediante ELISA. Se detectan anticuerpos séricos contra los antígenos de YF lo que sugiere una vacunación con éxito con la vacuna en forma de ADNⁱ de YF17D.

Ejemplo 8. (Ejemplo de referencia) Optimización de la distancia entre el extremo 3' del promotor CMV y el extremo 5' del ADNc mediante ensayo de encapsidación utilizando vectores HA o N y los auxiliares para el ADNc.

Para la función con éxito del ADNi, es importante conseguir una transcripción eficaz del ARN de TC-83 completo funcional a partir del plásmido con ADNi. Por lo tanto, es importante optimizar la transcripción, incluida la distancia entre el extremo del promotor y el comienzo del ADNc, con el fin de maximizar la eficacia de la síntesis de ARN funcional. Los autores construyen un "ADNi pequeño" que codifica únicamente el gen de la cápside del virus TC-83 incluidas las regiones reguladoras. Se eliminan todos los demás genes de TC-83 de tal "ADNi de la cápside". A continuación, los autores insertan oligonucleótidos sintéticos de longitudes variables (remítase a la Figura 13) entre el promotor CMV y el "ADNi de la cápside" utilizando el sitio Sacl en el extremo 3' del promotor CMV. Por lo tanto, se producen una serie de plásmidos de "ADNi de la cápside" en los que la distancia entre el promotor y el ADNi varía entre 8 y 25 pares de bases. Se utiliza cada constructo de ADNi de la cápside para transfectar células CHO mediante electroporación junto con (1) ARN auxiliar de GP y (2) ARN en un vector HA. El ARN auxiliar de GP codifica las glucoproteínas de TC-83, mientras que el ARN en un vector HA codifica el gen HA de la gripe. En las células CHO cotransfectadas, la cápside de TC-83 y las proteínas GP encapsidan el vector HA en partículas con un único ciclo. Se detecta el título de las partículas titulando tales partículas utilizando un ensayo de inmunofluorescencia (IFA) y antisuero HA. En este sistema, el nivel de expresión de la cápside del "ADNi de la cápside" es un factor limitante de la velocidad y afecta al título de partículas.

Los autores observan que la distancia óptima entre el extremo 3' del promotor CMV y el extremo 5' del ADNc de la cápside de TC-83 es de 15 pares de bases entre el sitio Sacl (el extremo del promotor CMV) y el comienzo del ADNc (Figura 9). Los autores observan que esta distancia óptima proporciona la expresión de un antígeno de la cápside funcional con un nivel máximo. Sin embargo, otros constructos con ADNi de la cápside con distancias de 12 a 18 pb también proporcionan un nivel detectable de expresión y títulos elevados de partículas. Se confirman los datos con varios experimentos utilizando la titulación del vector HA. Los autores también confirman esos resultados de la optimización cuando utilizan para la cuantificación el vector N que expresa el gen de la nucleoproteína en lugar del gen HA.

Ejemplo 9. (Ejemplo de referencia) Los virus TC-83 generados a partir de clones infecciosos *in vitro* son avirulentos en ratones BALB/c.

Se generan virus TC-83 mediante la transfección de células CHO con el ADNc (ADNi) de la vacuna con TC-83 infecciosos, clones n.º 12 y n.º 13-1. Se muestra la expresión de los antígenos TC-83 mediante IFA 24 h después de la transfección en células transfectadas con cualquier ADNi (n.º 12 y n.º 13-1). Se recolectan los virus a partir de cultivos de células CHO 96 h después de la transfección, después y el efecto citopático (CPE, por sus siglas en inglés) es evidente. Se determina el título de cada virus mediante un ensayo en placa estándar en monocapas de células Vero. El virus generado a partir del ADNi n.º 13-1 tiene el título de 7x10⁷ PFU/mL, mientras que el virus generado a partir del ADNi n.º 12 no muestra las placas, lo que sugiere una formación más lenta de placas y, posiblemente, un nivel más elevado de atenuación. A continuación, se inoculan 10⁵ unidades formadoras de placas (PFU, por sus siglas en inglés) del virus n.º 13-1 en ratones BALB/c por vía intramuscular de acuerdo con un protocolo estándar. El virus generado a partir del ADNi n.º 12 no se utiliza para la inoculación de animales debido a que no se puede determinar el título de placas. Se inocula el virus VEE natural (cepa Trinidad) en los animales como control.

En el grupo VEE de control, 10 de los 10 animales mueren tras la inoculación, lo que demuestra la naturaleza virulenta del virus de control (Figura 12). Por el contrario, el virus generado a partir de ADNi (n.º 13-1) es avirulento en ratones, ya que los ratones no muestran signos de enfermedad. Este resultado confirma que el ADNi contiene mutaciones atenuadas que se derivan de la vacuna con TC-83 y que esas mutaciones atenuadoras no revierten al fenotipo virulento natural durante la producción de virus a partir de ADNi.

45 REFERENCIAS

Barnett ED. Yellow fever: epidemiology and prevention. *Clin Infect Dis*. 15 de marzo de 2007;44(6):850-6. Epub 1 de febrero de 2007. Revisión.

Bredenbeek PJ, Molenkamp R, Spaan WJ, Deubel V, Marianneau P, Salvato MS, Moshkoff D, Zapata J, Tikhonov I, Patterson J, Carrion R, Ticer A, Brasky K, Lukashevich IS. A recombinant Yellow Fever 17D vaccine expressing Lassa virus glycoproteins. *Virology*. 20 de febrero de 2006;345(2):299-304.

Kinney RM, Chang GJ, Tsuchiya KR, Sneider JM, Roehrig JT, Woodward TM, Trent DW. Attenuation of Venezuelan equine encephalitis virus strain TC-83 is encoded by the 5'-noncoding region and the E2 envelope glycoprotein. *J Virol.* 1993;67(3):1269-77.

Monath TP. Yellow fever: an update. *Lancet Infect Dis.* Agosto de 2001;1(1):11-20.

5 Monath TP. Dengue and yellow fever--challenges for the development and use of vaccines. *N Engl J Med.* 29 de noviembre de 2007;357(22):2222-5.

Pugachev KV, Guirakhoo F, Monath TP. New developments in flavivirus vaccines with special attention to yellow fever. *Curr Opin Infect Dis.* Octubre de 2005;18(5):387-94.

10 Pushko P, Parker M, Ludwig GV, Davis NL, Johnston RE, Smith JF. Replicon-helper systems from attenuated Venezuelan equine encephalitis virus: expression of heterologous genes in vitro and immunization against heterologous pathogens *in vivo.* *Virology.* 1997;239(2):389-401.

Smithburn KC, Durieux C, Koerber R, *et al.* Yellow fever vaccination. Ginebra, Suiza: Organización Mundial de la Salud, 1956. Series monográficas de la OMS n.º 30.

15 Tao D, Barba-Spaeth G, Rai U, Nussenzweig V, Rice CM, Nussenzweig RS. Yellow fever 17D as a vaccine vector for microbial CTL epitopes: protection in a rodent malaria model. *J Exp Med.* 17 de enero de 2005; 201(2):201-9.

REIVINDICACIONES

1. Un vector plasmídico que contiene:
 - 5 (a) un promotor de la ARN polimerasa, ligado operablemente a un ADN que codifica una molécula de ARN infeccioso; y
 - (b) una cola de poli-A en dirección 3' respecto a dicho ADNdonde:
 - (i) la molécula de ARN codifica un virus de la fiebre amarilla (YF) atenuado; y
 - (ii) el promotor de la ARN polimerasa es adecuado para la expresión en células de mamífero.
- 10 2. El vector de la reivindicación 1, donde el promotor está ubicado entre aproximadamente 12 y aproximadamente 18 nucleótidos en dirección 5' respecto al extremo 5' de dicho ADN.
3. El vector de la reivindicación 2, donde el promotor está ubicado 15 nucleótidos en dirección 5' respecto al extremo 5' de dicho ADN.
- 15 4. El vector de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la cola de poli-A está ubicada entre 0 y 500 nucleótidos en dirección 3' respecto a dicho ADN.
5. El vector de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el promotor es un promotor de la ARN polimerasa de CMV.
- 20 6. El vector de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho ADN que codifica dicha molécula de ARN comprende un ADNc de YF17D (nucleótidos de 703 a 11564 de la Figura 8 o una secuencia polinucleotídica que tiene una identidad secuencial de al menos un 95% con dicho ADNc de YF17D a lo largo de la longitud completa de este último).
7. Una vacuna que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del vector de cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
8. La vacuna de la reivindicación 7 que comprende además un portador farmacéuticamente aceptable.
- 25 9. La vacuna de la reivindicación 7 o la reivindicación 8 para su uso en la inmunización de un mamífero contra un virus YF.
10. La vacuna para su uso tal y como se reivindica en la reivindicación 9, donde el mamífero es un ser humano.

FIG. 1: ADNi de TC-83 PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS *IN VITRO* O LA VACUNACIÓN *IN VIVO*

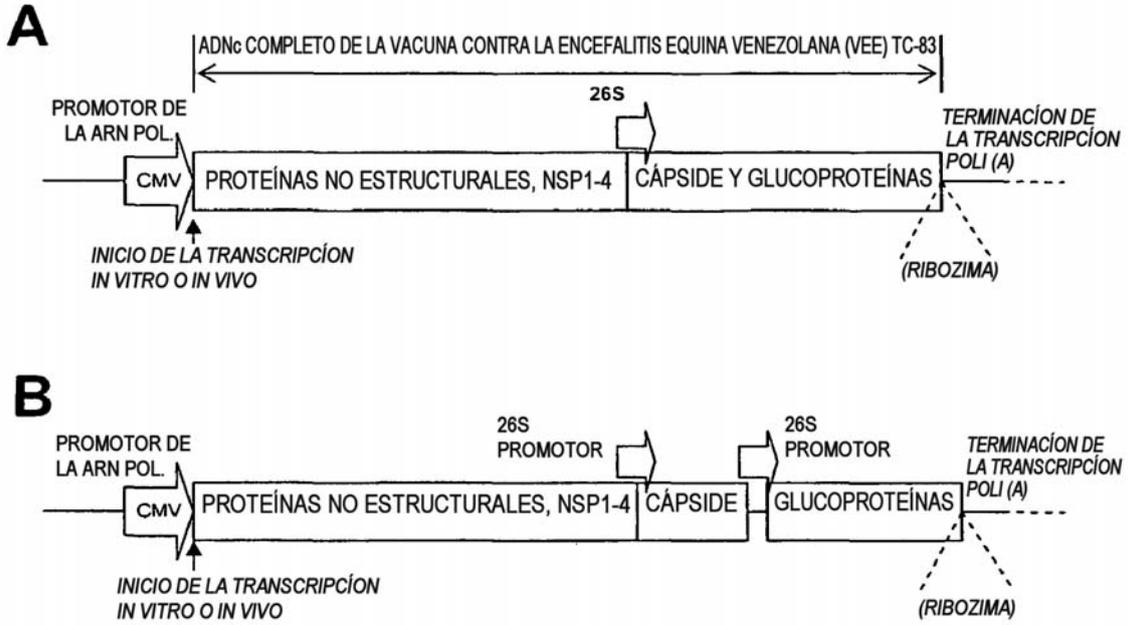


FIG. 2 :PRODUCCIÓN DE LA VACUNA CONTRA VEE *IN VITRO*
O *IN VIVO* A PARTIR DEL ADN DE CMV-TC83

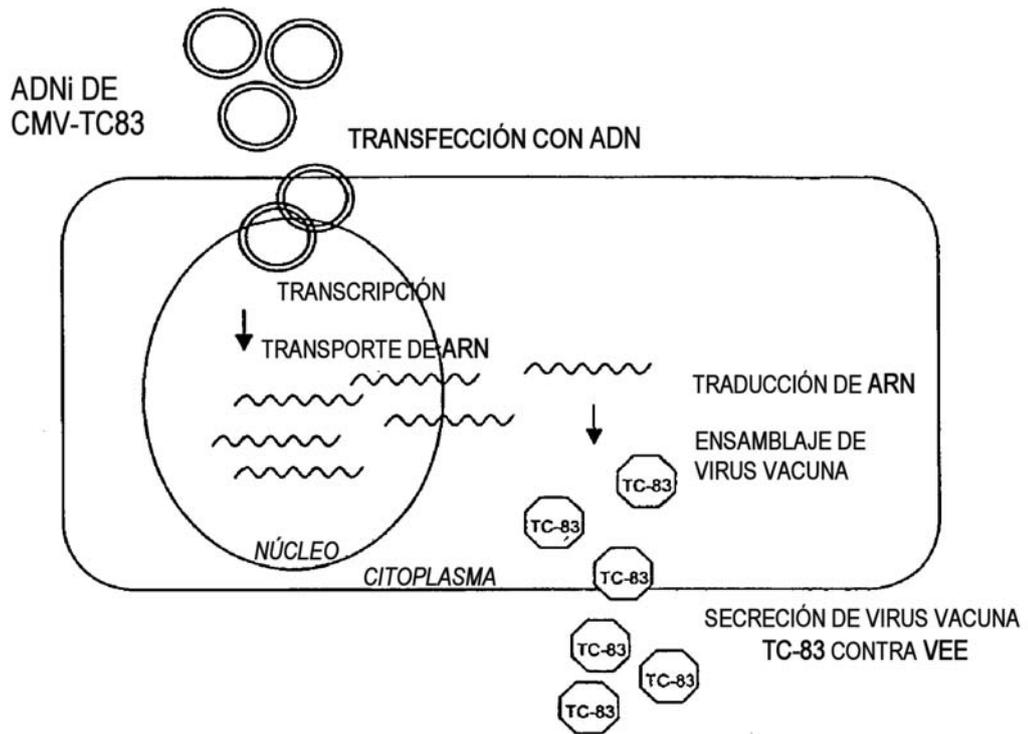


FIG. 3: ADN_i DEL VIRUS DE LA FIEBRE AMARILLA PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS *IN VITRO* O VACUNACIÓN *IN VIVO*

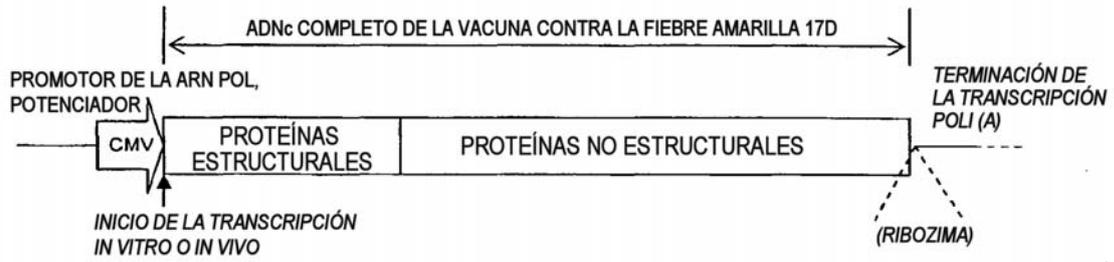


FIG. 4: PRODUCCIÓN DE LA VACUNA CONTRA LA FIEBRE AMARILLA
IN VITRO O *IN VIVO* A PARTIR DE ADN DE CMV-YF17D

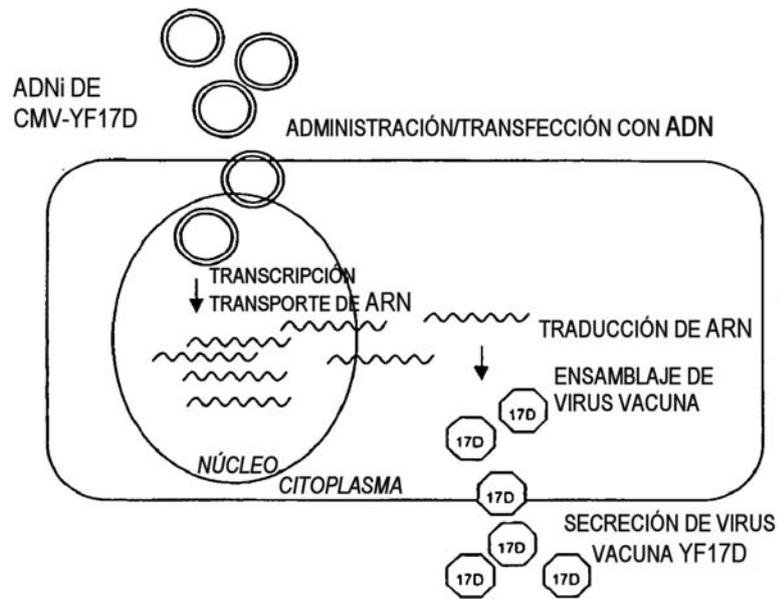


FIG. 5: ENSAYO DE IMMUNOFLUORESCENCIA

(A)



(B)

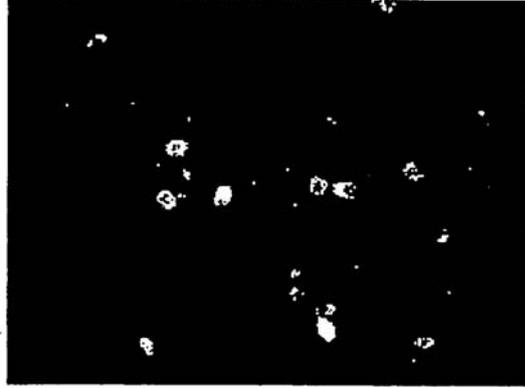


FIG. 6: FRAGMENTO DE LA SECUENCIA DE ADN_i DEL PLÁSMIDO PAA_TC83

```

1  ACAAGGCAAG GCTTGACCGA CAATTGCATG AAGAATCTGC TTAGGGTTAG
51  GCGTTTTGCG CTGCTTCGCG ATGTACGGGC CAGATATACG CGTGGCGCGC
101  CTGACATTGA TTATTGACTA GTTATTAATA GTAATCAATT ACGGGGTCAT
151  TAGTTCATAG CCCATATATG GAGTTCGCG TTACATAACT TACGGTAAAT
201  GGCCCGCCTG GCTGACCGCC CAACGACCCC CGCCCATGTA CGTCAATAAT
251  GACGTATGTT CCCATAGTAA CGCCAATAGG GACTTTCCAT TGACGTCAAT
301  GGGTGGAGTA TTTACGGTAA ACTGCCACT TGGCAGTACA TCAAGTGTAT
351  CATATGCCAA GTACGCCCC TATTGACGTC AATGACGGTA AATGGCCCGC
401  CTGGCATTAT GCCCAGTACA TGACCTTATG GGACTTTCCT ACTTGGCAGT
451  ACATCTACGT ATTAGTCATC GCTATTACCA TGGTGATGCG GTTTTGGCAG
501  TACATCAATG GCGTGGATA GCGGTTTGAC TCACGGGGAT TTCCAAGICT
551  CCACCCCATG GACGTCAATG GGAGTTTGTG TTGGCACCAA AATCAACGGG
601  ACTTTCCAAA ATGTCGTAAC AACTCCGCC CATTGACGCA AATGGGCGGT
651  AGGCGTGTAC GGTGGGAGGT CTATATAAGC AGAGCTCTCT GGCTAACTAG
701  AGATAGGCGG CGCATGAGAG AAGCCCAGAC CAATTACCTA CCAAAAATGG
751  AGAAAGTTCA CGTTGACATC GAGGAAGACA GCCCATTCTT CAGAGCTTTG
801  CAGCGGAGCT TCCCGCAGTT TGAGGTAGAA GCCAAGCAGG TCACTGATAA
851  TGACCATGCT AATGCCAGAG CGTTTTCGCA TCTGGCTTCA AAAGTATCG
901  AAACGGAGGT GGACCCATCC GACACGATCC TTGACATTGG AAGTGCGCCC
951  GCCCGCAGAA TGTATTCTAA GCACAAGTAT CATTGTATCT GTCCGATGAG
1001  ATGTGCGGAA GATCCGGACA GATTGTATAA GTATGCAACT AAGCTGAAGA
1051  AAAACTGTAA GGAAATAACT GATAAGGAAT TGGACAAGAA AATGAAGGAG
1101  CTCGCCGCCG TCATGAGCGA CCCTGACCTG GAAACTGAGA CTATGTGCCT
1151  CCACGACGAC GAGTCGTGTC GCTACGAAGG GCAAGTCGCT GTTACCAGG
1201  ATGTATACGC GGTGACGGA CCGACAAGTC TCTATCACCA AGCCAATAAG
1251  GGAGTTAGAG TCGCCTACTG GATAGGCTTT GACACCACCC CTTTTATGTT
1301  TAAGAACTTG GCTGGAGCAT ATCCATCATA CTCTACCAAC TGGGCCGAGC
1351  AAACCGTGTI AACGGCTCGT AACATAGGCC TATGCAGCTC TGACGTTATG
1401  GAGCGGTCAC GTAGAGGGAT GTCCATTCTT AGAAAGAAGT ATTTGAAACC
1451  ATCCAACAAT GTTCTATCT CTGTTGGCTC GACCATCTAC CACGAGAAGA
1501  GGGACTTACT GAGGAGCTGG CACCTGCCGT CTGTATTCA CTTACGTGGC
1551  AAGCAAAATF ACACATGTCG GTGTGAGACT ATAGTTAGTT GCGACGGGTA
1601  CGTCGTTAAA AGAATAGCTA TCAGTCCAGG CCTGTATGGG AAGCCTTCAG
1651  GCTATGCTGC TACGATGCAC CGCGAGGGAT TCTTGTGCTG CAAAGTGACA
1701  GACACATTGA ACGGGGAGAG GGTCTCTTTT CCGTGTGCA CGTATGTGCC
1751  AGCTACATTG TGTGACCAA TGACTGGCAT ACTGCCAACA GATGTCAGTG

```

Fig. 6 CONT.

1801 CGGACGACGC GCAAAAACCTG CTGGTTGGGC TCAACCAGCG TATAGTCGTC
 1851 AACGGTCGCA CCCAGAGAAA CACCAATACC ATGAAAAAAT ACCTTTTGCC
 1901 CGTAGTGGCC CAGGCATTG CTAGGTGGGC AAAGGAATAT AAGGAAGATC
 1951 AAGAAGATGA AAGGCCACTA GGA CTACGAG ATAGACAGTT AGTCATGGGG
 2001 TGTTGTTGGG CTTT TAGAAG GCACAAGATA ACATCTATTT ATAAGCGCCC
 2051 GGATACCCAA ACCATCATCA AAGTGAACAG CGATTCCAC TCATTCTGTC
 2101 TGCCAGGAT AGGCAGTAAC ACATTGGAGA TCGGGCTGAG AACAAGAATC
 2151 AGGAAAAATG TAGAGGAGCA CAAGGAGCCG TCACCTCTCA TTACCGCCGA
 2201 GGACGTACAA GAAGCTAAGT GCGCAGCCGA TGAGGCTAAG GAGGTGCGTG
 2251 AAGCCGAGGA GTTGC GCGCA GCTCTACCAC CTTTGGCAGC TGATGTTGAG
 2301 GAGCCCCTC TGGAAAGCCGA TGTCGACTTG ATGTTACAAG AGGCTGGGGC
 2351 CGGCTCAGT GAGACACCTC GTGGCTTGAT AAAGTTACC AGCTACGCTG
 2401 GCGAGGACAA GATCGGCTCT TACGCTGTGC TTTCTCCGCA GGCTGTACTC
 2451 AAGAGTAAA AATTATCTG CATCCACCT CTCGCTGAAC AAGTCATAGT
 2501 GATAACACAC TCTGGCCGAA AAGGGCGTTA TGCCGTGGAA CCATACCATG
 2551 GTAAAGTAGT GGTGCCAGAG GGACATGCAA TACCCGTCCA GGACTTTCAA
 2601 GCTCTGAGT AAAGTCCAC CATGTGTAC AACGAACGTG AGTTCGTAAA
 2651 CAGGTACCTG CACCATATTG CCACACATGG AGGAGCGCTG AACACTGATG
 2701 AAGAATATTA CAAAACCTGTC AAGCCCAGCG AGCACGACGG CGAATACCTG
 2751 TACGACATCG ACAGGAAACA GTGCGTCAAG AAAGA ACTAG TCACTGGGCT
 2801 AGGGCTCACA GCGGAGCTGG TGGATCCTCC CTTCCATGAA TTCGCCTACG
 2851 AGAGTCTGAG AACACGACCA GCCGCTCCTT ACCAAGTACC AACCATAGGG
 2901 GTGTATGGCG TGCCAGGATC AGGCAAGTCT GGCATCATT AAAGCGCAGT
 2951 CACCAAAAAA GATCTAGTGG TGAGCGCAA GAAAGAAAAC TGTGCAGAAA
 3001 TTATAAGGGA CGTCAAGAAA ATGAAAGGGC TGGACGTCAA TGCCAGAACT
 3051 GTGGACTCAG TGCTCTTGAA TGGATGCAAA CACCCCGTAG AGACCTGTA
 3101 TATTGACGAA GCTTTTGCTT GTCATGCAGG TACTCTCAGA GCGCTCATAG
 3151 CCATTATAAG ACCTAAAAAG GCAGTGTCTT GCGGGGATCC CAAACAGTGC
 3201 GGTTTTTTTA ACATGATGTG CCTGAAAGTG CATTITAACC ACGAGATTG
 3251 CACACAAGTC TTCCACAAAA GCATCTCTCG CCGTTGCACT AAATCTGTGA
 3301 CTTCCGTCGT CTCAACCTTG TTTTACGACA AAAAAATGAG AACGACGAAT
 3351 CCGAAAGAGA CTAAGATTGT GATTGACACT ACCGGCAGTA CCAAACCTAA
 3401 GCAGGACGAT CTCATTCTCA CTTGTTTCAG AGGGTGGGTG AAGCAGTTGC
 3451 AAATAGATTA CAAAGGCAAC GAAATAATGA CGGCAGCTGC CTCTCAAGGG
 3501 CTGACCCGTA AAGGTGTGTA TGCCGTTCCG TACAAGGTGA ATGAAAATCC
 3551 TCTGTACGCA CCCACCTCAG AACATGTGAA CGTCCTACTG ACCCGCACGG
 3601 AGGACCGCAT CGTGTGGAAA AACTAGCCG GCGACCCATG GATAAAAAACA
 3651 CTGACTGCCA AGTACCCTGG GAATTCACCT GCCACGATAG AGGAGTGGCA

FIG. 6 CONT.

3701 AGCAGAGCAT GATGCCATCA TGAGGCACAT CTTGGAGAGA CCGGACCCTA
 3751 CCGACGTCTT CCAGAATAAG GCAAACGTGT GTTGGGCCAA GGCTTTAGTG
 3801 CCGGTGCTGA AGACCGCTGG CATAGACATG ACCACTGAAC AATGGAACAC
 3851 TGTGGATTAT TTTGAAACGG ACAAAGCTCA CTCAGCAGAG ATAGTATTGA
 3901 ACCAACTATG CGTGAGGTTT TTTGGACTCG ATCTGGACTC CGGTCTATTT
 3951 TCTGCACCCA CTGTTCCGTT ATCCATTAGG AATAATCACT GGGATAAECT
 4001 CCCGTCGCCT AACATGTACG GGCTGAATAA AGAAGTGGTC CGTCAGCTCT
 4051 CTCGCAGGTA CCCACABCTG CCTCGGGCAG TTGCCACTGG AAGAGTCTAT
 4101 GACATGAACA CTGGTACACT GCGCAATTAT GATCCGCGCA TAAACCTAGT
 4151 ACCTGTAAAC AGAAGACTGC CTCATGCTTT AGTCCCTCCAC CATAATGAAC
 4201 ACCCACAGAG TGACTTTTCT TCATTCTGCA GCAAATTGAA GGGCAGAECT
 4251 GTCCTGGTGG TCGGGGAAAA GTTGTCCGTC CCAGGCCAAA TGGTTGACTG
 4301 GTTGTGAGAC CGGCCTGAGG CTACCTTCAG AGTCGGCTG GATTTAGGCA
 4351 TCCCAGGTGA TGTGCCAAA TATGACATAA TATTTGTAA TGTGAGACC
 4401 CCATATAAAT ACCATCACTA TCAGCAGTGT GAAGACCATG CCATTAAGCT
 4451 TAGCATGTTG ACCAAGAAAG CTTGTCTGCA TCTGAATCCC GGGGAACCT
 4501 GTGTCAGCAT AGGTTATGGT TACGCTGACA GGGCCAGCGA AAGCATCATT
 4551 GGTGCTATAG CGCGGCAGTT CAAGTTTCC CGGGTATGCA AACCAGAACT
 4601 CTCACTTGAA GAGACGGAAG TTCTGTTTGT ATTCATTGGG TACGATCGCA
 4651 AGGCCCGTAC GCACAATCCT TACAAGCTTT CATCAACCTT GACCAACATT
 4701 TATACAGGTT CCAGACTCCA CGAAGCCGGA TGTGCACCCT CATATCATGT
 4751 GGTGCGAGGG GATATTGCCA CGGCCACCGA AGGAGTGATT ATAAATGCTG
 4801 CTAACAGCAA AGGACAACCT GCGGAGGGG TGTGCGGAGC GCTGTATAAG
 4851 AAGTTCCCGG AAAGCTTCGA TTTACAGCCG ATCGAAGTAG GAAAAGCGCG
 4901 ACTGGTCAAA GGTGCAGCTA AACATATCAT TCATGCCGTA GGACCAAACT
 4951 TCAACAAAGT TTCGGAGGTT GAAGGTGACA AACAGTTGGC AGAGGCTTAT
 5001 GAGTCCATCG CTAAGATTGT CAACGATAAC AATTACAAGT CAGTAGCGAT
 5051 TCCACTGTTG TCCACCGGCA TCTTTCCCGG GAACAAAGAT CGACTAACCC
 5101 AATCATTGAA CCATTTGCTG ACAGCTTTAG ACACCACTGA TGCAGATGTA
 5151 GCCATATACT GCAGGGACAA GAAATGGGAA ATGACTCTCA AGGAAGCAGT
 5201 GGCTAGGAGA GAAGCAGTGG AGGAGATATG CATATCCGAC GACTCTTCAG
 5251 TGACAGAACC TGATGCAGAG CTGGTGAGGG TGCATCCGAA GAGTCTTTG
 5301 GCTGGAAGGA AGGGCTACAG CACAAGCGAT GGCAAAACTT TCTCATATTT
 5351 GGAAGGGACC AAGTTTACC AGGCGGCCAA GGATATAGCA GAAATTAATG
 5401 CCATGTGGCC CGTTGCAACG GAGGCCAATG AGCAGGTATG CATGTATATC
 5451 CTCGGAGAAA GCATGAGCAG TATTAGTCTG AAATGCCCCG TCGAAGAGTC
 5501 GGAAGCCTCC ACACCACCTA GCACGCTGCC TTGCTTGTGC ATCCATGCCA
 5551 TGACTCCAGA AAGAGTACAG CGCCTAAAAG CCTCACGTCC AGAACAAATT

FIG. 6 CONT.

5601 ACTGTGTGCT CATCCTTTC ATTGCCGAAG TATAGAATCA CTGGTGTGCA
 5651 GAAGATCCAA TGCTCCCAGC CTATATTGTT CTCACCGAAA GTGCCTGCGT
 5701 ATATTCATCC AAGGAAGTAT CTCGTGGAAA CACCACCGGT AGACGAGACT
 5751 CCGGAGCCAT CGGCAGAGAA CCAATCCACA GAGGGGACAC CTGAACAACC
 5801 ACCACTTATA ACCGAGGATG AGACCAGGAC TAGAACGCCT GAGCCGATCA
 5851 TCATCGAAGA GGAAGAAGAG GATAGCATAA GTTTGCTGTC AGATGGCCCG
 5901 ACCCACCAGG TGCTGCAAGT CGAGGCAGAC ATTCACGGGC CGCCCTCTGT
 5951 ATCTAGCTCA TCCTGGTCCA TTCCTCATGC ATCCGACTTT GATGTGGACA
 6001 GTTTATCCAT ACTTGACACC CTGGAGGGAG CTAGCGTGAC CAGCGGGGCA
 6051 ACGTCAGCCG AGACTAACTC TTACTTCGCA AAGAGTATGG AGTTTCTGGC
 6101 GCGACCGGTG CCTGCGCCTC GAACAGTATT CAGGAACCTT CCACATCCCG
 6151 CTCGCGCAC AAGAACACCG TCACTTGAC CCAGCAGGGC CTGCTCGAGA
 6201 ACCAGCCTAG TTTCCACCCC GCCAGGCGTG AATAGGGTGA TCACTAGAGA
 6251 GGAGCTCGAG GCGCTTACCC CGTCACGCAC TCCTAGCAGG TCGGTCTCGA
 6301 GAACCAGCCT GGTCTCCAAC CCGCCAGGCG TAAATAGGGT GATTACAAGA
 6351 GAGGAGTTG AGGCGTTCGT AGCACAACAA CAATGACGGT TTGATGCGGG
 6401 TGCATACATC TTTTCCTCCG ACACCGGTCA AGGGCATTTA CAACAAAAAT
 6451 CAGTAAGGCA AACGGTGCTA TCCGAAGTGG TGTGGAGAG GACCGAATTG
 6501 GAGATTTCGT ATGCCCGCG CCTCGACCAA GAAAAAGAAG AATTACTACG
 6551 CAAGAAATTA CAGTTAAATC CCACACCTGC TAACAGAAGC AGATACCAGT
 6601 CCAGGAAGGT GGAGAACATG AAAGCCATAA CAGCTAGACG TATTCTGCAA
 6651 GGCCTAGGGC ATTATTTGAA GGCAGAAGGA AAAGTGGAGT GCTACCGAAC
 6701 CCTGCATCCT GTTCCTTGT ATTCACTAG TGTGAACCGT GCCTTLTCAA
 6751 GCCCCAAGGT CGCAGTGGAA GCCTGTAACG CCATGTTGAA AGAGAACTTT
 6801 CCGACTGTGG CTTCTTACTG TATTATTCCA GAGTACGATG CCTATTGGA
 6851 CATGGTTGAC GGAGCTTCAT GCTGCTTAGA CACTGCCAGT TTTTGCCCTG
 6901 CAAAGCTGCG CAGCTTTCCA AAGAAACACT CCTATTGGA ACCCACAATA
 6951 CGATCGGCAG TGCCTTCAGC GATCCAGAAC ACGCTCCAGA ACGTCCTGGC
 7001 AGCTGCCACA AAAAGAAAT GCAATGTAC GCAATGAGA GAATTGCCCG
 7051 TATTGGATTC GCGGCCCTT AATGTGGAAT GCTTCAAGAA ATATGCGTGT
 7101 AATAATGAAT ATTGGGAAAC GTTAAAGAA AACCCTATCA GGCTTACTGA
 7151 AGAAAACGTG GTAATTACA TTACCAAATT AAAAGGACCA AAAGCTGCTG
 7201 CTCTTTTTCG GAAGACACAT AATTGGAATA TGTGACAGGA CATACCAATG
 7251 GACAGGTTG TAATGGACTT AAAGAGAGAC GTGAAAGTGA CTCCAGGAAC
 7301 AAAACATACT GAAGAACGGC CCAAGTACA GGTGATCCAG GCTGCCGATC
 7351 CGCTAGCAAC AGCGTATCTG TCGGAATCC ACCGAGAGCT GGTAGGAGA
 7401 TTAAATGCGG TCCTGCTTCC GAACATTCAT AACTGTTT ATATGTCGGC
 7451 TGAAGACTTT GACGCTATTA TAGCCGAGCA CTTCCAGCCT GGGGATTGTG

FIG. 6 CONT.

7501 TTCTGGAAAC TGACATCGCG TCGTTTGATA AAAGTGAGGA CGACGCCATG
7551 GCTCTGACCG CGTTAATGAT TCTGGAAGAC TTAGGTGTGG ACGCAGAGCT
7601 GTTGACGCTG ATTGAGGCGG CTTTCGGCGA AATTCATCA ATACATTTGC
7651 CCACTAAAAC TAAATTTAAA TTCGGAGCCA TGATGAAATC TGGAAATGTTT
7701 CTCACACTGT TTGTGAACAC AGTCATTAAC ATTGTAATCG CAAGCAGAGT
7751 GTTGAGAGAA CGGCTAACCG GATCACCATG TGCAGCATTC ATTGGAGATG
7801 ACAATATCGT GAAAGGAGTC AAATCGGACA AATTAATGGC AGACAGGTGC
7851 GCCACCTGGT TGAATATGGA AGTCAAGATT ATAGATGCTG TGGTGGGCGA
7901 GAAAGCGCCt TATTTCTGTG GAGGGTTTAT TTTGTGTGAC TCCGTGACCG
7951 GCACAGCGTG CCGTGTGGCA GACCCCCTAA AAAGGCTGTT TAAGCTTGGC
8001 AAACCTCTGG CAGCAGACGA TGAACATGAT GATGACAGGA GAAGGGCATT
8051 GCATGAAGAG TCAACACGCT GGAACCGAGT GGGTATTCTT TCAGAGCTGT
8101 GCAAGGCAGT AGAATCAAGG TATGAAACCG TAGGAAC TTC CATCATAGTT
8151 ATGGCCATGA CTACTCTAGC TAGCAGTGT AAATCATTCA GCTACCTGAG
| promoter 26S
8201 AGGGGCCCCCT ATRACTCTCT ACGGCTAACC TGAATGGACT ACGACATAGT
8251 CTAGTCCGCC AAGATGTTCC CGTCCAGCC AATGTATCCG ATGCAGCCAA
8301 TGCCCTATCG CAACCCGTTT CCGGCCCCGC GCAGGCCCTG GTTCCCAGAA
8351 ACCGACCCTT TTCTGGCGAT GCAGGTGCAG GAATTAACCC GCTCGATGGC
8401 TAACCTGACG TTCAAGCAAC GCCGGGACGC GCCACCTGAG GGGCCATCCG
8451 CTAAGAAACC GAAGAAGGAG GCCTCGCAA AACAGAAAGG GGGAGGCCAA
8501 GGAAGAAGA AGAAGAACCA AGGAAGAAG AAGGCTAAGA CAGGGCCGCC
8551 TAATCCGAAG GCACAGAATG GAAACAAGAA GAAGACCAAC AAGAAACCAG
8601 GCAAGAGACA GCGCATGGTC ATGAAATGG AATCTGACAA GACGTTCCTCA
8651 ATCATGTTGG AAGGGAAGAT AAACGGCTAC GCTTGTGTGG TCGGAGGGAA
8701 GTTATTCAGG CCGATGCATG TGAAGGCAA GATCGACAAC GACGTTCTGG
8751 CCGCGCTTAA GACGAAGAAA GCATCCAAAT ACGATCTTGA GTATGCAGAT
8801 GTGCCACAGA ACATGCGGGC CGATACATTC AAATACACCC ATGAGAAACC
8851 CCAAGGCTAT TACAGCTGGC ATCATGGAGC AGTCCAATAT GAAAATGGGC
8901 GTTTCACGGT GCCGAAAGGA GTTGGGGCCA AGGGAGACAG CGGACGACCC
8951 ATTCTGGATA ACCAGGGACG GGTGGTCTGCT ATTGTGCTGG GAGGTGTGAA
9001 TGAAGGATCT AGGACAGCCC TTTCAGTCGT CATGTGGAAC GAGAAGGGAG
9051 TTACCGTGAA GTATACTCCG GAGAACTGCG AGCAATGGTC ACTAGTGACC
9101 ACCATGTGTC TGCTCGCAA TGTGACGTTT CCATGTGCTC AACCACCAAT
9151 TTGCTACGAC AGAAAACCAG CAGAGACTTT GGCCATGCTC AGCGTTAACG
9201 TTGACAACCC GGGCTACGAT GAGCTGCTGG AAGCAGCTGT TAAGTGCCCC
9251 GGAAGGAAA GGAGATCCAC CGAGGAGCTG TTTAATGAGT ATAAGCTAAC
9301 GCGCCCTTAC ATGGCCAGAT GCATCAGATG TGCAGTTGGG AGCTGCCATA
9351 GTCCAATAGC AATCGAGGCA GTAAGAGCG ACGGGCACGA CGGTTATGTT

FIG. 6 CONT.

9401 AGACTTCAGA CTCCTCGCA GTATGGCCTG GATTCCTCCG GCAACTTAAA
 9451 GGGCAGGACC ATGCGGTATG ACATGCACGG GACCATTAAA GAGATACCAC
 9501 TACATCAAGT GTCACTCTAT ACATCTCGCC CGTGTACAT TGTGGATGGG
 9551 CACGGTTATT TCCTGCTTGC CAGGTGCCCG GCAGGGGACT CCATCACCAT
 9601 GGAATTTAAG AAAGATTCCG TCAGACACTC CTGCTCGGTG CCGTATGAAG
 9651 TGAAATTTAA TCCTGTAGGC AGAGAACTCT ATAUCTATCC CCCAGAACAT
 9701 GGAGTAGAGC AAGCGTGCCA AGTCTACGCA CATGATGCAC AGAACAGAGG
 9751 AGCTTATGTC GAGATGCACC TCCCGGGCTC AGAAGTGGAC AGCAGTTTGG
 9801 TTTCTTGAG CGGCAGTCA GTCACCGTGA CACCTCCTGA TGGGACTAGC
 9851 GCCCTGGTGG AATGCGAGTG TGGCGGCACA AAGATCTCCG AGACCATCAA
 9901 CAAGACAAAA CAGTTCAGCC AGTGCACAAA GAAGGAGCAG TGCAGAGCAT
 9951 ATCGGCTGCA GAACGATAAG TGGGTGTATA ATTCTGACAA ACTGCCAAA
 10001 GCAGCGGGAG CCACCTTAAA AGGAAAACCTG CATGTCCCAT TCTTGCTGGC
 10051 AGACGGCAAA TGCACCGTGC CTCTAGCACC AGAACCTATG ATAACCTCG
 10101 GTTTCAGATC AGTGTCACTG AACTGCACC CTAAGAATCC CACATATCTA
 10151 ATCACCCGCC AACTTGCTGA TGAGCCTCAC TACACGCACG AGCTCATATC
 10201 TGAACCAGCT GTTAGGAATT TTACCGTAC CGAAAAGGGG TGGGAGTTG
 10251 TATGGGGAAA CCACCCGCCG AAAAGGTTTT GGGCACAGGA AACAGCACCC
 10301 GGAATCCAC ATGGGCTACC GCACGAGGTG ATAACTCATT ATTACCACAG
 10351 ATACCCATG TCCACCATCC TGGGTTTGTG AATTTGTGCC GCCATTGCAA
 10401 CCGTTTCCGT TGCAGCTCT ACCTGGCTGT TTTGCAGATC TAGAGTTGCC
 10451 TGCCTAACFC CTTACCGGCT AACACCTAAC GCTAGGATAC CATTTTGTCT
 10501 GGCITGTGCTT TGCTGCGCCC GCACTGCCCG GGCCGAGACC ACCTGGGAGT
 10551 CCTTGATCA CCTATGGAAC AATAACCAAC AGATGTTCTG GATTCAATTG
 10601 CTGATCCCTC TGGCCGCCTT GATCGTAGTG ACTCGCCTGC TCAGGTGCCT
 10651 GTGCTGTGTC GTGCCTTTT TAGTCATGGC CGGCGCCGCA GGCGCCGGCG
 10701 CCTACGAGCA CGCGACCAG ATGCCGAGCC AAGCGGGAAT CTCGTATAAC
 10751 ACTATAGTCA ACAGAGCAGG CTACGCACCA CTCCCTATCA GCATAACACC
 10801 AACAAAGATC AAGCTGATAC CTACAGTGAA CTTGGAGTAC GTCACCTGCC
 10851 ACTACAAAAC AGGAATGGAT TCACCAGCCA TCAAATGCTG CGGATCTCAG
 10901 GAATGCACTC CAACTTACAG GCCTGATGAA CAGTGCAAAG TCTTCACAGG
 10951 GGTTTACCCG TTCATGTGGG GTGGTGCATA TTGCTTTTGC GACTGAGA
 11001 ACACCCAAGT CAGCAAGGCC TACGTAATGA AATCTGACGA CTGCCTTGGC
 11051 GATCATGCTG AAGCATATAA AGCGCACACA GCCTCAGTGC AGGCGTTCCCT
 11101 CAACATCACA GTGGGAGAAC ACTCTATTGT GACTACCGTG TATGTGAATG
 11151 GAGAAACTCC TGTGAATTC AATGGGGTCA AAATAACTGC AGGTCCGCTT
 11201 TCCACAGCTT GGACACCCTT TGATCGCAAA ATCGTGCAGT ATGCCGGGGA
 11251 GATCTATAAT TATGATTTTC CTGAGTATGG GGCAGGACAA CCAGGAGCAT

Fig. 6 CONT.

11301 TTGGAGATAT ACAATCCAGA ACAGTCTCAA GCTCTGATCT GTATGCCAAT
 11351 ACCAACCTAG TGCTGCAGAG ACCCAAAGCA GGAGCGATCC ACGTGCCATA
 11401 CACTCAGGCA CCTTCGGGT TTAGCAATG GAAGAAAGAT AAAGTCCAT
 11451 CATTGAAATT TACCGCCCT TTCGGATGCG AAATATATAC AAACCCCAT
 11501 CGCGCCGAAA ACTGTGCTGT AGGGTCAATT CCATTAGCCT TTGACATTCC
 11551 CGAGCCCTTG TTCACCAGGG TGTCAGAAAC ACCGACACTT TCAGCGGCCG
 11601 AATGCACTCT TAACGAGTGC GTGTATTCTT CCGACTTTGG TGGGATCGCC
 11651 ACGGTCAAGT ACTCGGCCAG CAAGTCAGGC AAGTGCGCAG TCCATGTGCC
 11701 ATCAGGGACT GCTACCCATA AAGAAGCAGC AGTCGAGCTA ACCGAGCAAG
 11751 GGTGCGGAC TATCCATTTC TCGACCGCAA ATATCCACCC GGAGTTCAGG
 11801 CTCCAAATAT GCACATCATA TGTTACGTGC AAAGGTGATT GTCACCCCCC
 11851 GAAAGACCAT ATTGTGACAC ACCCTCAGTA TCACGCCCAA ACATTACAG
 11901 CCGCGGTGTC AAAAACCCGG TGGACGTGGT TAACATCCCT GCTGGGAGGA
 11951 TCAGCCGTAA TTATTATAAT TGGCTTGGTG CTGGCTACTA TTGTGGCCAT
 12001 GTACGTGCTG ACCAACCAGA AACATAATTG AATACAGCAG CAATTGGCAA
 12051 GCTGCTTACA TAGAACTCGC GGCATTGGC ATGCCGCCTT AAAATTTTAA
 12101 TTTTATTTTT TCTTTCTTT TCCGAATCGG ATTTTGTTTT TAATATTTCA
 12151 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA GGTACGCGG CCGCCACTGT GCTGGATATC
 12201 TGCAGAATTC CACCACACTG GACTAGTGA TCAGCTTAAG TTTAAACCGC
 12251 TGATCAGCCT CGACTGTGCC TTCTAGTTGC CAGCCATCTG TTGTTTGCCC
 12301 CTCCCCCGTG CCTTCCTTGA CCCTGGAAGG TGCCACTCCC ACTGTCCTTT
 12351 CCTAATAAAA TGAGGAAATT GCATCGCATT GTCTGAGTAG GTGTCATTCT
 12401 ATTCTGGGGG GTGGGGTGGG GCAGGAC

FIG. 7: FRAGMENTO DE LA SECUENCIA DE ADN DEL PLÁSMIDO MODIFICADO PAA_TC-83_C_GP

```

1  ACAAGGCAAG GCTTGACCGA CAATTGCATG AAGAATCTGC TTAGGGTTAG
51  GCGTTTTGCG CTGCTTCGCG ATGTACGGGC CAGATATACG CGTGGCGCGC
    |AscI
    | inicio del promotor CMV
101 CTGACATTGA TTATTGACTA GTTATTAATA GTAATCAATT ACGGGGTCAT
151 TAGTTCATAG CCCATATATG GAGTTCGCGG TTACATAACT TACGGTAAAT
201 GGGCCGCGCT GCTGACCGCC CAACGACCCC CGCCCATTGA CGTCAATAAT
251 GACGTATGTT CCCATAGTAA CGCCAATAGG GACTTTCAT  TGACGTCAAT
301 GGGTGGAGTA TTTACGGTAA ACTGCCCACT TGGCAGTACA TCAAGTGTAT
351 CATATGCCAA GTACGCCCCC TATTGACGTC AATGACGGTA AATGGCCCGC
401 CTGGCATTAT GCCCAGTACA TGACCTTATG GGACTTTCCT ACTTGGCAGT
451 ACATCTACGT ATTAGTCATC GCTATTACCA TGGTGATGCG GTTTGGCAG
501 TACATCAATG GCGTGGATA GCGGTTTGAC TCACGGGGAT TTCCAAGTCT
551 CCACCCCAT  GACGTCAATG GGAGTTTGT  TTGGCAACAA AATCAACGGG
601 ACTTTCCAAA ATGTCGTAAC AACTCCGCCC CATTGACGCA AATGGCGGT
    | final del promotor CMV
651 AGGCGTGTAC GGTGGGAGGT CTATATAAGC AGAGCTCTCT GGCTAACTAG
    | inicio del ADNi de TC-83
701 AGATAGGCGG CGCATGAGAG AAGCCCAGAC CAATTACCTA CAAAAARTGG
751 AGAAAGTTCA CGTTGACATC GAGGAAGACA GCCCATTCCT CAGAGCTTTG
801 CAGCGGAGCT TCCCGCAGTT TGAGGTAGAA GCCAAGCAGG TCACTGATAA
851 TGACCATGCT AATGCCAGAG CGTTTTCGCA TCTGGCITCA AAACGTATCG
901 AAACGGAGGT GGACCCATCC GACACGATCC TTGACATTGG AAGTGCGCCC
951 GCCCCGAGAA TGTATTCTAA GCACAAGTAT CATTGTATCT GTCCGATGAG
1001 ATGTGCGGAA GATCCGGACA GATTGTATAA GTATGCAACT AAGCTGAAGA
1051 AAAACTGTAA GAAAATAACT GATAAGGAAT TGGACAAGAA AATGAAGGAG
1101 CTCGCCCGCG TCATGAGCGA CCCTGACCTG GAAACTGAGA CTATGTGCCT
1151 CCACGACGAC GAGTCGTGTC GCTACGAAGG GCAAGTCGCT GTTTACCAGG
1201 ATGTATACGC GGTGACGGA CCGACAAGTC TCTATACCA AGCCAATAAG
1251 GGAGTTAGAG TCGCCTACTG GATAGGCTTT GACACCACCC CTTTATGTT
1301 TAAGAACTTG GCTGGAGCAT ATCCATCATA CTCTACCAAC TGGGCCGAGC
1351 AAACCGTGT  AACGGCTCGT AACATAGGCC TATGCAGTC  TGACGTTATG
1401 GAGCGGTCAC GTAGAGGGAT GTCCATCTT  AGAAAGAAGT ATTTGAAACC
1451 ATCCAACAAT GTTCTATTCT CTGTTGGCTC GACCATCTAC CACGAGAAGA
1501 GGGACTTACT GAGGAGCTGG CACCTGCCGT CTGTATTTCA CTTACGTGGC
1551 AAGCAAATT  ACACATGTCG GTGTGAGACT ATAGTTAGTT GCGACGGGTA
1601 CGTCGTAA  AGAATAGCTA TCAGTCCAGG CCTGTATGGG AAGCCTTCAG
1651 GCTATGCTGC TACGATGCAC CGCGAGGGAT TCTTGTGCTG CAAAGTGACA
1701 GACACATTGA ACGGGGAGAG GGTCTCTTT  CCCGTGPGCA CGTATGTGCC

```

FIG. 7 CONT.

1751 AGCTACATTG TGTGACCAAA TGACTGGCAT ACTGGCAACA GATGTCAGTG
 1801 CGGACGACGC GCAAAAACCTG CTGGTTGGGC TCAACCAGCG TATAGTCGTC
 1851 AACGGTCGCA CCCAGAGAAA CACCAATACC ATGAAAAATT ACCTTTTGCC
 1901 CGTAGTGGCC CAGGCATTG CTAGGTGGGC AAAGGAATAT AAGGAAGATC
 1951 AAGAAGATGA AAGGCCACTA GGACTIONGAG ATAGACAGTT AGTCATGGGG
 2001 TGTGTGGG CTTTAGAAG GCACAAGATA ACATCTATTT ATAAGCGCCC
 2051 GGATACCCAA ACCATCATCA AAGTGAACAG CGATTTCCAC TCATTGCTGC
 2101 TGCCAGGAT AGGCAGTAAC ACATTGGAGA TCGGGCTGAG AACAGAATC
 2151 AGGAAATGT TAGAGGAGCA CAAGGAGCCG TCACCTCTCA TTACCGCCGA
 2201 GGACGTACAA GAAGCTAAGT GCGCAGCCGA TGAGGCTAAG GAGGTGCGTG
 2251 AAGCCGAGGA GTTGCGCGCA GCTCTACCAC CTTGGCAGC TGATGTTGAG
 2301 GAGCCCACTC TGGAAGCCGA TGTGACTTG ATGTTACAAG AGGCTGGGGC
 2351 CGGCTCAGTG GAGACACCTC GTGGCTTGAT AAAGTTACC AGCTACGCTG
 2401 GCGAGGACAA GATCGGCTCT TACGCTGTGC TTTCTCCGCA GGCTGTACTC
 2451 AAGAGTGAAG AATTATCTG CATCCACCCT CTCGCTGAAC AAGTCATAGT
 2501 GATAACACAC TCTGGCCGAA AAGGGCGTTA TGCCGTGGAA CCATACCATG
 2551 GTAAAGTAGT GGTGCCAGAG GGACATGCAA TACCCGTCCA GGACTTTCAA
 2601 GCTCTGAGTG AAAGTGCCAC CATTGTGTAC AACGAACGTG AGTTCGTAAG
 2651 CAGTACCTG CACCATATTG CCACACATGG AGGAGCGCTG AACACTGATG
 2701 AAGAATATTA CAAAACCTG AAGCCAGCG AGCACGACGG CGAATACCTG
 2751 TACGACATCG ACAGGAAACA GTGCGTCAAG AAAGAAGTAG TCACTGGGCT
 2801 AGGGCTCACA GCGGAGCTGG TGGATCCTCC CTTCATGAA TTCGCCTACG
 2851 AGAGTCTGAG AACACGACCA GCCGCTCCTT ACCAAGTACC AACCATAGGG
 2901 GTGTATGGCG TGCCAGGATC AGGCAAGTCT GGCATCATTAAAGCGCAGT
 2951 CACCAAAAAA GATCTAGTGG TGAGCGCAA GAAAGAAAAC TGTGCAGAAA
 3001 TTATAAGGGA CGTCAAGAAA ATGAAAGGGC TGGACGTCAA TGCCAGAACT
 3051 GTGGACTCAG TGCTCTTGAA TGGATGCAAA CACCCCGTAG AGACCCTGTA
 3101 TATTGACGAA GCTTTTGCTT GTCATGCAGG TACTCTCAGA GCGCTCATAG
 3151 CCATTATAAG ACCTAAAAAG GCAGTGTCTT GCGGGGATCC CAAACAGTGC
 3201 GGTTTTTTTA ACATGATGTG CCTGAAAGTG CATTITAACC ACGAGATTTG
 3251 CACACAAGTC TTCCACAAAA GCATCTCTCG CCGTTGCACT AAATCTGTGA
 3301 CTTGCGTCTG CTCAACCTTG TTTTACGACA AAAAAATGAG AACGACGAAT
 3351 CCGAAAGAGA CTAAGATTGT GATTGACACT ACCGGCAGTA CCAAACCTAA
 3401 GCAGGACGAT CTCATTCTCA CTTGTTTCAG AGGGTGGGTG AAGCAGTTGC
 3451 AATAGATTA CAAAGGCAAC GAAATAATGA CCGCAGCTGC CTCTCAAGGG
 3501 CTGACCCGTA AAGGTGTGTA TGCCGTTCGG TACAAGGTGA ATGAAAAATCC
 3551 TCTGTACGCA CCCACCTCAG AACATGTGAA CGTCTACTG ACCCGCACGG
 3601 AGGACCGCAT CGTGTGGAAG AACTAGCCG GCGACCCATG GATAAAAAACA

FIG. 7 CONT.

3651 CTGACTGCCA AGTACCCTGG GAATTTCACT GCCACGATAG AGGAGTGGCA
 3701 AGCAGAGCAT GATGCCATCA TGAGGCACAT CTTGGAGAGA CCGGACCCTA
 3751 CCGACGTCTT CCAGAATAAG GCAAACGTGT GTTGGGCCAA GGCTTTAGTG
 3801 CCGGTGCTGA AGACCGCTGG CATAGACATG ACCACTGAAC AATGGAACAC
 3851 TGTGGATTAT TTTGAAACGG ACAAAGCTCA CTCAGCAGAG ATAGTATTGA
 3901 ACCAACTATG CGTGAGGTTC TTTGGACTCG ATCTGGACTC CGGTCTATTT
 3951 TCTGCACCCA CTGTTCCGTT ATCCATTAGG AATAATCACT GGGATAACTC
 4001 CCCGTCGCCT AACATGTACG GGCTGAATAA AGAAGTGGTC CGTCAGCTCT
 4051 CTCGCAGGTA CCCACAAC TG CCTCGGGCAG TTGCCACTGG AAGAGTCTAT
 4101 GACATGAACA CTGGTACACT GCGCAATTAT GATCCGCGCA TAAACCTAGT
 4151 ACCTGTAAAC AGAAGACTGC CTCATGCTTT AGTCCTCCAC CATAATGAAC
 4201 ACCCAGAGAG TGACTTTTCT TCATTGCTCA GCAAATTGAA GGGCAGAACT
 4251 GTCCTGGTGG TCGGGGAAAA GTTGTCCGTC CCAGGCAAAA TGGTTGACTG
 4301 GTTGTGAGAC CGGCCTGAGG CTACCTTCAG AGCTCGGCTG GATTTAGGCA
 4351 TCCCAGGTGA TGTGCCAAA TATGACATAA TATTTGTTAA TGTGAGGACC
 4401 CCATATAAAT ACCATCACTA TCAGCAGTGT GAAGACCATG CCATTAAGCT
 4451 TAGCATGTTG ACCAAGAAAG CTTGTCTGCA TCTGAATCCC GCGGGAACCT
 4501 GTGTCAGCAT AGGTTATGGT TACGCTGACA GGGCCAGCGA AAGCATCATT
 4551 GGTGCTATAG CGCGGCAGTT CAAGTTTTCC CGGGTATGCA AACCGAAATC
 4601 CTCACTTGAA GAGACGGAAG TTCTGTTTGT ATTCATTGGG TACGATCGCA
 4651 AGGCCCGTAC GCACAATCCT TACAAGCTTT CATCAACCTT GACCAACATT
 4701 TATACAGGTT CCAGACTCCA CGAAGCCGGA TGTGCACCCT CATATCATGT
 4751 GGTGCGAGGG GATATTGCCA CGGCCACCGA AGGAGTGATT ATAAATGCTG
 4801 CTAACAGCAA AGGACAACCT GCGGAGGGG TGTGCGGAGC GCTGTATAAG
 4851 AAGTTCCCGG AAAGCTTCGA TTTACAGCCG ATCGAAGTAG GAAAAGCGCG
 4901 ACTGGTCAA GGTGCAGTA AACATATCAT TCATGCCGTA GGACCAAACCT
 4951 TCAACAAAGT TTCGGAGGTT GAAGGTGACA AACAGTTGGC AGAGGCTTAT
 5001 GAGTCCATCG CTAAGATTGT CAACGATAAC AATTACAAGT CAGTAGCGAT
 5051 TCCACTGTTG TCCACC GGCA TCTTTTCCGG GAACAAAGAT CGACTAACCC
 5101 AATCATTGAA CCATTTGCTG ACAGCTTTAG ACACCACTGA TGCAGATGTA
 5151 GCCATATACT GCAGGGACAA GAAATGGGAA ATGACTCTCA AGGAAGCAGT
 5201 GGCTAGGAGA GAAGCAGTGG AGGAGATATG CATATCCGAC GACTCTTCAG
 5251 TGACAGAACC TGATGCAGAG CTGGTGAGGG TGCATCCGAA GAGTCTTTG
 5301 GCTGGAAGGA AGGGCTACAG CACAAGCGAT GGCAAAACCT TCTCATATTT
 5351 GGAAGGGACC AAGTTTCACC AGGCGGCCAA GGATATAGCA GAAATTAATG
 5401 CCATGTGGCC CGTTGCAACG GAGGCCAATG AGCAGGTATG CATGTATATC
 5451 CTCGGAGAAA GCATGAGCAG TATTAGGTCG AAATGCCCGG TCGAAGAGTC
 5501 GGAAGCCTCC ACACCACCTA GCACGCTGCC TTGCTTGTGC ATCCATGCCA

FIG. 7 CONT.

5551 TGACTCCAGA AAGAGTACAG CGCCTAAAAG CCTCACGTCC AGAACAAATT
 5601 ACTGTGTGCT CATCCTTTCC ATTGCCGAAG TATAGAATCA CTGGTGTGCA
 5651 GAAGATCCAA TGCTCCCAGC CTATATTGTT CTCACCGAAA GTGCCTGCGT
 5701 ATATTTCATCC AAGGAAGTAT CTCGTGGAAA CACCACCGGT AGACGAGACT
 5751 CCGGAGCCAT CGGCAGAGAA CCAATCCACA GAGGGGACAC CTGAACAACC
 5801 ACCACTTATA ACCGAGGATG AGACCAGGAC TAGAACGCCT GAGCCGATCA
 5851 TCATCGAAGA GGAAGAAGAG GATAGCATAA GTTGTCTGTC AGATGGCCCC
 5901 ACCCACCAGG TGCTGCAAGT CGAGGCAGAC ATTCACGGGC CGCCCTCTGT
 5951 ATCTAGCTCA TCCTGGTCCA TTCCTCATGC ATCCGACTTT GATGTGGACA
 6001 CTTTATCCAT ACTTGACACC CTGGAGGGAG CTAGCGTGAC CAGCGGGGCA
 6051 ACGTCAGCCG AGACTAACTC TTA CTTCGCA AAGAGTATGG AGTTTCTGGC
 6101 GCGACCGGTG CCTGCGCCTC GAACAGTATT CAGGAACCCCT CCACATCCCC
 6151 CTCGCGCAC AAGAACACCG TCACTTGAC CCAGCAGGGC CTGCTCGAGA
 6201 ACCAGCCTAG TTTCCACCCC GCCAGGCGTG AATAGGGTGA TCACTAGAGA
 6251 GGAGCTCGAG GCGCTTACCC CGTCACGCAC TCCTAGCAGG TCGGTCTCGA
 6301 GAACCAGCCT GGTCTCCAAC CCGCCAGGCG TAAATAGGGT GATTACAAGA
 6351 GAGGAGTTG AGGCGTTCTGT AGCACAACAA CAATGACGGT TTGATGCGGG
 6401 TGCATACATC TTTTCTCCG ACACCGGTCA AGGGCATTTA CAACAAAAAT
 6451 CAGTAAGGCA AACGGTGCTA TCCGAAGTGG TGTGGAGAG GACCGAATTG
 6501 GAGATTTCGT ATGCCCCGCG CCTCGACCAA GAAAAAGAAG AATTACTACG
 6551 CAAGAAATTA CAGTTAAATC CCACACCTGC TAACAGAAGC AGATACCAGT
 6601 CCAGGAAGGT GGAGAACATG AAAGCCATAA CAGCTAGACG TATTCTGCAA
 6651 GGCCTAGGGC ATTATTTGAA GGCAGAAGGA AAAGTGGAGT GCTACCGAAC
 6701 CCTGCATCCT GTTCTTTGT ATTCACTAG TGTGAACCGT GCCTTTTCAA
 6751 GCCCAAGGT CGCAGTGGAA GCCTGTAACG CCATGTTGAA AGAGAACTTT
 6801 CCGACTGTGG CTTCTTACTG TATTATTCCA GAGTACGATG CCTATTTGGA
 6851 CATGGTTGAC GGAGCTTCAT GCTGCTTAGA CACTGCCAGT TTTTGCCCTG
 6901 CAAAGCTGCG CAGCTTTCCA AAGAAACACT CCTATTTGGA ACCCACAATA
 6951 CGATCGGCAG TGCCTTCAGC GATCCAGAAC ACGCTCCAGA ACGTCTGGC
 7001 AGCTGCCACA AAAAGAAATT GCAATGTAC GCAAATGAGA GAATTGCCCG
 7051 TATGGATTG GCGGCCTTT AATGTGGAAT GCTTCAAGAA ATATGCGTGT
 7101 AATAATGAAT ATTTGGAAAC GTTTAAAGAA AACCCCATCA GGCTTACTGA
 7151 AGAAAACGTG GTAATTACA TTACCAAATT AAAAGGACCA AAAGCTGCTG
 7201 CTCITTTTGC GAAGACACAT AATTGAATA TGTGCGAGGA CATACCAATG
 7251 GACAGGTTG TAATGGACTT AAAGAGAGAC GTGAAAGTGA CTCCAGGAAC
 7301 AAAACATACT GAAGAACGGC CCAAGGTACA GGTGATCCAG GCTGCCGATC
 7351 CGCTAGCAAC AGCGTATCTG TCGGAAATCC ACCGAGAGCT GGTAGGAGA
 7401 TTAAATGCGG TCCTGCTTCC GAACATTCAT AACTGTGTTG ATATGTCGGC

FIG. 7 CONT.

7451 TGAAGACTTT GACGCTATTA TAGCCGAGCA CTTCCAGCCT GGGGATTGTG
 7501 TTCTGGAAC TGACATCGCG TCGTTTGATA AAAGTGAGGA CGACGCCATG
 7551 GCTCTGACCG CGTTAATGAT TCTGGAAGAC TTAGGTGTGG ACGCAGAGCT
 7601 GTTGACGCTG ATTGAGGCGG CTTTCGGCGA AATTCATCA ATACATTGTC
 7651 CCACTAAAAC TAAATTTAAA TTCGGAGCCA TGATGAAATC TGGAAATGTC
 7701 CTCACACTGT TTGTGAACAC AGTCATTAAC ATTGTAATCG CAAGCAGAGT
 7751 GTTGAGAGAA CGGCTAACCG GATCACCATG TGCAGCATTC ATTGGAGATG
 7801 ACAATATCGT GAAAGGAGTC AAATCGGACA AATTAATGGC AGACAGGTGC
 7851 GCCACCTGGT TGAATATGGA AGTCAAGATT ATAGATGCTG TGSTGGGCGA
 7901 GAAAGCGCCT TATTTCTGTG GAGGGTTTAT TTTGTGTGAC TCCGTGACCG
 7951 GCACAGCGTG CCGTGTGGCA GACCCCTAA AAAGGCTGTT TAAGCTTGGC
 8001 AACCTCTGG CAGCAGACGA TGAACATGAT GATGACAGGA GAAGGGCATT
 8051 GCATGAAGAG TCAACACGCT GGAACCGAGT GGGTATTCTT TCAGAGCTGT
 8101 GCAAGGCAGT AGAATCAAGG TATGAAACCG TAGGAACTTC CATCATAGTT
 8151 ATGGCCATGA CTA¹CTCTAGC TAGCAGTGT AAATCATTCA GCTACCTGAG
 8201 AGGGGCCCT ATA¹ACTCTCT ACGGCTAACC TGAATGGACT ACGACATAGT
 8251 CTAGTCCGCC AAGATGTTCC CGTTCAGCC AATGTATCCG ATGCAGCCAA
 8301 TGCCCTATCG CAACCCGTTT CCGGCCCGC GCAGGCCCTG GTTCCCAGA
 8351 ACCGACCTT TTCTGGCGAT GCAGGTGCAG GAATTAACCC GCTCGATGGC
 8401 TAACCTGACG TTCAAGCAAC GCCGGGACGC GCCACCTGAG GGGCCATCCG
 8451 CTAAGAAACC GAAGAAGGAG GCCTCGCAA AACAGAAAG GGGAGGCCAA
 8501 GGAAGAAGA AGAAGAACCA AGGGAAGAAG AAGGCTAAGA CAGGGCCGCC
 8551 TAATCCGAAG GCACAGAATG GAAACAAGAA GAAGACCAAC AAGAAACCAG
 8601 GCAAGAGACA GCGCATGGTC ATGAAATTGG AATCTGACAA GACGTTCCCA
 8651 ATCATGTTGG AAGGGAAGAT AAACGGCTAC GCTTGTGTGG TCGGAGGAA
 8701 GTTATTCAGG CCGATGCATG TGAAGGCAA GATCGACAAC GACGTTCTGG
 8751 CCGCGTTAA GACGAAGAAA GCATCCAAAT ACGATCTGA GTATGCAGAT
 8801 GTGCCACAGA ACATGCGGGC CGATACATTC AAATACACCC ATGAGAAACC
 8851 CCAAGGCTAT TACAGCTGGC ATCATGGAGC AGTCCAATAT GAAAATGGGC
 8901 GTTTCACGGT GCCGAAAGGA GTTGGGGCCA AGGGAGACAG CGGACGACCC
 8951 ATTCTGGATA ACCAGGGACG GGTGGTCGCT ATTGTGCTGG GAGGTGTGAA
 9001 TGAAGGATCT AGGACAGCCC TTTCAATCGT CATGTGGAAC GAGAAGGGAG
 9051 TTACCGTGAA GTATACTCCG GAGAACTGCG AGCAATGGTG ACTAGTGACC
 9101 ACCATGTGTC TGCTCGCCAA TGTGACGTTT CCATGTGCTC AACCACCAAT
 9151 TTGCTACGAC AGAAAACCAG CAGAGACTTT GGCCATGCTC AGCGTTCCTA
 9201 TAACTCTCTA CGGCTAACCT GAATGGACTA Cgacatagtc tagtccgcca
 9251 agatgtcact agtgaccacc atgtgtctgc tcgccaatgt gacgttccca
 9301 tgtgctcaac caccaatttg ctacgacaga aaaccagcag agactttggc

FIG. 7 CONT.

9351 catgctcagc gttaacgttg acaaccggg ctacgatgag ctgctggaag
 9401 cagctgttaa gtgccccga aggaaaagga gatccaccga ggagctgttt
 9451 aatgagtata agctaacgag cccttacatg gccagatgca tcagatgtgc
 9501 agttgggagc tgccatagtc caatagcaat cgaggcagta aagagcgagc
 9551 ggcacgacgg ttatgttaga cttcagactt cctcgcagta tggcctggat
 9601 tcctccggca acttaaggag caggaccatg cggatgaca tgcacgggac
 9651 cattaagag ataccactac atcaagtgtc actctataca tctcggcctg
 9701 gtcacattgt ggatgggac gggtatttcc tgcttgccag gtgccccgca
 9751 ggggactcca tcaccatgga atttaagaaa gattccgta gacactcctg
 9801 ctggtgccc tatgaagtga aatttaatcc tgtaggcaga gaactctata
 9851 ctcatcccc agaacacgga gtagagcaag cgtgccaagt ctacgcacat
 9901 gatgcacaga acagaggagc ttatgtcgag atgcacctcc cgggctcaga
 9951 agtgacagc agtttggttt ccttgagcgg cagttcagtc accgtgacac
 10001 ctctgatgg gactagcggc ctggtggaat gcgagtgtgg cggcacaag
 10051 atctccgaga ccatcaaca gacaaaacag ttcagccagt gcacaagaa
 10101 ggagcagtc agagcatatc ggctgcagaa cgataagtgg gtgtataatt
 10151 ctgacaaact gcccaaagca gcgggagcca ccttaaaagg aaaactgcat
 10201 gtccattct tgctggcaga cggcaaatgc accgtgcctc tagcaccaga
 10251 acctatgata accttcggtt tcagatcagt gtcactgaaa ctgcacccta
 10301 agaatcccc atatctaate acccgccaac ttgctgatga gcctcactac
 10351 acgcacgagc tcatatctga accagctgtt aggaatttta ccgtcaccga
 10401 aaaaggttg gagtttgat ggggaaacca cccgccgaaa aggttttggg
 10451 cacaggaac agcaccgga aatccacatg ggctaccgca cgaggtgata
 10501 actcattatt accacagata ccctatgtcc accatcctgg gtttgcaat
 10551 ttgtgccgc attgcaaccg tttccgttgc agcgtctacc tggctgttt
 10601 gcagatctag agttgcgtgc ctaactcctt accggctaac acctaacgct
 10651 aggataccat tttgtctggc tgtgcttgc tgcgcccgca ctgcccggc
 10701 cgagaccacc tgggagtcct tggatcacct atggaacaat aaccaacaga
 10751 tgttctggat tcaattgctg atccctctgg cgccttgat cgtagtgact
 10801 cgccgtctca ggtgcgtgtg ctgtgtcgtg ccttttttag tcatggccgg
 10851 cgccgaggc gccggcgct acgagcacgc gaccacgatg ccgagccaag
 10901 cgggaatctc gtataacact atagtcaaca gagcaggcta cgcaccactc
 10951 cctatcagca taaccaaac aaagatcaag ctgataccta cagtgaactt
 11001 ggagtacgac acctgccact acaaaacag aatggattca ccagccatca
 11051 aatgctcgg atctcaggaa tgcactcca cttacaggcc tgatgaacag
 11101 tgcaagtct tcacaggggt ttaccggtc atgtggggtg gtgcatattg
 11151 cttttgcgac actgagaaca ccaagtcag caaggcctac gtaatgaat
 11201 ctgacgactg ccttgcggat catgctgaag catataaagc gcacacagcc

FIG. 7 CONT.

11251 tcagtcgagg cgttcctcaa catcacagtg ggagaacact ctattgtgac
 11301 taccgtgtat gtgaatggag aaactcctgt gaatttcaat ggggtcaaaa
 11351 taactgcagg tccgctttcc acagcttggg caccctttga tcgcaaaatc
 11401 gtgcagtatg ccggggagat ctataattat gattttcctg agtatggggc
 11451 aggacaacca ggagcatttg gagatataca atccagaaca gtctcaagct
 11501 ctgatctgta tgccaatacc aacctagtgc tgcagagacc caaagcagga
 11551 gcgatccacg tgccatacac tcaggcacct tcgggttttg agcaatggaa
 11601 gaaagataaa gtcctcatcat tgaatttac cgccccttcc ggatgcgaaa
 11651 tatatacaaa cccattcgc gccgaaaact gtgctgtagg gtcaattcca
 11701 ttagcctttg acattcccga cgccttgctc accaggggtg cagaaacacc
 11751 gacactttca gcggccgaat gcaactctta cgagtgcgtg tattcttccg
 11801 actttggtgg gatcgccacg gtcaagtact cggccagcaa gtcaggcaag
 11851 tgcgcagtcc atgtgccatc agggactgct accctaaaag aagcagcagt
 11901 cgagctaacc gagcaagggt cggcgactat ccatctctcg accgcaata
 11951 tccacccgga gttcaggctc caaatatgca catcatatgt tacgtgcaaa
 12001 ggtgattgtc accccccgaa agaccatatt gtgacacacc ctcagtatca
 12051 cccccaaa tttacagccg cggTGTCAAA AACCGCGTGG ACGTGGTTAA
 12101 CATCCCTGCT GGGAGGATCA GCCGTAATTA TTATAATTGG CTTGGTGCTG
 12151 GCTACTATTG TGGCCATGTA CGTGCTGACC AACCAGAAAC ATAATTGAAT
 12201 ACAGCAGCAA TTGGCAAGCT GCTTACATAG AACTCGCGGC GATTGGCATG
 12251 CCGCCTTAAA ATTTTATTT TATTTTCTT TTTCTTTTCC GAATCGGATT
 12301 TTGTTTTTAA TATTTCAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAGGG TACGCGCCG
 12351 CCACTGTGCT GGATATCTGC AGAATTCAC CACTGGAC TAGTGGATCA
 12401 GCTTAAGTTT AAACCGCTGA TCAGCCTCGA CTGTGCCTC TAGTTGCCAG
 12451 CCATCTGTTG TTTGCCCTC CCCCCTGCCT TCCTTGACCC TGAAGGTGC
 12501 CACTCCCACT GTCCTTTCCT AATAAAATGA GGAAATTGCA TCGCATTGTC
 12551 TGAGTAGGTG TCATTCTATT CTGGGGGGTG GGGTGGGGCA GGAC

¹ final de la secuencia de TC-83

¹ sitio de Poli (A)

Fig. 8: FRAGMENTO DE LA SECUENCIA DE ADN_i DE pCMV_YF17D

```

1  ACAAGGCAAG GCTTGACCGA CAATTGCATG AAGAATCTGC TTAGGGTTAG
51  GCGTTTTGCG CTGCTTCGCG ATGTACGGGC CAGATATACG CGTGGCGCGC
      ↓ INICIO DEL PROMOTOR CMV
101 CTGACATTGA TTATTGACTA GTTATTAATA GTAATCAATT ACGGGGTCAT
151 TAGTTCATAG CCCATATATG GAGTTCGCGG TTACATAACT TACGGTAAAT
201 GGCCCGCCTG GCTGACCGCC CAACGACCCC CGCCCATGTA CGTCAATAAT
251 GACGTATGTT CCCATAGTAA CGCCAATAGG GACTTTCAT  TGACGTCAAT
301 GGGTGGAGTA TTTACGGTAA ACTGCCCACT TGCCAGTACA TCAAGTGTAT
351 CATATGCCAA GTACGCCCCC TATTGACGTC AATGACGGTA AATGGCCCGC
401 CTGGCATTAT GCCCAGTACA TGACCTTATG GGACTTTCCT ACTTGGCAGT
451 ACATCTACGT ATTAGTCATC GCTATTACCA TGGTGATGCG GTTTTGGCAG
501 TACATCAATG GCGGTGGATA GCGGTTTGAC TCACGGGGAT TTCCAAGTCT
551 CCACCCCAT  GACGTCAATG GGAGTTTGT  TTGGACCAA AATCAACGGG
601 ACTTCCAAA  ATGTCGTAAC AACTCCGCC  CATTGACGCA AATGGGGCGT
      ↓ FINAL DEL PROMOTOR CMV
651 AGGCGTGTAC GGTGGGAGGT CTATATAAGC AGAGCTCTCT GGCTAACTAG
      ↓ inicio del ADNi de YF 17D
701 AGAGTAAATC CTGTGTGCTA ATTGAGGTGC ATTGGTCTGC AAATCGAGTT
751 GCTAGGCAAT AAACACATTT GGATTAATTT TAATCGTTCG TTGAGCGATT
801 AGCAGAGAAC TGACCAGAAC ATGTCTGGTC GTAAAGCTCA GGGAAAAACC
851 CTGGGCGTCA ATATGGTACG ACGAGGAGTT CGCTCCTTGT CAAACAAAAT
901 AAAACAAAA  ACAAACAAA  TTGGAACAG  ACCTGGACCT  TCAAGAGGTG
951 TTCAAGGATT TATCTTTTTC TTTTGTGTC  ACATTTGAC  TGGAAAAAAG
1001 ATCAGAGCCC ACCTAAAGAG GTTGTGAAA  ATGCTGGACC  CAAGACAAGG
1051 CTTGGCTGTT CTAAGGAAAG TCAAGAGAGT GGTGGCCAGT TTGATGAGAG
1101 GATTGTCTCT AAGGAAACGC CGTCCCATG  ATGTTCTGAC  TGTGCAATTC
1151 CTAATTTTGG GAATGCTGTT GATGACGGGT GGAGTGACCT TGGTSCGGAA
1201 AAACAGATGG TTGCTCCTAA ATGTGACATC TGAGGACCTC GGGAAAAACAT
1251 TCTCTGTGGG CACAGGCAAC TGCACAACAA ACATTTTGA  AGCCAAGTAC
1301 TGGTGCCAG  ACTCAATGGA ATACAACGT  CCCAATCTCA  GTCCAAGAGA
1351 GGAGCCAGAT GACATTGATT GCTGGTGCTA TGGGGTGGAA AACGTTAGAG
1401 TCGCATATGG TAAGTGTGAC TCAGCAGGCA GGTCTAGGAG GTCAAGAAGG
1451 GCCATTGACT TGCTTACGCA TGAAAACCAT GTTTGAAGA CCCGGCAAGA
1501 AAAATGGATG ACTGGAAGAA TGGGTGAAAG GCAACTCAA  AAGATTGAGA
1551 GATGGTTCGT GAGGAACCCC TTTTGTGCG  TGACGGCTCT  GACCATTGCC
1601 TACCTTGTGG GAAGCAACAT GACGCAACGA GTCGTGATTG CCCTACTGGT
1651 CTTGGCTGTT GGTCCGGCCT ACTCAGCTCA CTGCATTGGA ATTACTGACA
1701 GGGATTTTCA  TGAGGGGGTG  CATGGAGGAA  CTTGGGTTTC  AGCTACCCCTG
1751 GAGCAAGACA AGTGTGTCAC TGTTATGGCC CCTGACAAGC CTTTATTGGA

```

Fig. 8 CONT.

1801 CATCTCACTA GAGACAGTAG CCATTGATAG ACCTGCTGAG GTGAGGAAAG
 1851 TGTGTTACAA TGCAGTTCTC ACTCATGTGA AGATTAATGA CAAGTGCCCC
 1901 AGCACTGGAG AGGCCACCT AGCTGAAGAG AACGAAGGGG ACAATGCGTG
 1951 CAAGCGCACT TATTCTGATA GAGGCTGGGG CAATGGCTGT GGCCTATTTG
 2001 GGAAAGGGAG CATTGTGGCA TGCGCCAAAT TCACTTGTGC CAAATCCATG
 2051 AGTTTGTGTTG AGGTTGATCA GACCAAAATT CAGTATGTCA TCAGAGCACA
 2101 ATTGCATGTA GGGGCCAAGC AGGAAAATTG GAATACCGAC ATTAAGACTC
 2151 TCAAGTTTGA TGCCCTGTCA GGCTCCCAGG AAGTCGAGTT CATTGGGTAT
 2201 GGAAAAGCTA CACTGGAATG CCAGGTGCAA ACTGCGGTGG ACTTTGGTAA
 2251 CAGTTACATC GCTGAGATGG AAACAGAGAG CTGGATAGTG GACAGACAGT
 2301 GGGCCCAGGA CTTGACCCTG CCATGGCAGA GTGGAAGTGG CGGGGTGTGG
 2351 AGAGAGATGC ATCATCTTGT CGAATTTGAA CCTCCGCATG CCGCCACTAT
 2401 CAGAGTACTG GCCCTGGGAA ACCAGGAAGG CTCCTTGAAA ACAGCTCTTA
 2451 CTGGCGCAAT GAGGTTTACA AAGGACACAA ATGACAACAA CCTTTACAAA
 2501 CTACATGGTG GACATGTTTC TTGCAGAGTG AAATTTGCAG CTTTGACACT
 2551 CAAGGGGACA TCCTACAAAA TATGCACTGA CAAAATGTTT TTTGTCAAGA
 2601 ACCCAACTGA CACTGGCCAT GGCACGTGTG TGATGCAGGT GAAAGTGTCA
 2651 AAAGGAGCCC CCTGCAGGAT TCCAGTGATA GTAGCTGATG ATCTTACAGC
 2701 GGCAATCAAT AAAGGCATTT TGGTTACAGT TAACCCCATC GCCTCAACCA
 2751 ATGATGATGA AGTGCTGATT GAGGTGAACC CACCTTTTGG AGACAGCTAC
 2801 ATTATCGTTG GGAGAGGAGA TTCACGTCTC ACTTACCAGT GGCACAAAGA
 2851 GGGAAAGTCA ATAGGAAAGT TGTTCACTCA GACCATGAAA GCGGTGGAAC
 2901 GCCTGGCCGT CATGGGAGAC ACCGCCTGGG ATTTACAGTC CGCTGGAGGG
 2951 TTCTTCACTT CGGTTGGGAA AGGAATTCAT ACGGTGTTG GCTCTGCCTT
 3001 TCAGGGGCTA TTGECGGCT TGAAGTGGAT AACAAAGGTC ATCATGGGGG
 3051 CGGTACTTAT ATGGGTGGC ATCAACACAA GAAACATGAC AATGTCCATG
 3101 AGCATGATCT TGGTAGGAGT GATCATGATG TTTTGTCTC TAGGAGTTGG
 3151 GCGGATCAA GGATCGCCA TCAACTTTGG CAAGAGAGAG CTCAAGTGCG
 3201 GAGATGGTAT CTTCATATTT AGAGACTCTG ATGACTGGCT GAACAAGTAC
 3251 TCATACTATC CAGAAGATCC TGTGAAGCTT GCATCAATAG TGAAGCCTC
 3301 TTTGAAGAA GGGAAAGTGTG GCCTAAATTC AGTTGACTCC CTTGAGCATG
 3351 AGATGTGGAG AAGCAGGCA GATGAGATCA ATGCCATTTT TGAGGAAAAC
 3401 GAGGTGACA TTTCTGTTGT CGTGCAGGAT CCAAAGAATG TTRCCAGAG
 3451 AGGAACTCAT CCATTTTCCA GAATTCGGGA TGGTCTGCAG TATGGTTGGA
 3501 AGACTTGGGG TAAGAACCTT GTGTTCTCCC CAGGGAGGAA GAATGGAAGC
 3551 TTCATCATAG ATGGAAAGTC CAGGAAAGAA TGCCCGTTTT CAAACCGGGT
 3601 CTGGAATCTT TTCCAGATAG AGGAGTTTGG GACGGGAGTG TTCACCACAC
 3651 GCGTGTACAT GGACGCAGTC TTGGAATACA CCATAGACTG CGATGGATCT

FIG. 8 CONT.

3701 ATCTTGGGTG CAGCGGTGAA CGGAAAAAAG AGTGCCCATG GCTCTCCAAC
 3751 ATTTTGGATG GGAAGTCATG AAGTAAATGG GACATGGATG ATCCACACCT
 3801 TGGAGGCATT AGATTACAAG GAGTGTGAGT GGCCACTGAC ACATACGATT
 3851 GGAACATCAG TTGAAGAGAG TGAATGTTC ATGCCGAGAT CAATCGGAGG
 3901 CCCAGTTAGC TCTCACAATC ATATCCCITGG ATACAAGGTT CAGACGAACG
 3951 GACCTTGGAT GCAGGTACCA CTAGAAGTGA AGAGAGAAGC TTGCCCAGGG
 4001 ACTAGCGTGA TCATTGATGG CAACTGTGAT GGACGGGAA AATCAACCAG
 4051 ATCCACCACG GATAGCGGGA AAGTTATTCC TGAATGGTGT TGCCGCTCCT
 4101 GCACAATGCC GCCTGTGAGC TTCCATGGTA GTGATGGGTG TTGGTATCCC
 4151 ATGGAAATTA GGCCAAGGAA AACGCATGAA AGCCATCTGG TGCGCTCCTG
 4201 GGTTACAGCT GGAGAAATAC ATGCTGTCCC TTTTGGTTTG GTGAGCATGA
 4251 TGATAGCAAT GGAAGTGGTC CTAAGGAAAA GACAGGGACC AAAGCAAATG
 4301 TTGGTTGGAG GAGTAGTGCT CTGGGGAGCA ATGCTGGTCG GGCAAGTAAC
 4351 TCTCCTTGAT TTGCTGAAAC TCACAGTGGC TGTGGGATTG CATTTCCATG
 4401 AGATGAACAA TGGAGGAGAC GCCATGTATA TGGCCTTGAT TGCTGCCTTT
 4451 TCAATCAGAC CAGGGCTGCT CATCGGCTTT GGGCTCAGGA CCCTATGGAG
 4501 CCCTCGGGAA CGCCTTGTGC TGACCCTAGG AGCAGCCATG GTGGAGATTG
 4551 CCTTGGGTGG CGTGATGGC GGCCTGTGGA AGTATCTAAA TGCAGTTTCT
 4601 CTCTGCATCC TGACAATAAA TGCTGTGCT TCTAGGAAAG CATCAAATAC
 4651 CATCTTGCCT CATGTGGCTC TGTGACACC TGTCACTATG GCTGAGTGA
 4701 GACTTGCCGC AATGTTCTTT TGTGCCGTGG TTATCATAGG GGTCCITCAC
 4751 CAGAAATTTCA AGGACACCTC CATGCAGAAG ACTATACCTC TGGTGGCCCT
 4801 CACACTCACA TCTTACCTGG GCTTGACACA ACCTTTTTTG GGCCTGTGTG
 4851 CATTCTGGC AACCCGCATA TTTGGGCGAA GGAGTATCCC AGTGAATGAG
 4901 GCACTCGCAG CAGCTGGTCT AGTGGGAGTG CTGGCAGGAC TGGCTTTTCA
 4951 GGAGATGGAG AACTTCCTTG GTCCGATTGC AGTTGGAGGA CTCCTGATGA
 5001 TGCTGGTTAG CGTGCTGGG AGGGTGGATG GGCTAGAGCT CAAGAAGCTT
 5051 GGTGAAGTTT CATGGGAAGA GGAGGCGGAG ATCAGCGGGA GTTCCGCCCG
 5101 CTATGATGTG GCACTCAGTG AACAAAGGGA GTTCAAGCTG CTTTCTGAAG
 5151 AGAAAGTGCC ATGGGACCAG GTTGTGATGA CCTCGCTGGC CTTGGTTGGG
 5201 GCTGCCCTCC ATCCATTGTC TCTTCTGCTG GTCCTTGCTG GGTGGCTGTT
 5251 TCATGTCAGG GGAGCTAGGA GAAGTGGGGA TGTCTTGTGG GATATTCCCA
 5301 CTCTAAGAT CATCGAGGAA TGTGAACATC TGGAGGATGG GATTTATGGC
 5351 ATATTCAGT CAACCTTCTT GGGGGCCTCC CAGCGAGGAG TGGGAGTGGC
 5401 ACAGGGAGGG GTGTTCCACA CAATGTGGCA TGTACAAGA GGAGCTTTCC
 5451 TTGTCAGGAA TGCAAGAAG TTGATTCCAT CTTGGGCTTC AGTAAAGGAA
 5501 GACCTTGTCT CCTATGGTGG CTCATGGAAG TTGGAAGGCA GATGGGATGG
 5551 AGAGGAAGAG GTCCAGTTGA TCGCGCTGT TCCAGGAAAG AACGTGGTCA

FIG. 8 CONT.

5601 ACGTCCAGAC AAAACCGAGC TTGTTCAAAG TGAGGAATGG GGGAGAAATC
5651 GGGGCTGTCG CTCTTGACTA TCCGAGTGGC ACTTCAGGAT CTCCTATTGT
5701 TAACAGGAAC GGAGAGGTGA TTGGGCTGTA CGGCAATGGC ATCCTTGTCC
5751 GTGACAACTC CTTCGTGTCC GCCATATCCC AGACTGAGGT GAAGGAAGAA
5801 GGAAAGGAGG AGCTCCAAGA GATCCCGACA ATGCTAAAGA AAGGAATGAC
5851 AACTGTCCCTT GATTTTCATC CTGGAGCTGG GAAGACAAGA CGTTTCCTCC
5901 CACAGATCTT GGCCGAGTGC GCACGGAGAC GCTTGCGCAC TCTTGTGTGG
5951 GCCCCACCA GGGTTGTTCT TTCTGAAATG AAGGAGGCTT TTCACGGCCT
6001 GGACGTGAAA TTCCACACAC AGGCTTTTTC CGTCTACGGC AGCGGGAGAG
6051 AAGTCATGA TGCCATGTGC CATGCCACCC TAACTTACAG GATGTGGAA
6101 CCAACTAGGG TTGTTAACTG GGAAGTGATC ATTATGGATG AAGCCCATT
6151 TTTGGATCCA GCTAGCATAG CCGCTAGAGG TTGGGCAGCG CACAGAGCTA
6201 GGGCAATGA AAGTGCAACA ATCTTGATGA CAGCCACACC GCCTGGGACT
6251 AGTGATGAAT TTCCACATTC AAATGGTGAA ATAGAAGATG TTCAAACGGA
6301 CATACCAGT GAGCCCTGGA ACACAGGGCA TGACTGGATC CTAGCTGACA
6351 AAAGGCCAC GGCATGGTTC CTTCATCCA TCAGAGCTGC AAATGTCATG
6401 GCTGCCTCTT TCGTAAAGC TGGAAAGAGT GTGGTGGTCC TGAACAGGAA
6451 AACCTTTGAG AGAGAATACC CCACGATAAA GCAGAAGAAA CCTGACTTTA
6501 TATTGGCCAC TGACATAGCT GAAATGGGAG CCAACCTTTG CGTGGAGCGA
6551 GTGCTGGATT GCAGGACGGC TTTTAAAGCCT GTGCTTGTGG ATGAAGGGAG
6601 GAAGGTGGCA ATAAAAGGGC CACTTCGTAT CTCGCATCC TCTGTGCTC
6651 AAAGGAGGGG GCGCATTGGG AGAAATCCCA ACAGAGATGG AGACTCATA
6701 TACTATTCTG AGCCTACAAG TGAATAAAT GCCCACCACG TCTGCTGGTT
6751 GGAGGCCTCA ATGCTCTTGG ACAACATGGA GGTGAGGGGT GGAATGGTGG
6801 CCCCACTCTA TGGCGTTGAA GAACTAAAA CACCAGTTTC CCCTGGTGAA
6851 ATGAGACTGA GGGATGACCA GAGGAAAGTC TTCAGAGAAC TAGTGAGGAA
6901 TTGTGACCTG CCCGTTTGGC TTTGCTGGCA AGTGCCCAAG GCTGGTTTGA
6951 AGACGAATGA TCGTAAAGTG TGTTTTGAAG GCCCTGAGGA ACATGAGATC
7001 TTGAATGACA GCGGTGAAAC AGTGAAGTGC AGGGCTCCTG GAGGAGCAAA
7051 GAAGCCTCTG CGCCAAGGT GGTGTGATGA AAGGTGTCA TCTGACCAGA
7101 GTGCGCTGTC TGAATTTATT AAGTTTGCTG AAGGTAGGAG GGGAGCTGCT
7151 GAAGTGCTAG TTGTGCTGAG TGAACCCCT GATTTCCTGG CTAAAAAAGG
7201 TGGAGAGGCA ATGGATACCA TCAGTGTGTT CCTCCACTCT GAGGAAGGCT
7251 CTAGGGCTTA CCGCAATGCA CTATCAATGA TGCCTGAGGC AATGACAATA
7301 GTCATGCTGT TTATACTGGC TGGACTACTG ACATCGGGAA TGGTCATCTT
7351 TTTCATGTCT CCCAAAGGCA TCAGTAGAAT GTCTATGGCG ATGGGCACAA
7401 TGGCCGGCTG TGGATATCTC ATGTTCCCTG GAGGCGTCAA ACCCACTCAC
7451 ATCTCCTATG TCATGCTCAT ATTCTTTGTC CTGATGGTGG TTGTGATCCC

Fig. 8 CONT.

7501 CGAGCCAGGG CAACAAAGGT CCATCCAAGA CAACCAAGTG GCATACCTCA
 7551 TTATTGGCAT CCTGACGCTG GTTTCAGCGG TGGCAGCCAA CGAGCTAGGC
 7601 ATGCTGGAGA AAACCAAAGA GGACCTCTTT GGAAGAAGA ACTTAATTCC
 7651 ATCTAGTGCT TCACCCTGGA GTTGCCGGA TCTTGACCTG AAGCCAGGAG
 7701 CTGCCTGGAC AGTGTACGTT GGCATTGTTA CAATGCTCTC TCCAATGTTG
 7751 CACCCTGGA TCAAAGTCGA ATATGGCAAC CTGTCTCTGT CTGGAATAGC
 7801 CCAGTCAGCC TCAGTCCTTT CTTTCATGGA CAAGGGGATA CCATTCATGA
 7851 AGATGAATAT CTCGGTCATA ATGCTGCTGG TCAGTGGCTG GAATTCAATA
 7901 ACAGTGATGC CTCTGCTCTG TGGCATAGGG TGCCCATGC TCCACTGCTC
 7951 TCTCATTFTA CCTGGAATCA AAGCGCAGCA GTCAAAGCTT GCACAGAGAA
 8001 GGGTGTCCA TGGCGTGGC GAGAACCCTG TGGTTGATGG GAATCCAACA
 8051 GTTGACATTG AGGAAGCTCC TGAATGCCT GCCCTTTATG AGAAGAAACT
 8101 GGCTCTATAT CTCCTPCTTG CTCTCAGCCT AGCTTCTGTT GCCATGTGCA
 8151 GAACGCCCTT TTCATTGGCT GAAGGCATTG TCCTAGCATC AGCTGCCTTA
 8201 GGGCCGCTCA TAGAGGGAAA CACCAGCCTT CTTTGGAAATG GACCCATGGC
 8251 TGCTCCATG ACAGGAGTCA TGAGGGGGAA TCACTATGCT TTTGTGGGAG
 8301 TCATGTACAA TCTATGGAAG ATGAAAATG GACGCCGGGG GAGCGGAAT
 8351 GGAAAAACTT TGGGTGAAGT CTGGAAGAGG GAACTGAATC TGTGGACAA
 8401 GCGACAGTTT GAGTTGATA AAAGGACCGA CATTGTGGAG GTGGATCCTG
 8451 ATACGGCAGC CAGGCATTTG CCCGAAGGGA AGGTGGACAC CGGGGTGGCG
 8501 GTCTCCAGGG GGACCCGAAA GTTAAGGTGG TTCCATGAGC GTGGCTATGT
 8551 CAAGCTGGAA GGTAGGGTGA TTGACCTGGG GTGTGGCCGC GGAGGCTGGT
 8601 GTTACTACGC TGCTGCGCAA AAGGAAGTGA GTGGGTCAA AGGATTTACT
 8651 CTTGGAAGAG ACGCCATGA GAAACCCATG AATGTGCAAA GTCTGGGATG
 8701 GAACATCATC ACCTCAAGG ACAAACCTGA TATCCACCGC CTAGAACCAG
 8751 TGAAATGTGA CACCCTTTG TGTGACATTG GAGAGTCATC ATCGTCATCG
 8801 GTCACAGAGG GGGAAAGGAC CGTGAGAGTT CTTGATACTG TAGAAAAATG
 8851 GCTGGCTTGT GGGTTGACA ACTTCTGTGT GAAGTGTTA GCTCCATACA
 8901 TGCCAGATGT TCTCGAGAAA CTGGAATTGC TCCAAAGGAG GTTTGGCGGA
 8951 ACAGTGATCA GGAACCTCT CTCCAGGAAT TCCACTCATG AAATGTACTA
 9001 CGTGTCTGGA GCCCGCAGCA ATGTCACATT TACTGTGAAC CAAACATCCC
 9051 GCCTCCTGAT GAGGAGAATG AGGCGTCCAA CTGGAAAAGT GACCCTGGAG
 9101 GCIGACGTCA TCCTCCCAAT TGGGACACGC AGTGTGAGA CAGACAAGGG
 9151 ACCCTGGAC AAAGAGGCCA TAGAAGAAAG GGTGAGAGG ATAAAACTG
 9201 AGTACATGAC CTCTTGGTTT TATGACAATG ACAACCCCTA CAGGACCTGG
 9251 CACTACTGTG GCTCCTATGT CACAAAACC TCAGGAAGTG CGGCGAGCAT
 9301 GGTAATGGT GTTATTAAAA TTCTGACATA TCCATGGGAC AGGATAGAGG
 9351 AGGTACAAG AATGGCAATG ACTGACAAA CCCCTTTTGG ACAGCAAAGA

FIG. 8 CONT.

9401 GTGTTTAAAG AAAAAGTTGA CACCAGAGCA AAGGATCCAC CAGCGGGAAC
 9451 TAGGAAGATC ATGAAAAGTTG TCAACAGGTG GCTGTTCCGC CACCTGGCCA
 9501 GAGAAAAGAA CCCCAGACTG TGCACAAAGG AAGAATTTAT TGCAAAAAGTC
 9551 CGAAGTCATG CAGCCATTGG AGCTTACCTG GAAGAACAAG AACAGTGGAA
 9601 GACTGCCAAT GAGGCTGTCC AAGACCCAAA GTTCTGGGAA CTGGTGGATG
 9651 AAGAAAGGAA GCTGCACCAA CAAGGCAGGT GTCGGACTTG TGTGTACAAC
 9701 ATGATGGGGA AAAGAGAGAA GAAGCTGTCA GAGTTTGGGA AAGCAAAGGG
 9751 AAGCCGTGCC ATATGGTATA TGTGGCTGGG AGCGCGGTAT CTTGAGTTG
 9801 AGGCCCTGGG ATTCCTGAAT GAGGACCATT GGGCTTCCAG GGAAAACCTCA
 9851 GGAGGAGGAG TGGAAAGGCAT TGGCTTACAA TACCTAGGAT ATGTGATCAG
 9901 AGACCTGGCT GCAATGGATG GTGGTGGATT CTACGCGGAT GACACCGCTG
 9951 GATGGGACAC GCGCATCACA GAGGCAGACC TTGATGATGA ACAGGAGATC
 10001 TTGAACTACA TGAGCCACAA TCACAAAAAA CTGGCACAAG CAGTGATGGA
 10051 AATGACATAC AAGAACAAGG TGGTGAAGT GTTGAAGCA GCCCCAGGAG
 10101 GGAAAGCCTA CATGGATGTC ATAAGTCGAC GAGACCAGAG AGGATCCGGG
 10151 CAGGTAGTGA CTTATGCTCT GAACRCCATC ACCAACTTGA AAGTCCAATT
 10201 GATCAGAATG GCAGAAGCAG AGATGGTGAT ACATCACCAA CATGTTCAAG
 10251 ATTGTGATGA ATCAGTTCTG ACCAGGCTGG AGGCATGGCT CACTGAGCAC
 10301 GGATGTGACA GACTGAAGAG GATGGCGGTG AGTGGAGACG ACTGTGTGGT
 10351 CCGGCCCATC GATGACAGGT TCGGCCTGGC CCTGTCCCAT CTCACGCCA
 10401 TGTCCAAGGT TAGAAAGGAC ATATCTGAAT GGCAGCCATC AAAAGGGTGG
 10451 AATGATTGGG AGAATGTGCC CTCTGTTC CACCACTTCC ATGAACTACA
 10501 GCTGAAGGAT GGCAGGAGGA TTGTGGTGCC TTGCCGAGAA CAGGACGAGC
 10551 TCATTGGGAG AGGAAGGGTG TCTCCAGGAA ACGGCTGGAT GATCAAGGAA
 10601 ACAGCTTGCC TCAGCAAAGC CTATGCCAAC ATGTGGTCAC TGATGTATTT
 10651 TCACAAAAGG GACATGAGGC TACTGTCATT GGCTGTTTCC TCAGCTGTTT
 10701 CCACCTCATG GGTTCACAA GGACGCACAA CATGGTCGAT TCATGGGAAA
 10751 GGGGAGTGGG TGACCACGGA AGACATGCTT GAGGTGTGGA ACAGAGTATG
 10801 GATAACCAAC AACCCACACA TGCAGGACAA GACAATGGTG AAAAAATGGA
 10851 GAGATGTCCC TTATCTAACC AAGAGACAAG ACAAGCTGTG CGGATCACTG
 10901 ATTGGAATGA CCAATAGGGC CACCTGGGCC TCCCACATCC ATTTAGTCAT
 10951 CCATCGTATC CGAACGCTGA TTGGACAGGA GAAATACACT GACTACCTAA
 11001 CAGTCATGGA CAGGTATTCT GTGGATGCTG ACCTGCAACT GGGTGAGCTT
 11051 ATCTGAAACA CCATCTAACA GGAATAACCG GGATACAAAC CACGGGTGGA
 11101 GAACCGGACT CCCACAACC TGAACCGGG ATATAAACCA CGGCTGGAGA
 11151 ACCGGGCTCC GCACTTAAAA TGAAACAGAA ACCGGGATAA AAACCTACGGA
 11201 TGGAGAACCG GACTCCACAC ATTGAGACAG AAGAAGTTGT CAGCCCAGAA
 11251 CCCACACGA GTTTTGCCAC TGCTAAGCTG TGAGGCAGTG CAGGCTGGGA

FIG. 9: Optimización de la distancia entre el extremo 3' del promotor CMV y el extremo 5' del ADNc de TC-83 mediante el ensayo de encapsidación utilizando vectores HA o N y los auxiliares para el ADNc

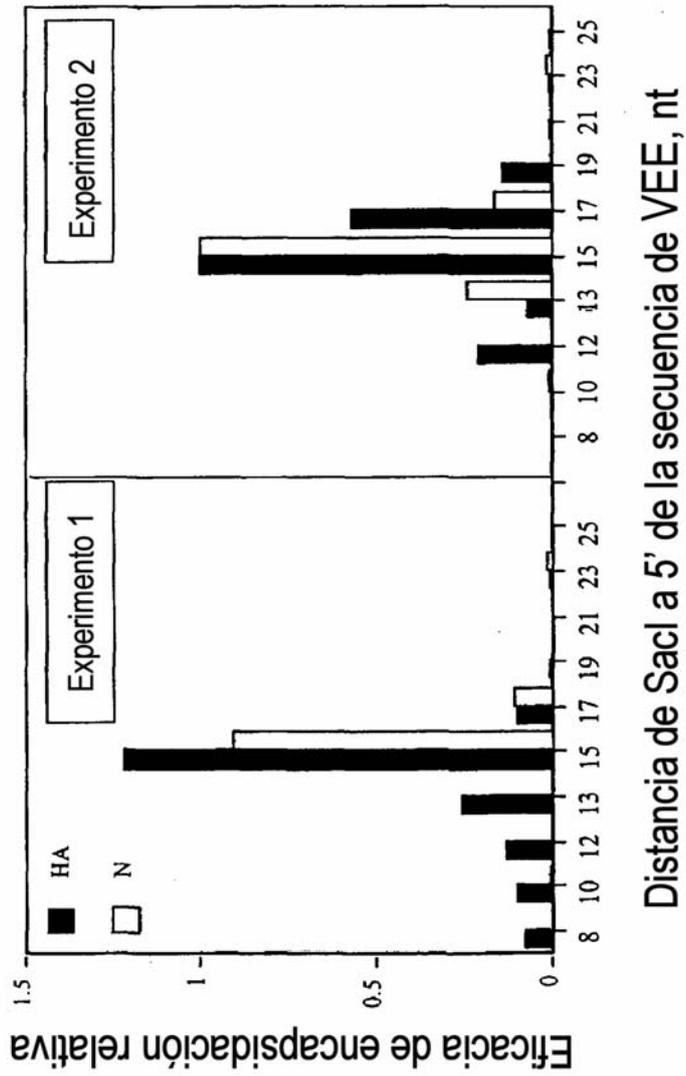


FIG. 10: Transfección de células CHO con ADNn de TC-83 n.º13-1 (natural)

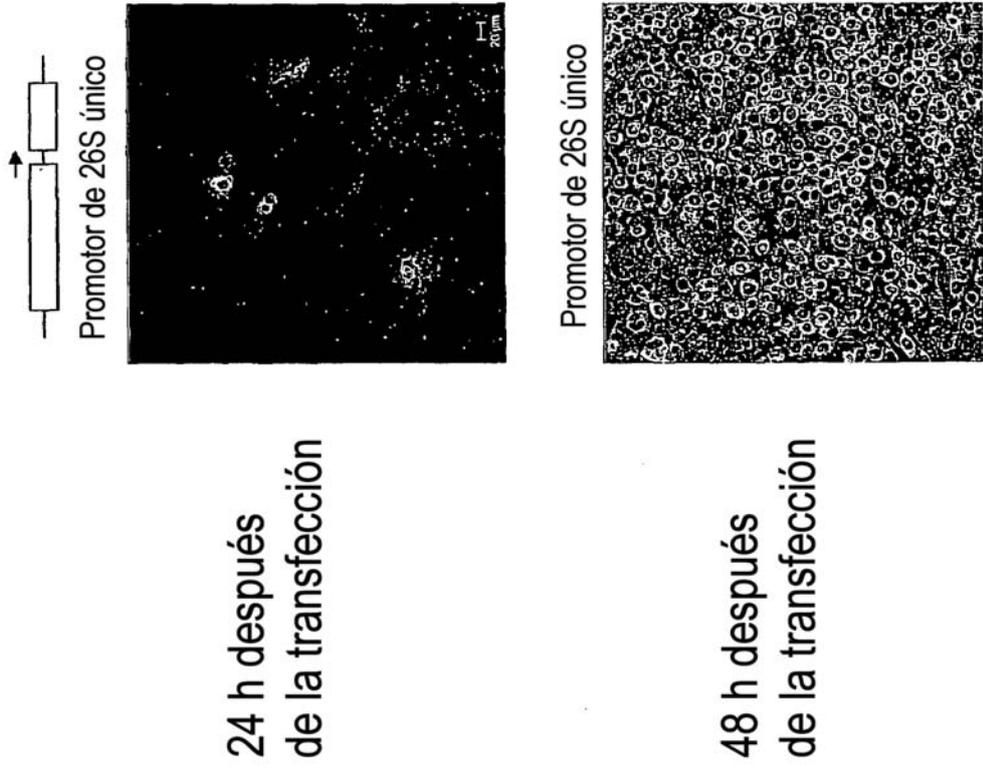


FIG. 11: Transfección de células CHO con ADNn de TC-83 n.º12 (Promotor 26S doble)

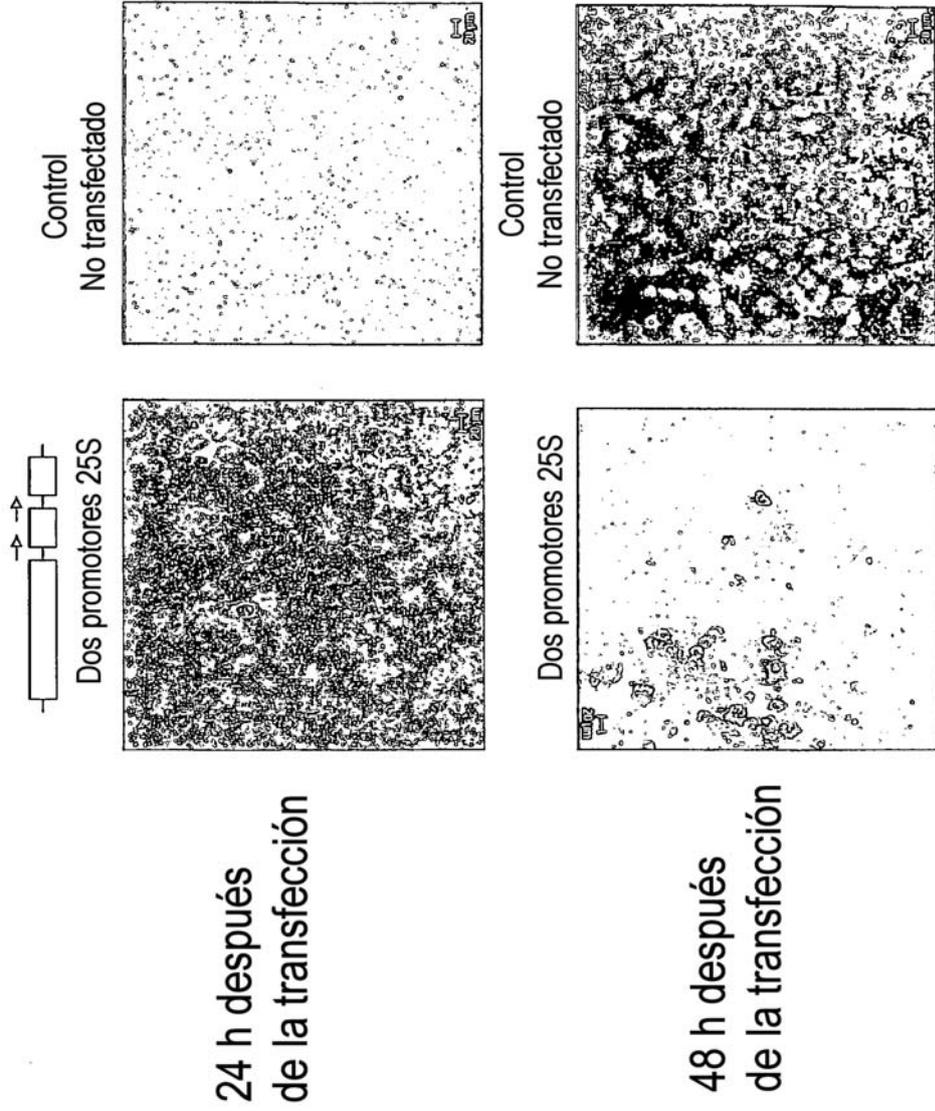


FIG. 12: Los virus TC-83 generados a partir de clones infecciosos
In Vitro son avirulentos en ratones BALB/c

TC-83 Clon	Expresión del antígeno de TC-83*	CPE**	Título, PFU/mL	Virulencia***, Muerte/Total
n.º12	Si	+++	no detectable	NE
n.º13-1	Si	+++	7×10^7	0/10
Control de VEE	NE	NE	NE	10/10

* Mediante inmunofluorescencia, 24 h después de la transfección

** Efecto citopático, 96 h después de la transfección

*** Determinado en ratones BALB/c

NE, no estudiado en este experimento.

Control de VEE, cepa Trd

FIG. 13

5' <u>aaagagctc</u> TctggctaactagagaacccactggAtggcgggcgcgatgagagaagcc3'	CM25/26
5' <u>aaagagctc</u> TctggctaactagagaacccacgAtggcgggcgcgatgagagaagcc3'	CM23/24
5' <u>aaagagctc</u> TctggctaactagagaacccgAtggcgggcgcgatgagagaagcc3'	CM21/22
5' <u>aaagagctc</u> TctggctaactagagaacgAtggcgggcgcgatgagagaagcc3'	CM19/20
5' <u>aaagagctc</u> TctggctaactagagagAtggcgggcgcgatgagagaagcc3'	CM17/18
5' <u>aaagagctc</u> TctggctaactagagAtggcgggcgcgatgagagaagcc3'	CM15/16
5' <u>aaagagctc</u> TctggctaactagAtggcgggcgcgatgagagaagcc3'	CM13/14
5' <u>aaagagctc</u> TctggctaactgAtggcgggcgcgatgagagaagcc3'	CM12/13
5' <u>aaagagctc</u> TctggctaagAtggcgggcgcgatgagagaagcc3'	CM10/11
5' <u>aaagagctc</u> TctggctgAtggcgggcgcgatgagagaagcc3'	CM8/9
5'ttatagggcccctctcaggtagctgaatg3'	VEE26SR