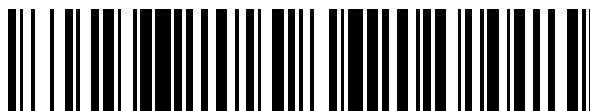


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 662**

51 Int. Cl.:

A61K 39/12 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.01.2011** **PCT/US2011/000001**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.07.2011** **WO11082388**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.01.2011** **E 11728540 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.07.2017** **EP 2519266**

54 Título: **Vacunas de ADN infeccioso frente al virus chikungunya**

30 Prioridad:

31.12.2009 US 291682 P

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

26.12.2017

73 Titular/es:

MEDIGEN, INC. (100.0%)
4539 Metropolitan Court
Frederick, MD 21704, US

72 Inventor/es:

PUSHKO, PETER;
TRETYAKOVA, IRINA y
LUKASHEVICH, IGOR

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

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

ES 2 647 662 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 de ADN infeccioso frente al virus chikungunya

5 Intereses gubernamentales

El Gobierno de los Estados Unidos ha proporcionado a los inventores el material y/o los reactivos que pueden estar relacionados con la materia objeto de la presente solicitud. Por consiguiente, el Gobierno de los Estados Unidos puede tener determinados derechos en la materia objeto.

10 Campo

Las vacunas atenuadas elaboradas con virus vivo y de ADN frente al virus chikungunya, y los sistemas y métodos para fabricar y administrar tales vacunas.

15 Antecedentes

Se ha sugerido una diversidad de vacunas, y sistemas y métodos, para fabricar y administrar las mismas. Sin embargo, tales vacunas, sistemas y métodos no son óptimos.

20 Sumario

La materia objeto para la que se busca protección es como se define en las reivindicaciones. En el primer aspecto de la invención se proporciona un vector de ADN que comprende:

25 (a) un ADN que codifica una molécula de ARN infecciosa que inicia la producción en células de una vacuna de virus atenuado vivo para el VCHIK; y (b) un promotor de la ARN polimerasa eucariota; en la que (i) el ADN que codifica una molécula de ARN infecciosa está unido operativamente al promotor de la ARN polimerasa, y (ii) la molécula de ARN infecciosa codifica un virus chikungunya (VCHIK).

30 En un segundo aspecto de la invención, se proporciona una vacuna que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un vector de ADN de la invención.

35 En un tercer aspecto de la invención, se proporciona la vacuna de la invención para su uso en un método de inmunización de un mamífero frente al VCHIK.

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona el uso de la vacuna de la invención en la fabricación de un medicamento para inmunizar a un mamífero frente al VCHIK.

40 En un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método de preparación de una vacuna, en el que el método comprende transfectar el vector de ADN de la invención en una célula eucariota y aislar virus infecciosos homogéneos clonalmente puros a partir de un medio de cultivo que comprende la célula eucariota transfectada, obteniendo de este modo una vacuna.

45 En aún otro aspecto de la invención, se proporciona un método *in vitro* de preparación de una célula eucariota transfectada, en el que el método comprende transfectar el vector de ADN de la invención en una célula eucariota para obtener una célula eucariota transfectada.

50 En otro aspecto más de la invención, se proporciona una célula eucariota que comprende el vector de la invención.

En el presente documento se describen vectores que comprenden ADN que codifica una molécula de ARN infecciosa y un promotor de la ARN polimerasa, en donde el ADN que codifica una molécula de ARN infecciosa está unido operativamente al promotor de la ARN polimerasa y las moléculas de ARN infeccioso codifican un virus chikungunya (VCHIK). En determinadas realizaciones, el VCHIK no es patógeno. También se describen vacunas para chikungunya que comprenden el ADN descrito anteriormente, y los usos de las vacunas para inmunizar frente al VCHIK. También se divulga un virus VCHIK atenuado vivo homogéneo clonalmente purificado preparado a partir de células en cultivo transfectadas con el ADN descrito anteriormente, las vacunas para chikungunya que lo comprenden y los métodos para el uso de las vacunas para inmunizar frente al virus VCHIK.

60 La presente solicitud también proporciona vectores que comprenden ADN que codifica una molécula de ARN infecciosa y un promotor de la ARN polimerasa de citomegalovirus (CMV), en donde el ADN que codifica una molécula de ARN infecciosa está unido operativamente al promotor de la ARN polimerasa de CMV, el promotor de la ARN polimerasa de CMV se emplaza de aproximadamente 13 a aproximadamente 17 (preferentemente 15 nucleótidos, como se ejemplifica en las Figuras 3-7 y 9) restos de nucleótido cadena arriba del extremo 5' de dicho ADN que codifica una molécula de ARN infecciosa, y la molécula de ARN infecciosa codifica un virus de VCHIK atenuado. En determinadas realizaciones, el VCHIK es un virus quimérico que contiene secuencias del VCHIK así

como de otro alfavirus. En determinadas realizaciones, el ADN que codifica el ARN infeccioso se modifica para mejorar características de dicho ARN infeccioso y del vector descrito.

En una realización ejemplar, se describe un vector que comprende: (a) un ADN que codifica una molécula de ARN infecciosa; y (b) un promotor de la ARN polimerasa; en el que: (i) el ADN que codifica una molécula de ARN infecciosa está unido operativamente al promotor de la ARN polimerasa; y (ii) la molécula de ARN infecciosa codifica un virus chikungunya (VCHIK). En algunos ejemplos, la molécula de ARN infecciosa codifica un virus chikungunya no patógeno. En algunos ejemplos, el promotor de la ARN polimerasa comprende un promotor de la ARN polimerasa de citomegalovirus (CMV), el promotor de la ARN polimerasa de CMV se emplaza de aproximadamente 13 a aproximadamente 17 restos de nucleótido cadena arriba del extremo 5' del ADN que codifica una molécula de ARN infecciosa, y la molécula de ARN infecciosa codifica un virus VCHIK atenuado. En diversos ejemplos un vector puede comprender la secuencia de ADN enumerada en las Figuras 3-7.

En algunas realizaciones, el VCHIK es un virus quimérico que contiene secuencias del VCHIK así como de otro alfavirus. El ADN que codifica el ARN infeccioso también puede modificarse para mejorar características del ARN infeccioso y del vector descrito.

Una vacuna para virus chikungunya puede comprender una cantidad terapéuticamente eficaz de tales vectores. En otros ejemplos de la presente divulgación, una vacuna para virus chikungunya puede comprender un virus VCHIK atenuado producido aislando el virus VCHIK a partir de células transfectadas con los vectores de ADN descritos en el presente documento. Un virus atenuado vivo homogéneo clonalmente purificado puede prepararse a partir de células en cultivo transfectadas con los vectores de ADN descritos en el presente documento. Tal preparación es particularmente útil como una vacuna.

Como alternativa, un vector puede comprender (a) ADN que codifica una molécula de ARN infecciosa; y (b) un promotor de la ARN polimerasa; en el que: (i) el ADN que codifica una molécula de ARN infecciosa está unida operativamente al promotor de la ARN polimerasa; y (ii) la molécula de ARN infecciosa codifica un alfavirus y contiene secuencias del VCHIK así como de otro alfavirus. Un ejemplo de tal vector comprende la secuencia de la Fig. 9.

Los vectores y vacunas descritos en el presente documento son para su uso en un método de inmunización de un animal frente a un virus chikungunya, que comprende la etapa de administrar la vacuna a un mamífero, tal como un animal o un ser humano.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra una comparación de vacunas atenuadas elaboradas con virus vivo, vacunas de ADN y la vacuna de i-DNA™ para el VCHIK descrita.

La Figura 2 ilustra un ejemplo de vacuna de i-DNA™ para el VCHIK y la inmunización con i-DNA™ del VCHIK. El ADNc del VCHIK de longitud completa se sitúa cadena abajo de un promotor optimizado (Popt). En células animales, por ejemplo células de ser humano o de ratones, inyectadas con i-DNA™, la transcripción a partir del promotor produce un ARN genómico infeccioso de longitud completa que tiene la capacidad de iniciar la replicación productiva de partículas de virus atenuados vivos del VCHIK e inducir respuestas inmunitarias específicas.

La Figura 3 ilustra un ejemplo (secuencia de nucleótidos) de i-DNA™ que codifica la vacuna atenuada elaborada con virus vivo de 181/25. Los extremos 5' y 3' precisos del ARN genómico funcional codificado por el i-DNA del VCHIK están determinados por el promotor de CMV optimizado y la ribozima, respectivamente.

La Figura 4 ilustra un ejemplo (secuencia de nucleótidos) de i-DNA™ que codifica la vacuna atenuada elaborada con virus vivo de 181/25 sin secuencias de ribozima. El extremo 5' preciso del ARN del VCHIK codificado por el i-DNA está determinado por el promotor de CMV optimizado. El emplazamiento del extremo 3' del ARN del VCHIK codificado por el i-DNA™ es desconocido, pero tal ARN tiene capacidad replicarse y de generar VCHIK vivo.

La Figura 5 ilustra un ejemplo (secuencia de nucleótidos) de i-DNA™ que codifica la vacuna atenuada elaborada con virus vivo de 181/25 con el promotor 26S duplicado. En esta construcción de i-DNA™, la cápside (C) y las glucoproteínas (GP) del VCHIK están codificadas a partir de promotores 26S distintos dentro del ARN del VCHIK.

La Figura 6 ilustra un ejemplo (secuencia de nucleótidos) de i-DNA™ que codifica la vacuna atenuada elaborada con virus vivo de 181/25 con el elemento de transporte nuclear en el extremo 3'. En esta construcción de i-DNA™ se introduce antes del poliA una secuencia de un elemento de transporte nuclear; esta secuencia potencia el transporte del ARN del VCHIK desde el núcleo al citoplasma.

La Figura 7 ilustra un ejemplo (secuencia de nucleótidos) de i-DNA™ que codifica la vacuna quimérica que comprende la vacuna atenuada elaborada con virus vivo de TC-83, en la que su región de genes estructurales se reemplaza por la región de genes estructurales (C y las GP) de la vacuna atenuada elaborada con virus vivo de del VCHIK 181/25.

La Figura 8 ilustra las construcciones de i-DNA™ del VCHIK de las Figuras 3-7. El ARN genómico del VCHIK se muestra en la parte superior. El plásmido de i-DNA™ contiene un fragmento de ADN (recuadro de líneas discontinuas) que codifica (i) el promotor eucariota optimizado Popt (preferentemente el promotor de CMV optimizado) y (ii) el ADNc de longitud completa del ARN funcional del VCHIK que codifica elementos necesarios

para la replicación del ARN genómico del VCHIK y la generación *in vitro* o *in vivo* de VCHIK atenuado vivo. Los dominios de secuencia de nucleótidos indicados pueden utilizarse en cualquiera de las construcciones. Por ejemplo, la ribozima (Figura 3) también puede utilizarse en las construcciones descritas en las Figuras 5-7 y 9.

La Figura 9 ilustra un ejemplo (secuencia de nucleótidos) del i-DNA™ quimérico del VCHIK obtenido de la cepa atenuada viva 181/25 que contiene la poliproteína C-GP de TC-83. Esta construcción de i-DNA™ quimérica puede utilizarse como una vacuna frente al virus de la encefalitis equina venezolana (EEV). También pueden utilizarse poliproteínas estructurales de otros alfavirus en lugar de TC-83, para desarrollar vacunas de i-DNA™ frente a los respectivos alfavirus a base del VCHIK.

La Figura 10 (A-C) ilustra fotomicrografías de ejemplo de células de ovario de hámster chino (CHO) transfectadas con i-DNA™ del VCHIK de longitud completa, clon n.º 10 (secuencia de la Figura 4), por ensayo de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo anti VCHIK específico, a las 48 horas postransfección.

La Figura 11 ilustra (A) la determinación del título y la morfología de placa del virus atenuado vivo obtenido del i-DNA, clon n.º 10, Figura 4; y, (B) las placas obtenidas de la vacuna IND de 181/25 que se pasó una vez en células CHO. El virus VCHIK obtenido del i-DNA™ tiene un tamaño de placa uniforme en comparación con la vacuna IND de 181/25 "clásica".

La Figura 12 ilustra la variación de secuencia dentro de la vacuna IND de 181/25. La vacuna se resuspendió en solución salina y se pasó una vez en células CHO. El ARN vírico se aisló, se preparó el ADNc por transcripción inversa PCR y se clonó en el vector pCR2.1. Se determinaron las secuencias de los fragmentos de ADNc clonados y compararon con secuencias del VCHIK conocidas procedentes del GenBank.

Descripción detallada

La chikungunya es una enfermedad transmitida por mosquitos provocada por el virus chikungunya (VCHIK). El VCHIK es un miembro del género *Alphavirus* de la familia *Togaviridae*. El género *Alphavirus* consiste en 29 especies distintas (junto con el virus O'nyong'nyong, el virus del Río Ross, el virus Sindbis, el virus del Bosque Semliki, el EEV y otros) que provocan ya sea encefalitis, enfermedad febril con artralgia o no se conoce que provoquen enfermedad en seres humanos. Los miembros de este género se transmiten principalmente a través de vectores; casi todos utilizan a los mosquitos como sus vectores invertebrados (Powers y Brault, 2009). Como se usa en el presente documento, VCHIK incluye virus quiméricos que contienen secuencias del VCHIK, así como de otros alfavirus; tales virus quiméricos comprenden preferentemente al menos el 50 % de las secuencias del VCHIK y/o una porción antigénica del VCHIK.

Como todos los alfavirus, el VCHIK tiene un genoma que consiste en una molécula de ARN monocatenario lineal de sentido positivo de aproximadamente 12 kb de longitud (Khan *et al.*, 2002). Las proteínas no estructurales necesarias para la replicación vírica están codificadas en los dos tercios del 5' del genoma y están reguladas a partir del promotor 49S, mientras que los genes estructurales están alineados en el tercio 3' y utilizan el promotor interno 26S. El extremo 5' del genoma tiene una protección terminal (*cap*) de 7-metilguanosina mientras que el extremo 3' está poliadenilado. También hay elementos de secuencias repetidas no codificantes 3' que generan estructuras secundarias predichas (Khan *et al.*, 2002).

En muchos países el VCHIK provoca brotes epidémicos explosivos y una morbilidad significativa. El virus está ampliamente extendido y puede importarse con facilidad en las regiones donde no está presente debido a los viajes desde las zonas endémicas. El VCHIK también es responsable de numerosas infecciones adquiridas en el laboratorio. Se han utilizado distintas estrategias para desarrollar una vacuna para el VCHIK, incluyendo la vacuna inactivada con formalina (Kitaoka, 1967), la atenuada elaborada con virus vivo (Levitt *et al.*, 1986) y la del alfavirus quimérico (Wang *et al.*, 2008). Se han examinado diversas formulaciones de posibles vacunas para el VCHIK y se han sometido a ensayos clínicos en seres humanos (revisados por Powers y Brault, 2009). Sin embargo, no está disponible actualmente una vacuna autorizada frente a la chikungunya.

Las vacunas son necesarias para controlar el VCHIK. De forma ideal, la vacuna debería tener un alto grado de seguridad, inducir una inmunidad y protección eficaces, ser genéticamente estable y no necesitar una "cadena de frío" desde el fabricante de la vacuna hasta el receptor de la misma. Los costos reducidos y la simplicidad de producción son importantes, debido a que el reservorio principal del VCHIK y la mayoría de los casos se localizan en países tropicales de recursos limitados.

Las vacunas atenuadas elaboradas con virus vivo frente a enfermedades víricas son atractivas debido al rápido inicio de la inmunidad y a una protección eficaz. La aplicación satisfactoria de las vacunas atenuadas elaboradas con virus vivo da como resultado el control de enfermedades infecciosas que provocan muchos virus de ARN tales como la poliomiелitis, el sarampión, las paperas, la rabia, la rubéola y la fiebre amarilla. Aproximadamente el 60 % de las vacunas autorizadas para su uso en Estados Unidos son vacunas atenuadas elaboradas con virus vivo. Entre las cuatro vacunas víricas aprobadas recientemente por la FDA (siglas del inglés *Food and drug administration*, Administración de alimentos y fármacos, tres representan vacunas atenuadas elaboradas con virus vivo - frente a rotavirus, al virus de la gripe A y B y de la varicela zoster. Esto indica que la estrategia con virus atenuado vivo continúa siendo muy atractiva para el desarrollo de vacunas.

Sin embargo, la seguridad es la preocupación principal respecto a las vacunas atenuadas elaboradas con virus vivo.

Una vacuna atenuada elaborada con virus vivo típica representa una población de virus que contiene múltiples variantes genéticas o cuasiespecies que tienen diversas características, incluyendo una potencial patogenicidad. La diversidad de cuasiespecies de los virus de ARN puede asociarse con patogenicidad. De forma adicional, las vacunas elaboradas con virus vivos asociadas contienen impurezas y agentes fortuitos derivados de las células que se utilizan para la fabricación de la vacuna. Tales impurezas/agentes fortuitos pueden asociarse con reacciones alérgicas y una elevada capacidad reactógena en los receptores de la vacuna.

De forma relativamente reciente, las vacunas de ADN se han hecho una estrategia popular de vacunación. Una vacuna de ADN típica contiene un gen de importancia para la vacuna cadena abajo de un promotor eucariota fuerte, tal como el promotor de citomegalovirus (CMV). Para la vacunación, la vacuna de ADN se inyecta en los tejidos del receptor de la vacuna, donde penetra a través de las membranas celular y nuclear de las células permisivas. En los núcleos de las células hospedadoras se produce la transcripción a partir del promotor de CMV y el ARNm transcrito migra desde el núcleo al citoplasma, en donde tienen lugar la traducción y la expresión del antígeno de importancia para la vacuna. Por lo tanto, se genera antígeno de forma directa en los tejidos del receptor de la vacuna, lo que da como resultado la inducción de la inmunidad frente al antígeno de interés. La ventaja de las vacunas de ADN son la simplicidad, el bajo costo de producción, la estabilidad genética, el alto nivel de pureza y que no hay necesidad de una cadena de frío. Las desventajas de las vacunas de ADN son las múltiples revacunaciones y que se necesitan altas cantidades de ADN para inducir una respuesta inmunitaria. La necesidad de múltiples revacunaciones y de altas cantidades de ADN inyectado en los núcleos de muchas células genera la preocupación de que las vacunas de ADN puedan integrarse en el ADN del hospedador y provocar mutagénesis insercional.

En el presente documento se describe una vacuna para la chikungunya nueva que combina las ventajas de las estrategias de la vacuna de virus atenuado vivo y la de ADN. En concreto, se describe una vacuna para el VCHIK de "ADN infeccioso" (i-DNA™) que representa una vacuna de ADN que genera *in vivo* una vacuna atenuada elaborada con virus vivo frente a la chikungunya. La diferencia entre la vacuna de ADN tradicional y la vacuna de i-DNA™ descrita en el presente documento es que la vacuna de ADN tradicional codifica un gen de interés mientras que la vacuna de i-DNA™ codifica el ARN genómico funcional completo del VCHIK atenuado vivo. Cuando el i-DNA™ del VCHIK se inyecta en el receptor de la vacuna, entra al núcleo y se transcribe el ARN infeccioso completo del VCHIK atenuado, lo que inicia la replicación en los tejidos *in vivo* de la vacuna atenuada elaborada con virus vivo y da como resultado una rápida inducción de la inmunidad frente al chikungunya.

Esta nueva estrategia para la vacunación frente al VCHIK combina las ventajas de las vacunas atenuadas convencionales elaboradas con virus vivo y las de ADN (Figuras 1 y 2). Al igual que las vacunas de ADN, es genéticamente estable, económica y de fabricación simple, y no necesita una cadena de frío. Al igual que la vacuna atenuada elaborada con virus vivo, para inducir una inmunidad eficaz necesita una única dosis pequeña.

Aunque combina las ventajas de las estrategias de la vacuna atenuada y de la de ADN, la vacuna de i-DNA™ de VCHIK carece de las desventajas de ambas. A diferencia de las vacunas atenuadas elaboradas con virus vivo, el i-DNA™ es genéticamente estable y representa un ADN homogéneo, clonalmente purificado y bien caracterizado que puede purificarse fácilmente hasta altos niveles de pureza. A diferencia de las vacunas de ADN convencionales, el i-DNA™ del VCHIK tiene la capacidad de inducir una inmunidad eficaz con una única vacunación, sin múltiples revacunaciones. Además, solo es necesaria una dosis baja de i-DNA™. Por ejemplo, podría utilizarse una dosis baja de aproximadamente 1 ng a aproximadamente 1 µg, preferentemente aproximadamente 10 ng a aproximadamente 1 µg y más preferentemente aproximadamente 100 ng a aproximadamente 1 µg de i-DNA™. Además, cuando se compara con una vacuna de ADN convencional, se podría utilizar aproximadamente 5 veces a aproximadamente 100 veces menos de i-DNA™, más preferentemente aproximadamente 10 veces a aproximadamente 100 veces menos de i-DNA™, aún más preferentemente aproximadamente 25 veces a aproximadamente 100 veces menos de i-DNA™ y muy preferentemente aproximadamente 50 veces a aproximadamente 100 veces menos de i-DNA™. El núcleo solo es necesario para generar las pocas copias iniciales del genoma de ARN y, después de eso, se produce en el citoplasma celular la replicación del virus VCHIK atenuado vivo, reduciendo así drásticamente la posibilidad de mutagénesis genética del ADN del hospedador. Por ejemplo, el uso del i-DNA™ del VCHIK podría reducir la posibilidad de mutagénesis genética del ADN del hospedador en al menos el 50 %, preferentemente al menos aproximadamente el 70 %, más preferentemente al menos aproximadamente el 80 %, aún más preferentemente al menos aproximadamente el 90 % y muy preferentemente aproximadamente el 100 %.

El i-DNA™ puede utilizarse de diversos modos para crear vacunas frente al VCHIK. Por ejemplo, el i-DNA™ puede introducirse mediante electroporación o cualquier otro modo aceptable conocido en la técnica, en células eucariotas aceptables para la producción de vacunas. El VCHIK atenuado vivo generado a partir de un clon de i-DNA™ representa una población de virus homogénea y contiene un número inferior de cuasiespecies, representando así una ventaja con respecto a las vacunas atenuadas elaboradas con virus vivo tradicionales. Por ejemplo, la población de virus generada a partir de un clon de i-DNA™ podría contener al menos aproximadamente el 50 % menos de cuasiespecies, preferentemente al menos aproximadamente el 70 % menos de cuasiespecies, más preferentemente al menos aproximadamente el 80 % menos de cuasiespecies, aún más preferentemente al menos aproximadamente el 90 % menos de cuasiespecies y muy preferentemente aproximadamente el 100 % menos de cuasiespecies que la

cantidad de cuasiespecies generadas por una vacuna convencional. Tal VCHIK atenuado vivo homogéneo generado a partir del plásmido de i-DNA™ puede configurarse en una formulación farmacéuticamente aceptable adecuada para la administración de la vacuna a las personas. Como alternativa, el i-DNA™ puede administrarse a las personas en un modo farmacéuticamente aceptable como se muestra, por ejemplo, en la Figura 2.

Se ha desarrollado un sistema similar para los flavivirus por ejemplo el virus del Nilo Occidental (por ejemplo, la Patente de Estados Unidos n.º 7.459.163).

En la Solicitud Internacional n.º PCT/US2009/004133, de los mismos solicitantes, se describe una vacuna de i-DNA™ para el virus de la encefalitis equina venezolana (EEV), otro alfavirus.

Sin embargo, hasta ahora no había un sistema de vacuna de i-DNA™ para el VCHIK. La dificultad radica en la configurar el i-DNA™ del VCHIK para combinar varias características que normalmente no están presentes en un virus VCHIK durante su ciclo de vida normal.

En realizaciones ejemplares, se crece de forma eficaz el plásmido de i-DNA™ del VCHIK en bacterias (que no es el hospedador normal para el VCHIK) como un plásmido de alto número de copias y, por lo tanto, el i-DNA™ está preferentemente libre de cualquier estructura secundaria fuerte, de orígenes de replicación crípticos o de fases de lectura abierta (ORF) que codifiquen productos tóxicos, o de cualquier otro elemento conocido o desconocido que inhiban del crecimiento de las bacterias o de la síntesis del ADN plasmídico.

En otras realizaciones ejemplares, el ARN genómico del VCHIK se transcribe de forma eficaz en los núcleos de las células hospedadoras. El nucleoplasma del núcleo normalmente representa un entorno hostil (debido al corte y empalme y otros mecanismos de procesamiento del ARN) para los ARN que han evolucionado para replicarse en el citoplasma, tal como el ARN del VCHIK. Tras la transcripción, el ARN resultante tiene preferentemente la capacidad de evitar la maquinaria de corte y empalme, y también migra de forma satisfactoria desde el núcleo al citoplasma a través de los poros nucleares, un proceso que está estrechamente controlado por proteínas y factores celulares. El ARN de los virus citoplasmáticos, tales como el VCHIK, normalmente no tiene elementos que aseguren la síntesis y transporte al núcleo del ARN de longitud completa intacto. Por lo tanto, el i-DNA™ preferentemente debería estar libre de sitios de corte y empalme crípticos, o de otros elementos que impidan la transcripción eficaz y el transporte del ARN al citoplasma.

En otras realizaciones ejemplares, para replicar en el citoplasma y generar una vacuna atenuada elaborada con virus vivo, el ARN transcrito debería ser funcional y tener extremos 5' y 3' auténticos que tengan la capacidad de sustentar la replicación de ARN.

En realizaciones ejemplares adicionales, para asegurar la síntesis y el transporte del ARN de VCHIK transcrito desde el núcleo al citoplasma, pueden eliminarse o introducirse determinadas secuencias en el i-DNA™ del VCHIK.

En el presente documento se describen ejemplos de varias configuraciones del i-DNA™ del VCHIK que pueden utilizarse para generar VCHIK atenuado vivo *in vitro* o *in vivo*, y que pueden configurarse en vacunas para chikungunya farmacéuticamente aceptables. Además, se espera que las vacunas de i-DNA™ de VCHIK descritas en el presente documento protejan frente al virus O'nyong'nyong, un alfavirus relacionado. Por consiguiente, las vacunas de i-DNA™ descritas en el presente documento también podrían utilizarse en un método de inmunización de un mamífero frente al virus O'nyong'nyong, los que incluiría la administración de una vacuna ejemplar al mamífero.

Ejemplos

Ejemplo 1. La vacuna atenuada elaborada con virus vivo CHIK 181/25 (TSI-GSD-218) candidata se generó a partir de la cepa 15561 del VCHIK y más tarde se probó de forma satisfactoria en ensayos clínicos en fase II (Edelman *et al.*, 2000; Levitt *et al.*, 1986). Sin embargo, la cepa 181/25 del VCHIK tiene desventajas comunes con otras vacunas elaboradas con virus vivo. Por ejemplo, existe el riesgo de reversión a una forma virulenta, lo que se ha demostrado anteriormente (Parker, 1994). Además de los riesgos de seguridad asociados con la posibilidad de reversión genética, otros puntos débiles incluyen la heterogeneidad de la población de virus dentro de la vacuna, la presencia de impurezas y de agentes fortuitos derivados del sustrato celular, y durante la preparación de la vacuna; la necesidad costosa e inconveniente de un suministro con cadena de frío, las dificultades en la producción de grandes cantidades de virus atenuado vivo y la necesidad de medidas de control de calidad constantes para mantener invariable el genotipo atenuado.

Una molécula de i-DNA™ contiene la copia del ADNc de longitud completa del ARN genómico de 181/25 bajo el control del promotor de CMV (Figura 3). La distancia entre el promotor y el inicio del ADNc del VCHIK (15±2 nucleótidos, de acuerdo con la numeración de los inventores, para más detalles véase la secuencia de nucleótidos en la Figura 3) asegura la generación de ARN genómico de VCHIK con el extremo 5' funcional que tiene capacidad de amplificación y replicación del ARN. La cola de poliA, la secuencia de la ribozima y las secuencias de terminación de la transcripción aseguran la generación de un ARN de VCHIK con el extremo 3' funcional. El fragmento de ADN

completo mostrado en la Figura 3 incluye (1) las secuencias del promotor/potenciador de CMV, las secuencias (2) del ADNc del VCHIK de longitud completa, (3) de la cola de poliA, (4) de la ribozima y (5) de terminación de la transcripción. Tal fragmento de ADN puede clonarse y propagarse en *E. coli* como parte de plásmidos conocidos en la técnica, incluyendo pero sin limitación pcDNA3.1, pCR2.1, pUC19 y otros. Después de la transcripción a partir del i-DNA™ mostrado en la Figura 3, se genera *in vivo* el ARN genómico de la vacuna atenuada elaborada con virus vivo, que inicia la replicación limitada del virus de la vacuna atenuada elaborada con virus vivo y la generación de una respuesta inmunitaria protectora (Figura 2).

Además de las mutaciones contenidas en la cepa del virus atenuado vivo 181/25 del VCHIK, pueden utilizarse otras configuraciones de mutaciones atenuantes para el desarrollo de vacunas de i-DNA™ del VCHIK. Para mejorar las características del i-DNA™ del VCHIK pueden utilizarse variaciones de secuencia adicionales, incluyendo delecciones, inserciones o sustituciones.

La Figura 4 muestra la secuencia de nucleótidos de un i-DNA™ variante que es similar a la mostrada en la Figura 3, pero que no contiene secuencias de ribozima. Sorprendentemente, tal i-DNA™ sin una ribozima tiene la capacidad de transcribir el ARN infeccioso funcional del VCHIK y de generar virus del VCHIK atenuado vivo. La Figura 10 demuestra que la transfección de células de ovario de hámster chino (CHO) con plásmido de i-DNA™ (clon n.º 10, ya sea en forma superenrollada o linealizada utilizando la enzima NotI) da como resultado la expresión de antígenos del VCHIK en la mayoría de las células CHO, lo que sugiere que (i) no estaban presentes sitios de corte y empalme crípticos u otros elementos restrictivos en el i-DNA™ o en el ARN codificado y (ii) que la transfección da como resultado un virus vivo, lo que asegura la propagación eficaz de la expresión antigénica en las células CHO transfectadas. Además, el i-DNA™ puede dar cabida a secuencias adicionales que pueden mejorar determinadas características de las vacunas de i-DNA™. Los ejemplos de tales secuencias de i-DNA™ se muestran en las Figuras 5 y 6.

Además, pueden fabricarse alfavirus quiméricos atenuados vivos que protejan frente al VCHIK y al virus O'nyong'nyong, colocando genes estructurales del VCHIK en lugar de otros genes estructurales de alfavirus. La Figura 7 muestra un ejemplo de una secuencia de nucleótidos en la que los genes estructurales del VCHIK obtenidos de la cepa 181/25 se introducen en el virus atenuado vivo TC-83 en lugar de los genes estructurales de TC-83. Otra vez, tal vacuna puede (1) representar virus homogéneo generado *in vitro* a partir de i-DNA™ en un modo farmacéuticamente aceptable o (2) representar la construcción de i-DNA™ formulada en un modo farmacéuticamente aceptable para la administración *in vivo*.

Como alternativa, pueden fabricarse vacunas quiméricas frente a alfavirus introduciendo en el i-DNA™ del VCHIK proteínas estructurales procedentes de otros alfavirus. La Figura 9 muestra un ejemplo de una secuencia de nucleótidos de un i-DNA™ del VCHIK quimérico que contiene la poliproteína estructural del virus TC-83 en lugar de la poliproteína estructural del virus VCHIK 181/25. Tal i-DNA™ quimérico puede utilizarse para la producción de vacunas de virus homogéneo o vacunas de i-DNA™ frente a infecciones por EEV.

Ejemplo 2. Generación de VCHIK atenuado vivo *in vitro* utilizando i-DNA. Cuando se introduce la molécula de i-DNA™ del VCHIK (Figuras 3-9) en células *in vitro*, por ejemplo mediante transfección, se genera en las células el ARN vírico del VCHIK. El ARN resultante es "infeccioso" e inicia en las células la producción de la vacuna de virus atenuado vivo VCHIK (Figura 10). El VCHIK atenuado vivo se acumula en el medio de cultivo y puede recogerse, y puede determinarse por ensayo de placas el título y la morfología de placa del virus atenuado vivo (Figura 11A). El VCHIK atenuado vivo puede formularse de modo farmacéuticamente aceptable de acuerdo con el estado actual de la técnica.

Ejemplo 3. Vacunación *in vivo* con la vacuna para VCHIK atenuada elaborada con virus vivo generada *in vitro* a partir de i-DNA™. La vacuna de virus VCHIK puede recogerse de células en cultivo como se describe en el Ejemplo 2 y utilizarse en una formulación farmacéuticamente aceptable para la vacunación de animales o de personas, de acuerdo con el estado actual de la técnica. La administración puede ser por cualquier vía normalmente utilizada para vacunación, incluyendo la subcutánea, intravenosa, intramuscular, combinaciones de las mismas y similares. Una ventaja de la vacuna que se genera a partir del i-DNA™ es que representa un virus progenie homogéneo generado a partir del mismo ADN estable bien caracterizado.

La Figura 11 muestra la homogeneidad del tamaño de placa del virus derivado de i-DNA™ (Figura 11A) en comparación con los tamaños de placa más homogéneos de una vacuna IND de 181/25 "clásica" (Figura 11B). Se espera que el tamaño de placa homogéneo dé como resultado una seguridad más alta del virus atenuado vivo obtenido de i-DNA debido a que las grandes placas de la vacuna IND de 181/25 (Figura 11B) pueden indicar la presencia de revertantes a virus virulentos. Los revertantes a virus virulento se detectan en el virus aislado de pacientes que experimentan efectos adversos tras la vacunación con la vacuna IND de 181/25 (n.º de registro de Genbank EF452494, nota de la fuente de aislamiento = "receptor de vacuna virémico").

La Figura 12 muestra los resultados de secuenciación de varios clones generados a partir de la vacuna IND de 181/25 mediante transcripción inversa y PCR. La vacuna de 181/25 se pasó una vez en células CHO, se aisló el

ARN y se llevó a cabo la transcripción inversa PCR (RT-PCR). Los fragmentos de RT-PCR se clonaron y secuenciaron.

Los fragmentos de ADNc se secuenciaron y se compararon con las secuencias de varias cepas virulentas del VCHIK procedentes del GenBank, así como con la secuencia de 181/25 original. El análisis reveló que varios clones secuenciados contenían mutaciones de “reversión” al virus virulento. El resultado mostrado en la Figura 12 es que en la región secuenciada uno de cada siete clones tiene la misma secuencia que la vacuna IND de 181/25, mientras que otros tenían sustituciones de nucleótidos presentes en los aislados virulentos. Solo el clon 3.5_40 de entre siete tiene un resto isoleucina (I) en el aminoácido 301, como en 181/25, mientras que los otros seis clones tienen el resto treonina (T), que está presente en los aislados virulentos del VCHIK de tipo silvestre y en el aislado VR1 del paciente enfermo vacunado con 181/25. También se detectó heterogeneidad en la posición 314.

Las vacunas descritas en el presente documento pueden proporcionar mayores ventajas de seguridad y regulación. Debido a que el mismo i-DNA™ clonalmente purificado utilizarse para la producción de distintos lotes de vacuna, estas vacunas tendrán una uniformidad y consistencia entre lotes mayores, en comparación con las vacunas actuales, las cuales pueden acumular mutaciones durante los pases de virus.

Ejemplo 4. Vacunación *in vivo* utilizando la vacuna de i-DNA™. Como alternativa, el i-DNA™ del VCHIK (Figuras 3-8) puede administrarse de forma directa al receptor de la vacuna en una formulación farmacéuticamente aceptable, por ejemplo por vía intramuscular o intravenosa, como se ilustra en la Figura 2. La administración directa de i-DNA™ al receptor de la vacuna inicia la producción *in vivo* de la vacuna de VCHIK en los tejidos del paciente y proporciona una vacunación satisfactoria frente a chikungunya. Una ventaja adicional de la inmunización con i-DNA™ frente a la vacuna de virus atenuado vivo convencional radica en las características inmunogénicas del propio i-DNA™. El ADN producido con bacterias, incluyendo el i-DNA™, contiene motivos CpG no metilados. Estos motivos activan la ruta de señalización del receptor de tipo toll (TLR) lo que da como resultado una inducción de la inmunidad innata y la producción de citocinas proinflamatorias y de interferones de tipo 1 (IFN 1), poco después de la inyección del ADN.

La señalización a través de receptores induce una respuesta de citocinas robusta a partir de las CD mieloides y la producción de IFN 1 a partir de las CD plasmocitoides, así como estimula la presentación cruzada de antígenos exógenos y respuestas de T CTL. Por lo tanto, la inmunización con i-DNA™ conduce a la activación y maduración de las CD incluso antes de que se liberen partículas de virus. Tales CD preactivadas potencian respuestas inmunitarias específicas inducidas por el virus atenuado vivos sintetizados recientemente.

Ejemplo 5. Vacunas de i-DNA™ con codones desoptimizados. Una vacuna, i-DNAC, contiene la copia de ADNc de longitud completa del genoma de ARN de la vacuna IND de 181/25, pero los codones traducionales dentro del gen de la cápside se desoptimizan a través de codones seleccionados. Otra vacuna, i-DNAE2-E1, también contiene la copia de ADNc de longitud completa del genoma de ARN de la vacuna IND de 181/25, pero los codones traducionales dentro de la región génica E2-E1 se desoptimizan de forma similar. Los genes E1, E2 y C se seleccionan a base de la inmunogenicidad de estos antígenos en ratones y del actual conocimiento sobre las respuestas inmunitarias adaptativas después de la infección por VCHIK en seres humanos. Los codones desoptimizados cambian solo la secuencia de nucleótidos y no dan lugar a cambios en la secuencia de aminoácidos. Estas mutaciones silenciosas aumentan la estabilidad genética y conservan el fenotipo atenuado, y se diseñan de forma que son necesarias al menos dos mutaciones genéticas independientes para cada codón para revertir a un codón de VCHIK de tipo silvestre.

Se sintetiza de forma bioquímica (GenScript, Piscataway, NJ) el fragmento sintético de 181/25 que abarca 3.771 pares de bases de la región 7567-11313 de los genes estructurales (C-E1-E2) de 181/25. Las construcciones recombinantes de i-DNA, i-DNAC e i-DNAE2-E1 de 181/25 se transfectan *in vitro* en células CHO-K1. Se recogen muestras de virus atenuado vivo del medio de cultivo y de células a intervalos de 6 horas durante 96 horas. Se evalúan *in vitro* los virus VCHIK vivos producidos a través de la transfección de las células y las características fenotípicas de estos virus recuperados, examinando parámetros cinéticos de replicación en cultivo celular, las propiedades antigénicas, la estabilidad genética y heterogeneidad molecular mediante los siguientes ensayos *in vitro*: (1) ensayo y fenotipo de placa; (2) curvas de crecimiento de virus; (3) transferencia de western; (4) inmunofluorescencia; (5) al menos 10 pases en *E. coli*; (6) transcripción inversa PCR y (7) secuenciación de ADN de la región estructural completa de al menos 120 aislados de placa obtenidos de cada virus, incluyendo el control 181/25 (para evaluar la heterogeneidad de la población y la estabilidad genética en células de mamífero). La capacidad de los antígenos de la vacuna de VCHIK nueva de reaccionar con antisueros humanos procedentes de casos clínicos de VCHIK recientes se evalúa a través de ELISA.

Ejemplo 6. Análisis de la vacuna de i-DNA™ en un modelo animal. La producción de i-DNA™ plasmídico a partir de *E. coli* se realiza utilizando métodos establecidos para la producción de un banco de células bacterianas, de fermentación, recogida, lisis de la biomasa y de purificación de ADN aguas abajo. Este procedimiento da como resultado un producto de ADN estéril con aproximadamente un 95 % de ADN superenrollado y una proporción de A260/A280 de aproximadamente 1,9, así como endotoxinas, ARN, ADN genómico e impurezas de proteína residuales mínimos. Los controles de calidad incluyen (1) análisis de endotoxinas, (2) gel de agarosa, (3) SDS-PAGE; (4) análisis con enzimas de restricción y (5) secuenciación de ADN. Se inyectan por vía intramuscular (i.m.)

un máximo de 100 ng de i-DNA™ en: (1) ratones ICR recién nacidos; (2) ratones CD-1 de 14 días; (3) ratones CD-1 envejecidos (3 meses) y (4) hámsteres inmunosuprimidos.

Como alternativa, se suministra i-DNA™ en los músculos cuádriceps mediante electroporación *in vivo*, en un volumen total de 0,1 ml utilizando el BTX ECM600 con un Electrodo 2-needle Array (BTX/Harvard Apparatus, Holliston, MA). El reactivo de transfección PolyPlus InVivo-Jet PEI (PolyPlus, Illkirch, Francia) puede utilizarse como otro método de transfección. Los parámetros de seguridad e inmunogenicidad incluyen (1) viremia; (2) morbilidad; (3) perfiles de citocinas; (4) ELISA de VCHIK; (5) respuestas de anticuerpos neutralizantes específicos para el virus; (6) inmunidad mediada por células y (7) anticuerpos anti DNA™.

Para los ratones ICR y CD-1, se dividieron en 5 grupos 60 animales de cada cepa (12 ratones por grupo): (1) i-DNA de 181/25; (2) i-DNAc; (3) i-DNAE2-E1; (4) virus 181/25 (control positivo) y (5) vacunados de forma simulada (control negativo). Cada plásmido de i-DNA™ se inyectó como una dosis única de 100 ng en 20-40 µl i.m. Los animales de control se inyectaron con 105 UFP de la vacuna de virus 181/25. Cada 2-7 días se tomaron muestras de sangre para determinar la viremia y la serología. En los días 0, 2, 4, 8 y 16 tras la inmunización, se sometieron a eutanasia 3 ratones de cada grupo y se tomaron muestras de sangre por punción cardíaca. Se espera que la activación del TLR9 por el i-DNA™ desencadene la producción de citocinas proinflamatorias a las 12-16 horas, poco tiempo después de la liberación del virus infeccioso, potenciando así las respuestas inmunitarias adaptativas. La inmunidad innata se analiza mediante ELISA de citocinas a distintos puntos temporales tras la inmunización con i-DNA™, utilizando reactivos para IFN-γ, IL-1α/β, TNF-α, MCP-1, IL-4, IL-6 e IL-12p40 (BD Biosciences, San Jose, CA). INF-α e INF-β se miden mediante ELISA (PBL Biomed Labs, NJ). Los niveles de IFN biológico activo se determinan utilizando un bioensayo de VEMC-L929 (Daffis *et al.*, 2007). Las respuestas inmunitarias específicas se miden mediante ELISA de IgG, ensayo de neutralización por reducción de placas (ENRP) y por ensayo de ELISPOT de IFN-γ utilizando grupos de péptidos de 15 meros solapantes en 11 aminoácidos (Mimotopes, Melbourne, Australia) (Muthumani *et al.*, 2008). Brevemente, se recubren placas de ELISPOT con Ac anti IFN-γ y se incuban durante 12 horas a 40°C. Las placas se lavan y bloquean con BSA al 1 %. Tras el lavado, se añaden a los pocillos 25 x 10⁴ esplenocitos por triplicado y se estimulan durante una noche por la incubación a 37 °C con grupos de péptidos derivados de E1, E2 y C específicos. Tras la estimulación, las células se lavaron e incubaron con anti IFN-γ de ratón biotinilado (R & D Systems). Se homogeneizan en PBS con SFB al 1 % muestras de tejido (hígado, bazo, ganglios linfáticos, pulmón, riñón y cerebro) y se utilizan para el ensayo de placas o la extracción de ARN con Trizol.

Para evaluar la seguridad e inmunogenicidad de las vacunas en condiciones de inmunocompromiso (Mateo *et al.*, 2007) se utilizan hámsteres dorados Sirios (*Mesocricetus auratus*) (Harlan Sprague Dawley) tratados con ciclofosfamida (CYP). Se utilizan en este estudio un total de 26 hámsteres. Los animales tratados con CYP se dividen en seis grupos. Tres grupos reciben los i-DNA original y modificado. Los tres grupos de control incluyen un grupo que recibe la vacuna de 181/25; un grupo de control que recibe el tratamiento con CYP pero no la vacuna y un grupo de control que no recibe CYP ni vacuna (Vertebrate Animals). Las construcciones de i-DNA™ se inyectan como única dosis (100 ng) por vía i.m. El virus de control 181/25 se inyecta en 100 µl (105 UFP). Los animales se examinan a diario durante 8 semanas (punto final) para observar cualquier evidencia de efectos adversos. Se registran la temperatura y el peso corporal. Para la detección de virus y para la serología se toman muestras de sangre de los animales cada 2 días durante la primera semana, después cada 7 días.

Referencias

- Daffis S, Samuel MA, Keller BC, Gale M Jr, Diamond MS. Cell-specific IRF-3 responses protect against West Nile virus infection by interferon-dependent and -independent mechanisms. *PLoS Pathog.* 27 de julio de 2007; 3(7): e106.
- Edelman, R., C. O. Tacket, S. S. Wasserman, S. A. Bodison, J. G. Perry y J. A. Mangiafico, 2000b, Phase II safety and immunogenicity study of live chikungunya virus vaccine TSI-GSD-218: *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 62, pág. 681-685.
- Khan, A. H., K. Morita, C. Parquet Md Mdel, F. Hasebe, E. G. Mathenge y A. Igarashi, 2002, Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site: *J Gen Virol*, v. 83, pág. 3075-84.
- Kitaoka, M., 1967, Japanese encephalitis vaccine including a preliminary report on dengue fever and Chikungunya vaccines: *Jpn J Med Sci Biol*, v. 20 Sup, pág. 41-56.
- Levitt, N. H., H. H. Ramsburg, S. E. Hasty, P. M. Repik, F. E. Cole, Jr. y H. W. Lupton, 1986, Development of an attenuated strain of chikungunya virus for use in vaccine production: *Vaccine*, v. 4, pág. 157-62.
- Mateo RI, Xiao SY, Travassos da Rosa AP, Lei H, Guzman H, Lu L, Tesh RB. Yellow fever 17-D vaccine is neurotropic and produces encephalitis in immunosuppressed hamsters. *Am J Trop Med Hyg.* 2007 Nov;77(5):919-24.
- Muthumani K, Lankaraman KM, Laddy DJ, Sundaram SG, Chung CW, *et al.* Immunogenicity of novel consensus-based DNA vaccines against Chikungunya virus. *Vaccine.* 2008; 26: 5128-5134.
- Powers, A. y A. Brault, 2009, O'nyong-nyong and chikungunya, pág. 589-607. En: *Vaccines for biodefense and emerging and neglected diseases*; editado por Alan D.T. Barrett y Lawrence R. Stanberry. Academic Press, Elsevier, Amsterdam, Londres, San Diego.

Parker, M. D., 1994, Structural protein gene sequences of Chikungunya vaccine virus, its parent and a virulent revertant, Virology Division, USAMRI-ID, Fort Detrick, Frederick, MD 21701, USA. N.º de registro de Gen-Bank L37661.

5 Wang, E., E. Volkova, A. P. Adams, N. Forrester, S. Y. Xiao, I. Frolov y S. C. Weaver, 2008, Chimeric alphavirus vaccine candidates for chikungunya: Vaccine, v. 26, pág. 5030-9.

Yamshchikov, V. Infectious DNA as a vaccine against West Nile and other flaviviruses. Número de patente de Estados Unidos: 7459163

REIVINDICACIONES

1. Un vector de ADN que comprende:

5 (a) un ADN que codifica una molécula de ARN infecciosa que inicia la producción en células de una vacuna de virus atenuado vivo VCHIK; y
(b) un promotor de la ARN polimerasa eucariota;
en el que:

10 (i) el ADN que codifica una molécula de ARN infecciosa está unido operativamente al promotor de la ARN polimerasa; y
(ii) la molécula de ARN infecciosa codifica un virus chikungunya (VCHIK).

2. El vector de ADN de la reivindicación 1, en el que la molécula de ARN infecciosa codifica un VCHIK no patógeno.

15 3. El vector de ADN de la reivindicación 1, en el que la molécula de ARN infecciosa codifica un VCHIK atenuado.

4. El vector de ADN de la reivindicación 1, en el que:

20 el promotor de la ARN polimerasa eucariota comprende un promotor de la ARN polimerasa de citomegalovirus (CMV),
el promotor de la ARN polimerasa de CMV se emplaza de aproximadamente 13 a aproximadamente 17 restos de nucleótido cadena arriba del extremo 5' del ADN que codifica una molécula de ARN infecciosa, y
la molécula de ARN infecciosa codifica un VCHIK atenuado.

25 5. El vector de ADN de la reivindicación 1, en el que el VCHIK es un virus quimérico que comprende al menos el 50 % de las secuencias del VCHIK así como secuencias de otro alfavirus, en el que el otro alfavirus se selecciona del grupo que consiste en virus O'nyong'nyong, virus del río Ross, virus Sindbis, virus del bosque Semliki y virus de la encefalitis equina venezolana (VEEV).

30 6. El vector de ADN de la reivindicación 5, que comprende la secuencia de ADN enumerada en la Figura 9.

7. El vector de ADN de la reivindicación 1, en el que el vector de ADN está libre de sitios de corte y empalme crípticos, y comprende secuencias que aseguran la síntesis y el transporte de la molécula de ARN del VCHIK infecciosa transcrita desde el núcleo al citoplasma.

35 8. Un vector de ADN de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende la secuencia de ADN enumerada en una cualquiera de las Figuras 3 a 7.

40 9. Una vacuna que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del vector de ADN de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

10. La vacuna de la reivindicación 9 para su uso en un método de inmunización de un mamífero frente al VCHIK.

45 11. Uso de la vacuna de la reivindicación 9 en la fabricación de un medicamento para inmunizar a un mamífero frente al VCHIK.

12. Un método de preparación de una vacuna, en el que el método comprende transfectar el vector de ADN de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en una célula eucariota y aislar virus infecciosos homogéneos clonalmente puros a partir de un medio de cultivo que comprende la célula eucariota transfectada, obteniendo de este modo una vacuna.

50 13. Un método *in vitro* de preparación de una célula eucariota transfectada, en el que el método comprende transfectar el vector de ADN de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en una célula eucariota, para obtener una célula eucariota transfectada.

55 14. Una célula eucariota que comprende el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

Figura 1

Requerimientos de la vacuna	Vacunas atenuadas elaboradas con virus vivo	Vacunas de ADN	Vacuna de i-DNA del VCHIK
Estabilidad genética	No	Sí	Sí
Fabricación simple	No	Sí	Sí
Económica	No	Sí	Sí
No necesita cadena de frío	No	Sí	Sí
Alta pureza	No	Sí	Sí
Vacunación de dosis única	Sí	No	Sí
La implicación del núcleo es mínima	Sí	No	Sí
Inicio rápido de la inmunidad	Sí	No	Sí
Protección eficaz	Sí	No	Sí

Figura 2

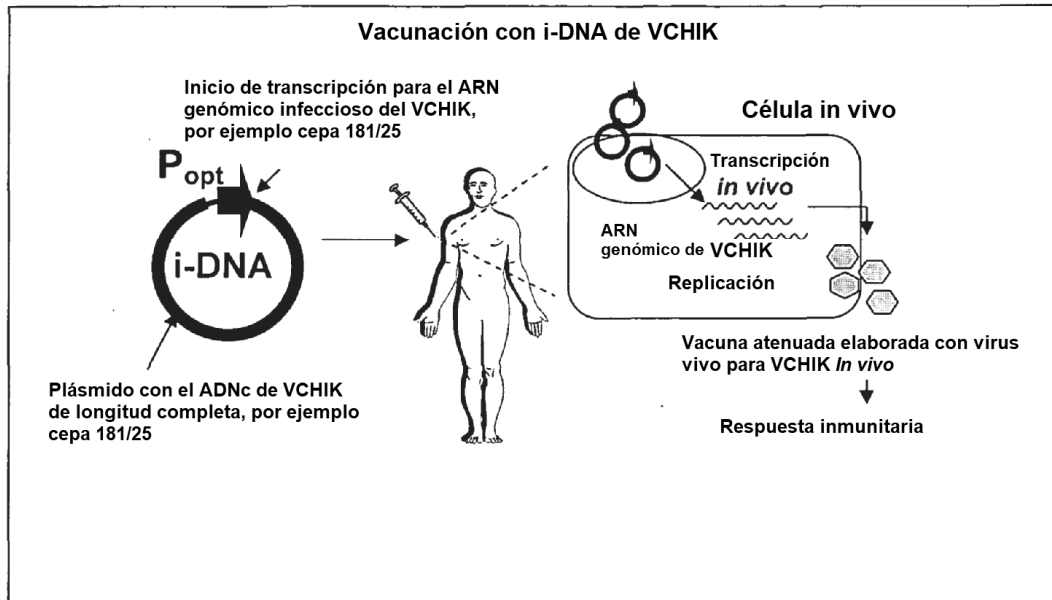


Figura 3. La secuencia de i-DNA contiene la ribozima del VHD antigenómica cadena arriba del sitio NotI (recuadrado)

```

1  GGCGCGCCTG ACATTGATTA TTGACTAGTT ATTAATAGTA ATCAATTACG
51 GGGTCATTAG TTCATAGCCC ATATATGGAG TTCCGCGTTA CATAACTTAC
101 GGTAAATGGC CCGCCTGGCT GACCGCCCAA CGACCCCCGC CCATTGACGT
151 CAATAATGAC GTATGTTCCC ATAGTAACGC CAATAGGGAC TTTCCATTGA
201 CGTCAATGGG TGGAGTATTT ACGGTAAACT GCCCACTTGG CAGTACATCA
251 AGTGTATCAT ATGCCAAGTA CGCCCCCTAT TGACGTCAAT GACGGTAAAT
301 GGCCCGCCTG GCATTATGCC CAGTACATGA CCTTATGGGA CTTTCCTACT
351 TGGCAGTACA TCTACGTATT AGTCATCGCT ATTACCATGG TGATGCGGTT
401 TTGGCAGTAC ATCAATGGGC GTGGATAGCG GTTTGACTCA CGGGGATTTT
451 CAAGTCTCCA CCCCATTTGAC GTCAATGGGA GTTTGTTTTG GCACCAAAAT
501 CAACGGGACT TTCCAAAATG TCGTAACAAC TCCGCCCCAT TGACGCAAAT
551 GGGCGGTAGG CGTGTACGGT GGGAGGTCTA TATAAGCAGA GCTCTCTGGC
601 TAACTAGAGa tggctgcgtg agacacacgt agcctaccag tttcttactg
651 ctctactctg caaagcaaga gattaataac ccatcatgga ttctgtgtac
701 gtggacatag acgctgacag cgcctttttg aaggccctgc aacgtgcgta
751 ccccatgttt gaggtggaac ctaggcaggt cacatcgaat gaccatgcta
801 atgctagagc gttctcgcac ctagccataa aactaataga gcaggaaatt
851 gatcccgact caaccatcct ggatataggt agtgcgccag caaggaggat
901 gatgtcggac aggaagtacc actgcgtttg cccgatgcgc agcgcagaag
951 atcccgagag actcgctaata tatgcgagaa agctcgcacg tgccgcagga
1001 aaagtccctg acagaaacat ttctggaaaag atcggggact tacaagcggg
1051 gatggccgtg ccagacacgg agacgccaac attttgctta cacacagatg
1101 tctcatgtag acagagagca gacgtcgcga tataccaaga cgtctatgct
1151 gtacacgcac ccacgtcgct ataccaccag gcgattaaag gagtccgagt
1201 ggcgtactgg gtagggttcg acacaacccc gttcatgtac aacgctatgg
1251 cgggtgccta cccctcatac tcgacaaaatt gggcggatga gcagggtactg
1301 aaggctaaga acataggatt atgttcaaca gacctgacgg aaggtagacg
1351 aggcaaattg tctatcatga gagggaaaaa gctaaaaccg tgcgaccgtg
1401 tgctgttctc agtaggggtca acgctttacc cggaaagccg cacgctactt

```

ES 2 647 662 T3

1451 aagagctggc acctaccatc ggtgttccat ctaaagggca agcttagctt
 1501 cacatgccgc tgtgacacag tggtttcgtg tgagggctac gtcgttaaga
 1551 gaataacgat gagcccaggc ctttatggaa aaaccatagg gtatgcggta
 1601 acccaccacg cagacggatt cttgatgtgc aagactaccg acacggttga
 1651 cggcgaaaga gtgtcattct cgggtgtgcac gtacgtgccg gcgaccattt
 1701 gtgatcaaat gaccggcatc cttgctacag aagtcacgcc ggaggatgca
 1751 cagaagctgt tgggtggggct gaaccagagg atagtggtta acggcagAAC
 1801 gcaacggaac acgaacacca tgaagaacta cctacttccc gtggctgccc
 1851 aggccttcag taagtgggca aaggagtgcc ggaaggacat ggaagatgag
 1901 aagcttctgg gggtcagaga aagaacacta acctgctgct gtctatgggc
 1951 atttaagaag cagaaaacac acacggtcta caagaggcct gatacccagt
 2001 caatccagaa ggttcaggcc gaatttgaca gctttgtagt accgggacctg
 2051 tggtcgtccg ggttgtcaat cccgttgagg actagaatca agtgggtgtt
 2101 acgcaaggtg ccgaaaacag acctgatccc atacagcggg aatgcccaag
 2151 aagcccagga tgcagaaaaa gaagcagagg aagaacgaga agcagaactg
 2201 actcatgagg ctctaccacc cctacaggca gcacaggaag atgtccaggt
 2251 cgaaatcgac gtggaacagc ttgaggatag agctgggtgct ggaataatag
 2301 agactccgag aggcgctatc aaagt tactg cccaactaac agaccacgtc
 2351 gtggggggagt acctggtact ttccccgcag accgtactac gcagccagaa
 2401 gctcagcctg atccacgctt tagcggagca agtgaagacg tgtacgcaca
 2451 gcggacgagc agggaggtat gcggtcgaag cgtacgatgg ccgagtccta
 2501 gtgccctcag gctatgcaat ttgcctgaa gacttccaga gtctaagcga
 2551 aagcgcaacg atggtgtaca acgaaagaga gttcgtaaAC agaaagt tac
 2601 accacattgc gatgcacgga ccagccctga aactgacga agagtcgtat
 2651 gagctggtga gggcagagag gacagaacac gagtacgtct acgacgtgga
 2701 ccagagaaga tgctgtaaga aggaagaagc tgcaggactg gtactggtgg
 2751 gcgacttgac taatccgccc taccacgaat tcgcatacga agggctaaaa
 2801 attcgccccg cctgcccata caaaattgca gtcataggag tcttcgggggt
 2851 accaggatct ggcaagtcag ccattatcaa gaacctagtt accaggcaag
 2901 acctggtgac tagcggaaag aaagaaaact gccaaagaaat cagcaccgac
 2951 gtgatgagac agagaggtct agagatatct gcacgtacgg tagattcgct
 3001 gctcttgaat ggatgcaaca gaccagtcga cgtgttgtac gtagacgagg

ES 2 647 662 T3

3051 cgtttgctgt ccactctgga acgttacttg ctttgatcgc cttgggtgaga
 3101 ccaagacaga aagttgtact ttgtgggtgac ccgaagcagt gcggcttctt
 3151 caatatgatg cagatgaaag tcaactacaa tcataacatc tgcacccaag
 3201 tgtaccacaa aagtatctcc aggcgggtgta cactgcctgt gactgccatt
 3251 gtgtcatcgt tgcattacga aggcaaaatg cgcactacga atgagtacaa
 3301 catgccgatt gtagtggaca ctacaggctc aacgaaacct gaccctggag
 3351 acctcgtgtt aacgtgcttc agaggggtggg ttaaacaact gcaaattgac
 3401 tatcgtggac acgaggtcat gacagcagcc gcacccaag ggtaaactag
 3451 aaaaggagtt tacgcagtta ggcaaaaagt taacgaaaac ccactctatg
 3501 catcaacatc agagcacgtc aacgtactcc taacgcgtac ggaaggtaaa
 3551 ctgggtatgga agacactctc tggtgacccg tggataaaga cgctgcagaa
 3601 cccaccgaaa ggaaacttca aagcaactat taaggagtgg gaggtggagc
 3651 acgcacgat aatggcgggc atctgcagtc accaagtgac ctttgacaca
 3701 ttccaaaaca aagccaacgt ttgctgggct aagagcttgg tcctatcct
 3751 cgaaacagcg gggataaaac taaatgatag gcagtgggtcc cagataattc
 3801 aagccttcaa agaagacaaa gcatactcac ccgaagtagc cctgaatgaa
 3851 atatgcacgc gcatgtatgg ggtggatcta gacagtgggc tattctctaa
 3901 accgttggtg tctgtgtatt acgcggataa ccattgggat aataggccgg
 3951 gaggaaagat gttcggattc aaccctgagg cagcgtccat tctagaaaga
 4001 aagtacccat ttacaaaagg aaagtggaac atcaacaagc agatctgcgt
 4051 gactaccagg aggatagaag acttcaacc taccaccaac attataccgg
 4101 tcaacaggag actaccacac tcattagtgg ccgaacaccg cccagtaaaa
 4151 ggggaaagaa tggaatggct ggtaacaag ataaacggac accacgtact
 4201 cctgggttagc ggctataacc ttgcaactgc tactaagaga gtcacctggg
 4251 tagcgccact aggtgtccgc ggagcggact atacatacaa cctagagctg
 4301 ggtctaccag caacrccttg taggtatgac ctagtgggtca taaacatcca
 4351 cacacctttt cgcatacacc attaccaaca gtgcgtagat cacgcaatga
 4401 aactgcaaat gctaggggggt gactcactga gactgctcaa accgggtggc
 4451 tctctattga tcagagcata cggttacgca gatagaacca gtgaacgagt
 4501 catctgcgta ctgggacgca agtttagatc gtctagagca ttgaaaccac
 4551 catgtgtcac cagtaatact gagatgtttt tcctatttag caattttgac
 4601 aatggcagaa ggaattttac aacgcatgtc atgaacaatc aactgaatgc

ES 2 647 662 T3

4651 agccttttcta ggacaggcca cccgagcagg atgtgcacca tcgtaccggg
 4701 taaaacgcac ggacatcgcg aagaacgatg aagagtgcgt gggttaacgcc
 4751 gccaacccctc gcggggttacc aggtgacggg gtttgcaagg cagtatatata
 4801 aaagtggccg gagtccttta aaaacagtgc aacaccagta ggaaccgcaa
 4851 aaacagttat gtgcggtacg tatccagtaa tccacgccgt aggaccaaac
 4901 ttctcaaatt attcggagtc tgaaggggac cgggaattgg cggctgccta
 4951 tcgagaagtc gcaaaggaag taactagact gggagtaaata agcgtagcta
 5001 tacctctcct ctccacaggt gtataactcag gagggaaga caggctaacc
 5051 cagtcactga accacctctt tacagccatg gactcgacgg atgcagacgt
 5101 ggtcatctac tgccgagaca aggaatggga gaagaaaata tctgaggcca
 5151 tacagatgcg gaccaagtg gagctgctgg atgagcacat ctccatagac
 5201 tgcgatgtca ttgcggtgca ccctgacagt agcttggcag gcagaaaagg
 5251 atacagcacc acggaaggcg cactgtattc atatctagaa gggacacgtt
 5301 ttcaccagac ggcagtggat atggcagaga tatacactat gtggccaaag
 5351 caaacagagg ccaatgagca agtctgccta tatgccctgg gggaaagtat
 5401 tgaatcaatc aggcagaaat gcccggtgga tgatgcagac gcatcatctc
 5451 ccccgaaaac tgtcccgtgt ctttgccggg atgccatgac tcctgaacgc
 5501 gtcacccgac ttgcgatgaa ccatgtcaca aatataattg tgtgttcttc
 5551 atttcccctt ccaaagtaca agatagaagg agtgcaaaaa gtcaaattgt
 5601 ccaaggtaat gttattcgat cacaatgtgc catcgcgctg aagtccaagg
 5651 gaatacagat cttcccagga gtctgtacag gaagtgagta cgacaacgtc
 5701 attgacgcac agccagtttg atctaagcgc cgatggcgag aactgcctg
 5751 tcccgtcaga cctggatgct gacgccccag ccctagaacc ggcctagac
 5801 gacggggcgg tacatacatt accaaccata atcggaacc ttgcggccgt
 5851 gtctgactgg gtaatgagca ccgtacctgt cgcgccgcct agaagaagg
 5901 gagggagaaa cctgactgtg acatgtgacg agagagaagg gaatataaca
 5951 cccatggcta gcgtccgatt ctttagagca gagctgtgtc cggccgtaca
 6001 agaaacagcg gagacgcgtg acacagctat ttcccttcag gcaccgcca
 6051 gtaccacat ggaactgagc catccaccga tctccttcgg agcaccaagc
 6101 gagacgttcc ccatcacatt tggggacttc gacgaaggag aaatcgaaag
 6151 cttgtcttct gagctactaa ctttcggaga cttcctaccc ggtgaagtgg
 6201 atgatctgac agatagcgac tgggccacgt gccagacac ggacgacgag

ES 2 647 662 T3

6251 ttatgactag acagggcagg tgggtatata ttctcgtcgg aactgggtcc
 6301 aggccattta caacagaagt cggtacgcca gtcagtgctg ccggtaaaca
 6351 ccctggagga agtccacgag gagaagtgtt acccacctaa gctggatgaa
 6401 ttaaaggagc aactactact taagaaactc caggagagtg cgtccatggc
 6451 caatagaagc aggtatcagt cacgcaaagt ggaaaatatg aaagcaacaa
 6501 tcatccagag actaaagaga ggctgtaaac tgtattttaat ggcagagacc
 6551 ccgaaagtcc cgacttatcg gaccatatac ccggcgcctg tgtactcgcc
 6601 tccgatcaat gtccgattgt ccaaccccga gtccgcagtg gcagcatgta
 6651 atgagttctt agctagaaac tacccaactg tttcatcata ccaaatacc
 6701 gacgagtatg atgcatatct agacatgggtg gacgggtcgg agagttgctt
 6751 ggaccgagcg acattcaatc cgtcaaaact taggagctac ccgaaacaac
 6801 atgcttatca cgcgccttct atcagaagcg ctgtaccttc ccattccag
 6851 aacacactac agaatgtact ggcagcagcc acgaaaagga actgcaacgt
 6901 cacacagatg aggggaattac ccacttttga ctcagcagta ttcaacgtgg
 6951 agtgttttta aaaattcgca tgtaaccgag aatactggga agaatttgca
 7001 gccagcccta tcaggataac aactgagaat ctaacaacct atgtcactaa
 7051 actaaagggg ccaaaagcag cagcgtgtgt tgcaaaaacc cataatctgc
 7101 tgccactgca ggatgtacca atggataggt tcacagtaga tatgaaaagg
 7151 gatgtgaagg taactcctgg taaaaagcat acagaggaaa gacctagggt
 7201 gcaggttata caggcggctg aacccttggc aacagcgtac ctatgtggaa
 7251 ttcacagaga actggttagg agattgaacg ccgtcctcct acccaatgtg
 7301 catacactat ttgacatgtc tgccgaggac ttcgatgcca ttatagccgc
 7351 aactttcaag ccaggagacg ctgtttttaga aacggacata gcctcctttg
 7401 ataagagcca agatgattca cttgcgctta ccgccttaat gctgttagaa
 7451 gatttgaggag tggatcactc cctgttggac ttgatagagg ctgctttcgg
 7501 agagatttcc agctgtcact tgccgacagg tacgcgcttc aagttcggcg
 7551 ctatgatgaa atccggtatg ttctaactc tgttcgtcaa cacgttggtta
 7601 aatatcacca tcgctagccg ggtgttggaa gatcgtctga caaaatccgc
 7651 atgcgcggcc ttcacgaggc acgacaacat aatacatggt gtcgtctccg
 7701 atgaattgat ggcagccaga tgcgctactt ggatgaacat ggaagtgaag
 7751 atcatagatg cagttgtatc ccagaaagct ccttactttt gtggagggtt
 7801 tatactgcat gatactgtga caggaacagc ttgcagagtg gcggacccgc

ES 2 647 662 T3

7851 taaaaagggtt attttaaattg ggcaaaccgt tagcggcagg tgacgaacaa
 7901 gatgaagaca gaagacgggc gctggctgat gaagtaatca gatggcaacg
 7951 aacaggggcta atagatgagc tggagaaagc ggtgtactct aggtacgaag
 8001 tgcaggggtat atcagttgcg gtaatgtcca tggccacctt tgcaagctcc
 8051 agatccaact tcgagaagct cagaggaccc gtcataactt tgtacggcgg
 8101 tcctaaatag gtacgcacta cagctaccta ttttgcagaa gccgacagca
 8151 ggtacctaata taccaatcag ccataatgga gtttatccca acccaaactt
 8201 tctacaatag gaggtaccag cctcgacctt ggactccgcg ccctactatc
 8251 caagttatca gaccagacc gcgtccgcaa aggaaagccg ggcaacttgc
 8301 ccagctgatc tcagcagtta ataaactgac aatgcgcgcg gtacctcaac
 8351 agaagccgcg caagaatcgg aagaataaga agcaaaagca aaagcagcag
 8401 gcgccacgaa acaacatgaa tcaaaagaag cagcccccta aaaagaaacc
 8451 ggctcaaaag aaaaagaagc cgggccgtag agagagaatg tgcataaaaa
 8501 tcgaaaatga ttgcatcttc gaagtcaagc atgaaggtaa ggtaacaggt
 8551 tacgcgtgct tggtagggga caaagtaatg aagccagcac acgtaaaggg
 8601 gaccatcgat aatgcggacc tggccaaatt ggcttcaag cggatcatcta
 8651 agtacgacct tgaatgcgcg cagatacccg tgcacatgaa gtccgacgct
 8701 tcgaagttca cccatgagaa accggagggg tactacaact ggcaccacgg
 8751 agcagtacag tactcaggag gccggttcac catccctaca ggtgcgggca
 8801 aaccagggga cagcggtaga ccgatcttcg acaacaaggg gcgcgtggtg
 8851 gccatagttt taggaggagc taatgaagga gcccgtagag ccctctcggt
 8901 ggtgacctgg aacaaagaca tcgtcacgaa aatcacccct gagggggccg
 8951 aagagtggag tcttgccatt ccagttatgt gcctgctggc aaataaccag
 9001 ttcccctgct cccagccccc ttgcacaccc tgctgctacg aaaaagagcc
 9051 ggagaaaacc ctgcgcacgc tagaagacaa cgtcatgagc cccgggtact
 9101 atcagctgct acaagcatcc ttaacatggt ctccccgccg ccagcgacgc
 9151 agtattaagg acaacttcaa tgtctataaa gccataagac cgtacctagc
 9201 tcaactgtccc gactgtggag aagggcactc gtgccatagt cccgtagcgc
 9251 tagaacgcat cagaaacgaa gcgacagacg ggacgctgaa aatccaggtt
 9301 tccttgcaaa tcggaataaa gacggatgat agccatgatt ggaccaagct
 9351 gcgttacatg gacaatcata tgccagcaga cgcagagagg gccaggctat
 9401 ttgtaagaac gtcagcaccg tgcacgatta ctggaacaat gggacacttc

ES 2 647 662 T3

9451 atcctggccc gatgtccgaa aggagaaact ctgacggtgg gattcactga
 9501 cggtaggaag atcagtcact catgtacgca cccatttcac cacgaccctc
 9551 ctgtgatagg ccgggaaaaa tttcattccc gaccgcagca cggtagagaa
 9601 ctaccttgca gcacgtacgc gcagagcacc gctgcaactg ccgaggagat
 9651 agaggtacat atgccccag acaccccaga tcgcacattg atgtcacaac
 9701 agtccggtaa tgtaaagatc acagtcaata gtcagacggt gcggtacaag
 9751 tgtaattgcg gtgactcaaa tgaaggacta accactacag acaaagtgat
 9801 taataactgc aaggttgatc aatgccatgc cgcggtcacc aatcacaaaa
 9851 aatggcagta taattcccct ctgggtcccgc gtaatgctga actcggggac
 9901 cgaagaggaa aagttcacat tccgtttcct ctggcaaatg tgacatgcag
 9951 ggtgcctaag gcaaggaacc ccaccgtgac gtacggaaaa aaccaagtca
 10001 tcatgctgct gtatcctgac caccacaacgc tcctgtccta ccggaatatg
 10051 ggagaagaac caaactatca agaagagtgg gtgacgcata agaaggagat
 10101 cagggttaacc gtgccgactg aagggctcga ggtcacgtgg ggcaacaacg
 10151 agccgtacaa gtattggccg cagttatcca caaacggtac agcccacggc
 10201 caccgcgatg agataatttt gtattattat gagctgtacc ctactatgac
 10251 tgtggtagtt gtgtcagttg cctcgttcgt actcctgtcg atggtgggtg
 10301 tggcagtggt gatgtgcatg tgtgcacgac gcagatgcat tacaccgtac
 10351 gaactgacac caggagctac cgtccccttc ctgcttagcc taatatgctg
 10401 cattagaaca gctaaagcgg ccacatacca agaggctgcg gtatacctgt
 10451 ggaacgagca gcagcctttg ttttggtgca aagcccttat tccgctggca
 10501 gccctgattg tcctatgcaa ctgtctgaga ctcttaccat gcttttgtaa
 10551 aacgttgact tttttagccg taatgagcgt cggtgccac actgtgagcg
 10601 cgtacgaaca cgtaacagtg atcccgaaca cggtgaggagt accgtataag
 10651 actctagtca acagaccggg ctacagcccc atggtactgg agatggagct
 10701 tctgtcagtc actttggagc caacgctatc gcttgattac atcacgtgcg
 10751 agtataaaac cgtcatcccg tctccgtacg tgaaatgctg cggtagagca
 10801 gagtgcaagg acaagagcct acctgattac agctgtaagg tcttcaccgg
 10851 cgtctaccca ttcattgtgg gcggcgcta ctgcttctgc gacactgaaa
 10901 atacgcaatt gagcgaagca catgtggaga agtccgaatc atgcaaaaca
 10951 gaatttgcat cagcatatag ggctcatacc gcatccgcat cagctaagct
 11001 ccgcgtcctt taccaaggaa ataatgttac tgtatctgct tatgcaaacg

ES 2 647 662 T3

```

11051 gcgatcatgc cgtcacagtt aaggacgcta aattcattgt ggggccaatg
11101 tcttcagcct ggacaccttt tgacaataaa atcgtggtgt acaaaggcga
11151 cgtctacaac atggactacc cgcccttcgg cgcaggaaga ccaggacaat
11201 ttggcgacat ccaaagtcgc acgcctgaga gcgaagacgt ctatgctaac
11251 acacaactgg tactgcagag accgtccgcg ggtacggtgc acgtgccgta
11301 ctctcaggca ccatctggct tcaagtattg gctaaaagaa cgaggggctg
11351 cgctgcagca cacagcacca tttggctgtc aaatagcaac aaaccgggta
11401 agagcgatga actgcgccgt agggaaacatg cctatctcca tcgacatacc
11451 ggacgcggcc ttcactaggg tcgtcgacgc gccatcttta acggacatgt
11501 cgtgtgaggt accagcctgc acccactcct cagacttttg gggcgtagcc
11551 atcattaaat atgcagccag caagaaaggc aagtgtgcgg tgcattcgat
11601 gactaacgcc gtcactattc gggaaagctga aatagaagta gaaggggaact
11651 ctcagttgca aatctctttt tcgacggccc tagccagcgc cgaattccgc
11701 gtacaagtct gttctacaca agtacactgt gcagccgagt gccatccacc
11751 gaaagaccat atagtcaatt acccggcgtc acacaccacc ctcggggtcc
11801 aagacatttc cgttacggcg atgtcatggg tgcagaagat cacgggaggt
11851 gtgggactgg ttgtcgctgt tgcagcactg atcctaatac tgggtgctatg
11901 cgtgtcgttt agcaggcact aacttgacaa ctaggtacga aggtatatgt
11951 gtcccctaag agacacacca catatagcta agaatacaata gataagtata
12001 gatcaaaggg ctgaacaacc cctgaatagt aaaaaatat aaaaatcaac
12051 aaaaatcata aaatagaaaa ccagaaacag aagtaggtaa gaaggtatat
12101 gtgtccccta agagacacac catatatagc taagaatcaa tagataagta
12151 tagatcaaag ggctgaataa ccctgaata ataacaaaat ataaaaatca
12201 ataaaaatca taaaatagaa aaccataaac agaagtagtt caaaggggcta
12251 taaaaccctt gaatagtaac aaaacataaa actaataaaa atcaaatgaa
12301 taccataatt ggcaatcgga agagatgtag gtacttaagc ttcctaaaag
12351 cagccgaact cgctttgaga tgtaggcgta gcacaccgaa ctcttccata
12401 attctccgaa cccacaggga cgtaggagat gttcaaagtg gctataaaac
12451 cctgaacagt aataaaacat aaaattaata aggatcaaata gagtaccata
12501 attggcaaac ggaagagatg taggtactta agcttcctaa aagcagccga
12551 actcactttg agatgtaggc atagcatacc gaactcttcc acaattctcc
12601 gtacccatag ggacgtagga gatgttattt tgtttttaat atttcAAAAA

```

ES 2 647 662 T3

```

12651 AAAAAAAAAA AAAAAAAGG GTACTgggtc ggcattggcat ctccacctcc
12701 tcgcggtccg acctgggcat ccgaaggagg acgcacgtcc actcggatgg
12751 ctaagggaga gccacgagct cctcgacaga tcataatcag ccataccaca
12801 tttgtagagg ttttacttgc tttaaaaaac ctcccacacc tccccctgaa
12851 cctgaaacat aaaatgaatg caattgttgt tgtaacttg tttattgcag
12901 cttataatgg ttacaaataa agcaatagca tcacaaattt cacaaataaa
12951 gcattttttt cactgcattc tagttgtggt ttgtccaaac tcatcaagat
13001 GCGGCCGCCA CTGTGCTGGA TATCTGCAGA ATTCCACCAC ACTGGACTAG
13051 TGGATCAGCT TAAGTTTAAA CCGCTGATCA GCCTCGACTG TGCCTTCTAG
13101 TTGCCAGCCA TCTGTTGTTT GCCCCTCCCC CGTGCCTTCC TTGACCCTGG
13151 AAGGTGCCAC TCCCCTGTC CTTTCCTAAT AAAATGAGGA AATTGCATCG
13201 CATTGTCTGA GTAGGTGTCA TTCTATTCTG GGGGGTGGGG TGGGGCAGGA
13251 C

```

Figura 4.

```

1  GGCGCGCCTG ACATTGATTA TTGACTAGTT ATTAATAGTA ATCAATTACG
51  GGGTCATTAG TTCATAGCCC ATATATGGAG TTCCGCGTTA CATAACTTAC
101 GGTAAATGGC CCGCCTGGCT GACCGCCCAA CGACCCCGC CCATTGACGT
151 CAATAATGAC GTATGTTCCC ATAGTAACGC CAATAGGGAC TTTCCATTGA
201 CGTCAATGGG TGGAGTATTT ACGGTAAACT GCCCACTTGG CAGTACATCA
251 AGTGTATCAT ATGCCAAGTA CGCCCCCTAT TGACGTCAAT GACGGTAAAT
301 GGCCCGCCTG GCATTATGCC CAGTACATGA CCTTATGGGA CTTTCCTACT
351 TGGCAGTACA TCTACGTATT AGTCATCGCT ATTACCATGG TGATGCGGTT
401 TTGGCAGTAC ATCAATGGGC GTGGATAGCG GTTTGACTCA CGGGGATTTC
451 CAAGTCTCCA CCCCATTGAC GTCAATGGGA GTTTGTTTTG GCACCAAAT
501 CAACGGGACT TTCCAAAATG TCGTAACAAC TCCGCCCAT TGACGCAAAT
551 GGGCGGTAGG CGTGTACGGT GGGAGGTCTA TATAAGCAGA GCTCTCTGGC
601 TAACTAGAGa tggctgcgtg agacacacgt agcctaccag tttcttactg
651 ctctactctg caaagcaaga gattaataac ccatcatgga ttctgtgtac
701 gtggacatag acgctgacag cgcctttttg aaggccctgc aacgtgcgta
751 ccccatgttt gaggtggaac ctaggcaggt cacatcgaat gaccatgcta
801 atgctagagc gttctcgcat ctagccataa aactaataga gcaggaaatt
851 gatcccgact caaccatcct ggatataggt agtgcgccag caaggaggat
901 gatgtcggac aggaagtacc actgcgtttg cccgatgcgc agcgcagaag
951 atcccgagag actcgctaata tatgcgagaa agctcgcata tgccgcagga
1001 aaagtccctg acagaaacat ttctggaaaag atcggggact tacaagcgg
1051 gatggccgtg ccagacacgg agacgccaac attttgctta cacacagatg
1101 tctcatgtag acagagagca gacgtcgcga tataccaaga cgtctatgct
1151 gtacacgcac ccacgtcgct ataccaccag gcgattaaag gagtccgagt
1201 ggcgtactgg gtaggggttcg acacaacccc gttcatgtac aacgctatgg
1251 cgggtgccta cccctcatac tcgacaaatt gggcggatga gcaggtagtg
1301 aaggctaaga acataggatt atgttcaaca gacctgacgg aaggtagacg
1351 aggcaaattg tctatcatga gagggaaaaa gctaaaaccg tgcgaccgtg
1401 tgctgttctc agtaggggtca acgctttacc cggaaagccg cacgctactt

```

1451 aagagctggc acctaccatc ggtgttccat ctaaagggca agcttagctt
 1501 cacatgccgc tgtgacacag tggtttcgtg tgagggctac gtcgttaaga
 1551 gaataacgat gagcccaggc ctttatggaa aaaccatagg gtatgcggta
 1601 acccaccacg cagacggatt cttgatgtgc aagactaccg acacggttga
 1651 cggcgaaaga gtgtcattct cgggtgtgcac gtacgtgccg gcgaccattt
 1701 gtgatcaaat gaccggcatc cttgctacag aagtcacgcc ggaggatgca
 1751 cagaagctgt tgggtggggct gaaccagagg atagtggtta acggcagaac
 1801 gcaacggaac acgaacacca tgaagaacta cctacttccc gtgggtcgccc
 1851 aggccttcag taagtgggca aaggagtgcc ggaaggacat ggaagatgag
 1901 aagcttcttg gggtcagaga aagaacacta acctgctgct gtctatgggc
 1951 atttaagaag cagaaaacac acacggtcta caagaggcct gatacccagt
 2001 caatccagaa gggttcaggcc gaatttgaca gctttgtagt accgggcctg
 2051 tggtcgtccg gggtgtcaat cccgttgagg actagaatca agtgggtggt
 2101 acgcaaggtg ccgaaaacag acctgatccc atacagcggg aatgcccaag
 2151 aagcccagga tgcagaaaaa gaagcagagg aagaacgaga agcagaactg
 2201 actcatgagg ctctaccacc cctacaggca gcacaggaag atgtccaggt
 2251 cgaaatcgac gtggaacagc ttgaggatag agctgggtgct ggaataatag
 2301 agactccgag aggcgctatc aaagt tactg cccaactaac agaccacgtc
 2351 gtggggggagt acctggtact ttccccgcag accgtactac gcagccagaa
 2401 gctcagcctg atccacgctt tagcggagca agtgaagacg tgtacgcaca
 2451 gcggacgagc agggaggtat gcggtcgaag cgtacgatgg ccgagtccta
 2501 gtgccctcag gctatgcaat ttgcctgaa gacttccaga gtctaagcga
 2551 aagcgcaacg atggtgtaca acgaaagaga gttcgtaaac agaaagttac
 2601 accacattgc gatgcacgga ccagccctga aactgacga agagtcgtat
 2651 gagctggtga gggcagagag gacagaacac gagtacgtct acgacgtgga
 2701 ccagagaaga tgctgtaaga aggaagaagc tgcaggactg gtactggtgg
 2751 gcgacttgac taatccgccc taccacgaat tcgcatacga agggctaaaa
 2801 attcgccccg cctgcccata caaaattgca gtcataaggag tcttcgggggt
 2851 accaggatct ggcaagtcag ccattatcaa gaacctagtt accaggcaag
 2901 acctggtgac tagcggaaag aaagaaaact gccaaagaaat cagcaccgac
 2951 gtgatgagac agagaggtct agagatatct gcacgtacgg tagattcgct
 3001 gctcttgaat ggatgcaaca gaccagtcga cgtgttgtag gtagacgagg

ES 2 647 662 T3

3051 cgtttgcggtg ccactctgga acgttacttg ctttgatcgc cttgggtgaga
 3101 ccaagacaga aagttgtact ttgtgggtgac ccgaagcagt gcggcttctt
 3151 caatatgatg cagatgaaag tcaactacaa tcataacatc tgcacccaag
 3201 tgtaccacaa aagtatctcc aggcgggtgta cactgcctgt gactgccatt
 3251 gtgtcatcgt tgcattacga aggcaaaatg cgcactacga atgagtacaa
 3301 catgccgatt gtagtggaca ctacaggctc aacgaaacct gaccctggag
 3351 acctcgtggt aacgtgcttc agaggggtggg ttaaacaact gcaaattgac
 3401 tatcgtggac acgaggtcat gacagcagcc gcacccaag ggttaactag
 3451 aaaaggagtt tacgcagtta ggcaaaaagt taacgaaaac ccactctatg
 3501 catcaacatc agagcacgtc aacgtactcc taacgcgtac ggaaggtaaa
 3551 ctgggtatgga agacactctc tggtgacccg tggataaaga cgctgcagaa
 3601 cccaccgaaa ggaaacttca aagcaactat taaggagtgg gaggtggagc
 3651 acgcatcgat aatggcgggc atctgcagtc accaagtgac ctttgacaca
 3701 ttccaaaaca aagccaacgt ttgctgggct aagagcttgg tccctatcct
 3751 cgaaacagcg gggataaaac taaatgatag gcagtgggtcc cagataattc
 3801 aagccttcaa agaagacaaa gcatactcac ccgaagtagc cctgaatgaa
 3851 atatgcacgc gcattgtatgg ggtggatcta gacagtgggc tattctctaa
 3901 accgttggta tctgtgtatt acgcggataa ccattgggat aataggccgg
 3951 gaggaaagat gttcggattc aacctgagg cagcgtccat tctagaaaga
 4001 aagtacccat ttacaaaagg aaagtggaa atcaacaagc agatctgcgt
 4051 gactaccagg aggatagaag acttcaaccc taccaccaac attataccgg
 4101 tcaacaggag actaccacac tcattagtgg ccgaacaccg cccagtaaaa
 4151 ggggaaagaa tggaatggct ggttaacaag ataaacggac accacgtact
 4201 cctgggttagc ggctataacc ttgcaactgc tactaagaga gtcacctggg
 4251 tagcgccact aggtgtccgc ggagcggact atacatacaa cctagagctg
 4301 ggtctaccag caacrcctgg taggtatgac ctagtgggtca taaacatcca
 4351 cacacctttt cgcatacacc attaccaaca gtgcgtagat cacgcaatga
 4401 aactgcaa at gctaggggggt gactcactga gactgctcaa accgggtggc
 4451 tctctattga tcagagcata cggttacgca gatagaacca gtgaacgagt
 4501 catctgcgta ctgggacgca agtttagatc gtctagagca ttgaaaccac
 4551 catgtgtcac cagtaatact gagatgtttt tcctatttag caattttgac
 4601 aatggcagaa ggaattttac aacgcatgtc atgaacaatc aactgaatgc

ES 2 647 662 T3

4651 agccttttcta ggacaggcca cccgagcagg atgtgcacca tcgtaccggg
 4701 taaaacgcat ggacatcgcg aagaacgatg aagagtgcgt ggttaacgcc
 4751 gccaacccctc gcgggttacc aggtgacggg gtttgcaagg cagtataata
 4801 aaagtggccg gagtccttta aaaacagtgc aacaccagta ggaaccgcaa
 4851 aaacagttat gtgcggtacg tatccagtaa tccacgccgt aggaccaaac
 4901 ttctcaaatt attcggagtc tgaaggggac cgggaattgg cggctgccta
 4951 tcgagaagtc gcaaaggaag taactagact gggagtaaat agcgtagcta
 5001 tacctctcct ctccacaggt gtatactcag gagggaaaga caggctaacc
 5051 cagtcactga accacctctt tacagccatg gactcgacgg atgcagacgt
 5101 ggtcatctac tgccgagaca aggaatggga gaagaaaata tctgaggcca
 5151 tacagatgcg gaccaagtg gagctgctgg atgagcacat ctccatagac
 5201 tgcatgtca ttcgctgca cctgacagt agcttggcag gcagaaaagg
 5251 atacagcacc acggaaggcg cactgtattc atatctagaa gggacacgtt
 5301 ttcaccagac ggcagtggat atggcagaga tatacactat gtggccaaag
 5351 caaacagagg ccaatgagca agtctgccta tatgccctgg gggaaagtat
 5401 tgaatcaatc aggcagaaat gcccggtgga tgatgcagac gcatcatctc
 5451 ccccgaaaac tgtcccggtg ctttgccggg atgccatgac tcctgaacgc
 5501 gtcacccgac ttcgcatgaa ccatgtcaca aatataattg tgtgttcttc
 5551 atttcccctt ccaaagtaca agatagaagg agtgcaaaaa gtcaaagtgt
 5601 ccaaggtaat gttattcgat cacaatgtgc catcgcgctg aagtccaagg
 5651 gaatacagat cttcccagga gtctgtacag gaagtgagta cgacaacgtc
 5701 attgacgcat agccagtttg atctaagcgc cgatggcgag acactgcctg
 5751 tcccgtcaga cctggatgct gacgccccag ccctagaacc ggccctagac
 5801 gacggggcgg tacatacatt accaaccata atcggaacc ttgcggccgt
 5851 gtctgactgg gtaatgagca ccgtacctgt cgcgccgcct agaagaagga
 5901 gagggagaaa cctgactgtg acatgtgacg agagagaagg gaatataaca
 5951 cccatggcta gcgtccgatt ctttagagca gagctgtgtc cggccgtaca
 6001 agaaacagcg gagacgcgtg acacagctat ttcccttcag gcaccgcaa
 6051 gtaccaccat ggaactgagc catccaccga tctccttcgg agcaccaagc
 6101 gagacgttcc ccatcacatt tggggacttc gacgaaggag aaatcgaaag
 6151 cttgtcttct gagctactaa ctttcggaga cttcctaccc ggtgaagtgg
 6201 atgatctgac agatagcgac tgggtccacgt gccagacac ggacgacgag

ES 2 647 662 T3

6251 ttatgactag acagggcagg tgggtatata ttctcgtcgg aactgggtcc
 6301 aggccattta caacagaagt cggtagcca gtcagtgtg cggtaaaca
 6351 ccctggagga agtccacgag gagaagtgtt acccacctaa gctggatgaa
 6401 tttaaaggagc aactactact taagaaactc caggagagtg cgtccatggc
 6451 caatagaagc aggtatcagt cacgcaaagt ggaaaatatg aaagcaacaa
 6501 tcatccagag actaaagaga ggctgtaaac tgtattttaat ggcagagacc
 6551 ccgaaagtcc cgacttatcg gaccatatac ccggcgctg tgtactcgcc
 6601 tccgatcaat gtccgattgt ccaacccga gtccgcagtg gcagcatgta
 6651 atgagttctt agctagaaac tacccaactg tttcatcata ccaaatcacc
 6701 gacgagtatg atgcatatct agacatgggtg gacgggtcgg agagttgctt
 6751 ggaccgagcg acattcaatc cgtcaaaact taggagctac ccgaaacaac
 6801 atgcttatca cgcgccttct atcagaagcg ctgtaccttc cccattccag
 6851 aacacactac agaatgtact ggcagcagcc acgaaaagga actgcaacgt
 6901 cacacagatg aggggaattac ccactttgga ctcagcagta ttcaacgtgg
 6951 agtgttttta aaaattcgca tgtaaccgag aatactggga agaatttgca
 7001 gccagcccta tcaggataac aactgagaat ctaacaacct atgtcactaa
 7051 actaaagggg ccaaaagcag cagcgtgtt tgcaaaaacc cataatctgc
 7101 tgccactgca ggatgtacca atggataggt tcacagtaga tatgaaaagg
 7151 gatgtgaagg taactcctgg tacaaagcat acagaggaaa gacctaagggt
 7201 gcaggttata caggcggtg aacccttggc aacagcgtac ctatgtggaa
 7251 ttcacagaga actggttagg agattgaacg ccgtcctcct acccaatgtg
 7301 catacactat ttgacatgtc tgccgaggac ttcgatgcca ttatagccgc
 7351 acacttcaag ccaggagacg ctgttttaga aacggacata gcctcctttg
 7401 ataagagcca agatgattca cttgcgctta ccgccttaat gctgttagaa
 7451 gatttgggag tggatcactc cctgttggac ttgatagagg ctgctttcgg
 7501 agagatttcc agctgtcatc tgccgacagg tacgcgcttc aagttcggcg
 7551 ctatgatgaa atccggtatg ttcctaactc tgttcgtcaa cacgttgta
 7601 aatatcacca tcgctagccg ggtgttggaa gatcgtctga caaaatccgc
 7651 atgcgcggcc ttcacggcg acgacaacat aatacatggt gtcgtctccg
 7701 atgaattgat ggcagccaga tgcgctactt ggatgaacat ggaagtgaag
 7751 atcatagatg cagttgtatc ccagaaagct ccttactttt gtggagggtt
 7801 tatactgcat gatactgtga caggaacagc ttgcagagtg gcggacccgc

ES 2 647 662 T3

7851 taaaaaggtt atttaaattg ggcaaaccgt tagcggcagg tgacgaacaa
 7901 gatgaagaca gaagacgggc gctggctgat gaagtaatca gatggcaacg
 7951 aacagggcta atagatgagc tggagaaagc ggtgtactct aggtacgaag
 8001 tgcaggggtat atcagttgcg gtaatgtcca tggccacctt tgcaagctcc
 8051 agatccaact tcgagaagct cagaggaccc gtcataactt tgtacggcgg
 8101 tcctaaatag gtacgcacta cagctaccta ttttgcagaa gccgacagca
 8151 ggtacctaata taccaatcag ccataatgga gtttatccca acccaaactt
 8201 tctacaatag gaggtaccag cctcgacctt ggactccgcg ccctactatc
 8251 caagttatca gacccagacc gcgtccgcaa aggaaagccg ggcaacttgc
 8301 ccagctgatc tcagcagtta ataaactgac aatgcgcgcg gtacctcaac
 8351 agaagccgcg caagaatcgg aagaataaga agcaaaagca aaagcagcag
 8401 gcgccacgaa acaacatgaa tcaaaagaag cagcccccta aaaagaaacc
 8451 ggctcaaaaag aaaaagaagc cgggccgtag agagagaatg tgcataaaaa
 8501 tcgaaaatga ttgcatcttc gaagtcaagc atgaaggtaa ggtaacaggt
 8551 tacgcgtgct tggtagggga caaagtaatg aagccagcac acgtaaaggg
 8601 gaccatcgat aatgcggacc tggccaaatt ggcttcaag cggatcatcta
 8651 agtacgacct tgaatgcgcg cagatacccg tgcacatgaa gtccgacgct
 8701 tcgaagttca cccatgagaa accggagggg tactacaact ggcaccacgg
 8751 agcagtacag tactcaggag gccggttcac catccctaca ggtgcgggca
 8801 aaccagggga cagcggtaga ccgatcttcg acaacaaggg gcgcgtggtg
 8851 gccatagttt taggaggagc taatgaagga gcccgtagag ccctctcggg
 8901 ggtgacctgg aacaaagaca tcgtcacgaa aatcaccctt gagggggccg
 8951 aagagtggag tcttgccatt ccagttatgt gcctgctggc aaataaccag
 9001 ttcccttgct cccagccccc ttgcacaccc tgctgctacg aaaaagagcc
 9051 ggagaaaacc ctgcgcatgc tagaagacaa cgtcatgagc cccgggtact
 9101 atcagctgct acaagcatcc ttaacatggt ctccccgccg ccagcgacgc
 9151 agtattaagg acaacttcaa tgtctataaa gccataagac cgtacctagc
 9201 tcaactgtccc gactgtggag aagggcactc gtgccatagt cccgtagcgc
 9251 tagaacgcat cagaaacgaa gcgacagacg ggacgctgaa aatccaggtt
 9301 tccttgcaaa tcggaataaa gacggatgat agccatgatt ggaccaagct
 9351 gcgttacatg gacaatcata tgccagcaga cgcagagagg gccaggctat
 9401 ttgtaagaac gtcagcaccg tgcacgatta ctggaacaat gggacacttc

ES 2 647 662 T3

9451 atcctggccc gatgtccgaa aggagaaact ctgacgggtgg gattcactga
 9501 cggtaggaag atcagtcact catgtacgca cccatttcac caagaccctc
 9551 ctgtgatagg ccgggaaaaa ttctattccc gaccgcagca cggtagagaa
 9601 ctaccttgca gcacgtacgc gcagagcacc gctgcaactg ccgaggagat
 9651 agaggtacat atgccccag acaccccaga tcgcacattg atgtcacaac
 9701 agtccggtaa tgtaaagatc acagtcaata gtcagacggg gcgggtacaag
 9751 tgtaattgcy gtgactcaaa tgaaggacta accactacag acaaagtgat
 9801 taataactgc aaggttgatc aatgccatgc cgcggtcacc aatcacaaaa
 9851 aatggcagta taattccct ctggtccgc gtaatgctga actcggggac
 9901 cgaaaaggaa aagttcacat tccgtttcct ctggcaaagt tgacatgcag
 9951 ggtgcctaag gcaaggaacc ccaccgtgac gtacggaaaa aaccaagtca
 10001 tcatgtgct gtatcctgac caccacaacgc tcctgtccta ccggaatatg
 10051 ggagaagaac caaactatca agaagagtgg gtgacgcata agaaggagat
 10101 caggttaacc gtgccgactg aagggtcga ggtcacgtgg ggcaacaacg
 10151 agccgtacaa gtattggccg cagttatcca caaacggtac agcccacggc
 10201 caccgcgatg agataatttt gtattattat gagctgtacc ctactatgac
 10251 tgtggtagtt gtgtcagtgg cctcgttcgt actcctgtcg atgggtgggtg
 10301 tggcagtggg gatgtgcatg tgtgcacgac gcagatgcat tacaccgtac
 10351 gaactgacac caggagctac cgtccctttc ctgcttagcc taatatgctg
 10401 cattagaaca gctaaagcgg ccacatacca agaggctgcg gtataacctgt
 10451 ggaacgagca gcagcctttg ttttggtgc aagcccttat tccgtggca
 10501 gccctgattg tcctatgcaa ctgtctgaga ctcttaccat gcttttgtaa
 10551 aacgttgact tttttagccg taatgagcgt cgggtgccac actgtgagcg
 10601 cgtacgaaca cgtaacagtg atcccgaaca cgggtgggagt accgtataag
 10651 actctagtca acagaccggg ctacagcccc atggtactgg agatggagct
 10701 tctgtcagtc actttggagc caacgctatc gcttgattac atcacgtgcg
 10751 agtataaaac cgtcatcccg tctccgtacg tgaaatgctg cggtagagca
 10801 gagtgaagg acaagagcct acctgattac agctgtaagg tcttcaccgg
 10851 cgtctacca ttcatgtggg gcggcgcccta ctgcttctgc gacactgaaa
 10901 atacgcaatt gagcgaagca catgtggaga agtccgaatc atgcaaaaca
 10951 gaatttgcat cagcatatag ggctcatacc gcatccgcat cagctaagct
 11001 ccgcgtcctt taccaaggaa ataatgttac tgtatctgct tatgcaaacg

ES 2 647 662 T3

11051 gcgatcatgc cgtcacagtt aaggacgcta aattcattgt ggggccaatg
 11101 tcttcagcct ggacaccttt tgacaataaa atcgtggtgt acaaaggcga
 11151 cgtctacaac atggactacc cgcccttcgg cgcaggaaga ccaggacaat
 11201 ttggcgacat ccaaagtcgc acgcctgaga gcgaagacgt ctatgctaac
 11251 acacaactgg tactgcagag accgtccgcg ggtacggtgc acgtgccgta
 11301 ctctcaggca ccatctgggt tcaagtattg gctaaaagaa cgaggggctg
 11351 cgctgcagca cacagcacca tttggctgtc aaatagcaac aaacccggtg
 11401 agagcgatga actgcgccgt aggggaacatg cctatctcca tcgacatacc
 11451 ggacgcggcc ttcactaggg tcgtcgacgc gccatcttta acggacatgt
 11501 cgtgtgaggt accagcctgc acccactcct cagactttgg gggcgtagcc
 11551 atcattaaat atgcagccag caagaaaggc aagtgtgcgg tgcattcgat
 11601 gactaacgcc gtcactattc ggggaagctga aatagaagta gaaggggaact
 11651 ctcagttgca aatctctttt tcgacggccc tagccagcgc cgaattccgc
 11701 gtacaagtct gttctacaca agtacactgt gcagccgagt gccatccacc
 11751 gaaagaccat atagtcaatt acccggcgtc acacaccacc ctcggggtcc
 11801 aagacatttc cgttacggcg atgtcatggg tgcagaagat cacgggaggt
 11851 gtgggactgg ttgtcgctgt tgcagcactg atcctaatacg tgggtgctatg
 11901 cgtgtcgttt agcaggcact aacttgacaa ctaggtacga aggtatatgt
 11951 gtcccctaag agacacacca catatagcta agaatacaata gataagtata
 12001 gatcaaaggg ctgaacaacc cctgaatagt aacaaaatat aaaaatcaac
 12051 aaaaatcata aaatagaaaa ccagaaacag aagtaggtaa gaaggtatat
 12101 gtgtccccta agagacacac catatatagc taagaatcaa tagataagta
 12151 tagatcaaag ggctgaataa ccctgaata ataacaaaat ataaaaatca
 12201 ataaaaatca taaaatagaa aaccataaac agaagtagtt caaagggtgta
 12251 taaaaccct gaatagtaac aaacataaaa actaataaaa atcaaatgaa
 12301 taccataatt ggcaatcgga agagatgtag gtacttaagc ttcctaaaag
 12351 cagccgaact cgctttgaga tgtaggcgta gcacaccgaa ctcttccata
 12401 attctccgaa cccacaggga cgtaggagat gttcaaagtg gctataaaac
 12451 cctgaacagt aataaaacat aaaattaata aggatcaaat gagtaccata
 12501 attggcaaac ggaagagatg taggtactta agcttcctaa aagcagccga
 12551 actcactttg agatgtaggc atagcatacc gaactcttcc acaattctcc
 12601 gtacccatag ggacgtagga gatgttattt tgtttttaat atttcAAAAA

ES 2 647 662 T3

```
12651 AAAAAAAAAA AAAAAAGGGT ACGCGGCCGC CACTGTGCTG GATATCTGCA
12701 GAATTCCACC ACACTGGACT AGTGGATCAG CTTAAGTTTA AACCGCTGAT
12751 CAGCCTCGAC TGTGCCTTCT AGTTGCCAGC CATCTGTTGT TTGCCCCTCC
12801 CCCGTGCCTT CCTTGACCCT GGAAGGTGCC ACTCCCCTG TCCTTTCCTA
12851 ATAAAATGAG GAAATTGCAT CGCATTGTCT GAGTAGGTGT CATTCTATTC
12901 TGGGGGGTGG GGTGGGGCAG GAC
```

Figura 5. El promotor 26S duplicado está recuadrado

```

1  GGCGCGCCTG ACATTGATTA TTGACTAGTT ATTAATAGTA ATCAATTACG
51 GGGTCATTAG TTCATAGCCC ATATATGGAG TTCCGCGTTA CATAACTTAC
101 GGTAATGGC CCGCCTGGCT GACCGCCCAA CGACCCCGC CCATTGACGT
151 CAATAATGAC GTATGTTCCC ATAGTAACGC CAATAGGGAC TTTCCATTGA
201 CGTCAATGGG TGGAGTATTT ACGGTAAACT GCCCACTTGG CAGTACATCA
251 AGTGTATCAT ATGCCAAGTA CGCCCCCTAT TGACGTCAAT GACGGTAAAT
301 GGCCCGCCTG GCATTATGCC CAGTACATGA CCTTATGGGA CTTTCCTACT
351 TGGCAGTACA TCTACGTATT AGTCATCGCT ATTACCATGG TGATGCGGTT
401 TTGGCAGTAC ATCAATGGGC GTGGATAGCG GTTTGACTCA CGGGGATTTT
451 CAAGTCTCCA CCCCATTGAC GTCAATGGGA GTTTGTTTTG GCACCAAAAT
501 CAACGGGACT TTCCAAAATG TCGTAACAAC TCCGCCCAT TGACGCAAAT
551 GGGCGGTAGG CGTGTACGGT GGGAGGTCTA TATAAGCAGA GCTCTCTGGC
601 TAACTAGAGa tggctgcggtg agacacacgt agcctaccag tttcttactg
651 ctctactctg caaagcaaga gattaataac ccatcatgga ttctgtgtac
701 gtggacatag acgctgacag cgcctttttg aaggccctgc aacgtgcgta
751 ccccatgttt gaggtggaac ctaggcaggt cacatcgaat gaccatgcta
801 atgctagagc gttctcgcat ctagccataa aactaataga gcaggaaatt
851 gatcccgact caaccatcct ggatataggt agtgcgccag caaggaggat
901 gatgtcggac aggaagtacc actgcgtttg cccgatgcgc agcgcagaag
951 atcccgagag actcgcataa tatgcgagaa agctcgcata tgccgcagga
1001 aaagtcctgg acagaaacat ttctggaaag atcggggact tacaagcggg
1051 gatggccgtg ccagacacgg agacgccaac attttgctta cacacagatg
1101 tctcatgtag acagagagca gacgtcgcga tataccaaga cgtctatgct
1151 gtacacgcac ccacgtcgct ataccaccag gcgattaaag gagtccgagt
1201 ggcgtactgg gtagggttcg acacaacccc gttcatgtac aacgctatgg
1251 cgggtgccta cccctcatac tcgacaaatt gggcggatga gcaggtagtg
1301 aaggctaaga acataggatt atgttcaaca gacctgacgg aaggtagacg
1351 aggcaaattg tctatcatga gagggaaaaa gctaaaaccg tgcgaccgtg
1401 tgctgttctc agtaggggtca acgctttacc cggaagccg cacgctactt

```

1451 aagagctggc acctaccatc ggtgttccat ctaaagggca agcttagctt
 1501 cacatgccgc tgtgacacag tggtttcgtg tgagggctac gtcgttaaga
 1551 gaataacgat gagcccaggc ctttatggaa aaaccatagg gtatgcggtg
 1601 acccaccacg cagacggatt cttgatgtgc aagactaccg acacggttga
 1651 cggcgaaaga gtgtcattct cgggtgtgcac gtacgtgccg gcgaccattt
 1701 gtgatcaaata gaccggcatc cttgctacag aagtcacgcc ggaggatgca
 1751 cagaagctgt tgggtggggct gaaccagagg atagtgggta acggcagaac
 1801 gcaacggaac acgaacacca tgaagaacta cctacttccc gtggctcgccc
 1851 aggccctcag taagtgggca aaggagtgcc ggaaggacat ggaagatgag
 1901 aagcttctgg gggtcagaga aagaacacta acctgctgct gtctatgggc
 1951 atttaagaag cagaaaacac acacgggtcta caagaggcct gatacccagt
 2001 caatccagaa ggttcaggcc gaatttgaca gctttgtagt accgggcctg
 2051 tggctcgccg ggttgtcaat cccgttgagg actagaatca agtgggtgtt
 2101 acgcaaggtg ccgaaaacag acctgatccc atacagcggg aatgcccagg
 2151 aagcccagga tgcagaaaaa gaagcagagg aagaacgaga agcagaactg
 2201 actcatgagg ctctaccacc cctacaggca gcacaggaag atgtccagggt
 2251 cgaaatcgac gtggaacagc ttgaggatag agctgggtgct ggaataatag
 2301 agactccgag aggcgctatc aaagttactg cccaactaac agaccacgtc
 2351 gtgggggaggt acctggtact ttccccgcag accgtactac gcagccagaa
 2401 gctcagcctg atccacgctt tagcggagca agtgaagacg tgtacgcaca
 2451 gcggacgagc agggaggtat gcggtcgaag cgtacgatgg ccgagtccta
 2501 gtgccctcag gctatgcaat ttcgcctgaa gacttccaga gtctaagcga
 2551 aagcgcaacg atggtgtaca acgaaagaga gttcgtaaac agaaagttac
 2601 accacattgc gatgcacgga ccagccctga aactgacga agagtcgtat
 2651 gagctgggtg gggcagagag gacagaacac gactacgtct acgacgtgga
 2701 ccagagaaga tgctgtaaga aggaagaagc tgcaggactg gtactgggtg
 2751 gcgacttgac taatccgccc taccacgaat tcgcatacga agggctaaaa
 2801 attcgccccg cctgcccata caaaattgca gtcataaggag tcttcgggggt
 2851 accaggatct ggcaagtcag ccattatcaa gaacctagtt accaggcaag
 2901 acctggtgac tagcggaaag aaagaaaact gccaaagaaat cagcaccgac
 2951 gtgatgagac agagaggtct agagatatct gcacgtacgg tagattcgct
 3001 gctcttgaat ggatgcaaca gaccagtcga cgtgttgtac gtagacgagg

ES 2 647 662 T3

3051 cgtttgctg ccactctgga acgttacttg ctttgatcgc cttgggtgaga
 3101 ccaagacaga aagttgtact ttgtgggtgac ccgaagcagt gcggcttctt
 3151 caatatgatg cagatgaaag tcaactacaa tcataacatc tgcacccaag
 3201 tgtaccacaa aagtatctcc aggcgggtgta cactgcctgt gactgccatt
 3251 gtgtcatcgt tgcattacga aggcaaaatg cgcactacga atgagtacaa
 3301 catgccgatt gtagtggaca ctacaggctc aacgaaacct gaccctggag
 3351 acctcgtgtt aacgtgcttc agaggggtggg ttaaacaact gcaaattgac
 3401 tatcgtggac acgaggtcat gacagcagcc gcacccaag ggtaactag
 3451 aaaaggagtt tacgcagtta ggcaaaaagt taacgaaaac ccactctatg
 3501 catcaacatc agagcacgctc aacgtactcc taacgcgtac ggaaggtaaa
 3551 ctggtatgga agacactctc tggtgacccg tggataaaga cgctgcagaa
 3601 cccaccgaaa ggaaacttca aagcaactat taaggagtgg gaggtggagc
 3651 acgcatcgat aatggcgggc atctgcagtc accaagtgac ctttgacaca
 3701 ttccaaaaca aagccaacgt ttgctgggct aagagcttgg tccctatcct
 3751 cgaaacagcg gggataaaac taaatgatag gcagtggctc cagataattc
 3801 aagccttcaa agaagacaaa gcatactcac ccgaagtagc cctgaatgaa
 3851 atatgcacgc gcatgtatgg ggtggatcta gacagtgggc tattctctaa
 3901 accgttggta tctgtgtatt acgcggataa ccattgggat aataggccgg
 3951 gaggaaagat gttcggattc aaccctgagg cagcgtccat tctagaaaga
 4001 aagtacccat ttacaaaagg aaagtggaac atcaacaagc agatctgcgt
 4051 gactaccagg aggatagaag acttcaaccc taccaccaac attataccgg
 4101 tcaacaggag actaccacac tcattagtgg ccgaacaccg ccagtaaaa
 4151 ggggaaagaa tggaatggct ggtaacaag ataaacggac accacgtact
 4201 cctggttagc ggctataacc ttgcactgcc tactaagaga gtcacctggg
 4251 tagcgccact aggtgtccgc ggagcggact atacatacaa cctagagctg
 4301 ggtctaccag caacrccttg taggtatgac ctagtgggtca taaacatcca
 4351 cacacctttt cgcatacacc attaccaaca gtgcgtagat cacgcaatga
 4401 aactgcaa at gctaggggggt gactcactga gactgctcaa accgggtggc
 4451 tctctattga tcagagcata cggttacgca gatagaacca gtgaacgagt
 4501 catctgcgta ctgggacgca agtttagatc gtctagagca ttgaaaccac
 4551 catgtgtcac cagtaatact gagatgtttt tcctattttag caatttttgac
 4601 aatggcagaa ggaattttac aacgcagtgc atgaacaatc aactgaatgc

ES 2 647 662 T3

4651 agccttttgta ggacaggcca cccgagcagg atgtgcacca tcgtaccggg
 4701 taaaacgcat ggacatcgcg aagaacgatg aagagtgcgt ggttaacgcc
 4751 gccaacccctc gcgggttacc aggtgacggg gtttgcaagg cagtatataa
 4801 aaagtggccg gagtccttta aaaacagtgc aacaccagta ggaaccgcaa
 4851 aaacagttat gtgcggtacg tatccagtaa tccacgccgt aggaccaaac
 4901 ttctcaaatt attcggagtc tgaaggggac cgggaattgg cggctgccta
 4951 tcgagaagtc gcaaaggaag taactagact gggagtaaata agcgtagcta
 5001 tacctctcct ctccacaggt gtatactcag gagggaaaga caggctaacc
 5051 cagtcactga accacctctt tacagccatg gactcgacgg atgcagacgt
 5101 ggtcatctac tgccgagaca aggaatggga gaagaaaata tctgaggcca
 5151 tacagatgcg gacccaagtg gagctgctgg atgagcacat ctccatagac
 5201 tgcgatgtca ttgcggtgca ccctgacagt agcttggcag gcagaaaagg
 5251 atacagcacc acggaaggcg cactgtattc atatctagaa gggacacgtt
 5301 ttcaccagac ggcagtggat atggcagaga tatacactat gtggccaaag
 5351 caaacagagg ccaatgagca agtctgccta tatgccctgg gggaaagtat
 5401 tgaatcaatc aggcagaaat gcccggtgga tgatgcagac gcatcatctc
 5451 ccccgaaaac tgtcccggtg ctttgccggg atgccatgac tctgaacgc
 5501 gtcaccgcgac ttgcgatgaa ccatgtcaca aatataattg tgtgttcttc
 5551 atttcccctt ccaaagtaca agatagaagg agtgcaaaaa gtcaaagtct
 5601 ccaaggtaat gttattcgat cacaatgtgc catcgcgcggt aagtccaagg
 5651 gaatacagat cttcccagga gtctgtacag gaagtgagta cgacaacgtc
 5701 attgacgcat agccagtttg atctaagcgc cgatggcgag aactgcctg
 5751 tcccgtcaga cctggatgct gacgccccag ccctagaacc ggccctagac
 5801 gacggggcgg tacatacatt accaaccata atcggaaacc ttgcggccgt
 5851 gtctgactgg gtaatgagca ccgtacctgt cgcgccgcct agaagaagga
 5901 gagggagaaa cctgactgtg acatgtgacg agagagaagg gaatataaca
 5951 cccatggcta gcgtccgatt ctttagagca gagctgtgtc cggccgtaca
 6001 agaaacagcg gagacgcgtg acacagctat ttcccttcag gcaccgcaa
 6051 gtaccaccat ggaactgagc catccaccga tctccttcgg agcaccaagc
 6101 gagacgttcc ccatcacatt tggggacttc gacgaaggag aaatcgaaag
 6151 cttgtcttct gagctactaa ctttcggaga cttcctaccc ggtgaagtgg
 6201 atgatctgac agatagcgac tgggtccacgt gccagacac ggacgacgag

ES 2 647 662 T3

6251 ttatgactag acagggcagg tgggtatata ttctcgtcgg acactgggtcc
 6301 aggccattta caacagaagt cggtacgcca gtcagtgctg ccggtaaaca
 6351 ccctggagga agtccacgag gagaagtgtt acccacctaa gctggatgaa
 6401 ttaaaggagc aactactact taagaaactc caggagagtg cgtccatggc
 6451 caatagaagc aggtatcagt cacgcaaagt ggaaaatatg aaagcaacaa
 6501 tcatccagag actaaagaga ggctgtaaac tgtattttaat ggcagagacc
 6551 ccgaaagtcc cgacttatcg gaccatatac ccggcgcttg tgtactcgcc
 6601 tccgatcaat gtccgattgt ccaaccccgga gtccgcagtg gcagcatgta
 6651 atgagttctt agctagaaac tacccaactg tttcatcata ccaaatacacc
 6701 gacgagtatg atgcatatct agacatgggtg gacgggtcgg agagttgctt
 6751 ggaccgagcg acattcaatc cgtcaaaact taggagctac ccgaaacaac
 6801 atgcttatca cgcgccttct atcagaagcg ctgtaccttc cccattccag
 6851 aacacactac agaatgtact ggcagcagcc acgaaaagga actgcaacgt
 6901 cacacagatg agggaattac ccacttttga ctcagcagta ttcaacgtgg
 6951 agtgttttta aaaattcgca tgtaaccgag aatactggga agaatttgca
 7001 gccagcccta tcaggataac aactgagaat ctaacaacct atgtcactaa
 7051 actaaagggg ccaaaagcag cagcgctgtt tgcaaaaacc cataatctgc
 7101 tgccactgca ggatgtacca atggataggt tcacagtaga tatgaaaagg
 7151 gatgtgaagg taactcctgg taaaagcat acagaggaaa gacctaaagt
 7201 gcaggttata caggcggtg aacccttggc aacagcgtac ctatgtggaa
 7251 ttcacagaga actggttagg agattgaacg ccgtcctcct acccaatgtg
 7301 catacactat ttgacatgtc tgccgaggac ttcgatgcca ttatagccgc
 7351 acacttcaag ccaggagacg ctgtttttaga aacggacata gctcctttg
 7401 ataagagcca agatgattca cttgcgctta ccgccttaat gctgttagaa
 7451 gatttgaggag tggatcactc cctggttgac ttgatagagg ctgctttcgg
 7501 agagatttcc agctgtcatc tgccgacagg tacgcgcttc aagttcggcg
 7551 ctatgatgaa atccggtatg ttcctaactc tgttcgtcaa cacgttggtta
 7601 aatatcacca tcgctagccg ggtgttgga gatcgtctga caaaatccgc
 7651 atgcgcggcc ttcacggcg acgacaacat aatacatggt gtcgtctccg
 7701 atgaattgat ggcagccaga tgcgctactt ggatgaacat ggaagtgaag
 7751 atcatagatg cagttgtatc ccagaaagct ccttactttt gtggagggtt
 7801 tatactgcat gatactgtga caggaacagc ttgcagagtg gcggaccgcg

ES 2 647 662 T3

7851 taaaaaggtt atttaaattg ggcaaaccgt tagcggcagg tgacgaacaa
 7901 gatgaagaca gaagacgggc gctggctgat gaagtaatca gatggcaacg
 7951 aacagggcta atagatgagc tggagaaagc ggtgtactct aggtacgaag
 8001 tgcagggtat atcagttgcg gtaatgtcca tggccacctt tgcaagctcc
 8051 agatccaact tcgagaagct cagaggaccc gtcataactt tgtacggcgg
 8101 tcctaaatag gtacgcacta cagctaccta ttttgcagaa gccgacagca
 8151 ggtacctaata taccaatcag ccataatgga gtttatccca acccaaactt
 8201 tctacaatag gaggtaccag cctcgacctt ggactccgcg ccctactatc
 8251 caagttatca gaccagacc gcgtccgcaa aggaaagccg ggcaacttgc
 8301 ccagctgatc tcagcagtta ataaactgac aatgcgcgcg gtacctcaac
 8351 agaagccgcg caagaatcgg aagaataaga agcaaaagca aaagcagcag
 8401 gcgccacgaa acaacatgaa tcaaaagaag cagcccccta aaaagaaacc
 8451 ggctcaaaaag aaaaagaagc cgggccgtag agagagaatg tgcatgaaaa
 8501 tcgaaaatga ttgcatcttc gaagtcaagc atgaaggtaa ggtaacaggt
 8551 tacgcgtgct tggtagggga caaagtaatg aagccagcac acgtaaaggg
 8601 gaccatcgat aatgcggacc tggccaaatt ggccttcaag cggtcacta
 8651 agtacgacct tgaatgcgcg cagatacccg tgcacatgaa gtccgacgct
 8701 tcgaagttca cccatgagaa accggagggg tactacaact ggcaccacgg
 8751 agcagtacag tactcaggag gccggttcac catccctaca ggtgcgggca
 8801 aaccagggga cagcggtaga ccgatcttcg acaacaaggg gcgcgtggtg
 8851 gccatagttt taggaggagc taatgaagga gcccgtagag ccctctcggt
 8901 ggtgacctgg aacaaagaca tcgtcacgaa aatcacccct gagggggccc
 8951 aagagtggag tcttgccTAG aggaccgctc ataactttgt acggcgggtcc
 9001 taaataggta cgcactacag ctacctatttt tgcagaagcc gacagcaggt
 9051 acctaaatac caatcagcca taATGattcc agttatgtgc ctgctggcaa
 9101 ataccacggt ccctgctcc cagccccctt gcacaccctg ctgctacgaa
 9151 aaagagccgg agaaaaccct gcgcatgcta gaagacaacg tcatgagccc
 9201 cgggtactat cagctgctac aagcatcctt aacatgttct ccccgccgcc
 9251 agcgacgcag tattaaggac aacttcaatg tctataaagc cataagaccg
 9301 tactagctc actgtcccga ctgtggagaa gggcactcgt gccatagctc
 9351 cgtagcgcta gaacgcacga gaaacgaagc gacagacggg acgctgaaaa

ES 2 647 662 T3

9401 tccagggtttc cttgcaaadc ggaataaaga cggatgatag coactgattgg
 9451 accaagctgc gttacatgga caatcatatg ccagcagacg cagagagggc
 9501 caggctatatt gtaagaacgt cagcaccgtg cactgattact ggaacaatgg
 9551 gacacttcat cctggcccga tgtccgaaag gagaaactct gacgggtggga
 9601 ttactgacg gtaggaagat cagtcactca tgtacgcacc catttcacca
 9651 cgacctcct gtgataggcc gggaaaaatt tcattcccga ccgcagcacg
 9701 gtagagaact accttgacgc acgtacgcgc agagcaccgc tgcaactgcc
 9751 gaggagatag aggtacatat gccccagac accccagatc gcacattgat
 9801 gtcacaacag tccggtaatg taaagatcac agtcaatagt cagacgggtg
 9851 ggtacaagtg taattgcggt gactcaaactg aaggactaac cactacagac
 9901 aaagtgatta ataactgcaa ggttgatcaa tgccatgccg cggtcaccaa
 9951 tcacaaaaaa tggcagtata attcccctct ggtccgcgct aatgctgaac
 10001 tcgggggaccg aaaaggaaaa gttcacattc cgtttcctct ggcaaatgtg
 10051 acatgcaggg tgccaaaggc aaggaaacccc accgtgacgt acggaaaaaa
 10101 ccaagtcac atgctgctgt atcctgacca cccaacgctc ctgtcctacc
 10151 ggaatatggg agaagaacca aactatcaag aagagtgggt gacgcataag
 10201 aaggagatca ggttaaccgt gccgactgaa gggctcgagg tcacgtgggg
 10251 caacaacgag ccgtacaagt attggccgca gttatccaca aacggtacag
 10301 cccacggcca cccgcatgag ataattttgt attattatga gctgtaccct
 10351 actatgactg tggtagttgt gtcagtggcc tcgttcgtac tcctgtcgat
 10401 ggtgggtgtg gcagtgggga tgtgcatgtg tgcacgacgc agatgcatta
 10451 caccgtacga actgacacca ggagctaccg tccctttcct gcttagccta
 10501 atatgctgca ttagaacagc taaagcggcc acataccaag aggctgcggt
 10551 atacctgtgg aacgagcagc agcctttgtt ttggctgcaa gcccttattc
 10601 cgctggcagc cctgattgtc ctatgcaact gtctgagact cttaccatgc
 10651 ttttgtaaaa cgttgacttt tttagccgta atgagcgtcg gtgcccacac
 10701 tgtgagcgcg tacgaacacg taacagtgat cccgaacacg gtgggagtag
 10751 cgtataagac tctagtcaac agaccgggct acagcccatc ggtactggag
 10801 atggagcttc tgtcagtcac tttggagcca acgctatcgc ttgattacat
 10851 cagctgcgag tataaaacgc tcatcccgtc tccgtacgtg aaatgctgcg
 10901 gtacagcaga gtgcaaggac aagagcctac ctgattacag ctgtaaggtc
 10951 ttcaccggcg tctaccatt catgtggggc ggcgcctact gcttctgcga

ES 2 647 662 T3

```

11001 cactgaaaat acgcaattga gcgaagcaca tgtggagaag tccgaatcat
11051 gcaaaacaga atttgcata gcatataggg ctcataccgc atccgcatca
11101 gctaagctcc gcgtccttta ccaaggaaat aatgttactg tatctgctta
11151 tgcaaacggc gatcatgccg tcacagttaa ggacgctaaa ttcattgtgg
11201 ggccaatgtc ttcagcctgg acaccttttg acaataaaat cgtgggtgtac
11251 aaaggcgacg tctacaacat ggactaccgc cccttcggcg caggaagacc
11301 aggacaatth ggcgacatcc aaagtgcac gcctgagagc gaagacgtct
11351 atgctaacac acaactggta ctgcagagac cgtccgcggg tacgggtgcac
11401 gtgccgtact ctcaggcacc atctggcttc aagtattggc taaaagaacg
11451 aggggcgctg ctgcagcaca cagcaccatt tggctgtcaa atagcaacaa
11501 acccggttag agcgatgaac tgcgccgtag ggaacatgcc tatctccatc
11551 gacataccgg acgcggcctt cactaggggtc gtcgacgcgc catctttaac
11601 ggacatgtcg tgtgaggtag cagcctgcac ccactcctca gactttgggg
11651 gcgtagccat cattaaatat gcagccagca agaaaggcaa gtgtgcggtg
11701 cattcgatga ctaacgccgt cactattcgg gaagctgaaa tagaagtaga
11751 agggaaactct cagttgcaaa tctctttttc gacggcccta gccagcgccg
11801 aattccgcgt acaagtctgt tctacacaag tacactgtgc agccgagtgc
11851 catccaccga aagaccatat agtcaattac ccggcgtcac acaccaccct
11901 cgggggtcaa gacatttcgg ttacggcgat gtcatgggtg cagaagatca
11951 cgggaggtgt gggactggtt gtcgctgttg cagcactgat cctaactcgtg
12001 gtgctatgcg tgtcgtttag caggcactaa cttgacaact aggtacgaag
12051 gtatatgtgt cccctaagag acacaccaca tatagctaag aatcaataga
12101 taagtataga tcaaagggtc gaacaacccc tgaatagtaa caaaatataa
12151 aatcaacaa aatcataaa atagaaaacc agaaacagaa gtaggtaaga
12201 aggtatatgt gtcccctaag agacacacca tatatagcta agaataata
12251 gataagtata gatcaaagg ctgaataacc cctgaataat aacaaaatat
12301 aaaaatcaat aaaaatcata aaatagaaaa ccataaacag aagtagttca
12351 aagggtata aaacccctga atagtaacaa aacataaaac taataaaaat
12401 caaatgaata ccataattgg caatcggaag agatgtaggt acttaagctt
12451 cctaaaagca gccgaactcg ctttgagatg taggcgtagc acaccgaact
12501 cttccataat tctccgaacc cacagggacg taggagatgt tcaaagtggc
12551 tataaaaccc tgaacagtaa taaaacataa aattaataag gatcaaatga

```

ES 2 647 662 T3

12601 gtaccataat tggcaaacgg aagagatgta ggtacttaag cttcctaaaa
12651 gcagccgaac tcactttgag atgtaggcat agcataccga actcttccac
12701 aattctccgt acccataggg acgtaggaga tgttattttg tttttaatat
12751 ttcAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAGGGTAC GCGGCCGCCA CTGTGCTGGA
12801 TATCTGCAGA ATTCCACCAC ACTGGACTAG TGGATCAGCT TAAGTTTAAA
12851 CCGCTGATCA GCCTCGACTG TGCCTTCTAG TTGCCAGCCA TCTGTTGTTT
12901 GCCCCTCCCC CGTGCCTTCC TTGACCCTGG AAGGTGCCAC TCCCCTGTC
12951 CTTTCCTAAT AAAATGAGGA AATTGCATCG CATTGTCTGA GTAGGTGTCA
13001 TTCTATTCTG GGGGGTGGGG TGGGGCAGGA C

Figura 6. La secuencia relacionada con el elemento de transporte de ARN (ETA) de grupo D está recuadrada.

```

1  GGCGCGCCTG ACATTGATTA TTGACTAGTT ATTAATAGTA ATCAATTACG
51 GGGTCATTAG TTCATAGCCC ATATATGGAG TTCCGCGTTA CATAACTTAC
101 GGTAATGGC CCGCCTGGCT GACCGCCCAA CGACCCCCGC CCATTGACGT
151 CAATAATGAC GTATGTTCCC ATAGTAACGC CAATAGGGAC TTTCCATTGA
201 CGTCAATGGG TGGAGTATTT ACGGTAAACT GCCCACTTGG CAGTACATCA
251 AGTGTATCAT ATGCCAAGTA CGCCCCCTAT TGACGTCAAT GACGGTAAAT
301 GGCCCGCCTG GCATTATGCC CAGTACATGA CCTTATGGGA CTTTCCTACT
351 TGGCAGTACA TCTACGTATT AGTCATCGCT ATTACCATGG TGATGCGGTT
401 TTGGCAGTAC ATCAATGGGC GTGGATAGCG GTTTGACTCA CGGGGATTTT
451 CAAGTCTCCA CCCCATTGAC GTCAATGGGA GTTTGTTTTG GCACCAAAAT
501 CAACGGGACT TTCCAAAATG TCGTAACAAC TCCGCCCCAT TGACGCAAAT
551 GGGCGGTAGG CGTGTACGGT GGGAGGTCTA TATAAGCAGA GCTCTCTGGC
601 TAACTAGAGa tggtgcgtg agacacacgt agcctaccag tttcttactg
651 ctctactctg caaagcaaga gattaataac ccatcatgga ttctgtgtac
701 gtggacatag acgctgacag cgcctttttg aaggccctgc aacgtgcgta
751 cccatgttt gaggtggaac ctaggcaggt cacatcgaat gaccatgcta
801 atgctagagc gttctcgcat ctagccataa aactaataga gcaggaaatt
851 gatcccgact caaccatcct ggatataggt agtgcgccag caaggaggat
901 gatgtcggac aggaagtacc actgcgtttg ccgatgcgc agcgcagaag
951 atcccgagag actcgcta tatgcgagaa agctcgcatc tgccgcagga
1001 aaagtcctgg acagaaacat ttctggaaag atcggggact tacaagcggt
1051 gatggccgtg ccagacacgg agacgccaac attttgctta cacacagatg
1101 tctcatgtag acagagagca gacgtcgca tataccaaga cgtctatgct
1151 gtacacgcac ccacgtcgct ataccaccag gcgattaaag gagtccgagt
1201 ggcgtactgg gtagggttcg acacaacccc gttcatgtac aacgctatgg
1251 cgggtgccta cccctcatac tgcacaaatt gggcggatga gcaggtagtg
1301 aaggctaaga acataggatt atgttcaaca gacctgacgg aaggtagacg
1351 aggcaaattg tctatcatga gagggaaaaa gctaaaaccg tgcgaccgtg
1401 tgctgttctc agtaggggtca acgctttacc cggaagccg cacgctactt

```

ES 2 647 662 T3

1451 aagagctggc acctaccatc ggtgttccat ctaaagggca agcttagctt
 1501 cacatgccgc tgtgacacag tggtttcgtg tgagggctac gtcgttaaga
 1551 gaataacgat gagcccaggc ctttatggaa aaaccatagg gtatgcggta
 1601 acccaccacg cagacggatt cttgatgtgc aagactaccg acacggttga
 1651 cggcgaaaga gtgtcattct cgggtgtgcac gtacgtgccg gcgaccattt
 1701 gtgatcaaata gaccggcatc cttgctacag aagtcacgcc ggaggatgca
 1751 cagaagctgt tgggtggggct gaaccagagg atagtggtta acggcagaac
 1801 gcaacggaac acgaacacca tgaagaacta cctacttccc gtggctcgccc
 1851 aggccttcag taagtgggca aaggagtgcc ggaaggacat ggaagatgag
 1901 aagcttctgg gggtcagaga aagaacacta acctgctgct gtctatgggc
 1951 atttaagaag cagaaaacac acacgggtcta caagaggcct gatacccagt
 2001 caatccagaa ggttcaggcc gaatttgaca gctttgtagt accgggcctg
 2051 tggtcgtccg ggttgtcaat cccgttgagg actagaatca agtgggtgtt
 2101 acgcaaggtg ccgaaaacag acctgatccc atacagcggg aatgcccaag
 2151 aagcccagga tgcagaaaaa gaagcagagg aagaacgaga agcagaactg
 2201 actcatgagg ctctaccacc cctacaggca gcacaggaag atgtccagg
 2251 cgaaatcgac gtggaacagc ttgaggatag agctgggtgct ggaataatag
 2301 agactccgag aggcgctatc aaagttactg cccaactaac agaccacgtc
 2351 gtgggggagt acctggtact ttccccgcag accgtactac gcagccagaa
 2401 gctcagcctg atccacgctt tagcggagca agtgaagacg tgtacgcaca
 2451 gcggacgagc agggaggtat gcggtcgaag cgtacgatgg ccgagtccta
 2501 gtgccctcag gctatgcaat ttgcgctgaa gacttccaga gtctaagcga
 2551 aagcgcaacg atgggtgtaca acgaaagaga gttcgtaaac agaaagttac
 2601 accacattgc gatgcacgga ccagccctga aactgacga agagtcgtat
 2651 gagctgggtga gggcagagag gacagaacac gagtacgtct acgacgtgga
 2701 ccagagaaga tgctgtaaga aggaagaagc tgcaggactg gtactggtgg
 2751 gcgacttgac taatccgccc taccacgaat tcgcatacga agggctaaaa
 2801 attcgccccg cctgcccata caaaattgca gtcataaggag tcttcgggg
 2851 accaggatct ggcaagtcag ccattatcaa gaacctagtt accaggcaag
 2901 acctggtgac tagcggaaag aaagaaaact gccaaagaaat cagcaccgac
 2951 gtgatgagac agagaggtct agagatatct gcacgtacgg tagattcgct
 3001 gctcttgaat ggatgcaaca gaccagtcga cgtgttgtac gtagacgagg

ES 2 647 662 T3

3051 cgtttgcggtg ccactctgga acgttacttg ctttgatcgc cttgggtgaga
 3101 ccaagacaga aagttgtact ttgtgggtgac ccgaagcagt gcggtcttctt
 3151 caatatgatg cagatgaaag tcaactacaa tcataacatc tgcacccaag
 3201 tgtaccacaa aagtatctcc aggcgggtgta cactgcctgt gactgccatt
 3251 gtgtcatcgt tgcattacga aggcaaaatg cgcactacga atgagtacaa
 3301 catgccgatt gtagtggaca ctacaggctc aacgaaacct gaccctggag
 3351 acctcgtgtt aacgtgcttc agaggggtggg ttaaacaact gcaaattgac
 3401 tatcgtggac acgaggtcat gacagcagcc gcacccaag ggtaaactag
 3451 aaaaggagtt tacgcagtta ggcaaaaagt taacgaaaac ccactctatg
 3501 catcaacatc agagcacgtc aacgtactcc taacgcgtac ggaaggtaaa
 3551 ctgggtatgga agacactctc tggtgaccgc tggataaaga cgctgcagaa
 3601 cccaccgaaa ggaaacttca aagcaactat taaggagtgg gaggtggagc
 3651 acgcacgat aatggcgggc atctgcagtc accaagtgac ctttgacaca
 3701 ttccaaaaca aagccaacgt ttgctgggct aagagcttgg tcctatcct
 3751 cgaaacagcg gggataaaac taaatgatag gcagtgggtcc cagataattc
 3801 aagccttcaa agaagacaaa gcatactcac ccgaagtagc cctgaatgaa
 3851 atatgcacgc gcattgtatgg ggtggatcta gacagtgggc tattctctaa
 3901 accgttggtg tctgtgtatt acgcggataa ccattgggat aataggccgg
 3951 gaggaaagat gttcggattc aaccctgagg cagcgtccat tctagaaaga
 4001 aagtacccat ttacaaaagg aaagtggaac atcaacaagc agatctgcgt
 4051 gactaccagg aggatagaag acttcaaccc taccaccaac attataccgg
 4101 tcaacaggag actaccacac tcattagtgg ccgaacaccg ccagtaaaa
 4151 ggggaaagaa tggaatggct ggtaacaag ataaacggac accacgtact
 4201 cctgggttagc ggctataacc ttgcactgcc tactaagaga gtcacctggg
 4251 tagcgccact aggtgtccgc ggagcggact atacatacaa cctagagctg
 4301 ggtctaccag caacrccttg taggtatgac ctagtgggtca taaacatcca
 4351 cacacctttt cgcatacacc attaccaaca gtgcgtagat cacgcaatga
 4401 aactgcaaata gctaggggggt gactcactga gactgctcaa accgggtggc
 4451 tctctattga tcagagcata cggttacgca gatagaacca gtgaacgagt
 4501 catctgcgta ctgggacgca agtttagatc gtctagagca ttgaaaccac
 4551 catgtgtcac cagtaatact gagatgtttt tcctatttag caattttgac
 4601 aatggcgagaa ggaattttac aacgcatgtc atgaacaatc aactgaatgc

ES 2 647 662 T3

4651 agccttttgta ggacaggcca cccgagcagg atgtgcacca tcgtaccggg
 4701 taaaacgcat ggacatcgcg aagaacgatg aagagtgcgt ggtaaacgcc
 4751 gccaacccctc gcgggttacc aggtgacggg gtttgcaagg cagtatatataa
 4801 aaagtggccg gagtccttta aaaacagtgc aacaccagta ggaaccgcaa
 4851 aaacagttat gtgcggtacg tatccagtaa tccacgccgt aggaccaaac
 4901 ttctcaaatt attcggagtc tgaaggggac cgggaattgg cggctgccta
 4951 tcgagaagtc gcaaaggaag taactagact gggagtaaata agcgtagcta
 5001 tacctctcct ctccacaggt gtatactcag gagggaaaga caggctaacc
 5051 cagtcaactga accacctctt tacagccatg gactcgacgg atgcagacgt
 5101 ggtcatctac tgccgagaca aggaatggga gaagaaaata tctgaggcca
 5151 tacagatgcg gacccaagtg gagctgctgg atgagcacat ctccatagac
 5201 tgcgatgtca ttgcggtgca ccctgacagt agcttggcag gcagaaaagg
 5251 atacagcacc acggaaggcg cactgtattc atatctagaa gggacacgtt
 5301 ttcaccagac ggcagtggat atggcagaga tatacactat gtggccaaag
 5351 caaacagagg ccaatgagca agtctgccta tatgccctgg gggaaagtat
 5401 tgaatcaatc aggcagaaat gcccggtgga tgatgcagac gcatcatctc
 5451 ccccgaaaac tgtcccggtg ctttgccggg atgccatgac tctgaacgc
 5501 gtcacccgac ttgcgatgaa ccatgtcaca aatataattg tgtgttcttc
 5551 atttcccctt ccaaagtaca agatagaagg agtgcaaaaa gtcaaagtct
 5601 ccaaggtaat gttattcgat cacaatgtgc catcgcgctg aagtccaagg
 5651 gaatacagat cttcccagga gtctgtacag gaagtgagta cgacaacgtc
 5701 attgacgcat agccagtttg atctaagcgc cgatggcgag aactgcctg
 5751 tcccgtcaga cctggatgct gacgccccag ccctagaacc ggccctagac
 5801 gacggggcgg tacatacatt accaaccata atcggaacc ttgcggccgt
 5851 gtctgactgg gtaatgagca ccgtacctgt cgcgccgcct agaagaagga
 5901 gagggagaaa cctgactgtg acatgtgacg agagagaagg gaatataaca
 5951 cccatggcta gcgtccgatt ctttagagca gagctgtgtc cggccgtaca
 6001 agaaacagcg gagacgcgtg acacagctat ttcccttcag gcaccgcaa
 6051 gtaccaccat ggaactgagc catccaccga tctccttcgg agcaccaagc
 6101 gagacgttcc ccatcacatt tggggacttc gacgaaggag aaatcgaaag
 6151 cttgtcttct gagctactaa ctttcggaga cttcctaccc ggtgaagtgg
 6201 atgatctgac agatagcgac tgggtccacgt gccagacac ggacgacgag

ES 2 647 662 T3

6251 ttatgactag acagggcagg tgggtatata ttctcgtcgg acactgggtcc
 6301 aggccattta caacagaagt cggtagcca gtcagtgtg ccggtaaaca
 6351 ccctggagga agtccacgag gagaagtgtt acccacctaa gctggatgaa
 6401 ttaaaggagc aactactact taagaaactc caggagagtg cgtccatggc
 6451 caatagaagc aggtatcagt cacgcaaagt ggaaaatatg aaagcaacaa
 6501 tcatccagag actaaagaga ggctgtaaac tgtattttaat ggcagagacc
 6551 ccgaaagtcc cgacttatcg gaccatatac ccggcgctg tgtactcgcc
 6601 tccgatcaat gtccgattgt ccaacccga gtccgcagtg gcagcatgta
 6651 atgagttctt agctagaaac tacccaactg tttcatcata ccaaatacacc
 6701 gacgagtatg atgcatatct agacatgggtg gacgggtcgg agagttgctt
 6751 ggaccgagcg acattcaatc cgtcaaaact taggagctac ccgaaacaac
 6801 atgcttatca cgcgccttct atcagaagcg ctgtaccttc ccattccag
 6851 aacacactac agaatgtact ggcagcagcc acgaaaagga actgcaacgt
 6901 cacacagatg agggaattac ccactttgga ctcagcagta ttcaacgtgg
 6951 agtgttttta aaaattcgca tgtaaccgag aatactggga agaatttgca
 7001 gccagcccta tcaggataac aactgagaat ctaacaacct atgtcactaa
 7051 actaaagggg ccaaaagcag cagcgctgtt tgcaaaaacc cataatctgc
 7101 tgccactgca ggatgtacca atggataggt tcacagtaga tatgaaaagg
 7151 gatgtgaagg taactcctgg tacaagcat acagaggaaa gacctaaggt
 7201 gcaggttata caggcggtg aacccttggc aacagcgtag ctatgtggaa
 7251 ttcacagaga actggttagg agattgaacg ccgtcctcct acccaatgtg
 7301 catacactat ttgacatgtc tgccgaggac ttcatgcca ttatagccgc
 7351 acacttcaag ccaggagacg ctgtttttaga aacggacata gcctcctttg
 7401 ataagagcca agatgattca cttgcgctta ccgccttaat gctgttagaa
 7451 gatttgggag tggatcactc cctgttggac ttgatagagg ctgctttcgg
 7501 agagatttcc agctgtcatc tgccgacagg tacgcgcttc aagttcggcg
 7551 ctatgatgaa atccggtatg ttcctaactc tgttcgtcaa cacgttggtta
 7601 aatatcacca tcgctagccg ggtgttgga gatcgtctga caaaatccgc
 7651 atgcgcggcc ttcacggcg acgacaacat aatacatggt gtcgtctccg
 7701 atgaattgat ggcagccaga tgcgctactt ggatgaacat ggaagtgaag
 7751 atcatagatg cagttgtatc ccagaaagct ccttactttt gtggaggggt
 7801 tatactgcat gatactgtga caggaacagc ttgcagagtg gcggaccgcg

ES 2 647 662 T3

7851 taaaaaggtt atttaaattg ggcaaaccgt tagcggcagg tgacgaacaa
 7901 gatgaagaca gaagacgggc gctggctgat gaagtaatca gatggcaacg
 7951 aacagggcta atagatgagc tggagaaagc ggtgtactct aggtacgaag
 8001 tgcaggggat atcagttgcg gtaatgtcca tggccacctt tgcaagctcc
 8051 agatccaact tcgagaagct cagaggaccc gtcataactt tgtacggcgg
 8101 tcctaaatag gtacgcacta cagctaccta ttttgcagaa gccgacagca
 8151 ggtacctaata taccaatcag ccataatgga gtttatccca acccaaactt
 8201 tctacaatag gaggtaccag cctcgacctt ggactccgcg ccctactatc
 8251 caagttatca gaccagacc gcgtccgcaa aggaaagccg ggcaacttgc
 8301 ccagctgatc tcagcagtta ataaactgac aatgcgcgcg gtacctcaac
 8351 agaagccgcg caagaatcgg agaataaga agcaaaagca aaagcagcag
 8401 gcgccacgaa acaacatgaa tcaaaagaag cagcccccta aaaagaaacc
 8451 ggctcaaaaag aaaaagaagc cgggccgtag agagagaatg tgcataaaaa
 8501 tcgaaaatga ttgcatcttc gaagtcaagc atgaaggtaa ggtaacaggt
 8551 tacgcgtgct tggtagggga caaagtaatg aagccagcac acgtaaaggg
 8601 gaccatcgat aatgcggacc tggccaaatt ggccctcaag cggatcatcta
 8651 agtacgacct tgaatgcgcg cagatacccg tgcacatgaa gtccgacgct
 8701 tcgaagttca cccatgagaa accggagggg tactacaact ggcaccacgg
 8751 agcagtacag tactcaggag gccgggtcac catccctaca ggtgcgggca
 8801 aaccagggga cagcggtaga ccgatcttcg acaacaaggg gcgcgtggtg
 8851 gccatagttt taggaggagc taatgaagga gcccgtagag ccctctcggt
 8901 ggtgacctgg aacaaagaca tcgtcacgaa aatcacccct gagggggccg
 8951 aagagtggag tcttgccatt ccagttatgt gcctgctggc aaataaccag
 9001 ttcccctgct cccagcccc ttgcacaccc tgctgctacg aaaaagagcc
 9051 ggagaaaacc ctgcgcacgc tagaagacaa cgtcatgagc cccgggtact
 9101 atcagctgct acaagcatcc ttaacatggt ctccccgccg ccagcgacgc
 9151 agtattaagg acaacttcaa tgtctataaa gccataagac cgtacctagc
 9201 tctactgtcc gactgtggag aagggcactc gtgccatagt cccgtagcgc
 9251 tagaacgcat cagaaacgaa gcgacagacg ggacgctgaa aatccaggtt
 9301 tccttgcaaa tcggaataaa gacggatgat agccatgatt ggaccaagct
 9351 gcgttacatg gacaatcata tgccagcaga cgcagagagg gccaggctat
 9401 ttgtaagaac gtcagcaccg tgcacgatta ctggaacaat gggacacttc

ES 2 647 662 T3

9451 atcctggccc gatgtccgaa aggagaaact ctgacggtgg gattcactga
 9501 cggtaggaag atcagtcact catgtacgca cccatttcac caccaccctc
 9551 ctgtgatagg ccgggaaaaa tttcattccc gaccgcagca cggtagagaa
 9601 ctaccttgca gcacgtacgc gcagagcacc gctgcaactg ccgaggagat
 9651 agaggtacat atgccccag acaccccaga tcgcacattg atgtcacaac
 9701 agtccggtaa tgtaaagatc acagtcaata gtcagacggt gcggtacaag
 9751 tgtaattgcg gtgactcaaa tgaaggacta accactacag acaaagtgat
 9801 taataactgc aaggttgatc aatgccatgc cgcggtcacc aatcacaaaa
 9851 aatggcagta taattcccct ctggtcccgc gtaatgctga actcggggac
 9901 cgaagaggaa aagttcacat tccgtttcct ctggcaaatg tgacatgcag
 9951 ggtgcctaag gcaaggaacc ccaccgtgac gtacggaaaa aaccaagtca
 10001 tcatgctgct gtatcctgac caccacaacgc tcctgtccta ccggaatatg
 10051 ggagaagaac caaactatca agaagagtgg gtgacgcata agaaggagat
 10101 cagggttaacc gtgccgactg aagggctcga ggtcacgtgg ggcaacaacg
 10151 agccgtacaa gtattggccg cagttatcca caaacggtac agcccacggc
 10201 caccgcgatg agataatttt gtattattat gagctgtacc ctactatgac
 10251 tgtggtagtt gtgtcagtgg cctcgttcgt actcctgtcg atgggtgggtg
 10301 tggcagtggg gatgtgcatg tgtgcacgac gcagatgcat tacaccgtac
 10351 gaactgacac caggagctac cgtccctttc ctgcttagcc taatatgctg
 10401 cattagaaca gctaaagcgg ccacatacca agaggctgcg gtataacctgt
 10451 ggaacgagca gcagcctttg ttttggtgc aagcccttat tccgctggca
 10501 gccctgattg tcctatgcaa ctgtctgaga ctcttaccat gcttttgtaa
 10551 aacgttgact tttttagccg taatgagcgt cggtgccac actgtgagcg
 10601 cgtacgaaca cgtaacagtg atcccgaaca cggtgaggag accgtataag
 10651 actctagtca acagaccggg ctacagcccc atggtactgg agatggagct
 10701 tctgtcagtc actttggagc caacgctatc gcttgattac atcacgtgcg
 10751 agtataaaac cgtcatcccg tctccgtacg tgaaatgctg cggtagagca
 10801 gagtgcaagg acaagagcct acctgattac agctgtaagg tcttcaccgg
 10851 cgtctaccca ttcatgtggg gcggcgccta ctgcttctgc gacactgaaa
 10901 atacgcaatt gagcgaagca catgtggaga agtccgaatc atgcaaaaaca
 10951 gaatttgcat cagcatatag ggctcatacc gcatccgcac cagctaagct
 11001 ccgcgtcctt taccaaggaa ataatgttac tgtatctgct tatgcaaacg

ES 2 647 662 T3

11051 gcgatcatgc cgtcacagtt aaggacgcta aattcattgt ggggccaatg
 11101 tcttcagcct ggacaccttt tgacaataaa atcgtggtgt acaaaggcga
 11151 cgtctacaac atggactacc cgcccttcgg cgcaggaaga ccaggacaat
 11201 ttggcgacat ccaaagtcgc acgcctgaga gcgaagacgt ctatgctaac
 11251 acacaactgg tactgcagag accgtccgcg ggtacggtgc acgtgccgta
 11301 ctctcaggca ccatctgggt tcaagtattg gctaaaagaa cgaggggctg
 11351 cgctgcagca cacagcacca tttggctgtc aaatagcaac aaacccggta
 11401 agagcgatga actgcgccgt agggaaacatg cctatctcca tcgacatacc
 11451 ggacgcggcc ttcactaggg tcgtcgacgc gccatcttta acggacatgt
 11501 cgtgtgaggt accagcctgc acccactcct cagactttgg gggcgtagcc
 11551 atcattaaat atgcagccag caagaaaggc aagtgtgcgg tgcattcgat
 11601 gactaacgcc gtcactattc gggaagctga aatagaagta gaaggggaact
 11651 ctcagttgca aatctctttt tcgacggccc tagccagcgc cgaattccgc
 11701 gtacaagtct gttctacaca agtacactgt gcagccgagt gccatccacc
 11751 gaaagaccat atagtcaatt acccggcgtc acacaccacc ctcggggtcc
 11801 aagacatttc cgttacggcg atgtcatggg tgcagaagat cacgggaggt
 11851 gtgggactgg ttgtcgctgt tgcagcactg atcctaatacg tgggtgctatg
 11901 cgtgtcgttt agcaggcact aacttgacaa ctaggtacga aggtatatgt
 11951 gtcccctaag agacacacca catatagcta agaatacaata gataagtata
 12001 gatcaaaggg ctgaacaacc cctgaatagt aacaaaatat aaaaatcaac
 12051 aaaaatcata aaatagaaaa ccagaaacag aagtaggtaa gaaggtatat
 12101 gtgtccccta agagacacac catatatagc taagaatcaa tagataagta
 12151 tagatcaaag ggctgaataa ccctgaata ataacaaaat ataaaaatca
 12201 ataaaaatca taaaatagaa aaccataaac agaagtagtt caaagggcta
 12251 taaaaccctt gaatagtaac aaaacataaa actaataaaa atcaaatgaa
 12301 taccataatt ggcaatcgga agagatgtag gtacttaagc ttcctaaaag
 12351 cagccgaact cgctttgaga tgtaggcgta gcacaccgaa ctcttcata
 12401 attctccgaa cccacaggga cgtaggagat gttcaaagtg gctataaaac
 12451 cctgaacagt aataaaacat aaaattaata aggatcaaat gagtaccata
 12501 attggcaaac ggaagagatg taggtactta agcttcctaa aagcagccga
 12551 actcactttg agatgtaggc atagcatacc gaactcttcc acaattctcc
 12601 gtacccatag ggacgtagga gatgttattt tgtttttaat atttcgagag

ES 2 647 662 T3

```

12651 agttgcaagg ctaagcactg caatggaaag gctctgcggc atatatgagc
12701 ctattctagg gagacatgtc atctttcatg aagggttcagt gtcctagttc
12751 ccttccccca ggcaaaacga cacgggagca ggtcaggggtt gctctgggta
12801 aaagcctgta agcctaagag ctaatcctgt acatggctcc ttacctaca
12851 cactggggat ttgaccteta tctccactct cattaAAAAA AAAAAAAAAA
12901 AAAAAAGGGT ACGCGGCCGC CACTGTGCTG GATATCTGCA GAATTCCACC
12951 AACTGGACT AGTGGATCAG CTTAAGTTTA AACCGCTGAT CAGCCTCGAC
13001 TGTGCCTTCT AGTTGCCAGC CATCTGTTGT TTGCCCCTCC CCCGTGCCTT
13051 CCTTGACCCT GGAAGGTGCC ACTCCCACTG TCCTTTCCTA ATAAAATGAG
13101 GAAATTGCAT CGCATTGTCT GAGTAGGTGT CATTCTATTC TGGGGGGTGG
13151 GGTGGGGCAG GAC

```

Figura 7. La poliproteína estructural del VCHIK dentro del i-DNA de TC-83 está recuadrada.

```

1  GGCGCGCCTG ACATTGATTA TTGACTAGTT ATTAATAGTA ATCAATTACG
51 GGGTCATTAG TTCATAGCCC ATATATGGAG TTCCGCGTTA CATAACTTAC
101 GGTAAATGGC CCGCCTGGCT GACCGCCCAA CGACCCCGC CCATTGACGT
151 CAATAATGAC GTATGTTCCC ATAGTAACGC CAATAGGGAC TTTCCATTGA
201 CGTCAATGGG TGGAGTATTT ACGGTAAACT GCCCACTTGG CAGTACATCA
251 AGTGTATCAT ATGCCAAGTA CGCCCCCTAT TGACGTCAAT GACGGTAAAT
301 GGCCCGCCTG GCATTATGCC CAGTACATGA CCTTATGGGA CTTTCCTACT
351 TGGCAGTACA TCTACGTATT AGTCATCGCT ATTACCATGG TGATGCGGTT
401 TTGGCAGTAC ATCAATGGGC GTGGATAGCG GTTTGACTCA CGGGGATTTC
451 CAAGTCTCCA CCCCATTGAC GTCAATGGGA GTTTGTTTTG GCACCAAAT
501 CAACGGGACT TTCCAAAATG TCGTAACAAC TCCGCCCCAT TGACGCAAAT
551 GGGCGGTAGG CGTGTACGGT GGGAGGTCTA TATAAGCAGA GCTCTCTGGC
601 TAACTAGAGA TAGGCGGCGC ATGAGAGAAG CCCAGACCAA TTACCTACCC
651 AAAATGGAGA AAGTTCACGT TGACATCGAG GAAGACAGCC CATTCTCAG
701 AGCTTTGCAG CGGAGCTTCC CGCAGTTTGA GGTAAGGCC AAGCAGGTCA
751 CTGATAATGA CCATGCTAAT GCCAGAGCGT TTTCGCATCT GGCTTCAAAA
801 CTGATCGAAA CGGAGGTGGA CCCATCCGAC ACGATCCTTG ACATTGGAAG
851 TGCGCCCGCC CGCAGAATGT ATTCTAAGCA CAAGTATCAT TGTATCTGTC
901 CGATGAGATG TGCGGAAGAT CCGGACAGAT TGTATAAGTA TGCAACTAAG
951 CTGAAGAAAA ACTGTAAGGA AATAACTGAT AAGGAATTGG ACAAGAAAAT
1001 GAAGGAGCTC GCCGCCGTCA TGAGCGACCC TGACCTGGAA ACTGAGACTA
1051 TGTGCCTCCA CGACGACGAG TCGTGTCGCT ACGAAGGGCA AGTCGCTGTT
1101 TACCAGGATG TATACGCGGT TGACGGACCG ACAAGTCTCT ATCACCAAGC
1151 CAATAAGGGA GTTAGAGTCG CCTACTGGAT AGGCTTTGAC ACCACCCCTT
1201 TTATGTTTAA GAACTTGGCT GGAGCATATC CATCATACTC TACCAACTGG
1251 GCCGACGAAA CCGTGTTAAC GGCTCGTAAC ATAGGCCTAT GCAGCTCTGA
1301 CGTTATGGAG CGGTCACGTA GAGGGATGTC CATTCTTAGA AAGAAGTATT

```

ES 2 647 662 T3

1351 TGAAACCATC CAACAATGTT CTATTCTCTG TTGGCTCGAC CATCTACCAC
 1401 GAGAAGAGGG ACTTACTGAG GAGCTGGCAC CTGCCGTCTG TATTTCACTT
 1451 ACGTGGCAAG CAAAATTACA CATGTCGGTG TGAGACTATA GTTAGTTGCG
 1501 ACGGGTACGT CGTTAAAAGA ATAGCTATCA GTCCAGGCCT GTATGGGAAG
 1551 CCTTCAGGCT ATGCTGCTAC GATGCACCGC GAGGGATTCT TGTGCTGCAA
 1601 AGTGACAGAC ACATTGAACG GGGAGAGGGT CTCTTTTCCC GTGTGCACGT
 1651 ATGTGCCAGC TACATTGTGT GACCAAATGA CTGGCATACT GGCAACAGAT
 1701 GTCAGTGCGG ACGACGCGCA AAAACTGCTG GTTGGGCTCA ACCAGCGTAT
 1751 AGTCGTCAAC GGTGCGACCC AGAGAAACAC CAATACCATG AAAAATTACC
 1801 TTTTGCCCGT AGTGGCCCAG GCATTTGCTA GGTGGGCAAA GGAATATAAG
 1851 GAAGATCAAG AAGATGAAAG GCCACTAGGA CTACGAGATA GACAGTTAGT
 1901 CATGGGGTGT TGTGTTGGGCTT TTAGAAGGCA CAAGATAACA TCTATTTATA
 1951 AGCGCCCGGA TACCCAAACC ATCATCAAAG TGAACAGCGA TTTCCACTCA
 2001 TTCGTGCTGC CCAGGATAGG CAGTAACACA TTGGAGATCG GGCTGAGAAC
 2051 AAGAATCAGG AAAATGTTAG AGGAGCACAA GGAGCCGTCA CCTCTCATT
 2101 CCGCCGAGGA CGTACAAGAA GCTAAGTGCG CAGCCGATGA GGCTAAGGAG
 2151 GTGCGTGAAG CCGAGGAGTT GCGCGCAGCT CTACCACCTT TGGCAGCTGA
 2201 TGTTGAGGAG CCCACTCTGG AAGCCGATGT CGACTTGATG TTACAAGAGG
 2251 CTGGGGCCGG CTCAGTGGAG ACACCTCGTG GCTTGATAAA GGTTACCAGC
 2301 TACGCTGGCG AGGACAAGAT CGGCTCTTAC GCTGTGCTTT CTCCGCAGGC
 2351 TGTACTCAAG AGTGAAAAAT TATCTTGCAT CCACCCTCTC GCTGAACAAG
 2401 TCATAGTGAT AACACACTCT GGCCGAAAAG GGCATTATGC CGTGGAACCA
 2451 TACCATGGTA AAGTAGTGGT GCCAGAGGGA CATGCAATAC CCGTCCAGGA
 2501 CTTTCAAGCT CTGAGTGAAA GTGCCACCAT TGTGTACAAC GAACGTGAGT
 2551 TCGTAAACAG GTACCTGCAC CATATTGCCA CACATGGAGG AGCGCTGAAC
 2601 ACTGATGAAG AATATTACAA AACTGTCAAG CCCAGCGAGC ACGACGGCGA
 2651 ATACCTGTAC GACATCGACA GGAAACAGTG CGTCAAGAAA GAACTAGTCA
 2701 CTGGGCTAGG GCTCACAGGC GAGCTGGTGG ATCCTCCCTT CCATGAATTC
 2751 GCCTACGAGA GTCTGAGAAC ACGACCAGCC GCTCCTTACC AAGTACCAAC
 2801 CATAGGGGTG TATGGCGTGC CAGGATCAGG CAAGTCTGGC ATCATTAATA
 2851 GCGCAGTCAC CAAAAAAGAT CTAGTGGTGA GCGCCAAGAA AGAAAACTGT

ES 2 647 662 T3

```

2901 GCAGAAATTA TAAGGGACGT CAAGAAAATG AAAGGGCTGG ACGTCAATGC
2951 CAGAACTGTG GACTCAGTGC TCTTGAATGG ATGCAAACAC CCCGTAGAGA
3001 CCCTGTATAT TGACGAAGCT TTTGCTTGTC ATGCAGGTAC TCTCAGAGCG
3051 CTCATAGCCA TTATAAGACC TAAAAAGGCA GTGCTCTGCG GGGATCCCAA
3101 ACAGTGCGGT TTTTTTAACA TGATGTGCCT GAAAGTGCAT TTAAACCACG
3151 AGATTTGCAC ACAAGTCTTC CACAAAAGCA TCTCTCGCCG TTGCACTAAA
3201 TCTGTGACTT CGGTCGTCTC AACCTTGTTT TACGACAAAA AAATGAGAAC
3251 GACGAATCCG AAAGAGACTA AGATTGTGAT TGACACTACC GGCAGTACCA
3301 AACCTAAGCA GGACGATCTC ATTCTCACTT GTTTCAGAGG GTGGGTGAAG
3351 CAGTTGCAAA TAGATTACAA AGGCAACGAA ATAATGACGG CAGCTGCCTC
3401 TCAAGGGCTG ACCCGTAAAG GTGTGTATGC CGTTCGGTAC AAGGTGAATG
3451 AAAATCCTCT GTACGCACCC ACCTCAGAAC ATGTGAACGT CCTACTGACC
3501 CGCACGGAGG ACCGCATCGT GTGGAAAACA CTAGCCGGCG ACCCATGGAT
3551 AAAAACACTG ACTGCCAAGT ACCCTGGGAA TTTCACTGCC ACGATAGAGG
3601 AGTGGCAAGC AGAGCATGAT GCCATCATGA GGCACATCTT GGAGAGACCG
3651 GACCCTACCG ACGTCTTCCA GAATAAGGCA AACGTGTGTT GGGCCAAGGC
3701 TTTAGTGCCG GTGCTGAAGA CCGCTGGCAT AGACATGACC ACTGAACAAT
3751 GGAACACTGT GGATTATTTT GAAACGGACA AAGCTCACTC AGCAGAGATA
3801 GTATTGAACC AACTATGCGT GAGGTTCTTT GGA CTGATC TGGACTCCGG
3851 TCTATTTTCT GCACCCACTG TTCCGTTATC CATTAGGAAT AATCACTGGG
3901 ATA ACTCCCC GTCGCCTAAC ATGTACGGGC TGAATAAAGA AGTGGTCCGT
3951 CAGCTCTCTC GCAGGTACCC ACAACTGCCT CGGGCAGTTG CCACTGGAAG
4001 AGTCTATGAC ATGAACACTG GTACACTGCG CAATTATGAT CCGCGCATAA
4051 ACCTAGTACC TGTAACACAGA AGACTGCCTC ATGCTTTAGT CCTCCACCAT
4101 AATGAACACC CACAGAGTGA CTTTTCTTCA TTCGTCAGCA AATTGAAGGG
4151 CAGAACTGTC CTGGTGGTGC GGGAAAAGTT GTCCGTCCCA GGCAAAATGG
4201 TTGACTGGTT GTCAGACCGG CCTGAGGCTA CCTTCAGAGC TCGGCTGGAT
4251 TTAGGCATCC CAGGTGATGT GCCCAAATAT GACATAATAT TTGTTAATGT
4301 GAGGACCCCA TATAAATACC ATCACTATCA GCAGTGTGAA GACCATGCCA
4351 TTAAGCTTAG CATGTTGACC AAGAAAGCTT GTCTGCATCT GAATCCCGGC
4401 GGAACCTGTG TCAGCATAGG TTATGGTTAC GCTGACAGGG CCAGCGAAAG

```

ES 2 647 662 T3

4451 CATCATTGGT GCTATAGCGC GGCAGTTCAA GTTTTCCTGG GTATGCAAAC
 4501 CGAAATCCTC ACTTGAAGAG ACGGAAGTTC TGTTTGTATT CATTGGGTAC
 4551 GATCGCAAGG CCCGTACGCA CAATCCTTAC AAGCTTTCAT CAACCTTGAC
 4601 CAACATTTAT ACAGGTTCCA GACTCCACGA AGCCGGATGT GCACCCTCAT
 4651 ATCATGTGGT GCGAGGGGAT ATTGCCACGG CCACCGAAGG AGTGATTATA
 4701 AATGCTGCTA ACAGCAAAGG ACAACCTGGC GGAGGGGTGT GCGGAGCGCT
 4751 GTATAAGAAG TTCCCGGAAA GCTTCGATTT ACAGCCGATC GAAGTAGGAA
 4801 AAGCGCGACT GGTCAAAGGT GCAGCTAAAC ATATCATTCA TGCCGTAGGA
 4851 CCAAACCTCA ACAAAGTTTC GGAGGTTGAA GGTGACAAAC AGTTGGCAGA
 4901 GGCTTATGAG TCCATCGCTA AGATTGTCAA CGATAACAAT TACAAGTCAG
 4951 TAGCGATTCC ACTGTTGTCC ACCGGCATCT TTTCCGGGAA CAAAGATCGA
 5001 CTAACCCAAT CATTGAACCA TTTGCTGACA GCTTTAGACA CCACTGATGC
 5051 AGATGTAGCC ATATACTGCA GGGACAAGAA ATGGGAAATG ACTCTCAAGG
 5101 AAGCAGTGGC TAGGAGAGAA GCAGTGGAGG AGATATGCAT ATCCGACGAC
 5151 TCTTCAGTGA CAGAACCTGA TGCAGAGCTG GTGAGGGTGC ATCCGAAGAG
 5201 TTCTTTGGCT GGAAGGAAGG GCTACAGCAC AAGCGATGGC AAAACTTTCT
 5251 CATATTTGGA AGGGACCAAG TTTCACCAGG CGGCCAAGGA TATAGCAGAA
 5301 ATTAATGCCA TGTGGCCCGT TGCAACGGAG GCCAATGAGC AGGTATGCAT
 5351 GTATATCCTC GGAGAAAGCA TGAGCAGTAT TAGGTCGAAA TGCCCCGTCTG
 5401 AAGAGTCGGA AGCCTCCACA CCACCTAGCA CGCTGCCTTG CTTGTGCATC
 5451 CATGCCATGA CTCCAGAAAG AGTACAGCGC CTAAAAGCCT CACGTCCAGA
 5501 ACAAATTACT GTGTGCTCAT CCTTTCCATT GCCGAAGTAT AGAATCACTG
 5551 GTGTGCAGAA GATCCAATGC TCCCAGCCTA TATTGTTCTC ACCGAAAGTG
 5601 CCTGCGTATA TTCATCCAAG GAAGTATCTC GTGGAAACAC CACCGGTAGA
 5651 CGAGACTCCG GAGCCATCGG CAGAGAACCA ATCCACAGAG GGGACACCTG
 5701 AACAACCACC ACTTATAACC GAGGATGAGA CCAGGACTAG AACGCCTGAG
 5751 CCGATCATCA TCGAAGAGGA AGAAGAGGAT AGCATAAGTT TGCTGTCAGA
 5801 TGGCCCGACC CACCAGGTGC TGCAAGTCGA GGCAGACATT CACGGGCCGC
 5851 CCTCTGTATC TAGCTCATCC TGGTCCATTC CTCATGCATC CGACTTTGAT
 5901 GTGGACAGTT TATCCATACT TGACACCCTG GAGGGAGCTA GCGTGACCAG
 5951 CGGGGCAACG TCAGCCGAGA CTAACCTCTTA CTTGCGCAAAG AGTATGGAGT

ES 2 647 662 T3

6001 TTCTGGCGCG ACCGGTGCCT GCGCCTCGAA CAGTATTCAG GAACCCTCCA
 6051 CATCCCGCTC CGCGCACAAG AACACCGTCA CTTGCACCCA GCAGGGCCTG
 6101 CTCGAGAACC AGCCTAGTTT CCACCCCGCC AGGCGTGAAT AGGGTGATCA
 6151 CTAGAGAGGA GCTCGAGGCG CTTACCCCGT CACGCACTCC TAGCAGGTCG
 6201 GTCTCGAGAA CCAGCCTGGT CTCCAACCCG CCAGGCGTAA ATAGGGTGAT
 6251 TACAAGAGAG GAGTTTGAGG CGTTCGTAGC ACAACAACAA TGACGGTTTG
 6301 ATGCGGGTGC ATACATCTTT TCCTCCGACA CCGGTCAAGG GCATTTACAA
 6351 CAAAAATCAG TAAGGCAAAC GGTGCTATCC GAAGTGGTGT TGGAGAGGAC
 6401 CGAATTGGAG ATTTTCGTATG CCCCGCGCCT CGACCAAGAA AAAGAAGAAT
 6451 TACTACGCAA GAAATTACAG TTAAATCCCA CACCTGCTAA CAGAAGCAGA
 6501 TACCAGTCCA GGAAGGTGGA GAACATGAAA GCCATAACAG CTAGACGTAT
 6551 TCTGCAAGGC CTAGGGCATT ATTTGAAGGC AGAAGGAAAA GTGGAGTGCT
 6601 ACCGAACCCT GCATCCTGTT CCTTTGTATT CATCTAGTGT GAACCGTGCC
 6651 TTCTCAAGCC CCAAGGTCGC AGTGGAAGCC TGTAACGCCA TGTTGAAAGA
 6701 GAACTTTCCG ACTGTGGCTT CTTACTGTAT TATTCAGAG TACGATGCCT
 6751 ATTTGGACAT GGTTGACGGA GCTTCATGCT GCTTAGACAC TGCCAGTTTT
 6801 TGCCCTGCAA AGCTGCGCAG CTTTCCAAAG AAACACTCCT ATTTGGAACC
 6851 CACAATACGA TCGGCAGTGC CTTCAGCGAT CCAGAACACG CTCCAGAACG
 6901 TCCTGGCAGC TGCCACAAAA AGAAATTGCA ATGTCACGCA AATGAGAGAA
 6951 TTGCCCCGTAT TGGATTCGGC GGCCTTTAAT GTGGAATGCT TCAAGAAATA
 7001 TGCGTGTAAT AATGAATATT GGGAAACGTT TAAAGAAAAC CCCATCAGGC
 7051 TTACTIONAAGA AAACGTGGTA AATTACATTA CCAAATTAAA AGGACCAAAA
 7101 GCTGCTGCTC TTTTTCGCAA GACACATAAT TTGAATATGT TGCAGGACAT
 7151 ACCAATGGAC AGGTTTGTA TGGACTTAAA GAGAGACGTG AAAGTGACTC
 7201 CAGGAACAAA ACATACTGAA GAACGGCCCA AGGTACAGGT GATCCAGGCT
 7251 GCCGATCCGC TAGCAACAGC GTATCTGTGC GGAATCCACC GAGAGCTGGT
 7301 TAGGAGATTA AATGCGGTCC TGCTTCCGAA CATTCATACA CTGTTTGATA
 7351 TGTCGGCTGA AGACTTTGAC GCTATTATAG CCGAGCACTT CCAGCCTGGG
 7401 GATTGTGTTT TGGAACCTGA CATCGCGTCG TTTGATAAAA GTGAGGACGA
 7451 CGCCATGGCT CTGACCGCGT TAATGATTCT GGAAGACTTA GGTGTGGACG
 7501 CAGAGCTGTT GACGCTGATT GAGGCGGCTT TCGGCGAAAT TTCATCAATA

ES 2 647 662 T3

7551 CATTTGCCCA CTAAACTAA ATTTAAATTC GGAGCCATGA TGAAATCTGG
 7601 AATGTTCTTC ACCTGTTTG TGAACACAGT CATTAACATT GTAATCGCAA
 7651 GCAGAGTGTT GAGAGAACGG CTAACCGGAT CACCATGTGC AGCATTTCATT
 7701 GGAGATGACA ATATCGTGAA AGGAGTCAAA TCGGACAAAT TAATGGCAGA
 7751 CAGGTGCGCC ACCTGGTTGA ATATGGAAGT CAAGATTATA GATGCTGTGG
 7801 TGGGCGAGAA AGCGCCCTAT TTCTGTGGAG GGTTTATTTT GTGTGACTCC
 7851 GTGACCGGCA CAGCGTGCCG TGTGGCAGAC CCCCTAAAAA GGCTGTTTAA
 7901 GCTTGCCAAA CCTCTGGCAG CAGACGATGA ACATGATGAT GACAGGAGAA
 7951 GGGCATTGCA TGAAGAGTCA ACACGCTGGA ACCGAGTGGG TATTCTTTCA
 8001 GAGCTGTGCA AGGCAGTAGA ATCAAGGTAT GAAACCGTAG GAACTTCCAT
 8051 CATAGTTATG GCCATGACTA CTCTAGCTAG CAGTGTTAAA TCATTAGCT
 8101 ACCTGAGAGG GGCCCTATA ACTCTCTACG GCTAACCTGA ATGGACTACG
 8151 ACATAGTCTA GTCCGCCAAG ATGgagttta tcccaacca aactttctac
 8201 aataggaggt accagcctcg accttggact ccgcgccta ctatccaagt
 8251 tatcagaccc agaccgcgtc cgcaaaggaa agccgggcaa cttgcccagc
 8301 tgatctcagc agttaataaa ctgacaatgc gcgcggtacc tcaacagaag
 8351 ccgcgcaaga atcggaagaa taagaagcaa aagcaaaagc agcaggcgcc
 8401 acgaaacaac atgaatcaaa agaagcagcc ccctaaaaag aaaccggctc
 8451 aaaagaaaaa gaagccgggc cgtagagaga gaatgtgcat gaaaatcgaa
 8501 aatgattgca tcttcgaagt caagcatgaa ggtaaggtaa caggttacgc
 8551 gtgcttggtg ggggacaaag taatgaagcc agcacacgta aaggggacca
 8601 tcgataatgc ggacctggcc aaattggcct tcaagcggtc atctaagtac
 8651 gaccttgaat gcgcgcagat acccgtgcac atgaagtccg acgcttcgaa
 8701 gttcacccat gagaaaccgg aggggtacta caactggcac cacggagcag
 8751 tacagtactc aggaggccgg ttcaccatcc ctacaggtgc gggcaaacca
 8801 ggggacagcg gtagaccgat cttcgacaac aaggggcgcg tgggtggccat
 8851 agtttttagga ggagctaata aaggagcccg tacagccctc tcggtggtga
 8901 cctggaacaa agacatcgtc acgaaaatca cccctgaggg ggccgaagag
 8951 tggagtcctg ccattccagt tatgtgcctg ctggcaaata ccacgttccc

9001 ctgctcccag ccccttgca caccctgctg ctacgaaaaa gagccggaga
 9051 aaaccctgcg catgctagaa gacaacgtca tgagccccgg gtactatcag
 9101 ctgctacaag catccttaac atgttctccc cgccgccagc gacgcagtat
 9151 taaggacaac ttcaatgtct ataaagccat aagaccgtac ctagctcact
 9201 gtcccgactg tggagaaggg cactcgtgcc atagtcccgt agcgctagaa
 9251 cgcatcagaa acgaagcgac agacgggacg ctgaaaatcc aggtttcctt
 9301 gcaaatcgga ataaagacgg atgatagcca tgattggacc aagctgcgtt
 9351 acatggacaa tcatatgcca gcagacgcag agagggccag gctatttgta
 9401 agaacgtcag caccgtgcac gattactgga acaatgggac acttcatcct
 9451 ggcccgatgt ccgaaaggag aaactctgac ggtgggattc actgacggta
 9501 ggaagatcag tcatcatgt acgcacccat ttcaccacga cctcctgtg
 9551 ataggccggg aaaaatttca ttcccgaccg cagcacggta gagaactacc
 9601 ttgcagcacg tacgcgcaga gcaccgctgc aactgccgag gagatagagg
 9651 tacatatgcc ccagacacc ccagatcgca cattgatgtc acaacagtcc
 9701 ggtaatgtaa agatcacagt caatagtcag acggtgcggt acaagtgtaa
 9751 ttgcggtgac tcaaatgaag gactaaccac tacagacaaa gtgattaata
 9801 actgcaaggt tgatcaatgc catgccgcg tgaccaatca caaaaaatgg
 9851 cagtataatt cccctctggt cccgcgtaat gctgaactcg gggaccgaaa
 9901 aggaaaagtt cacattccgt ttctctggc aaatgtgaca tgcaggggtg
 9951 ctaaggcaag gaaccccacc gtgacgtacg gaaaaaacca agtcatcatg
 10001 ctgctgtatc ctgaccaccc aacgctcctg tcctaccgga atatgggaga
 10051 agaaccaaac tatcaagaag agtgggtgac gcataagaag gagatcaggt
 10101 taaccgtgcc gactgaaggg ctcgaggtca cgtggggcaa caacgagccg
 10151 tacaagtatt ggccgcagtt atccacaaac ggtacagccc acggccacc
 10201 gcatgagata attttgatatt attatgagct gtaccctact atgactgtgg
 10251 tagttgtgtc agtggcctcg ttctgactcc tgtcgatggg ggggtgtggc
 10301 gtgggggatgt gcatgtgtgc acgacgcaga tgcattacac cgtacgaact
 10351 gacaccagga gctaccgtcc ctttctgct tagcctaata tgctgcatta
 10401 gaacagctaa agcggccaca taccaagagg ctgcggtata cctgtggaac

10451 gagcagcagc ctttgttttg gctgcaagcc cttattccgc tggcagccct
 10501 gattgtccta tgcaactgtc tgagactctt accatgcttt tgtaaaacgt
 10551 tgactttttt agccgtaatg agcgtcgggtg cccacactgt gagcgcgtac
 10601 gaacacgtaa cagtgatccc gaacacgggtg ggagtaccgt ataagactct
 10651 agtcaacaga ccgggctaca gccccatggt actggagatg gagcttctgt
 10701 cagtcacttt ggagccaacg ctatcgcttg attacatcac gtgcgagtat
 10751 aaaaccgtca tcccgtctcc gtacgtgaaa tgctgcggta cagcagagtg
 10801 caaggacaag agcctacctg attacagctg taaggtcttc accggcgtct
 10851 acccattcat gtggggcggc gcctactgct tctgcgacac tgaaaatacg
 10901 caattgagcg aagcacatgt ggagaagtcc gaatcatgca aacagaatt
 10951 tgcatacgca tatagggctc ataccgcac cgcatacagct aagctccgcg
 11001 tcctttacca aggaataat gttactgtat ctgcttatgc aaacggcgat
 11051 catgccgtca cagttaagga cgctaaattc attgtggggc caatgtcttc
 11101 agcctggaca ccttttgaca ataaaatcgt ggtgtacaaa ggcgacgtct
 11151 acaacatgga ctaccgccc ttgcggcgag gaagaccagg acaatttggc
 11201 gacatccaaa gtcgcacgcc tgagagcgaa gacgtctatg ctaacacaca
 11251 actggtactg cagagaccgt ccgcgggtac ggtgcacgtg ccgtactctc
 11301 aggcaccatc tggcttcaag tattggctaa aagaacgagg ggcgtcgctg
 11351 cagcacacag caccatttgg ctgtcaaata gcaacaaacc cggtaagagc
 11401 gatgaactgc gccgtaggga acatgcctat ctccatcgac ataccggacg
 11451 cggccttcac tagggtcgtc gacgcgccat ctttaacgga catgtcgtgt
 11501 gaggtaccag cctgcaccca ctctcagac tttgggggcg tagccatcat
 11551 taaatatgca gccagcaaga aaggcaagtg tgcggtgcat tcgatgacta
 11601 acgccgtcac tattcgggaa gctgaaatag aagtagaagg gaactctcag
 11651 ttgcaaactc ctttttcgac ggcctagcc agcgcggaat tccgcgtaca
 11701 agtctgttct acacaagtac actgtgcagc cgagtgccat ccaccgaaag
 11751 accatatagt caattaccg gcgtcacaca ccaccctcg ggtccaagac
 11801 atttccgtta cggcgatgtc atgggtgcag aagatcacgg gaggtgtggg
 11851 actggttgct gctgttgac cactgatcct aatcgtggtg ctatgcgtgt

ES 2 647 662 T3

```
11901 cgtttagcag gcacTGAATA CAGCAGCAAT TGGCAAGCTG CTTACATAGA
11951 ACTCGCGGCG ATTGGCATGC CGCCTTAAAA TTTTATTTT ATTTTTTCTT
12001 TTCTTTTCCG AATCGGATTT TGTTTTTAAT ATTTCAAAAA AAAAAAAAAA
12051 AAAAAAGGGT ACGCGGCCGC CACTGTGCTG GATATCTGCA GAATTCCACC
12101 AACTGGACT AGTGGATCAG CTTAAGTTTA AACCGCTGAT CAGCCTCGAC
12151 TGTGCCTTCT AGTTGCCAGC CAT
```

Figura 8.

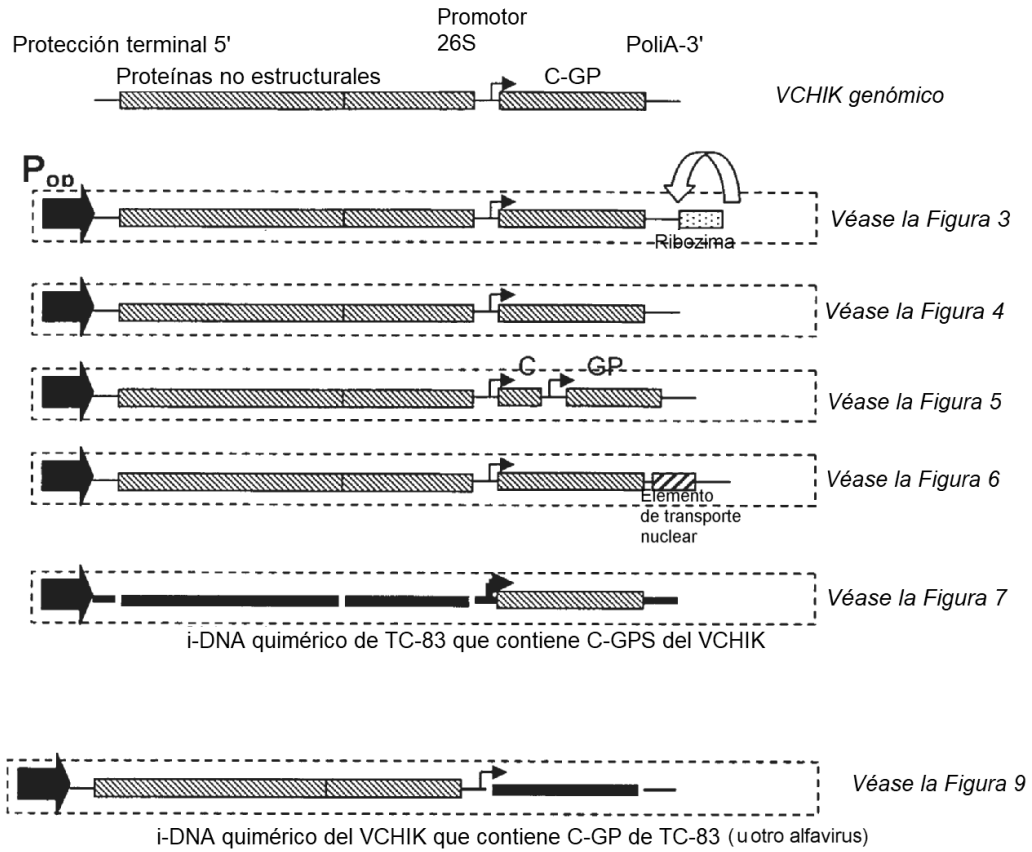


Figura 9. i-DNA quimérico del VCHIK obtenido de la cepa atenuada viva 181/25 que contiene C-GP de TC-83. Este i-DNA puede utilizarse como una vacuna frente a EEV. La poliproteína estructural de TC-83 está recuadrada.

```

1  GGCGCGCCTG ACATTGATTA TTGACTAGTT ATTAATAGTA ATCAATTACG
51  GGGTCATTAG TTCATAGCCC ATATATGGAG TTCCGCGTTA CATAACTTAC
101 GGTAAATGGC CCGCCTGGCT GACCGCCCAA CGACCCCGC CCATTGACGT
151 CAATAATGAC GTATGTTCCC ATAGTAACGC CAATAGGGAC TTTCCATTGA
201 CGTCAATGGG TGGAGTATTT ACGGTAAACT GCCCACTTGG CAGTACATCA
251 AGTGTATCAT ATGCCAAGTA CGCCCCCTAT TGACGTCAAT GACGGTAAAT
301 GGCCCGCCTG GCATTATGCC CAGTACATGA CCTTATGGGA CTTTCCTACT
351 TGGCAGTACA TCTACGTATT AGTCATCGCT ATTACCATGG TGATGCGGTT
401 TTGGCAGTAC ATCAATGGGC GTGGATAGCG GTTTGACTCA CGGGGATTTT
451 CAAGTCTCCA CCCCATTGAC GTCAATGGGA GTTTGTTTTG GCACCAAAT
501 CAACGGGACT TTCCAAAATG TCGTAACAAC TCCGCCCCAT TGACGCAAAT
551 GGGCGGTAGG CGTGTACGGT GGGAGGTCTA TATAAGCAGA GCTCTCTGGC
601 TAACTAGAGa tggctgcgtg agacacacgt agcctaccag tttcttactg
651 ctctactctg caaagcaaga gattaataac ccatcatgga ttctgtgtac
701 gtggacatag acgctgacag cgcctttttg aaggccctgc aacgtgcgta
751 ccccatgttt gaggtggaac ctaggcaggt cacatcgaat gaccatgcta
801 atgctagagc gttctcgcac ctagccataa aactaataga gcaggaaatt
851 gatcccgact caaccatcct ggatataggt agtgcgccag caaggaggat
901 gatgtcggac aggaagtacc actgcgtttg cccgatgcgc agcgcagaag
951 atcccgagag actcgcataa tatgcgagaa agctcgcac tgccgcagga
1001 aaagtccttg acagaaacat ttctggaaag atcggggact tacaagcgg
1051 gatggccgtg ccagacacgg agacgccaac attttgctta cacacagatg
1101 tctcatgtag acagagagca gacgtcgca tataccaaga cgtctatgct
1151 gtacacgcac ccacgtcgct ataccaccag gcgattaaag gagtccgagt
1201 ggcgtactgg gtagggttcg acacaacccc gttcatgtac aacgctatgg
1251 cgggtgccta cccctcatac tcgacaaatt gggcggatga gcaggtagtg
1301 aaggctaaga acataggatt atgttcaaca gacctgacgg aaggtagacg
1351 aggcaaattg tctatcatga gagggaaaaa gctaaaaccg tgcgaccgtg
1401 tgctgttctc agtaggggtca acgctttacc cggaaagccg cacgctactt
1451 aagagctggc acctaccatc ggtgttccat ctaaagggca agcttagctt

```

1501 cacatgccgc tgtgacacag tggtttcgtg tgagggctac gtcgttaaga
 1551 gaataacgat gagcccaggc ctttatggaa aaaccatagg gtatgcggtg
 1601 acccaccacg cagacggatt cttgatgtgc aagactaccg acacgggttg
 1651 cggcgaaaga gtgtcattct cgggtgtgcac gtacgtgccg gcgaccattt
 1701 gtgatcaaat gaccggcatc cttgctacag aagtcacgcc ggaggatgca
 1751 cagaagctgt tgggtggggct gaaccagagg atagtgggta acggcagaac
 1801 gcaacggaac acgaacacca tgaagaacta cctacttccc gtggctgccc
 1851 aggccttcag taagtgggca aaggagtgcc ggaaggacat ggaagatgag
 1901 aagcttctgg gggtcagaga aagaacacta acctgctgct gtctatgggc
 1951 atttaagaag cagaaaacac acacgggtcta caagaggcct gatacccagt
 2001 caatccagaa gggtcaggcc gaatttgaca gctttgtagt accgggcctg
 2051 tggctcgtccg gggtgtcaat cccgttgagg actagaatca agtgggtgtt
 2101 acgcaagggtg ccgaaaacag acctgatccc atacagcggg aatgcccag
 2151 aagcccagga tgcagaaaaa gaagcagagg aagaacgaga agcagaactg
 2201 actcatgagg ctctaccacc cctacaggca gcacaggaag atgtccaggt
 2251 cgaaatcgac gtggaacagc ttgaggatag agctgggtgct ggaataatag
 2301 agactccgag aggcgctatc aaagt tactg cccaactaac agaccacgtc
 2351 gtggggggagt acctgggtact ttccccgcag accgtactac gcagccagaa
 2401 gctcagcctg atccacgctt tagcggagca agtgaagacg tgtacgcaca
 2451 gcggacgagc agggagggtat gcggtcgaag cgtacgatgg ccgagtccta
 2501 gtgccctcag gctatgcaat ttgcctgaa gacttccaga gtctaagcga
 2551 aagcgcaacg atggtgtaca acgaaagaga gttcgtaaac agaaagttac
 2601 accacattgc gatgcacgga ccagccctga aactgacga agagtcgtat
 2651 gagctgggtg gggcagagag gacagaacac gagtacgtct acgacgtgga
 2701 ccagagaaga tgctgtaaga aggaagaagc tgcaggactg gtactgggtg
 2751 gcgacttgac taatccgccc taccacgaat tcgcatacga agggctaaaa
 2801 attcgccccg cctgcccata caaaattgca gtcataaggag tcttcggggg
 2851 accaggatct ggcaagtcag ccattatcaa gaacctagtt accaggcaag
 2901 acctggtgac tagcggaaag aaagaaaact gccaaagaaat cagcaccgac
 2951 gtgatgagac agagagggtct agagatatct gcacgtacgg tagattcgct
 3001 gctcttgaat ggatgcaaca gaccagtcga cgtgttgtag gtagacgagg
 3051 cgtttgcggtg ccactctgga acgttacttg ctttgatcgc cttgggtgaga
 3101 ccaagacaga aagttgtact ttgtgggtgac ccgaagcagt gcggcttctt
 3151 caatatgatg cagatgaaag tcaactacaa tcataacatc tgcacccaag
 3201 tgtaccacaa aagtatctcc aggcgggtgta cactgcctgt gactgccatt
 3251 gtgtcatcgt tgcattacga aggcaaaatg cgcactacga atgagtacaa
 3301 catgccgatt gtagtggaca ctacaggctc aacgaaacct gaccctggag
 3351 acctcgtggtt aacgtgcttc agaggggtggg ttaaacaact gcaaattgac

3401 tatcgtggac acgaggtcat gacagcagcc gcatcccaag ggttaactag
 3451 aaaaggagtt tacgcagtta ggcaaaaagt taacgaaaac ccactctatg
 3501 catcaacatc agagcacgtc aacgtactcc taacgcgtac ggaaggtaaa
 3551 ctggtatgga agacactctc tggtgacccg tggataaaga cgctgcagaa
 3601 cccaccgaaa ggaaacttca aagcaactat taaggagtgg gaggtggagc
 3651 acgcatcgat aatggcgggc atctgcagtc accaagtgac ctttgacaca
 3701 ttccaaaaca aagccaacgt ttgctgggct aagagcttgg tccttatcct
 3751 cgaaacagcg gggataaaac taaatgatag gcagtgggcc cagataattc
 3801 aagccttcaa agaagacaaa gcatactcac ccgaagtagc cctgaatgaa
 3851 atatgcacgc gcatgtatgg ggtggatcta gacagtgggc tattctctaa
 3901 accgttggta tctgtgtatt acgcggataa ccattgggat aataggccgg
 3951 gaggaagat gttcggattc aaccctgagg cagcgtccat tctagaaaga
 4001 aagtacccat ttacaaaagg aaagtggaac atcaacaagc agatctgcgt
 4051 gactaccagg aggatagaag acttcaacc taccaccaac attataccgg
 4101 tcaacaggag actaccacac tcattagtgg ccgaacaccg ccagtaaaaa
 4151 ggggaaagaa tggaatggct ggtaacaag ataaacggac accacgtact
 4201 cctggtttagc ggctataacc ttgcactgcc tactaagaga gtcacctggg
 4251 tagcgccact aggtgtccgc ggagcggact atacatacaa cctagagctg
 4301 ggtctaccag caacrccttg taggtatgac ctagtggcca taaacatcca
 4351 cacacctttt cgcatacacc attaccaaca gtgcgtagat cacgcaatga
 4401 aactgcaaatt gctagggggg gactcactga gactgctcaa accgggtggc
 4451 tctctattga tcagagcata cggttacgca gatagaacca gtgaacgagt
 4501 catctgcgta ctgggacgca agtttagatc gtctagagca ttgaaaccac
 4551 catgtgtcac cagtaatact gagatgtttt tcctatttag caattttgac
 4601 aatggcagaa ggaattttac aacgcatgtc atgaacaatc aactgaatgc
 4651 agcctttgta ggacaggcca cccgagcagg atgtgcacca tcgtaccggg
 4701 taaaacgcac ggacatcgcg aagaacgatg aagagtgcgt ggttaacgcc
 4751 gccaacccctc gcgggttacc aggtgacggg gtttgcaagg cagtatataa
 4801 aaagtggccg gagtccttta aaaacagtgc aacaccagta ggaaccgcaa
 4851 aaacagttat gtgcggtacg tatccagtaa tccacgccgt aggaccaaac
 4901 ttctcaaatt attcggagtc tgaaggggac cgggaattgg cggctgccta
 4951 tcgagaagtc gcaaaggaag taactagact gggagtaaata agcgtagcta
 5001 tacctctcct ctccacaggt gtatactcag gagggaaaga caggctaacc
 5051 cagtcactga accacctctt tacagccatg gactcgacgg atgcagacgt
 5101 ggtcatctac tgccgagaca aggaatggga gaagaaaata tctgaggcca
 5151 tacagatgcg gacccaagtg gagctgctgg atgagcacat ctccatagac
 5201 tgcgatgtca ttgcggtgca ccctgacagt agcttggcag gcagaaaagg
 5251 atacagcacc acggaaggcg cactgtattc atatctagaa gggacacggt

ES 2 647 662 T3

5301 ttcaccagac ggcagtggat atggcagaga tatacactat gtggccaaag
 5351 caaacagagg ccaatgagca agtctgccta tatgccctgg gggaaagtat
 5401 tgaatcaatc aggcagaaat gcccggtgga tgatgcagac gcatcatctc
 5451 ccccgaaaac tgtcccgtgt ctttgcgggt atgccatgac tcctgaacgc
 5501 gtcacccgac ttcgcatgaa ccatgtcaca aatataattg tgtgttcttc
 5551 atttcccctt ccaaagtaca agatagaagg agtgcaaaaa gtcaaagtct
 5601 ccaaggtaat gttattcgat cacaatgtgc catcgcgcggt aagtccaagg
 5651 gaatacagat cttcccagga gtctgtacag gaagtgagta cgacaacgtc
 5701 attgacgcat agccagtttg atctaagcgc cgatggcgag aactgcctg
 5751 tcccgtcaga cctggatgct gacgccccag ccctagaacc ggccctagac
 5801 gacggggcgg tacatacatt accaaccata atcggaaacc ttgcggccgt
 5851 gtctgactgg gtaatgagca ccgtacctgt cgcgcgcgct agaagaagga
 5901 gagggagaaa cctgactgtg acatgtgacg agagagaagg gaatataaca
 5951 cccatggcta gcgtccgatt ctttagagca gagctgtgtc cggccgtaca
 6001 agaaacagcg gagacgcgtg acacagctat ttcccttcag gcaccgcaa
 6051 gtaccaccat ggaactgagc catccaccga tctccttcgg agcaccaagc
 6101 gagacgttcc ccatcacatt tggggacttc gacgaaggag aaatcgaaag
 6151 cttgtcttct gagctactaa ctttcggaga cttcctaccc ggtgaagtgg
 6201 atgatctgac agatagcgac tgggtccacgt gccagacac ggacgacgag
 6251 ttatgactag acagggcgagg tgggtatata ttctcgtcgg aactgggtcc
 6301 aggccattta caacagaagt cggtaacgca gtcagtgtct cgggtaaaca
 6351 ccctggagga agtccacgag gagaagtgtt acccacctaa gctggatgaa
 6401 ttaaaggagc aactactact taagaaactc caggagagtg cgtccatggc
 6451 caatagaagc aggtatcagt cacgcaaagt ggaaaatatg aaagcaacaa
 6501 tcatccagag actaaagaga ggctgtaaac tgtattttaat ggcagagacc
 6551 ccgaaagtcc cgacttatcg gaccatatac ccggcgcctg tgtactcgcc
 6601 tccgatcaat gtccgattgt ccaaccccgga gtccgcagtg gcagcatgta
 6651 atgagttctt agctagaaac tacccaactg tttcatcata ccaaataacc
 6701 gacgagtatg atgcatatct agacatgggt gacgggtcgg agagttgctt
 6751 ggaccgagcg acattcaatc cgtcaaaact taggagctac ccgaaacaac
 6801 atgcttatca cgcgccttct atcagaagcg ctgtaccttc ccattccag
 6851 aacacactac agaatgtact ggcagcagcc acgaaaagga actgcaacgt
 6901 cacacagatg aggggaattac ccactttgga ctcagcagta ttcaacgtgg
 6951 agtgttttta aaaattcgca tgtaaccgag aatactggga agaatttgca
 7001 gccagcccta tcaggataac aactgagaat ctaacaacct atgtcactaa
 7051 actaaagggg ccaaaagcag cagcgtctgt tgcaaaaacc cataatctgc
 7101 tgccactgca ggatgtacca atggataggt tcacagtaga tatgaaaagg
 7151 gatgtgaagg taactcctgg tacaagcat acagaggaaa gacctaagggt

7201 gcagggttata caggcggtctg aacccttggc aacagcgtac ctatgtggaa
 7251 ttcacagaga actggttagg agattgaacg ccgtcctcct acccaatgtg
 7301 catacactat ttgacatgtc tgccgaggac ttcgatgcc a ttatagccgc
 7351 acacttcaag ccaggagacg ctgtttttaga aacggacata gcctcctttg
 7401 ataagagcca agatgattca cttgcgctta ccgccttaat gctgttagaa
 7451 gatttgggag tggatcactc cctgttggac ttgatagagg ctgctttcgg
 7501 agagatttcc agctgtcactc tgccgacagg tacgcgcttc aagttcggcg
 7551 ctatgatgaa atccggtatg ttcctaactc tgttcgtcaa cacgttgtta
 7601 aatatcacca tcgctagccg ggtgttggaa gatcgtctga caaaatccgc
 7651 atgcgcggcc ttcctcggcg acgacaacat aatacatggt gtcgtctccg
 7701 atgaattgat ggcagccaga tgcgctactt ggatgaacat ggaagtgaag
 7751 atcatagatg cagttgtatc ccagaaagct ccttactttt gtggaggggt
 7801 tatactgcat gatactgtga caggaacagc ttgcagagtg gcggaccgcc
 7851 taaaaagggt atttaaattg ggcaaaccgt tagcggcagg tgacgaacaa
 7901 gatgaagaca gaagacgggc gctggctgat gaagtaatca gatggcaacg
 7951 aacagggcta atagatgagc tggagaaagc ggtgtactct aggtacgaag
 8001 tgcagggtat atcagttgcy gtaatgtcca tggccacctt tgcaagctcc
 8051 agatccaact tcgagaagct cagaggaccc gtcataactt tgtacggcgg
 8101 tcctaaatag gtacgcacta cagctaccta ttttgcagaa gccgacagca
 8151 ggtacctaata taccatcag ccataatgtt cccgttccag ccaatgtatc
 8201 cgatgcagcc aatgccctat cgcaaccctg tcgcgggccc gcgcaggccc
 8251 tgggttcccca gaaccgaccc ttttctggcg atgcagggtgc aggaattaac
 8301 ccgctcgatg gctaacctga cgttcaagca acgcccggac gcgccacctg
 8351 agggggccatc cgctaagaaa ccgaagaagg aggcctcgca aaaacagaaa
 8401 gggggaggcc aaggggaaga gaagaagaac caaggggaaga agaaggctaa
 8451 gacagggccg cctaattccga aggcacagaa tggaaacaag aagaagacca
 8501 acaagaaacc aggcaagaga cagcgcgatg tcatgaaatt ggaatctgac
 8551 aagacgttcc caatcatgtt ggaagggaag ataaacggct acgcttgtgt
 8601 ggtcggaggg aagttattca ggccgatgca tgtggaaggc aagatcgaca
 8651 acgacgttct ggccgcgctt aagacgaaga aagcatccaa atacgatctt
 8701 gagtatgcag atgtgccaca gaacatgcgg gccgatacat tcaataacac
 8751 ccatgagaaa cccaaggct attacagctg gcatcatgga gcagtccaat
 8801 atgaaaatgg gcgtttcacg gtgccgaaag gagttggggc caagggagac
 8851 agcggacgac ccattctgga taaccaggga cgggtggctg ctattgtgct
 8901 gggaggtgtg aatgaaggat ctaggacagc ctttccagtc gtcatgtgga
 8951 acgagaaggg agttaccgtg aagtatactc cggagaactg cgagcaatgg
 9001 tcactagtga ccaccatgtg tctgctcgcc aatgtgacgt tcccatgtgc

ES 2 647 662 T3

9051 tcaaccacca atttgctacg acagaaaacc agcagagact ttggccatgc
 9101 tcagcgttaa cggtgacaac cggggctacg atgagctgct ggaagcagct
 9151 gttaagtgcc ccggaaggaa aaggagatcc accgaggagc tgtttaatga
 9201 gtataagcta acgcgccctt acatggccag atgcatcaga tgtgcagttg
 9251 ggagctgcca tagtccaata gcaatcgagg cagtaaagag cgacggggcac
 9301 gacggttatg ttagacttca gacttcctcg cagtatggcc tggattcctc
 9351 cggcaactta aagggcagga ccatgcggta tgacatgcac gggaccatta
 9401 aagagatacc actacatcaa gtgtcactct atacatctcg ccggtgtcac
 9451 attgtggatg ggcacggtta tttcctgctt gccaggtgcc cggcagggga
 9501 ctccatcacc atggaattta agaaagattc cgtcagacac tctgtctcgg
 9551 tgccgtatga agtgaaatth aatcctgtag gcagagaact ctatactcat
 9601 cccccagAAC acggagtaga gcaagcgtgc caagtctacg cacatgatgc
 9651 acagaacaga ggagcttatg tcgagatgca cctcccgggc tcagaagtgg
 9701 acagcagttt ggtttccttg agcggcagtt cagtacccgt gacacctcct
 9751 gatgggacta gcgccctggg ggaatgcgag tgtggcggca caaagatctc
 9801 cgagaccatc aacaagacaa aacagttcag ccagtgcaca aagaaggagc
 9851 agtgcagagc atatcggctg cagaacgata agtgggtgta taattctgac
 9901 aaactgcccA aagcagcggg agccacctta aaaggaaaac tgcattgtccc
 9951 attcttgctg gcagacggca aatgcaccgt gcctctagca ccagaacctA
 10001 tgataacctt cggtttcaga tcagtgtcac tgaaactgca ccctaagaat
 10051 cccacatata taatcaccgg ccaacttgct gatgagcctc actacacgca
 10101 cgagctcata tetgaaccag ctgttaggaa ttttaccgtc accgaaaaag
 10151 ggtgggagtt tgtatgggga aaccacccgc cgaaaagggt ttgggcacag
 10201 gaaacagcac ccggaatcc acatgggcta ccgcacgagg tgataactca
 10251 ttattaccac agatacccta tgtccaccat cctgggtttg tcaatttgtg
 10301 ccgccattgc aaccgtttcc gttgcagcgt ctacctggct gttttgcaga
 10351 tctagagttg cgtgcctaac tccttaccgg ctaacacctA acgctaggat
 10401 accattttgt ctggctgtgc tttgctgcgc ccgcactgcc cgggcccaga
 10451 ccacctggga gtccttgat cacctatgga acaataacca acagatgttc
 10501 tggattcaat tgctgatccc tctggccgcc ttgatcgtag tgactcgcct
 10551 gctcaggtgc gtgtgctgtg tcgtgccttt tttagtcatg gccggcgccg
 10601 caggcgccgg cgctacgag cagcgacca cgatgcgag ccaagcggga
 10651 atctcgtata aactatagt caacagagca ggctacgcac cactccctat
 10701 cagcataaca ccaacaaaga tcaagctgat acctacagtg aacttgaggt
 10751 acgtcacctg ccactacaaa acaggaatgg attcaccagc catcaaatgc

ES 2 647 662 T3

10801 tgcggatctc aggaatgcac tccaacttac aggcctgatg aacagtgcaa
 10851 agtcttcaca ggggtttacc cgttcatgtg ggggtggtgca tattgctttt
 10901 gcgacactga gaacacccaa gtcagcaagg cctacgtaat gaaatctgac
 10951 gactgccttg cggatcatgc tgaagcatat aaagcgcaca cagcctcagt
 11001 gcaggcgttc ctcaacatca cagtgggaga aactcttatt gtgactaccg
 11051 tgtatgtgaa tggagaaact cctgtgaatt tcaatgggggt caaaataact
 11101 gcaggctcgc tttccacagc ttggacaccc tttgatcgca aaatcgtgca
 11151 gtatgccggg gagatctata attatgattt tcctgagtat ggggcaggac
 11201 aaccaggagc atttggagat atacaatcca gaacagctctc aagctctgat
 11251 ctgtatgccca ataccaacct agtgctgcag agacccaaag caggagcgat
 11301 ccacgtgccca tacactcagg caccttcggg ttttgagcaa tggaagaaag
 11351 ataaagctcc atcattgaaa tttaccgcc ctttcggatg cgaaatatat
 11401 acaaacccca ttcgcgcga aaactgtgct gtaggggtcaa ttccattagc
 11451 ctttgacatt cccgacgcct tgttcaccag ggtgtcagaa acaccgacac
 11501 tttcagcggc cgaatgcact cttaacgagt gcgtgtattc ttccgacttt
 11551 ggtgggatcg ccacgggtcaa gtactcggcc agcaagtcag gcaagtgcgc
 11601 agtccatgtg ccatcaggga ctgctaccct aaaagaagca gcagtcgagc
 11651 taaccgagca agggtcggcg actatccatt tctcgaccgc aaatatccac
 11701 ccggagtcca ggctccaaat atgcacatca tatgttacgt gcaaagggtga
 11751 ttgtcacccc ccgaaagacc atattgtgac acaccctcag tatcacgccc
 11801 aaacatttac agccgcggtg tcaaaaaccg cgtggacgtg gttaacatcc
 11851 ctgctgggag gatcagccgt aattattata attggcttgg tgctggctac
 11901 tattgtggcc atgtacgtgc tgaccaacca gaaacataat tga|cttgaca
 11951 actaggtacg aaggtatatg tgtcccctaa gagacacacc acatatagct
 12001 aagaatcaat agataagtat agatcaaagg gctgaacaac ccctgaatag
 12051 taacaaaata taaaaatcaa caaaaatcat aaaatagaaa accagaaaca
 12101 gaagtaggta agaaggtata tgtgtcccct aagagacaca ccatatatag
 12151 ctaagaatca atagataagt atagatcaaa gggctgaata acccctgaat
 12201 aataacaaaa tataaaaatc aataaaaatc ataaaataga aaaccataaa
 12251 cagaagtagt tcaaagggtc ataaaacccc tgaatagtaa caaaacataa
 12301 aactaataaa aatcaaata gaatacataat tggcaatcgg aagagatgta
 12351 ggtacttaag cttcctaaaa gcagccgaac tcgctttgag atgtaggcgt
 12401 agcacaccga actcttccat aattctccga acccagaggg acgtaggaga
 12451 tgttcaaagt ggctataaaa ccctgaacag taataaaaca taaaattaat
 12501 aaggatcaaa tgagtaccat aattggcaaa cggaagagat gtaggtactt
 12551 aagcttccta aaagcagccg aactcacttt gagatgtagg catagcatac

ES 2 647 662 T3

```
12601 cgaactcttc cacaattctc cgtacccata gggacgtagg agatgttatt
12651 ttgttttttaa tatttcAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAGGG TACGCGGCCG
12701 CCACTGTGCT GGATATCTGC AGAATTCCAC CACACTGGAC TAGTGGATCA
12751 GCTTAAGTTT AAACCGCTGA TCAGCCTCGA CTGTGCCTTC TAGTTGCCAG
12801 CCATCTGTTG TTTGCCCCTC CCCCCTGCCT TCCTTGACCC TGGAAGGTGC
12851 CACTCCCACT GTCCTTTCCT AATAAAATGA GGAAATTGCA TCGCATTGTC
12901 TGAGTAGGTG TCATTCTATT CTGGGGGGTG GGGTGGGGCA GGAC
```

Figura 10A
i-DNA™ del VCHIK

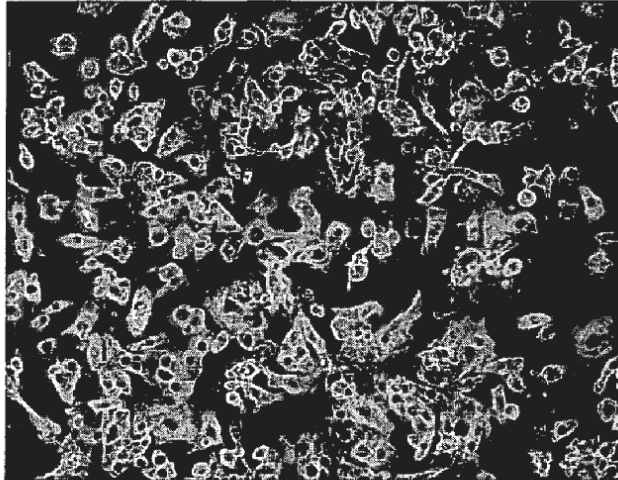


Figura 10B
Control negativo



Figura 10C
i-DNA™ del VCHIK linealizado
utilizando NotI (alto aumento)

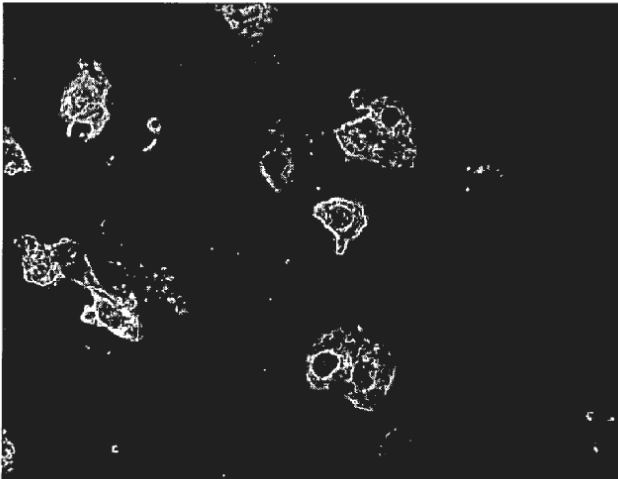


Figura 11A

Virus obtenido de i-DNA™ del VCHIK

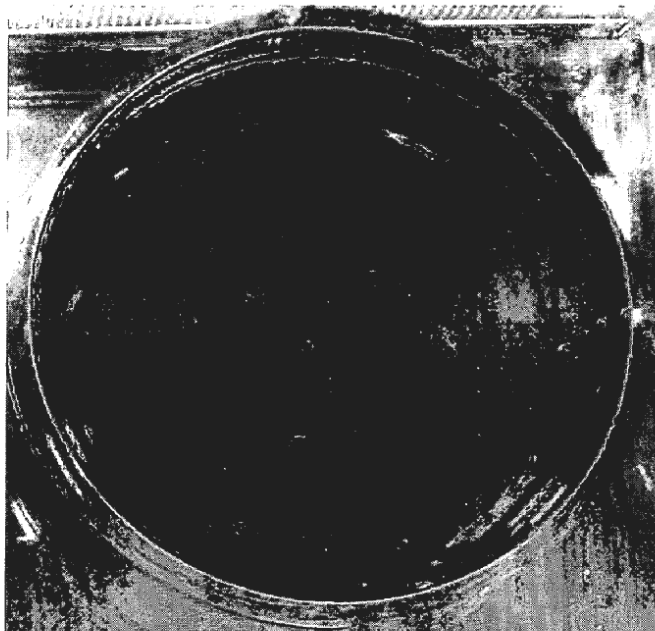


Figura 11B

Vacuna IND de 181/25

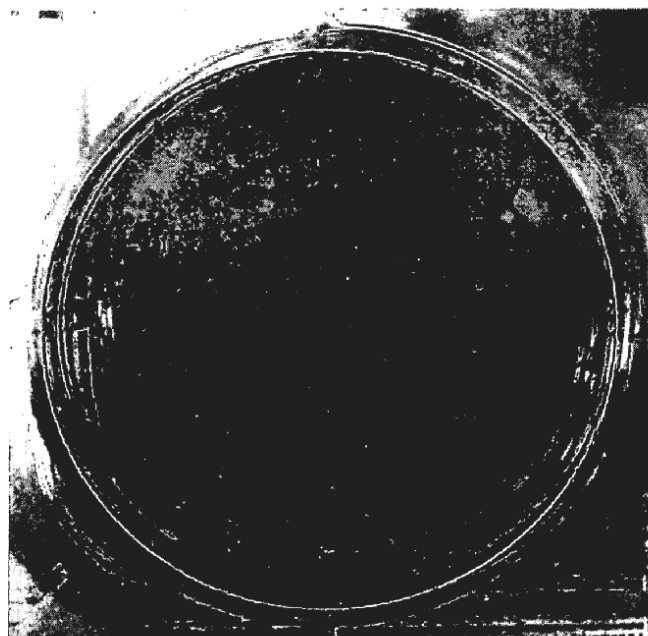


Figura 12

Vacuna IND de 181/25*: Heterogeneidad de secuencia
con reversión al virus virulento

Clon

	301	314	
3.5_23	TGYAVTHHADGFLMCKTTDTVDGERVSFSVCTYVPATICDQMTGILATEVTPEDAQKLLV		126
3.5_53	TGYAVTHHADGFLMCKTTDTVDGERVSFSVCTYVPATICDQMTGILATEVTPEDAQKLLV		127
GB_3412-78	TGYAVTHHADGFLMCKTTDTVDGERVSFSVCTYVPATICDQMTGILATEVTPEDAQKLLV		360
3.5_33	TGYAVTHHADGFLMCKTTDTVDGERVSFSVCTYVPATICDQMTGILATEVTPEDAQKLLV		125
3.5_54	TGYAVTHHADGFLMCKTTDTVDGERVSFSVCTYVPATICDQMTGILATEVTPEDAQKLLV		126
3.5_10	TGYAVTHHADGFLMCKTTDTVDGERVSFSVCTYVPATICDQMTGILATEVTPEDAQKLLV		319
GB VR1 **	TGYAVTHHADGFLMCKTTDTVDGERVSFSVCTYVPATICDQMTGILATEVTPEDAQKLLV		360
4.1_23	TGYAVTHHADGFLMCKTTDTVDGERVSFSVCTYVPATICDQMTGILATEVTPEDAQKLLV		360
GB TH35	TGYAVTHHADGFLMCKTTDTVDGERVSFSVCTYVPATICDQMTGILATEVTPEDAQKLLV		360
GB AF15561	TGYAVTHHADGFLMCKTTDTVDGERVSFSVCTYVPATICDQMTGILATEVTPEDAQKLLV		360
GB_181/25	TGYAVTHHADGFLMCKTTDTVDGERVSFSVCTYVPATICDQMTGILATEVTPEDAQKLLV		360
3.5_40	TGYAVTHHADGFLMCKTTDTVDGERVSFSVCTYVPATICDQMTGILATEVTPEDAQKLLV		319

*****:*****

* Edelman *et al.* PHASE II SAFETY AND IMMUNOGENICITY STUDY OF LIVE CHIKUNGUNYA VIRUS VACCINE TSI-GSD-218. Am. J. Trop. Med. Hyg., 62(6), 2000, pág. 681-685

** Aislado virulento del paciente virémico vacunado con 181/25, EF452494.