

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 755**

51 Int. Cl.:

G01N 33/551 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/541 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.10.2011 PCT/US2011/058457**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.05.2012 WO12058637**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2011 E 11837226 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2017 EP 2633321**

54 Título: **Ensayos de antisueros para virus relacionados con VLM en seres humanos y otros mamíferos**

30 Prioridad:
31.10.2010 US 408630 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.03.2018

73 Titular/es:
**TOCAGEN INC. (100.0%)
3030 Bunker Hill Street Suite 230
San Diego, CA 92109, US**

72 Inventor/es:
**JOLLY, DOUGLAS, J.;
IBANEZ, CARLOS;
PEREZ, OMAR, D. y
GRUBER, HARRY, E.**

74 Agente/Representante:
UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 660 755 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

Ensayos de antisueros para virus relacionados con VLM en seres humanos y otros mamíferos

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un método para detectar anticuerpos antivíricos para el virus anfitriónico de la leucemia murina o un virus relacionado con el virus de la leucemia murina en una muestra biológica. Más generalmente, esta divulgación se refiere a métodos para detectar virus relacionados con el VLM, incluyendo
 10 vectores de replicación retrovíricos, y para detectar respuestas inmunitarias a dichos virus que utilizan partículas víricas completas purificadas como el antígeno diana mediante ELISA, unión competitiva, transferencia Western u otros métodos de detección serológicos. Las partículas purificadas también se pueden utilizar en la estimulación de linfocitos T para detectar respuestas inmunocelulares.

15 Antecedentes

Existen varias necesidades y ventajas que provienen de la capacidad de detectar la presencia de VLM o virus relacionados con el VLM en sujetos humanos o mamíferos. En la actualidad se están desarrollando los primeros
 20 tratamientos que emplean vectores de replicación retrovíricos (RVR) en tratamiento en seres humanos, principalmente para el cáncer (véase el documento WO2010036986 y (www.clinicaltrials.gov NCT01156584) y existe una necesidad de seguir la replicación de los RVR en el torrente sanguíneo en caso de que alcance niveles considerados potencialmente patógenos y justifiquen la intervención farmacológica (por ejemplo, alrededor de varios cientos de miles de copias/ml para el VIH). La seropositividad cuantitativa o semicuantitativa ha sido una forma útil
 25 de seguir las infecciones víricas en curso, en general, y la infección retrovírica, en particular, y proporciona información sobre la infección y la replicación activa de dichos agentes. Sin embargo, los RVR específicos del individuo pueden variar y es posible que se puedan producir cambios en el virus tras una replicación prolongada en seres humanos o animales. Por tanto, es importante que un ensayo para vigilar dichos eventos sea tan amplio como sea posible y no se centre en uno o unos pocos epítomos antigénicos. En segundo lugar, parece muy probable que
 30 algunos individuos puedan estar infectados o haberse infectado con virus relacionados con VLM. Esto se basa en la observación de que un alto nivel de seropositividad en un virus relacionado con el VLM ha mostrado claramente existir en un pequeño porcentaje de individuos (alrededor del 1%). Recientemente, diversas publicaciones sugieren que se han aislado algunos gammaretrovirus exógenos de seres humanos y estos se conocen como XMRV o virus relacionados con VLM (MLVRV, Urisman A, Molinaro R, et al. (2006) PLoS Pathog 2(3): e25., Lombardi V. et al. Science 2009, Lo et al PNAS 2010 (www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1006901107).

El documento US2010167268 divulga métodos para detectar, diagnosticar, vigilar o gestionar una enfermedad relacionada con XMRV tal como una enfermedad neuroinmunitaria relacionada con XMRV tal como un síndrome de
 35 fatiga crónica o un linfoma relacionado con XMRV tal como un linfoma de células del manto en un sujeto.

40 Sumario

La presente invención proporciona un método para detectar anticuerpos antivíricos contra el virus anfitriónico de la leucemia murina (VLM) o un virus relacionado con el virus de la leucemia murina (MLVRV) en una muestra biológica que comprende: a) incubar una muestra de fluido biológico con un reactivo de captura inmovilizado sobre un soporte
 45 sólido para unir al reactivo de captura múltiples anticuerpos antivíricos contra un VLM o MLVRV anfitriónico, donde el reactivo de captura comprende una preparación de partículas víricas completas exentas de suero de VLM o MLVRM; b) detectar los anticuerpos antivíricos unidos al reactivo de captura inmovilizado poniendo en contacto los anticuerpos antivíricos unidos con un agente secundario de detección marcado. En una realización, la muestra biológica se aísla de un mamífero. En una realización adicional, el mamífero es un paciente autoinmunitario, infectado víricamente, inmunodeprimido, o de cáncer. En otra realización más, la muestra biológica se aísla de un ser humano. En una realización adicional, el ser humano es un paciente autoinmunitario, infectado víricamente con
 50 inmunosupresión, o de cáncer. En una realización, el método comprende además medir la cantidad de anticuerpo antivírico, donde la cantidad de anticuerpo se titula utilizando una serie de diluciones; donde la cantidad de anticuerpo determinado es IgG o IgM mediante el uso de reactivos de detección específicos secundarios. En una realización, la muestra biológica es plasma, suero, orina, saliva, hisopo bucal, hisopo nasal, aspiración con aguja fina, semen, secreción vaginal o leche. En otra realización más, el reactivo de captura se inmoviliza a aproximadamente 1,5 µg/ml. En una realización, el soporte sólido es una placa de microvaloración, un porta de vidrio, un porta de nailon, una membrana de nitrocelulosa o una membrana de PVDF. En otra realización, el soporte sólido es una perla de látex, una perla de vidrio o una microsfera. En una realización adicional, el soporte sólido es una punta de pipeta, una tarjeta de microfluidos o un chip semiconductor. En otra realización más, el agente secundario es un anticuerpo secundario que está marcado de forma detectable. En una realización determinada, el método comprende además un control que comprende el mAb 83A25 monoclonal. En una realización adicional, el método comprende además un control que comprende suero o plasma humano de un individuo que es fuertemente seropositivo para el VLM, identificado mediante el cribado de múltiples sueros humanos.

65

ASPECTOS ADICIONALES DE LA DIVULGACIÓN

La divulgación proporciona también un kit de inmunoensayo para detectar anticuerpos antivíricos que comprende: (a) un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a una envoltura anfotrópica como control; y (b) un reactivo de captura que comprende una partícula vírica purificada. En un aspecto de la divulgación, el soporte sólido es una placa de microvaloración. En un aspecto adicional de la divulgación, el soporte sólido es una microesfera. En otro aspecto más de la divulgación, el reactivo de captura es una partícula vírica análoga al VLM. En otro aspecto más de la divulgación, el reactivo de captura es una proteína purificada con origen en el VLM. En otro aspecto más de la divulgación, el reactivo de captura es una proteína recombinante purificada con origen en VLM o una secuencia análoga a VLM. En otro aspecto de la divulgación, el control positivo es suero o plasma humano de un individuo que es fuertemente seropositivo para el antígeno de captura, y dicho suero se ha identificado cribando múltiples sueros humanos. En un aspecto de la divulgación, el anticuerpo detectable es un anticuerpo monoclonal. En otro aspecto adicional de la divulgación, el anticuerpo monoclonal detectable es un anticuerpo monoclonal de murino. En otro aspecto de la divulgación, el anticuerpo detectable es un anticuerpo policlonal. En un aspecto adicional de la divulgación, el anticuerpo policlonal detectable es un anticuerpo policlonal de conejo o cabra u oveja o pollo. En cualquiera de los anteriores aspectos de la divulgación, el kit se usa en un escenario clínico o diagnóstico. En un aspecto de la divulgación, el kit se usa para vigilar las respuestas inmunitarias de los individuos infectados o tratados por VLM o los individuos infectados o tratados con un análogo de VLM.

En cualquiera de los anteriores métodos o kits, la partícula vírica purificada puede producirse mediante un método que comprende transformar una línea de células 293 con un plásmido que codifica un virus VLM retrovírico o un virus análogo a VLM; cultivar la célula 293 para producir partículas víricas; aislar las partículas víricas; infectar una línea de células HT1080 con las partículas víricas produciendo de esta forma la línea de células productora de partículas víricas, producir las partículas víricas y purificar las partículas víricas.

La divulgación proporciona líneas celulares productoras de retrovirus para la producción de partículas de retrovirus competentes para la replicación, comprendiendo la línea de células una línea de células de mamíferos tal como una célula de cáncer de próstata, una línea de linfocitos T, una línea de tumor neural, un fibrosarcoma, un osteosarcoma, una línea de células de timoma, una línea de fibroblastos o una línea de células endoteliales, expresando dicha línea de células de forma estable un genoma retrovírico que comprende un gen *gag*, un gen *pol*, un gen *env*, y un factor *psi* (Ψ) retrovírico para el ensamblaje del vector retrovírico recombinante. En un aspecto de la divulgación, a partícula de retrovirus competente para la replicación se expresa de forma estable. En otro aspecto de la divulgación, la línea de células inmortalizada es una línea de células humana. En otro aspecto de la divulgación, la línea de células se selecciona entre una de las líneas de células LNCAP de tumor de próstata (ATCC n.º CRL-1740, DU145 (ATCC n.º HTB-81), o PC-3 (ATCC n.º CRL-1435); la línea de células HT1080 (ATCC n.º CCL-121); la línea de células U87-MG de glioma humano (ATCC n.º HTB-14); la línea de linfocitos T SupT1 (ATCC n.º CRL-1942); la línea Hela ce carcinoma de cuello de útero humano, la línea de células CV1 de mono verde africano o derivados tales como células COS; las células HEK 293 y derivadas de 293; o las células CHO y derivadas de CHO. En otro aspecto de la divulgación, la línea de células se aisló y expresaba ya el retrovirus. En un aspecto relacionado de la divulgación, la línea de células es 222Rv1 (ATCC CRL-2505, Knouf et al. J.Virol 83: 7353-7356, 2009) lo que hace del XMRV un artefacto recombinante (T.Paprotka, et al. 2011, op.cit.). En otro aspecto de la divulgación, la semivida es mayor de 7 días a 2-8°C. En un aspecto de la divulgación, la secuencia del polinucleótido retrovírico se deriva de uno o más virus de leucemia murina (VLM), el virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV), el MoMLV anfotrópico, el retrovirus relacionado con el VLM xenotrópico (XMRV), el virus relacionado con el VLM (MLVRV) se encuentra en seres humanos, el VLM xenotrópico, el VLM politrópico, el VLM anfotrópico, el virus de la leucemia del mono gibón (GALV), el virus del tumor de mama de murino (MuMTV), el virus del sarcoma de Rous (VSR), el virus de la leucemia del mono gibón (GALV), el virus endógeno del babuino (BEV), el virus RD114 de felino, T5.0002 (documento WO2010045002A2) u otro gamma retrovirus, o los híbridos del anterior. El genoma del retrovirus producido mediante la línea de células productoras o introducido en una línea de células para fabricar una línea de células productoras comprende diversos dominios. Por ejemplo, el promotor puede comprender un promotor de CMV que tiene una secuencia que se muestra en la SEQ ID NO:7, 8 o 9 desde el nucleótido 1 a aproximadamente el nucleótido 582 y puede incluir una modificación en una o más bases de ácidos nucleicos y que es capaz de dirigir e iniciar la transcripción; un polinucleótido del dominio CMV-R-U5 comprende una secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 7, 8 o 9 desde aproximadamente el nucleótido 1 a aproximadamente el nucleótido 1202 o las secuencias que son al menos un 95% idénticas a una secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 7, 8 o 9, donde el polinucleótido promueve la transcripción de una molécula de ácido nucleico unida operativamente a la anterior; el dominio del ácido nucleico *gag* comprende una secuencia desde aproximadamente el nucleótido número 1203 a aproximadamente el nucleótido 2819 de la SEQ ID NO: 7 o 9 o una secuencia que tiene al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 99,8% de identidad con la anterior; el dominio *pol* comprende una secuencia desde aproximadamente el nucleótido número 2820 a aproximadamente el nucleótido 6358 de la SEQ ID NO:7 o 9 o una secuencia que tiene al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 99,8% de identidad con la anterior; el dominio *env* comprende una secuencia desde aproximadamente el número 6359 a aproximadamente el nucleótido 8323 de la SEQ ID NO:7 o 9 o una secuencia que tiene al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 99,8% de identidad con la anterior; la secuencia IRES y el ácido nucleico heterólogo son secuencias extra opcionales que se usan cuando el virus está siendo utilizado como un vector.

La divulgación proporciona también una preparación exenta de células que comprende partículas víricas purificadas obtenida a partir de la línea de células productora de retrovirus descrita en el presente documento. En algunos aspectos de la divulgación, se usa una preparación de partículas víricas aisladas para realizar un ELISA u otro ensayo de unión a anticuerpo para el ensayo en sangre humana o animal, plasma, suero, orina, saliva, hisopo bucal, hisopo nasal, aspiración con aguja fina, semen, secreción vaginal, leche u otro fluido o extracto corporal. Los anticuerpos detectados pueden ser IgM, IgG, IgA, IgE o IgD, dependiendo del tipo de anticuerpo secundario u otro reactivo de unión secundario utilizado en el ensayo.

La divulgación proporciona también un método para construir una línea de células productora de vectores descrita en el presente documento que comprende transformar una línea de células 293 con un plásmido que codifica un vector retrovítico que comprende de 5' a 3': una fusión CMV-R-U5 del promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano en una región R-U5 del VLM; un PBS, un sitio de unión al cebador para la transcriptasa inversa; un sitio 5' de corte y empalme; una señal de empaquetamiento ψ ; una secuencia de codificación gag para el antígeno específico del grupo del VLM; una secuencia de codificación pol para la poliproteína de la polimerasa de VLM; un sitio 3' de corte y empalme; una secuencia de codificación env para la proteína de la envoltura; cultivar la célula 293 para producir partículas víricas; aislar las partículas víricas; infectar una línea de células con las partículas víricas produciendo la línea de células productora de partículas víricas. La divulgación proporciona también plásmidos donde el promotor no es una fusión CMV-R-U5 del promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano en una región R-U5 del VLM, sino que es una fusión de la región r-U5 del VLM con un promotor alternativo tal como el promotor del VSR o el promotor de la actina, o la LTR del VLM con las regiones U3, R y U5. La divulgación proporciona también líneas de células generadas por los métodos anteriores. La divulgación proporciona también líneas productoras de virus, preparadas mediante estos métodos con células HT1080, células PC3, células LNCaP, células SupT1, células U87, células D17, células CF2, células 293, células Hela, células CV1, células CHO o líneas de células derivadas de cualquiera de estas.

La divulgación proporciona también un método para producir una composición para ensayar anticuerpos dirigidos contra retrovirus que comprende cultivar las líneas de células descritas en el presente documento para producir partículas víricas y purificar sustancialmente las partículas víricas.

La divulgación proporciona también bancos de células que comprenden las líneas de células de la divulgación. En algunos aspectos de la divulgación, las líneas de células de la divulgación se hacen crecer en suspensión. En algunos aspectos de la divulgación, las líneas de células de la divulgación se hacen crecer en medio exento de suero. En algunos aspectos de la divulgación, la línea de células se hace crecer en suspensión en medio exento de suero.

Descripción de los dibujos

La **Figura 1** muestra la cinética de la replicación vírica de 22Rv1 en las líneas de células HT1080, U87 y LNCaP. La **Figura 2** muestra la cinética de la replicación vírica de 22Rv1 en las líneas de células PC3 y Sup-T1.

La **Figura 3A-F** muestra (a) un esquema del vector retrovítico recombinante de la divulgación; (b y c) una cartografía plasmídica de un polinucleótido de la divulgación (promotor de CMV: 1 - 582; R:583 - 650; U5:651 - 1202; Sitio de unión al cebador (PBS):728 - 776; sitio 5' de corte y empalme: 788 - 789; gag:1203 - 2819; pol:2820 - 6358; sitio 3' de corte y empalme: 3314 - 3315; 4070A env: 6359 - 8323; EMCV IRES:8327 - 8876; yCD2:8877 - 9353; tracto de poli purina (PPT):9386 - 9404; U3:9405 - 9854; R:9855 - 9921; U5:9922 - 9998; (d y e) una secuencia de un polinucleótido de la divulgación (SEQ ID NO:7); (f) un esquema de una RCR de primera y segunda generación de la divulgación.

La **Figura 4** es un cromatograma que muestra el intercambio aniónico (AEX) del virus de la leucemia murina anfitriónico (MLV), Tocagen Lote n.º: TMLV001. La parte izquierda del cromatograma muestra la carga del sobrenadante del cultivo recogido (la escala x no es cuantitativa). La parte central, que se inicia a aproximadamente 800 ml, muestra un pico de lavado (A1) como resultado de un aumento intermedio en la concentración de NaCl. La parte derecha del cromatograma muestra la elución, eluyendo el pico diana principal (A2) desde la columna AEX exactamente antes de los 1400 ml.

La **Figura 5** muestra un cromatograma que muestra la exclusión por tamaño (SEC) del VLM anfitriónico. La parte izquierda del cromatograma muestra una columna de SEC precargada destinada al cebado de la resina de cromatografía con el fin de minimizar la pérdida debida a las interacciones no deseadas entre la diana y la resina de cromatografía (Pico precargado: S1). La parte derecha del cromatograma muestra la carga real y la elución isocrática del VLM diana. El pico diana principal (S2) se encuentra a aproximadamente 250 ml y excluye específicamente el pico residual comenzando desde alrededor de 260-270 ml (S3).

La **Figura 6** muestra un SDS-PAGE con tinción de plata que muestra (T) el virus de la leucemia murina anfitriónico natural purificado (VLM), Tocagen Lote n.º: TMLV001 y, (N) el HT1080 no expuesto a tratamiento anteriormente procesado de forma idéntica. Tocagen Lote n.º: TMLV001 y (N) HT1080 no expuesto a tratamiento anteriormente procesado (N) tratado utilizando el proceso idéntico. Se realizó el análisis SDS-PAGE en condiciones de reducción y tinción de plata posterior. Las muestras son, de izquierda a derecha: (N) HT1080 no expuesto a tratamiento anteriormente cultivado y procesado de forma análoga a TMLV001 (hilera derecha), (L) Invitrogen Benchmark Protein Ladder (véase el panel de la derecha para los tamaños de proteínas), (T) VLM anfitriónico natural purificado (Tocagen TMLV001; de HT1080) que tiene un título de UT de $5,4 \times 10^8$ /ml.

La **Figura 7** muestra una curva de respuesta a la dosis del control positivo del ensayo. Se determinó la reactividad del control positivo del ensayo utilizando un cóctel de un anticuerpo dirigido contra Ig de rata y un anticuerpo dirigido contra IgG humana conjugado con HRP.

La **Figura 8A-C** muestra las curvas de respuesta a la dosis de 83A25 y suero humano (HS) solo o en combinación con diferentes anticuerpos secundarios. Se evaluó la reactividad del mAb 83A25 y HS en el ensayo ELISA dirigido contra el VLM humano y se desarrollaron anticuerpos dirigidos contra Ig de rata, o anticuerpos dirigidos contra IgG humana conjugados con HRP solos y en el cóctel de conjugados. A) anticuerpo 83A25 solo: círculo blanco, anticuerpo dirigido contra Ig de rata, cuadrado negro, anticuerpo dirigido contra Ig de rata + anticuerpo dirigido contra Ig humana, triángulo negro, anticuerpo dirigido contra Ig humana, B) anticuerpo 83A25 enriquecido en HS: círculo blanco, anticuerpo dirigido contra Ig de rata, cuadrado negro, anticuerpo dirigido contra Ig de rata + anticuerpo dirigido contra Ig humana, triángulo negro, anticuerpo dirigido contra Ig humana y C) HS solo: círculo blanco, anticuerpo dirigido contra Ig de rata, cuadrado negro, anticuerpo dirigido contra Ig de rata + anticuerpo dirigido contra Ig humana, triángulo negro, anticuerpo dirigido contra Ig humana. Se ensayó un factor de dilución 1:5 comenzando en la dilución 1:100.

La **Figura 9** muestra los plasmas seleccionados a partir de las muestras cribadas para generar el control negativo de ELISA y el control positivo de ELISA y para el ensayo de la transferencia Western. Se seleccionaron plasmas humanos con valores de DO_{450} nm intermedios y altos para el análisis de antígenos dirigidos contra el VLM utilizando transferencia Western (barras rayadas). Se muestran también los plasmas seleccionados para generar el control negativo (barras negras). Las muestras se presentan en relación con todos los plasmas cribados utilizando el ELISA dirigido contra el VLM.

La **Figura 10** muestra la confirmación de la presencia de anticuerpos dirigidos contra el VLM en muestras de plasma humano mediante el análisis de transferencia Western. Los plasmas con valores altos (131, 194), intermedios (856A, 183) o bajos (NC) significan valores de DO a 450 nm analizados mediante ELISA que se sometieron a ensayo para determinar la presencia de anticuerpos dirigidos contra VLM. Los lisados celulares de células HT1080 y BSA purificado se incluyeron en el ensayo como controles de hileras.

La **Figura 11** muestra las curvas de titulación de un plasma de control positivo humano (PC) que se generaron a partir del donante 131 en el ELISA dirigido contra el VLM. Se ensayaron las diluciones de plasma PC (Lote n.º OT11DV-68-30) y se representaron gráficamente frente a los valores promedio calculados de la DO a 450 nm para dos réplicas separadas. Se calculó el título de PC a 1:250 para dos réplicas del PC. Se usó un control de especie emparejado humano como el control positivo en el ELISA dirigido contra VLM para muestras humanas.

La **Figura 12** muestra una comparativa de la detección de anticuerpos en sueros recogidos en el día 36, el día 44 y los sueros d36+d44 combinados de perros inmunizados. El suero positivo de perros inmunizados y el suero negativo de perros no inmunizados se sometieron a ensayo para determinar los anticuerpos IgG dirigidos contra VLM utilizando el antígeno de captura del VLM. El eje X representa la serie de diluciones y las unidades de absorbancia (DO) se representan en el eje Y. Se llevó a cabo un análisis de ajuste de 4 parámetros en el software Spectramax. Los parámetros de la ecuación $[Y=(A-D)/(1+(x/C)^B) + D]$ se relacionan en la figura. Señalar que el parámetro "C" es una notación de salida directa de la máquina y la designación "e" es equivalente a las designaciones de "E" en el documento. R^2 es el valor de la eficacia del ajuste de datos.

La **Figura 13** muestra una respuesta a la dosis del control del suero positivo para algunos experimentos. Se llevó a cabo un análisis de ajuste de 4 parámetros en el software Spectramax. Los parámetros de la ecuación $[Y=(A-D)/(1+(x/C)^B) + D]$ se relacionan en la figura. Señalar que el parámetro "C" es una notación de salida directa de la máquina y la designación "e" es equivalente a las designaciones de "E" en el documento. R^2 es el valor de la eficacia del ajuste de datos.

La **Figura 14** muestra una respuesta a la dosis de un ensayo de control de suero positivo para algunos experimentos; se llevó a cabo el análisis de ajuste de 4 parámetros en el software Spectramax. Los parámetros de la ecuación $[Y=(A-D)/(1+(x/C)^B) + D]$ se relacionan en la figura. Señalar que el parámetro "C" es una notación de salida directa de la máquina y la designación "e" es equivalente a las designaciones de "E" en el documento. R^2 es el valor de la eficacia del ajuste de datos.

La **Figura 15** representa gráficamente el título de una IgG dirigida contra el vector para sujetos caninos a los que se administró IC con una dosis de Toca 511 E7.

La **Figura 16** representa gráficamente el título de una IgG dirigida contra el vector para sujetos caninos a los que se administró IV con una dosis de Toca 511 E9. Los valores iniciales de los días 7, 14, 28, 60, y 90 se presentan en la figura.

La **Figura 17** muestra una inmunotransferencia que muestra las diluciones víricas y las transferencias de plasma enriquecido.

La **Figura 18** muestra la detección de la expresión de gp70 vírico en muestras de VLM y XMRV utilizando el anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra gp70 (clon 514) mediante transferencia Western.

La **Figura 19** muestra las secuencias y alineaciones de una "Query" de VLM (SEQ ID NO:10) y "sbjct" de XMRV (SEQ ID NO:11) útiles en los métodos y composiciones de la divulgación.

La **Figura 20A-B** muestra el curso de aparición y desaparición de las secuencias de ADN y ARN de Toca 511, más las mediciones de ELISA relacionadas utilizando el ensayo de la presente invención, en la sangre de tres pacientes de glioma de grado alto que recibieron una dosis intracraneal en su tumor a una dosificación de $2,6 \times 10^3$ UT/gramo de cerebro. A: paciente 101; B paciente 102; C paciente 103. Pt101 y 102 muestran secuencias de ácidos nucleicos detectables (sensibilidad 5000 copias/ml para el ARN en plasma, 250 copias/microgramo para el ADN de sangre completa), mientras que Pt 103 no muestra secuencias detectables. Todos los pacientes mostraron positividad para ELISA usando las composiciones y métodos de la divulgación (triángulos).

Descripción detallada

Tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un/a", "y", y "el" incluyen las referencias plurales salvo que el contexto indique claramente otra cosa. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye una pluralidad de dichas células y la referencia al "vector" incluye la referencia a uno o más vectores, y así sucesivamente.

A no ser que se defina de otra forma, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente una persona normalmente experta en la materia a la cual pertenece esta divulgación.

Asimismo, el uso de "o" significa "y/o" a no ser que se indique otra cosa. De manera similar, "comprende", "comprenden", "que comprende" "incluye", "incluyen" y "que incluye", es indistinto y no se pretende que sea limitante.

Debe entenderse además que, cuando las descripciones de diversas realizaciones utilizan el término "que comprende", los expertos en la materia entenderán que, en algunos casos específicos, una realización puede describirse alternativamente utilizando el lenguaje "consiste esencialmente en" o "consiste en".

Los retrovirus se han clasificado de diversas maneras, pero la nomenclatura se ha normalizado en la última década (véase ICTVdB - The Universal Virus Database, v 4 en el sitio web (www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/) y el libro de texto "Retroviruses," Eds. Coffin, Hughs y Varmus, Cold Spring Harbor Press 1997. Un retrovirus competente para la replicación se deriva de la familia de virus Retroviridae y puede comprender un miembro de la subfamilia Orthoretrovirinae, o más normalmente comprende un retrovirus del género gammaretrovirus. En un aspecto de la divulgación, el virus comprende un retrovirus competente para la replicación que es un vector de replicación retrovírico (RVR), que, a su vez, comprende un sitio 5' interno de entrada al ribosoma (IRES) para un polinucleótido que codifica una citosina desaminasa. En un aspecto de la divulgación, el polinucleótido que codifica una citosina desaminasa se encuentra en 3' con respecto a un polinucleótido env de un vector retrovírico.

La divulgación proporciona retrovirus de muchos tipos como reactivos de inmunorreactividad. El retrovirus utilizado en la divulgación puede ser un retrovirus natural o bien retrovirus modificados derivados de diversos miembros de la familia. La clasificación de la familia retroviridae ha cambiado varias veces durante los últimos diez a quince años. Actualmente, la familia Retroviridae consiste en dos subfamilias: la Spumaretrovirinae, que tiene un único género, el espumavirus (o virus espumosos) tales como el virus espumoso humano y de simio (HVF) y la subfamilia Orthoretrovirinae que tiene 6 géneros -betaretrovirus (por ejemplo, MMTV), gammaretrovirus (por ejemplo, VLM), alfaretrovirus (por ejemplo, ALV), deltaretrovirus (por ejemplo, BLV y HTLV-1), lentivirus (por ejemplo, VIH 1) y épsilon retrovirus (por ejemplo, virus del sarcoma dérmico de la pared del ojo). Estas clasificaciones se realizan sobre la base de características moleculares comunes tales como los marcos de lectura relativos para *gag*, *pol* y *env*, el procesamiento de las poliproteínas, los ARNt individuales utilizados para el cebado de la transcripción inversa, y la naturaleza de las estructuras LTR. El método original de clasificación de los retrovirus era en los grupos A, B, C y D sobre la base de la morfología de partículas, tal como se observan al microscopio electrónico durante la maduración vírica. Las partículas de tipo A representan las partículas inmaduras de los virus del tipo B y D observados en el citoplasma de las células infectadas. Estas partículas no son infecciosas. Las partículas de tipo B brotan como viriones maduros de la membrana plasmática envolviendo las partículas de tipo A intracitoplasmáticas. En la membrana poseen un núcleo toroidal de 75 nm, a partir del cual proyectan largas espigas de glicoproteínas. Tras el brote, las partículas de tipo B contienen un núcleo denso en electrones localizado excéntricamente. Los betaretrovirus, el virus del tumor de mama de ratón (MMTV), tiene una morfología de tipo B, pero los betaretrovirus pueden tener también una estructura de tipo D. Las partículas de tipo D se asemejan a partículas de tipo B en que muestran estructuras de tipo anular en el citoplasma celular infectado, que brotan desde la superficie celular, pero el virión incorpora espigas de glicoproteínas superficiales cortas. Los núcleos densos en electrones se localizan también excéntricamente en el interior de las partículas. El virus Mason Pfizer del mono (MPMV), también un betaretrovirus, es el prototipo de virus de tipo D. Las partículas intracitoplásmicas no se pueden observar en células infectadas por los virus de tipo C. En cambio, las partículas maduras brotan directamente de la superficie celular mediante una condensación en forma de 'C' creciente que a continuación se cierra sobre sí misma y queda encerrada por la membrana plasmática. Las espigas de glicoproteínas de la envoltura pueden ser visibles, junto con un núcleo uniformemente denso en electrones. El brote puede producirse desde la superficie de la membrana plasmática o directamente en el interior de vacuolas intracelulares. Los alfaretrovirus, gammaretrovirus, deltaretrovirus y épsiloretrovirus tienen, todos ellos, el aspecto estructural de tipo C.

Los retrovirus se definen por la manera donde se replica su material genético. Durante la replicación, el ARN se convierte en ADN. Tras la infección de la célula, se genera una molécula bicatenaria de ADN a partir de las dos moléculas de ARN que transporta la partícula vírica mediante el proceso molecular conocido como transcripción inversa. La forma de ADN queda integrada covalentemente en el genoma de la célula hospedadora como un provirus, a partir del cual los ARN víricos se expresan con la ayuda de factores celulares y/o víricos. Los ARN víricos expresados se empaquetan en partículas y se liberan como un virión infeccioso.

- La partícula de retrovirus está compuesta por dos moléculas de ARN idénticas. Cada genoma natural tiene una molécula de ARN monocatenario de sentido positivo, que está protegida en el extremo 5' y poliadenilada en la cola 3'. La partícula de virus diploide contiene las dos hebras de ARN complejadas con proteínas gag, enzimas víricas (productos del gen pol) y moléculas de ARNt hospedador en una estructura de 'núcleo' de proteínas gag. Rodeando y protegiendo esta cápsida hay una bicapa lipídica, derivada de las membranas de células hospedadoras y que contiene proteínas de la envoltura vírica (env). Las proteínas env se unen a un receptor celular del virus y la partícula penetra normalmente en la célula hospedadora mediante endocitosis mediada por receptor y/o fusión de membranas.
- Después que la envoltura exterior se rompe, el ARN vírico se copia a ADN mediante transcripción inversa. Esta está catalizada por la enzima transcriptasa inversa codificada por la región pol y utiliza el ARNt de la célula hospedadora empaquetado en el virión como cebador para la síntesis de ADN. De esta manera, el genoma del ARN se convierte en el genoma de ADN más complejo.
- El ADN lineal bicatenario producido mediante transcripción inversa puede estar, o no en forma circular en el núcleo. Ahora, el provirus tiene dos repeticiones idénticas en ambos extremos, conocidas como repeticiones terminales largas (LTR). Los extremos de las dos secuencias LTR producen el sitio reconocido por un producto pol -la proteína integrasa- que cataliza la integración, de tal manera que el provirus está siempre unido a dos pares de bases (pb) del ADN hospedador procedentes de los extremos de las LTR. Se observa una duplicación de las secuencias celulares en los extremos de ambas LTR, reminiscencia del modelo de integración de los elementos genéticos susceptibles de transposición. Se produce la integración en un gran número de sitios en el genoma de la célula diana, con sesgos que dependen del tipo de retrovirus y del tipo de célula. Sin embargo, modificando el componente integrasa (int) del gen pol (véase a continuación) es posible controlar o dirigir parcialmente la integración de un genoma retrovírico.
- La transcripción, el corte y empalme del ARN y la traducción del ADN vírico integrado están mediadas por las proteínas de la célula hospedadora. Se generaron transcritos cortados y empalmados de forma diversa. En el caso de los retrovirus humanos VIH-1/2 y HTLV-I/II, se utilizaron también proteínas víricas para regular la expresión génica. La interacción entre factores celulares y víricos es un factor en el control de la latencia del virus y la secuencia temporal donde se expresan los genes víricos.
- Los retrovirus pueden transmitirse horizontal y verticalmente. La transmisión infecciosa eficaz de los retrovirus requiere la expresión sobre la célula diana de receptores que reconocen específicamente las proteínas de la envoltura vírica, aunque los virus pueden utilizar rutas de entrada no específicas independientes del receptor baja eficacia. Asimismo, el tipo de célula diana debe ser capaz de soportar todas las etapas del ciclo de replicación una vez que el virus se ha unido y penetrado. La transmisión vertical se produce cuando el genoma vírico queda integrado en la línea germinal del hospedador. A continuación, el provirus pasará de una generación a otra como si fuera un gen celular. Por tanto, se establecen provirus endógenos que a menudo se encuentran latentes, pero que pueden activarse cuando el hospedador se expone a los agentes adecuados.
- Como se ha mencionado anteriormente, el ADN intermedio integrado se denomina provirus. Como se describe a continuación, no se requiere un virus auxiliar para la producción del retrovirus recombinante de la divulgación, ya que se proporcionan secuencias para la encapsidación en el genoma proporcionando de esta forma un vector retrovírico competente para la replicación para la administración o el tratamiento génico.
- El genoma retrovírico y el ADN provírico de la divulgación tienen al menos tres genes: el gag, el pol, y el env, estos genes pueden estar flanqueados por una o dos repeticiones terminales largas (LTR) o, en el provirus, están flanqueados por dos repeticiones terminales largas (LTR) y las secuencias que contienen las secuencias que actúan en cis tales como psi. El gen gag codifica las proteínas estructurales internas (matriz, cápsida y nucleocápsida); el gen pol codifica la ADN polimerasa dirigida al ARN (transcriptasa inversa), la proteasa y la integrasa; y el gen env codifica las glicoproteínas de la envoltura vírica. Las LTR 5' y/o 3' promueven la transcripción y la poliadenilación del ARN de los viriones. La LTR contiene el resto de secuencias que actúan en cis necesarias para la replicación vírica. Todos estos componentes están presentes en las partículas víricas de la divulgación actual junto con una molécula de ARNt y la membrana vírica derivada de la célula hospedadora que produjo el virus. El producto del gen env está incluido en la membrana de la envoltura vírica, junto con algunas moléculas de la superficie celular procedentes de la célula productora. El gen de la envoltura está muy fuertemente glicosilado en un modelo característico que está bastante normalizado, pero dependerá de la célula productora. Por estos motivos, las partículas víricas producidas para detectar anticuerpos en seres humanos suelen fabricarse mejor en líneas de células humanas, pero puede ser ventajoso preparar el virus en células de otras especies tales como de perro (por ejemplo, células D17 o Cf2) para descartar la detección de dichas autoproteínas, por ejemplo, en sujetos humanos con autoinmunidad por reactividad cruzada. Los lentivirus tienen genes adicionales que incluyen vif, vpr, tat, rev, vpu, nef, y vpx (en VIH-1, VIH-2 y/o VIS), y algunos de estos pueden incorporarse a las partículas víricas (por ejemplo, vif y nef).
- Adyacentes a las LTR 5' se encuentran las secuencias necesarias para la transcripción inversa del genoma (el sitio de unión al cebador del ARNt) y para la encapsidación eficaz del ARN vírico en partículas (el sitio Psi). Si las secuencias necesarias para la encapsidación (o el empaquetamiento del ARN retrovírico en el virión infeccioso)

desaparecen del genoma vírico, el resultado es un defecto en cis que evita la encapsidación del ARN vírico genómico. La divulgación proporciona un retrovirus recombinante capaz de infectar una célula que no está en división, una célula en división, o una célula que tiene un trastorno de proliferación celular. El retrovirus competente para la replicación recombinante de la divulgación comprende una secuencia de polinucleótido que codifica un GAG vírico, un POL vírico, un ENV vírico, y opcionalmente un polinucleótido heterólogo que se expresa después que el vector vírico infecta una célula diana, encapsulado en un virión.

Dependiendo del uso previsto del vector retrovírico de la divulgación, cualquier número de polinucleótidos heterólogos o secuencias de ácidos nucleicos pueden insertarse en el vector retrovírico. Se proporcionan algunos ejemplos en la solicitud de patente internacional n.º WO2010/036986.

Como se ha mencionado en otra parte en el presente documento, se piensa que el mismo XMRV es un artefacto producido por la contaminación de las muestras por ADN de ratón y la recombinación de los aislados xenotrópicos de laboratorio (T.Paprotka, et al. "Recombinant Origin of the Retrovirus XMRV" *Science* 333, 97 (2011); J.Cohen & M.Enserink "False Positive" *Science* 333: 1694-1701 (2011); G. Simmons et al. "Failure to Confirm XMRV/MLVs in the Blood of Patients with Chronic Fatigue Syndrome: A Multi-Laboratory Study," (www.sciencexpress.org/10.1126/science.1213841). Sin embargo, como se demuestra aquí (véanse, por ejemplo, las Figuras 9 y 10, Ejemplos 15 y 16, y Tabla 7) existen individuos con un elevado número de títulos anti-VLM que se producen naturalmente, indicando que la infección por VLM de seres humanos con virus relacionados con VLM existe y se produce. Por tanto, en esta solicitud, XMRV se utiliza como un ejemplo de cómo dicho virus puede detectarse y seguirse. Como se ha señalado anteriormente, un método para vigilar las infecciones retrovíricas es observar los anticuerpos de las proteínas víricas en la sangre/suero/plasma de los individuos sospechosos de estar infectados o bien analizarse por un motivo u otros (donación de sangre, progresión de la carga vírica, vigilancia de la enfermedad, vigilancia terapéutica del tratamiento retrovírico, etc.). Normalmente, el antígeno utilizado en dichos ensayos está preparado en bacterias, baculovirus o células de mamíferos. Estos antígenos se utilizan a continuación en ELISA u otros ensayos de unión a anticuerpos, con la proteína como diana y el suero o plasma de los sujetos ensayados para determinar la reactividad con los antígenos específicos. Es deseable poder rastrear la presencia o ausencia de reactividad en el suero ya que esto está normalmente bien correlacionado con el aumento o la disminución de la presencia del virus en individuos infectados. Sin embargo, el uso de péptidos o proteínas como dianas de ensayo puede tener uso limitado en la detección de un conjunto heterogéneo de virus relacionados tales como los representados por los virus relacionados el VLM (MLVRV), ya que reduce indeseablemente el conjunto de virus que detectará el ensayo.

Asimismo, los antígenos sintetizados solos, incluso en células de mamíferos, no incorporarán las estructuras tridimensionales del virus producido in vivo, y pueden modificarse de forma inadecuada o carecer de una modificación adecuada. Esto puede conducir a falsos negativos. Recientemente, se han diseñado ensayos específicos de péptidos para XMRV (Qiu et al., *Retrovirology*, 7:68, 2010) y es improbable detectar todas las variantes análogas al VLM. También se han diseñado ensayos utilizando lisados celulares de células infectadas retrovíricamente, pero estos utilizan preparaciones brutas no purificadas y, a diferencia de la presente divulgación, no se detectaron muestras positivas (Switzer et al. *Retrovirology*, 7:57, 2010), debido probablemente a la interferencia y a un alto fondo.

El ciclo de vida de los retrovirus implica una etapa cuando el material genético del virus se inserta en el genoma de una célula hospedadora. Esta etapa es esencial debido a que el ácido nucleico vírico insertado, el provirus, se replica mediante la maquinaria de la célula hospedadora. Como parte de este proceso, el genoma de ARN del retrovirus se replica a través de un intermedio de ADN bicatenario antes de la inserción en el genoma de la célula hospedadora. La conversión inicial de la molécula de ARN vírico en una molécula de ADN bicatenario (ADNbc) se lleva a cabo mediante una transcriptasa inversa. El ADNbc se integra a continuación en el genoma de la célula hospedadora mediante una integrasa para replicarse adicionalmente por la maquinaria celular hospedadora. La transcriptasa inversa y la integrasa requeridas para la conversión del ARN en ADNbc y para la integración en el genoma hospedador se incluyen en la partícula vírica durante la infección. El ADN provírico se transcribe finalmente utilizando la maquinaria del hospedador en múltiples copias de ARN. Estas moléculas de ARN se traducen a continuación en péptidos o proteínas víricas o se integran en partículas víricas que se liberan desde la célula al medio o al medio extracelular.

Un genoma de ARN retrovírico comprende usualmente 6 regiones típicas que conducen a la expresión de múltiples proteínas. Esta región incluye las secuencias de los genes *gag*, *pol* y *env* asociadas con la señal de empaquetamiento, una señal psi (ψ) y flanqueadas por las regiones de repeticiones terminales largas 5' y/o 3' (LTR). El gen *gag* conduce a la expresión de los componentes de las proteínas del núcleo de las nucleoproteínas del virus, mientras que los productos del gen *pol* están implicados en la síntesis de polinucleótidos y en la recombinación. El gen *env* codifica los componentes de la envoltura de la partícula retrovírica. Las regiones LTR en 5' y 3' incluyen promotores y ayudan en la integración del genoma vírico en el ADN cromosómico de la célula hospedadora. La señal psi se refiere a la señal de empaquetamiento retrovírico que controla el empaquetamiento eficaz del ARN en la partícula vírica. Debido a su capacidad para formar provirus, los retrovirus son también útiles para modificar el genoma de una célula diana u hospedadora y se han realizado diversas modificaciones para utilizar los retrovirus en terapia génica. La terapia génica que utiliza vectores retrovíricos se lleva a cabo generalmente añadiendo un

polinucleótido heterólogo al genoma vírico que codifica o produce un polipéptido o transcrito de interés, empaquetando el genoma recombinante en una partícula vírica e infectando una célula hospedadora diana. A continuación, la célula diana incorporará el gen exógeno como parte de un provirus.

- 5 Los vectores retrovíricos anteriormente defectivos se han utilizado como antígenos diana para observar la respuesta inmunitaria tras la administración de vectores víricos no replicativos (Martineau et al. Human Gene Ther. 8:1231-1241, 1997). Puede ser útil el uso de antígenos individuales como se ha descrito anteriormente, pero dada la variación de tipo de VLM con los cuales pueden infectarse los individuos, el enfoque de antígeno único diana corre el riesgo de ser demasiado específico, y no detectar un positivo verdadero. Sin embargo, poco se ha notificado acerca del desarrollo de sistemas de vectores retrovíricos competentes para la replicación. Los métodos descritos aquí permiten la vigilancia inmunitaria de los vectores víricos competentes para la replicación y su persistencia.

15 Se pretende que el término "RCR" o "RVR" como se usa en el presente documento signifique un retrovirus competente para la replicación (RCR) o un retrovirus replicante (RVR). Un virus competente para la replicación es una partícula vírica que tiene la capacidad de replicarse por sí misma en una célula hospedadora. Algunos RVR/RCR pueden transportar un gen heterólogo.

20 Como se usa en el presente documento, la expresión "vector plásmido de RCR" significa un plásmido que incluye todo o parte de un genoma retrovírico que incluye las secuencias de repeticiones terminales largas (LTR) retrovíricas 5' y 3', una señal de empaquetamiento (ψ), y puede incluir uno o más polinucleótidos que codifican proteína(s) o polipéptido(s) de interés, tal como un agente terapéutico o un marcador seleccionable. El término "terapéutico" se utiliza en un sentido genérico e incluye agentes de tratamiento, agentes profilácticos, y agentes de sustitución.

25 Los términos "vector", "construcción de vector" y "vector de expresión" significan el vehículo por el cual una secuencia de ADN o ARN (por ejemplo, un gen extraño) se puede introducir en una célula hospedadora, con el fin de transformar el hospedador y promover la expresión (por ejemplo, la transcripción y la traducción) de la secuencia introducida. Los vectores comprenden normalmente el ADN de un agente transmisible, donde el ADN extraño que codifica una proteína se inserta mediante la tecnología de la enzima de restricción. Un tipo común de vector es un "plásmido", que generalmente es una molécula de ADN bicatenario autocontenida que puede aceptar fácilmente el ADN (extraño) adicional y que se puede introducir fácilmente en una célula hospedadora adecuada. Se han descrito un gran número de vectores, incluyendo plásmidos y vectores fúngicos, para la replicación y/o la expresión en una variedad de hospedadores eucariotas y procariotas. Los ejemplos no limitantes incluyen plásmidos pKK (Clonotech), plásmidos pUC, plásmidos pET (Novagen, Inc., Madison, Wis.), plásmidos pRSET o pREP (Invitrogen, San Diego, Calif.), o plásmidos pMAL (New England Biolabs, Beverly, Mass.), y muchas células hospedadoras adecuadas, utilizando los métodos divulgados o citados en el presente documento o conocidos de otra manera por los expertos en la materia en la técnica relevante. Los vectores de clonación recombinantes incluirán a menudo uno o más sistemas de replicación para la clonación o la expresión, uno o más marcadores para la selección en el hospedador, por ejemplo, resistencia a antibióticos, y uno o más casetes de expresión.

40 Se pretende que los términos "transfectar" o "transfección" como se usan en el presente documento signifiquen la transferencia de al menos un ácido nucleico exógeno en una célula. El ácido nucleico puede ser ARN, ADN o una combinación de ambos. El ácido nucleico exógeno se refiere a un ácido nucleico que no se encuentra como resultado de la división de la célula hospedadora o la multiplicación de la célula hospedadora.

45 Se pretende que el término "virus", como se usa en el presente documento signifique el virus físico o la partícula retrovírica.

50 La expresión "línea de células", como se usa en el presente documento, se refiere a células cultivadas que se pueden pasar (divididas) más de una vez. La divulgación se refiere a líneas de células que se pueden pasar más de 2 veces, hasta 200 veces, o más, e incluyen cualquier número entero incluido en el intervalo.

55 Los términos "expresa" y "expresión" significan permitir u ocasionar que la información en un gen o secuencia de ADN llegue a manifestarse, por ejemplo, producir una proteína activando las funciones celulares implicadas en la transcripción y la traducción de un gen o secuencia de ADN correspondiente. Una secuencia de ADN se expresa en o mediante una célula para formar un "producto de expresión" tal como una proteína. El producto de expresión por sí mismo, por ejemplo, la proteína resultante, también puede decirse que se "expresa" por la célula. Un polinucleótido o polipéptido se expresa de forma recombinante, por ejemplo, cuando se expresa o produce en una célula hospedadora extraña bajo el control de un promotor extraño o nativo, o en una célula hospedadora nativa bajo el control de un promotor extraño.

60 Se pretende que las expresiones "expresión estable" y "expresar de forma estable", como se usan en el presente documento, signifiquen que el material genético se está expresando de forma estable y/o está integrado permanentemente y de forma estable en el genoma de la célula hospedadora y, por tanto, tiene la misma expresión potencial en el tiempo que el material genético nativo de la célula hospedadora.

65 Se pretende que las expresiones "expresión transitoria" y "expresar de forma transitoria" como se usan en el

presente documento, signifiquen que el periodo de expresión temporal del material genético y/o no está integrado permanentemente y de forma estable en el genoma de la célula hospedadora y, por tanto, no tiene la misma expresión potencial en el tiempo que el material genético nativo de la célula hospedadora.

5 Como se usa en el presente documento, el término "heterólogo" en la secuencia de ácido nucleico o transgén se refiere a (i) una secuencia que no existe normalmente en un retrovirus natural, (ii) una secuencia que se origina de una especie extraña, o (iii) si procede de la misma especie, puede modificarse sustancialmente a partir de su forma original. Como alternativa, una secuencia de ácido nucleico sin cambiar que no se expresa normalmente en una célula es una secuencia de ácido nucleico heteróloga.

10 El término "terapéutico" como se usa en el presente documento se refiere a una acción que previene, invierte, o retrasa el curso natural de una enfermedad o trastorno, o sus síntomas. Una acción terapéutica puede ser preventiva, curativa o meramente paliativa, y no significa que el paciente humano o animal afectado no muera a causa de la enfermedad.

15 La expresión virus relacionado con VLM (MLVRV) se refiere a un retrovirus que infecta tanto por transmisión natural como por administración intencionada a una especie que o sea un roedor y tiene al menos un 60% de homología con al menos una de la LTR, Gag, pol, integrasa, la envoltura o regiones no codificantes del MLV clásico (NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) los VLM relacionados, tales como el VLM ecotrópico NC_001501.1, el VLM anfitriónico (AF010170.1), XMRV (FN692043.1), el VLM xenotrópico, o el VLM politrópico).

20 Se produce una partícula vírica antigénica o una partícula vírica de unión a anticuerpo por una célula productora de la divulgación. En un aspecto de la divulgación, las líneas de células productoras de la divulgación pueden crecer como un cultivo adherente, en suspensión o en un medio exento de suero. Las líneas de células productoras pueden también crecer en medio exento de suero y suspensión simultáneamente, o como una línea adherente en medio exento de suero. Aunque el medio exento de suero y la capacidad de crecer en suspensión son las condiciones típicas, las células de la divulgación (por ejemplo, 293, 293T, células HT1080, células PC3, células LNCaP, células SupT1, células U87, células D17 o células CF2) pueden cultivarse de forma adherente con un medio regular que contiene suero para conseguir fines concretos. Dichos fines pueden ser, por ejemplo, facilitar la transfección de las células o seleccionar los clones celulares.

25 El tipo de células productoras utilizadas para generar el retrovirus (descrito más completamente a continuación) es útil para la producción de las partículas víricas competentes para la replicación para su uso como dianas para detectar respuestas de anticuerpos a la partícula del vector o a los componentes del mismo. Dichos métodos son útiles para vigilar infecciones, muestras de tejidos y administración de genes y la terapia génica que utiliza partículas retrovíricas.

30 La divulgación proporciona un método para generar una línea de células productora que comprende transformar o transfectar un primer tipo de célula de mamífero con un vector plásmido RCR de la divulgación, cultivar el primer tipo de célula para producir partículas retrovíricas, obtener un medio exento de células a partir del primer tipo de células productor de las partículas retrovíricas, donde el medio exento de células comprende partículas retrovíricas, poner en contacto un segundo tipo de células de mamífero con el medio para infectar el segundo tipo de células y cultivar el segundo tipo de células para producir una línea de células productoras que produce un vector retrovírico competente para la replicación para usar en la transformación de las células de mamíferos. El primer tipo de células puede ser casi cualquier tipo de célula de mamífero que sea capaz de producir virus después de la transfección y puede incluir células HeLa, células COS, células de ovario de hámster chino (CHO), y células HT1080, y la transfección puede ser con fosfato de calcio u otros agentes tales como formulaciones lipídicas conocidas por los expertos en la materia como útiles para la transfección.

35 40 45 50 En un aspecto de la divulgación, el primer tipo de célula es una célula de riñón de embrión humano. En otro aspecto de la divulgación, la célula de riñón de embrión humano es una célula 293 (denominada también a menudo como células HEK 293, células 293, o, de forma menos precisa células HERK), que son una línea de células originalmente derivada de células de riñón de embrión humano que crecen en un cultivo de tejido. Se generaron células HEK 293 mediante la transformación de cultivos de células de riñón de embrión humano normales con ADN cizallado de adenovirus 5. Las células HEK 293 son fáciles de hacer crecer y se transfectan muy fácilmente y se han usado ampliamente en la investigación de biología celular durante muchos años. Se utilizan también por la industria de la biotecnología para producir proteínas y virus terapéuticos para terapia génica.

55 60 En otro aspecto de la divulgación, el primer tipo de célula es una célula de mamífero transformada con un antígeno T grande de SV40. En un aspecto particular de la divulgación, se utilizan células HEK 293T. Una importante variante de esta línea de células es la línea de células 293T que contiene al antígeno T grande de SV40 que permite la replicación episómica de los plásmidos transfectados que contienen el origen de replicación de SV40. Esto permite la amplificación de los plásmidos transfectados y la expresión temporal extendida de los productos génicos deseados.

65 La expresión "célula 293 humana" como se usa en el presente documento incluye la línea de células HEK 293T, la

- línea de células 293 humana (ATCC N.º CRL 1573) (Graham, et al., J. Gen. Virol., Vol. 36, págs. 59-72 (1977)), o una línea de células formada por las células 293 transfectantes con uno o más vehículos de expresión (por ejemplo, vectores plásmidos) que incluye polinucleótidos que codifican diversas proteínas *gag*, *pol*, y *env*. La envoltura puede ser una envoltura anfotrópica, una envoltura ecotrópica, una envoltura xenotrópica, una envoltura XMRV, una envoltura politrópica, una envoltura GALV, una envoltura RD114, una envoltura FeLV u otra envoltura retroviral. Dichas células pueden incluir también otros polinucleótidos tales como, por ejemplo, polinucleótidos que codifican marcadores seleccionables.
- El primer tipo de células (por ejemplo, células HEK 293T) puede transformarse con un vector plásmido RCR de la divulgación en cualquier número de medios que incluyen fosfato de calcio y similares. Se conocen en la técnica las condiciones de cultivo típicas para células de mamíferos, especialmente, células 293.
- Una vez transformadas, el primer tipo de células se cultiva en condiciones para la producción de partículas víricas. Dichas condiciones incluyen normalmente realimentar células en un medio adecuado, CO₂, y humedad. Las condiciones de cultivo pueden incluir también la adición de antibióticos, antifúngicos, factores de crecimiento y similares. Normalmente, el medio realimentado se recoge después de 24, 48, 72 o 96 horas, y dicho procedimiento se conoce como un procedimiento de transfección de la expresión transitoria.
- El medio de las células cultivadas anteriores se puede usar directamente en un cultivo adicional. Como alternativa, las partículas víricas en el medio de las células cultivadas puede aislarse usando cualquier número de técnicas conocidas en la materia incluyendo centrifugación, técnicas de exclusión por tamaño, cromatografía de intercambio aniónico y similares.
- Cuando el medio se usa directamente, el medio se puede añadir al medio utilizado en el cultivo del segundo tipo de célula. Cuando las partículas víricas se purifican sustancialmente en primer lugar, las partículas se pueden lavar o resuspender en un tampón o medio adecuado o a una concentración concreta para la infectividad antes de la adición del segundo tipo de célula, conduciendo a la generación de una línea de células productoras de expresión estable.
- En un aspecto de la divulgación, el segundo tipo de células es una línea de células de fibrosarcoma humano. En un aspecto específico de la divulgación, la línea de células es una línea de células HT1080 o una de sus derivadas. La línea de células HT1080 de fibrosarcoma humano (ATCC, n.º de catálogo CCL-121) puede obtenerse directamente de la American Type Culture Collection (P.O. Box 1549, Manassas, VA). El método incluye infectar las células HT1080 con un RCR de la divulgación para proporcionar una célula hospedadora transformada de forma estable. La célula hospedadora transfectada de forma estable puede cultivarse para producir partículas víricas para usar en terapia génica o administración de genes o puede "depositarse en un banco" para su uso posterior, y puede ser un combinado de células transfectadas, o una línea de células clonada. Las células depositadas en un banco pueden congelarse y almacenarse usando técnicas conocidas en la materia.
- En un aspecto adicional de la divulgación, las células infectadas con el virus generado por transfección transitoria o por otros medios, pueden ser cualquier línea de células de mamífero conocida por ser infectable con el virus correspondiente. Se puede ensayar la infectabilidad por un virus mediante los métodos descritos en el Ejemplo 1 y que se muestran en las Figuras 1 y 2. Se puede vigilar el crecimiento de un virus mediante la PCR del ADN celular, La RT-PCR para genomas víricos en el sobrenadante o los ensayos con transcriptasa inversa para determinar las actividades de la transcriptasa inversa en el sobrenadante vírico tales como el ensayo PERT (por ejemplo, L. Shastry et al., Hum Gen Ther., 16:1227-1236, 2005). Los ejemplos específicos de líneas de células que se pueden usar son las células HT1080, células PC3, células LNCaP, células SupT1, células U87, células Sup T1, células D17, células CF2, células Hela, células 293, CV1 y CHO. Se pueden usar líneas de células derivadas de estas líneas de células. En algunos aspectos de la divulgación, se pueden usar también líneas de células que se aislaron y un retrovirus relacionado con VLM ya preparado (por ejemplo 22Rv1 ATCC CRL-2505) como líneas productoras de virus. En otros aspectos de la divulgación, se pueden infectar células tales como las de los tipos relacionados anteriormente mediante cultivo simultáneo con PBMC a partir de individuos infectados. Pueden aislarse los clones procedentes de células infectadas por cualquiera de estos modos y purificarse y aislarse los clones de células con propiedades deseables (por ejemplo, que dan lugar a títulos altos de virus).
- En un aspecto de la divulgación, las células se cultivan en presencia de suero de feto de ternera u otros aditivos no definidos. En otro aspecto de la divulgación, las células se cultivarán en medio exento de suero. En un aspecto de la divulgación, las células se cultivan en un medio exento de suero o un medio definido. Las partículas víricas RCR (por ejemplo, los virus relacionados con VLM) pueden purificarse sustancialmente a partir del medio de las células productoras. El virus purificado puede lavarse, diluirse y resuspenderse en un transportador farmacéuticamente aceptable adecuado. Como alternativa, el vector purificado puede almacenarse tanto mediante congelación como liofilización.
- En un aspecto de la divulgación, el virus se suministrará como una solución estéril acuosa que contiene los siguientes excipientes de la formulación (en mg/ml): sacarosa 10,0, manitol 10,0 y NaCl 5,3. La solución puede contener también albúmina de suero humano (HSA, Baxter) 1,0 y ácido ascórbico 0,10.

Como se describe adicionalmente en el presente documento, cualquier número de retrovirus de la divulgación se puede utilizar con las líneas productoras de células y el proceso descrito en el presente documento.

5 En los ejemplos específicos proporcionados en el presente documento, se usó Toca 511, un VLM anfotrópico que transporta un polinucleótido heterólogo que codifica un polipéptido con citosina desaminasa (véase, por ejemplo, el documento WO2010036986 A2) para demostrar los métodos y composiciones de la divulgación. En otro ejemplo específico, se usó VLM anfotrópico (ATCC VR-1450) para demostrar los métodos y composiciones de la divulgación. Como se describe en el presente documento, Toca 511 se refiere a un vector retrovítico competente para la replicación codificado en un plásmido designado como pAC3-yCD2 y Ampho MLV se refiere a un retrovirus codificado en un plásmido designado como pAMS, ATCC n.º 45167. El virus está comprendido por un retrovirus competente para la replicación derivado de un virus de la leucemia murina (VLM) que codifica todos los componentes retrovíticos (gag, pol y env) requeridos para la replicación vírica, con la envoltura ecotrópica original sustituida con la envoltura anfotrópica procedente del virus 4070A. Como alternativa, se pueden usar otros virus que codifican plásmidos o preparaciones víricas, por ejemplo, XMRV o un virus relacionado con VM.

15 Los métodos y composiciones de la divulgación son aplicables a otros virus, vectores víricos y vectores retrovíticos recombinantes. La divulgación describe diversos vectores de modificación y recombinantes que se pueden producir por las líneas y métodos de la divulgación.

20 Los retrovirus y métodos de la divulgación proporcionan un retrovirus competente para la replicación que no requiere un virus auxiliar o una secuencia de ácido nucleico o proteínas adicionales a fin de propagar y producir el virión. Por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico del retrovirus de la divulgación codifican, por ejemplo, un antígeno específico de grupo y una transcriptasa inversa, (y las enzimas integrasa y proteasa necesarias para la maduración y la transcripción inversa), respectivamente, como se ha descrito anteriormente. Los gag y pol víricos pueden derivarse de un lentivirus, tal como un VIH o un gammaretrovirus tal como MoMLV. Asimismo, el genoma de ácido nucleico del retrovirus de la divulgación incluye una secuencia que codifica una proteína de la envoltura vírica (ENV). El gen env puede derivarse de cualesquiera retrovirus. El env puede ser una proteína de la envoltura anfotrópica que permite la transducción de células de ser humano y otras especies, el virus de la leucemia murina (VLM), el virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV), el MoMLV anfotrópico, el retrovirus relacionado con el VLM xenotrópico (XMRV), el virus relacionado con el VLM que se encuentra en seres humanos, el VLM xenotrópico, el VLM politrópico, el VLM anfotrópico, el virus de la leucemia del mono gibón (GALV), el virus del tumor de mama de murino (MuMTV), el virus del sarcoma de Rous (VSR), el virus de la leucemia del mono gibón (GALV), el virus endógeno del babuino (BEV), el virus RD114 de felino, otros gamma retrovirus, o los híbridos del anterior.

35 Asimismo, la divulgación proporciona una secuencia de polinucleótidos que codifica un vector retrovítico recombinante de la divulgación. La secuencia del polinucleótido puede incorporarse en diversas partículas víricas. Por ejemplo, los diversos vectores víricos que se pueden utilizar para la administración de genes incluyen adenovirus, virus del herpes, vaccinia, y baculovirus. Se pueden preparar los retrovirus utilizando dichos vectores (replicativos o no replicativos) para administrar los genes retrovíticos a células para preparar células productoras para el retrovirus. A continuación, el retrovirus puede recogerse y purificarse de acuerdo con los métodos descritos en esta memoria descriptiva. En otro aspecto más, la divulgación proporciona plásmidos que comprenden una construcción derivada de un retrovirus recombinante. El plásmido puede introducirse directamente en una célula diana o un cultivo de células tales como HT1080 u otras células de cultivo de tejidos. Las células resultantes liberan el vector retrovítico en el medio de cultivo.

45 La divulgación proporciona una construcción de polinucleótido que comprende, desde 5' a 3': un promotor o región reguladora útil para iniciar la transcripción; una señal de empaquetamiento psi; una secuencia de ácido nucleico que codifica gag, una secuencia de ácido nucleico que codifica pol; una secuencia de ácido nucleico que codifica env. Por ejemplo, el promotor puede comprender un promotor de CMV que tiene una secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 7, 8, o 9 desde el nucleótido 1 a aproximadamente el nucleótido 582 y puede incluir la modificación de una o más (por ejemplo, 2-5, 5-10, 10-20, 20-30, 30-50, 50-100 o más bases de ácidos nucleicos) siempre que el promotor modificado sea capaz de dirigir e iniciar la transcripción. En un aspecto de la divulgación, el promotor o la región reguladora comprende un polinucleótido del dominio CMV-R-U5. El dominio CMV-R-U5 comprende el promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano en una región R-U5 del VLM. En un aspecto de la divulgación, el polinucleótido del dominio CMV-R-U5 comprende una secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 7, 8 o 9 desde aproximadamente el nucleótido 1 a aproximadamente el nucleótido 1202 o las secuencias que son al menos un 95% idénticas a una secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 7, 8, o 9 donde el polinucleótido promueve la transcripción de una molécula de ácido nucleico unida operativamente a la anterior. El dominio gag del polinucleótido puede derivarse de cualquier número de retrovirus, pero se derivará normalmente del virus de la leucemia murina (VLM), el virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV), el MoMLV anfotrópico, el retrovirus relacionado con el VLM xenotrópico (XMRV), el virus relacionado con el VLM que se encuentra en seres humanos, el VLM xenotrópico, el VLM politrópico, el VLM anfotrópico, el virus de la leucemia del mono gibón (GALV), el virus del tumor de mama de murino (MuMTV), el virus del sarcoma de Rous (VSR), el virus de la leucemia del mono gibón (GALV), el virus endógeno del babuino (BEV), el virus RD114 de felino, otros gamma retrovirus, o los híbridos del anterior.

En un aspecto de la divulgación, el dominio *gag* comprende una secuencia desde aproximadamente el nucleótido número 1203 a aproximadamente el nucleótido 2819 o una secuencia que tiene al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 99,8% (redondeado a la décima más cercana) de identidad con la anterior. El dominio *pol* del polinucleótido puede derivarse de cualquier número de retrovirus, pero se derivará normalmente del virus de la leucemia murina (VLM), el virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV), el MoMLV anfotrópico, el retrovirus relacionado con el VLM xenotrópico (XMRV), el virus relacionado con el VLM que se encuentra en seres humanos, el VLM xenotrópico, el VLM politrópico, el VLM anfotrópico, el virus de la leucemia del mono gibón (GALV), el virus del tumor de mama de murino (MuMTV), el virus del sarcoma de Rous (VSR), el virus de la leucemia del mono gibón (GALV), el virus endógeno del babuino (BEV), el virus RD114 de felino, otros gamma retrovirus, o los híbridos del anterior.

En un aspecto de la divulgación, el dominio *pol* comprende una secuencia desde aproximadamente el nucleótido número 2820 a aproximadamente el nucleótido 6358 o una secuencia que tiene al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 99,9% (redondeado a la décima más cercana) de identidad con la anterior. El dominio *env* del polinucleótido puede derivarse de cualquier número de retrovirus, pero se derivará normalmente del virus de la leucemia murina (VLM), el virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV), el MoMLV anfotrópico, el retrovirus relacionado con el VLM xenotrópico (XMRV), los virus relacionados con el VLM que se encuentran en seres humanos, el VLM xenotrópico, el VLM politrópico, el VLM anfotrópico, el virus de la leucemia del mono gibón (GALV), el virus del tumor de mama de murino (MuMTV), el virus del sarcoma de Rous (VSR), el virus de la leucemia del mono gibón (GALV), el virus endógeno del babuino (BEV), el virus RD114 de felino, otros gamma retrovirus, o los híbridos del anterior.

En un aspecto de la divulgación, el dominio *env* comprende una secuencia desde aproximadamente el número 6359 a aproximadamente el nucleótido 8323 o una secuencia que tiene al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% o 99,8% (redondeado a la décima más cercana) de identidad con la anterior. La 3' LTR puede derivarse de cualquier número de retrovirus, normalmente el virus de la leucemia murina (VLM), el virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV), el MoMLV anfotrópico, el retrovirus relacionado con el VLM xenotrópico (XMRV), el virus relacionado con el VLM que se encuentra en seres humanos, el VLM xenotrópico, el VLM politrópico, el VLM anfotrópico, el virus de la leucemia del mono gibón (GALV), el virus del tumor de mama de murino (MuMTV), el virus del sarcoma de Rous (VSR), el virus de la leucemia del mono gibón (GALV), el virus endógeno del babuino (BEV), el virus RD114 de felino, otros gamma retrovirus, o los híbridos del anterior.

En un aspecto de la divulgación, la 3' LTR comprende un dominio U3-R-U5. En otro aspecto más de la divulgación, la LTR comprende una secuencia como se muestra en la SEQ ID NO:7 o 9 desde aproximadamente el nucleótido 9405 a aproximadamente el nucleótido 9998 o una secuencia que tiene al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99,5% (redondeado a la más cercana 10°) de identidad con la anterior.

La divulgación proporciona también un genoma de vector retrovírico recombinante desde 5' a 3' una fusión CMV-R-U5 del promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano con la región R-U5 del VLM; un PBS, un sitio de unión al cebador para la transcriptasa inversa; un sitio 5' de corte y empalme; una señal de empaquetamiento ψ ; un *gag*, un antígeno específico del grupo de ORF del VLM; un *pol*, un poliproteína del ORF de la polimerasa del VLM; un sitio 3' de corte y empalme; un 4070A *env*, un ORF de la proteína de la envoltura de la cepa 4070A del VLM; un PPT, un tracto de polipurina; y U3-R-U5, una repetición terminal larga del VLM. Esta estructura se representa gráficamente además en la Figura 3.

Tal como se ha descrito anteriormente, la divulgación proporciona células hospedadoras (por ejemplo, 293, 293T, células HT1080, células PC3, células LNCaP, células SupT1, células U87, células D17, células CF2, HeLa, células COS, células de ovario de hámster chino (CHO)) que se transducen (transforman o transfectan) con un virus o vector vírico proporcionado en el presente documento. El vector puede ser, por ejemplo, un plásmido (por ejemplo, como el utilizado con las células 293T), una partícula vírica (como la utilizada con las células HT1080), un fago, etc. Las células hospedadoras pueden cultivarse en un medio nutriente convencional modificado según sea adecuado para activar promotores, seleccionar transformantes, o amplificar un polinucleótido codificante. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, el pH y similares, son aquellas utilizadas anteriormente con la célula hospedadora seleccionada para la expresión, y serán evidentes para una persona normalmente experta en la técnica y en las referencias citadas en el presente documento, incluyendo, *por ejemplo*, Sambrook, Ausubel y Berger, así como, por ejemplo, Freshney (1994) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 3ª ed. (Wiley-Liss, Nueva York) y las referencias citadas en los anteriores.

En un aspecto de la divulgación, una célula productora produce vectores retrovíricos competentes para la replicación que tienen una estabilidad aumentada con respecto a los vectores retrovíricos preparados mediante técnicas de transfección transitoria convencionales. Dicha estabilidad aumentada durante la producción, infección y replicación es importante para el tratamiento de los trastornos de proliferación celular. La combinación de la eficacia de transducción, la estabilidad del transgén y la selectividad diana se proporciona por el retrovirus competente para la replicación. Las composiciones y los métodos proporcionan una estabilidad de inserción y mantiene la actividad de la transcripción del transgén y la viabilidad de la traducción del polipéptido codificado.

- Las preparaciones víricas de la divulgación actual se pueden purificar de diversas manera mediante centrifugación, ultrafiltración, coprecipitación con otros agentes tales como polietilenglicol (PEG) pero, de forma óptima son muy purificadas mediante la recogida de sobrenadantes, la filtración, el tratamiento con benzonasa, y la cromatografía. La cromatografía puede ser sobre diversos tipos de columnas tales como celulosa sulfonada, OH-apatita u otras, pero se realiza preferentemente en columnas de intercambio aniónico (AEX) seguido por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Estos procedimientos permiten la concentración del virus, seguida por la transición en el tampón en la columna SECF. A continuación, la preparaciones pueden ultrafiltrarse para esterilizar y clarificar las preparaciones antes de distribuir en alícuotas para el almacenamiento y el uso.
- Estas preparaciones víricas pueden utilizarse para detectar anticuerpos contra virus con algunos epítomos comunes, pero que no son necesariamente idénticos a los utilizados para la detección. Esto se debe a las secuencias relacionadas y a los epítomos conformacionales en los retrovirus en general (por ejemplo, GB Mortuza et al. Nature 431:481-485 2004) y en particular los retrovirus relacionados con el VLM. Los métodos de la divulgación pueden utilizar diversos métodos de detección de proteínas y virus. En una realización, los métodos comprenden el ELISA de un virus completo unido sobre una placa, ensayos de unión competitivos, transferencias Western, y otros métodos conocidos por los expertos en la materia. Estos se pueden usar en máquinas comerciales especializadas tales como el Artitect System (Abbott) o en formatos de microtitulación en 96 pocillos o 384 pocillos, para el cribado de un gran número de muestras.
- Como se usa en el presente documento, una "muestra biológica" se refiere a una muestra de tejido o fluido aislada de un sujeto, que incluye comúnmente anticuerpos producidos por el sujeto. Se conocen en la técnica las muestras típicas que incluyen dichos anticuerpos e incluyen, aunque no de forma limitativa, sangre, plasma, suero, materia fecal, orina, médula ósea, bilis, líquido cefalorraquídeo, fluido linfático, muestras de la piel, secreciones de la piel, de los tractos respiratorio, intestinal, y genitourinario, lágrimas, saliva, leche, células sanguíneas, órganos, biopsias y también muestras de constituyentes de cultivos celulares in vitro, incluyendo, aunque no de forma limitativa, medio acondicionado resultante del crecimiento de células y tejidos en medio de cultivo, por ejemplo, células recombinantes, y componentes celulares. Los fluidos cribados pueden ser sangre, plasma, suero, orina, saliva, hisopo bucal, hisopo nasal, aspiración con aguja fina, semen, secreción vaginal, leche u otro fluido o extracto corporal, incluyendo heces.
- Se puede usar un soporte sólido común en los ensayos y composiciones de la divulgación. "Soporte sólido común" tiene la intención de ser una única matriz sólida a la cual se une la partícula retrovírica utilizada en los inmunoensayos del sujeto por medio covalente o por medio no covalente tal como adsorción hidrófoba.
- "Inmunológicamente reactivo" significa que un antígeno reaccionará específicamente con anticuerpos antirretrovíricos (por ejemplo, anticuerpos dirigidos contra VLM) presentes en una muestra biológica procedente de un sujeto o muestra que se está ensayando.
- "Complejo inmunitario" pretende ser una combinación formada con un anticuerpo que se une a un epítomo o un antígeno. Los anticuerpos detectados pueden ser IgM, IgG, IgA, IgE o IgD, dependiendo del tipo de anticuerpo secundario u otro reactivo de unión secundario utilizado en el ensayo. Los métodos de detección para el reactivo secundario pueden ser peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina o cualquier sistema de detección secundario conocido por los expertos en la materia.
- Como se usa en el presente documento, los términos "marca" y "marca detectable" se refieren a una molécula capaz de detección, incluyendo, aunque no de forma limitativa, isótopos radiactivos, sustancias fluorescentes, sustancias quimioluminiscentes, cromóforos, enzimas, sustratos de enzimas, cofactores de enzimas, inhibidores de enzimas, cromóforos, colorantes, iones metálicos, soluciones coloidales de metales, ligandos (por ejemplo, biotina, avidina, estreptavidina o haptenos) y similares. El término "fluorescente" se refiere a una sustancia o una parte de la misma que es capaz de presentar fluorescencia en el intervalo detectable. Los ejemplos concretos de marcas que se pueden usar en la invención incluyen, aunque no de forma limitativa, peroxidasa de rábano picante (HRP), fluoresceína, FITC, rodamina, dansilo, umbeliferona, éster de dimetil acridinio (DMAE), Texas red, luminol, NADPH y α - o β -galactosidasa.
- En un aspecto de la divulgación, una partícula vírica producida mediante los métodos de la divulgación se une a un soporte sólido. A continuación se pone en contacto una muestra de un sujeto con el soporte sólido en condiciones donde cualquier anticuerpo para un epítomo de la partícula vírica puede participar en un complejo inmunitario con la partícula vírica. El soporte sólido puede lavarse y, a continuación, ponerse en contacto con un anticuerpo secundario (por ejemplo, un anticuerpo dirigido contra Ig humana) marcado con una etiqueta detectable. A continuación, se puede desarrollar el soporte sólido (según sea adecuado para la etiqueta detectable) y cuantificarse.

Ejemplos

Ejemplo de referencia 1. Determinación del crecimiento de XMRV o MLVRV en diferentes líneas de células

Se ha notificado la replicación de XMRV aislado de células de cáncer de próstata y PBMC de pacientes de CFS y

muestra que el virus es capaz de replicarse en células humanas. Tal como se ha señalado anteriormente, se ha sugerido que XMRV es un artefacto producido por la contaminación de muestras por ADN de ratón y recombinación de aislados xenotrópicos de laboratorio (T. Paprotka, et al., "Recombinant Origin of the Retrovirus XMRV" Science 333:97, 2011); J.Cohen & M.Enserink, "False Positive" Science 333:1694 - 1701, 2011; y G. Simmons et al., "Failure to Confirm XMRV/MLVs in the Blood of Patients with Chronic Fatigue Syndrome: A Multi-Laboratory Study" (www.sciencexpress.org/10.1126/science.1213841). Sin embargo, como se demuestra aquí (véanse, por ejemplo, las Figuras 9 y 10, Ejemplos 15 y 16, y Tabla 7) existen individuos con un elevado número de títulos anti-VLM que se producen naturalmente, indicando que se puede producir la infección por VLM de seres humanos con virus relacionados con VLM. Por tanto, en esto y los siguientes ejemplos, XMRV se utiliza como un ejemplo de cómo dicho virus puede detectarse y seguirse. XMRV se detectó mediante métodos de la PCR normalizados donde dos conjuntos de cebadores, uno en la región *gag* y el otro en la región *env*, se usan para detectar la presencia de ADN provírico de XMRV y dicha detección se confirma además mediante la PCR anidada (Lombardi et al.). Además de la identificación del ADN provírico, se ha demostrado adicionalmente la presencia del virus mediante la detección de la proteína vírica en PBMC de pacientes de CFS y mediante transmisión vírica en cultivos de células.

22Rv1 (ATCC CRL-2505) es una línea de células de cáncer de próstata humano derivada de un carcinoma prostático primario. Se ha descrito múltiples copias integradas y un alto nivel de producción de XMRV en Knouf et al., J.virol 2009 op.cit). La PCR cuantitativa, como se ha descrito anteriormente, desveló aproximadamente 140 copias de XMRV en el genoma de 22Rv1 con un título de 1,5e7 UT/ml. Este virus se usó para determinar si una línea de células soportará la infección por XMRV. Se pueden usar métodos similares para otros virus relacionados con VLM.

Se usó el sobrenadante del cultivo de células 22Rv1 que contenía un título de XMRV de 1,5e7 UT/ml para infectar un panel de líneas de células humanas cultivadas: HT1080 (fibrosarcoma), U87-MG (glioma), LNCaP (próstata), y Sup-T1 (linfoblastos T). Cada línea de células se infectó con XMRV a una MOI de 0,1. Se determinaron las cinéticas de la replicación vírica en estas líneas de células mediante la qPCR utilizando ADN_g normalizado para cada uno de los pases y el conjunto de cebadores específicos de XMRV que se apoya en la región *env* (XMRV 6252F: 5'-TTT GAT TCC TCA GTG GGC TC-3' (SEQ ID NO:1); XMRV6391R: 5'-CGA TAC AGT CTT AGT CCC CAT G-3' (SEQ ID NO:2); sonda *env* de XMRV: 5'-HEX-CCC TTT TAC CCG CGT CAG TGA ATT CT-3'-BHQ (SEQ ID NO:3)), (Figuras 1 y 2). A una infectividad máxima, se recogió el sobrenadante vírico de cada una de las células infectadas y se determinó el título de XMRV mediante la qPCR utilizando el conjunto de cebadores que se apoya en la región *pol* (*pol*-F: 5'-AAC AAG CGG GTG GAA GAC ATC-3' (SEQ ID NO:4); *pol*-R: 5'-CAA AGG CGA AGA GAG GCT GAC-3' (SEQ ID NO:5); sonda *pol*: 5'-HEX-CCC ACC GTG CCC AAC CCT TAC AAC C-3'-TAMRA (SEQ ID NO:6)). Los resultados desvelan que una variedad de líneas de células humanas se puede infectar por XMRV y producir un título relativamente alto (Tabla 1).

Tabla 1

Muestra	título medido	título medido promedio	desviación estándar	CV
HT1080	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
	0,00E+00			
	0,00E+00			
HT1080 lote 15 1:10	8,95E+08	8,68E+08	2,42E+07	2,79E-02
	8,59E+08			
	8,50E+08			
HT1080 XMRV	1,90E+07	1,99E+07	1,22E+06	6,14E-02
	2,13E+07			
	1,95E+07			
LNCaP	5,88E+03	2,02E+03	3,34E+03	1,65E+00
	7,70E+01			
	1,19E+02			
LNCaP lote 15 1:10	2,38E+08	2,22E+08	1,50E+07	6,75E-02
	2,21E+08			
	2,08E+08			
LNCaP XMRV	3,98E+07	3,00E+07	1,84E+07	6,13E-01
	4,14E+07			
	8,78E+06			
PC3	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
	0,00E+00			
	0,00E+00			
PC3 lote 15 1:10	4,67E+07	4,25E+07	3,57E+06	8,40E-02
	4,04E+07			
	4,05E+07			
PC3 XMRV	3,93E+06	3,44E+06	1,18E+06	3,43E-01
	4,30E-06			

Muestra	título medido	título medido promedio	desviación estándar	CV
	2,10E+06			
SUPT1	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
	0,00E+00			
	0,00E+00			
SUPT1XMRV	8,31E+06	7,90E+06	3,57E+05	4,52E-02
	7,71E+06			
	7,67E+06			
U87	1,92E+03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
	0,00E+60			
	1,77E+03			
U87 lote 15 1:10	7,16E-08	7,89E+08	6,38E+07	8,08E-02
	8,28E+08			
	8,24E+08			
U87XMRV	3,00E+07	2,96E+07	2,60E+06	8,76E-02
	3,20E+07			
	2,69E+07			

Ejemplo de referencia 2. Líneas de células productoras de expresión estable para preparar el virus T5.0002 competente para la replicación.

5 El vector vírico está codificado por un plásmido (pAC3-yCD2; a.k.a. T5.0002, véase, por ejemplo, el documento WO2010045002A2) consistente en 11.893 pares de bases de nucleótidos. La línea de células productoras del vector "HT1080+T5.0002", se produjo transduciendo las células HT1080 no expuestas anteriormente a tratamiento con el virus AC3-yCD2 producido transitoriamente en células 293T mediante transfección. Se llevó a cabo la transfección transitoria utilizada para producir AC3-yCD2 (partículas víricas) utilizando una "disolución madre de plásmido calificado" secuenciada. Más específicamente, el vector AC3-yCD2 producido transitoriamente se recogió 48 horas después de la transfección y se filtró a través de un filtro de 0,45 µm con 0,8 ml de sobrenadante filtrado utilizado para transducir un cultivo confluyente al 75% de células HT1080 que contiene 15 ml de medio. Este volumen de infección se convirtió a una dosis de transducción aproximada de aproximadamente 0,1 unidades de transducción (UT) por células. Se dejó diseminarse la transducción en la totalidad del cultivo durante 9 días con células realimentadas o pasadas cada 2-4 días antes de la disolución inicial previa al banco consistente en 12 viales conteniendo cada vial aproximadamente 5×10^6 células por vial. El medio de congelación incluía DMSO al 10%, USP (Cryoserv, Bioniche Pharma USA, LLC, Lake Forest, IL) y suero de feto de bovino irradiado con radiación gamma al 90% (Hyclone Laboratories, Inc, Logan Utah). Se congelaron las células en un congelador a -80°C y a continuación se transfirieron a una concentración con nitrógeno líquido en condiciones de fase de vapor el día siguiente. Los medios utilizados para hacer crecer células HT1080+T5.0002 para producir el vector comprenden un medio DMEM definido, GlutaMax (sustituto de L-glutamina), aminoácidos no esenciales (NEAA) y suero de feto de bovino definido (FBS).

25 Se desarrolló la línea de células 293T a partir de células HEK (riñón embrionario humano) 293 y se describió originalmente en 1987 (Dubridge 1987). La línea de células se desarrolló transfectando un mutante del antígeno T de SV40 sensible a la temperatura, tsA1609 (Dubridge 1987), en células HEK 293 (Graham 1977). Las células 293T son más susceptibles a la transfección que la línea de células HEK 293 original. Debido a su mayor transfectabilidad, las células 293T se han usado comúnmente para producir vectores de título alto mediante transfección transitoria (Yang et al., Hum. Gene Ther.10:123-132, 1999).

Ejemplo de referencia 3. Preparación de virus a partir de la línea productora de expresión estable HT1080+T5.0002 como una línea adherente con suero de feto de ternera.

35 Se hicieron crecer células HT1080+T5.0002 en recipientes de cultivo de células multicapa desechables (Cell Stack, Corning). La producción del vector retrovírico Toca 511 bruto se llevó a cabo recogiendo el medio acondicionado procedente de cultivos confluentes de células HT1080+T5.0002 recogido cada periodo de 10-24 horas durante 2-4 ciclos de recogida utilizando un proceso discontinuo alimentado manualmente utilizando múltiples Cell Stacks que contenían aproximadamente 1,2 l de medio acondicionado de cada una. Se recogió el vector retrovírico Toca 511 bruto directamente en bolsas de proceso de 10-20 l y se almacenó a 2-8°C hasta que se recogieron aproximadamente 40 l de material. La muestra del combinado bruto combinado se utilizó para la determinación del micoplasma PTC, en el ensayo vírico in vitro, la carga biológica, la titulación y las retenciones de la PCR divulgativas.

45 El material del vector bruto se clarificó pasándolo a través de un cartucho de filtro de 0,45 micrómetros y se trató con benzonasa para digerir el ADN genómico de la célula hospedadora. A continuación se capturó el vector Toca 511 clarificado y digerido con ADN y se concentró utilizando cromatografía de intercambio aniónico (AEX). El producto a granel concentrado eluido se somete a continuación a intercambio de tampones y a una etapa de purificación utilizando cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). El tampón de la formulación comprende un tampón de

formulación basado en Tris que contiene cloruro sódico, sacarosa, manitol, y albúmina de suero humana. El volumen formulado es de 0,2 micrómetros filtrado para asegurar la esterilidad, muestreado para el ensayo y dividido a continuación en múltiples recipientes como un material a granel almacenado y congelado a continuación (<) -65°C.

5 Ejemplo de referencia 4. Ensayo de titulación mediante PCR cuantitativa.

La concentración del vector funcional, o título, se determinó utilizando un método basado en la PCR cuantitativa (qPCR). En este método, el vector se titula infectando una línea de células hospedadoras transducible (por ejemplo, células PC-3 de carcinoma prostático humano, ATCC n.º de Cat. CRL-1435) con un volumen normalizado de vector y midiendo la cantidad resultante de provirus presente en las células hospedadoras tras la transducción. Las células y el vector se incubaron en condiciones de cultivo normalizadas (37°C, 5% de CO₂) durante 24 h para permitir la infección completa antes de la adición del AZT antirretrovírico Para detener la replicación del vector. A continuación, las células se recogieron de la placa de cultivo y el ADN genómico (ADNg) se purificó utilizando un kit de purificación del ADNg Purelink de Invitrogen y se eluyeron de la columna de purificación con agua estéril exenta de ARNasa/ADNasa. Se midió la relación de absorbancia A_{260}/A_{280} en un espectrofotómetro para determinar la concentración y la pureza relativa de la muestra. Las concentraciones de ADNg se normalizaron con agua exenta de ARNasa/ADNasa adicional hasta la concentración más baja de cualquier conjunto dado de preparaciones de ADNg de tal manera que la entrada de ADN para la qPCR es constante para todas las muestras analizadas. Se evaluó además la pureza del ADN genómico mediante la electroforesis de una alícuota de cada muestra en un gel de agarosa al 0,8% teñido con bromuro de etidio. Si la muestra pasa un intervalo de absorbancia A_{260}/A_{280} de 1,8-2,0 y muestra una única banda de ADNg, a continuación, la muestra está lista para el análisis de la qPCR del número de copias províricas del vector. Utilizando cebadores que interrogan la región LTR del provirus (vector de ADN transcrito de forma inversa y vector de ADN que se integra en el ADNg hospedador), se llevó a cabo la qPCR para estimar el número total de eventos de transducción producidos cuando el volumen conocido del vector se utilizó para transducir el número de células conocido. Se calculó el número de eventos de transducción por reacción a partir de una curva patrón que utiliza un plásmido que transporta una diana de un número de copias conocido que se diluyó en serie desde 10^7 a 10 copias y se midió en condiciones idénticas de la qPCR como las muestras. A partir del conocimiento de cuántos equivalentes genómicos se utilizaron para cada reacción de la qPCR (a partir de la concentración previamente determinada) y cuántos eventos de transducción se produjeron por reacción, los inventores determinaron el número total de eventos de transducción que se produjeron basándose en el número total de células que estuvieron presentes en el momento de la transducción. Este valor es el título del vector tras la dilución en el medio que contiene las células durante la transducción inicial. Para calcular el valor del título corregido, la dilución se corrige multiplicando por el rendimiento del volumen del cultivo y el volumen del título dividido por el volumen del título. Estos experimentos se llevaron a cabo en cultivos replicados y se analizaron mediante la qPCR utilizando mediciones por triplicado para cada condición para determinar un título promedio y con su desviación estándar y el coeficiente de la varianza asociada.

Ejemplo de referencia 5. Purificación y concentración de virus.

Los virus de la divulgación se fabrican mediante procedimientos de transfección transitoria de células 293 o HT1080, o a partir de un combinado no clonal de células productoras, o a partir de una línea de células productoras clonada. Dependiendo de la adaptación de la línea de células, el medio puede ser, independientemente, con suero, o exento de suero, y las células pueden hacerse crecer como células adherentes o en suspensión, con el sobrenadante del cultivo celular recogido en modo perfusión. El sobrenadante del cultivo se recogió, y se almacenó durante hasta 2 semanas a 4°C. Este volumen recogido se filtró a través de un cartucho de filtro de 0,45 micrómetros para eliminar grandes desechos celulares, se trató con benzonasa para digerir el ADN celular (L.Shastry et al. Hum Gene Ther., 15:221,2004) y se sometió además a purificación mediante cromatografía. (véase, por ejemplo, US5792643; T. Rodriguez et al., J Gene Med. 9:233, 2007; P.Sheridan et al., Mol.Ther., 2:262-275, 2000). La preparación vírica tratada con benzonasa se cargó en una columna de intercambio aniónico y el virus se eluyó en un gradiente de NaCl por etapas (véase, por ejemplo, la Figura 4). La fracción que contenía el virus se puede identificar mediante el ensayo de la PCR, o mediante A_{215} , A_{280} así como A_{400} . Las fracciones positivas se recogieron y se combinaron. La preparación combinada se cargó posteriormente en una columna de exclusión por tamaño (SEC) para eliminar la sal así como los diferentes contaminantes restantes y para acondicionar el virus en el tampón de formulación (véase, por ejemplo, la Figura 5). Se analizó la SEC en condiciones isocráticas con el tampón de formulación y la fracción vírica procedente de la columna SEC se recogió procedente del volumen de los huecos. Las fracciones identificadas positivamente se combinaron, se filtraron mediante un filtro estéril de 0,2 micrómetros, se distribuyeron en alícuotas y se congelaron a menos 65°C o por debajo. La preparación vírica se liberó basándose en el ensayo normalizado tal como esterilidad, micoplasma y endotoxinas, con una pureza y consistencia evaluadas mediante el análisis del gel SDS PAGE (véase, por ejemplo, la Figura 6). Se determinó el título como unidades de transducción (UT) por cuantificación de la PCR del ADN vírico integrado en células diana. El producto final se dirigió para tener un título de hasta 10^9 UT/ml y se formuló en una solución de sacarosa tamponada con Tris isotónico.

Ejemplo de referencia 6. Clonación de un combinado no clonal de células HT1080 infectadas.

65 *Dilución de siembra.* Se marcaron el medio precalentado y múltiples placas de cultivo celular de 96 pocillos para identificar el clon según la posición en la placa y el pocillo y los pocillos se cargaron con medio precalentado que

5 contenía una única suspensión celular de HT1080. Se recogió un pase temprano de células HT1080 infectadas al 100% tripsinizando una única suspensión de células consistente en 1 célula por 600 microlitros. Se administraron 200 µl a cada pocillo de una placa de 96 pocillos para sembrar aproximadamente 0,3 células por pocillo. En la realización de este procedimiento, una mayoría de los pocillos recibió 0, 1 o 2 células por pocillo. Se dejó que las células se unieran durante aproximadamente 4 horas y se examinó cada pocillo para eliminar los pocillos que habían recibido más de 1 célula por pocillo o que están vacíos.

10 *Propagación del clon.* Los pocillos que contenían inicialmente 1 célula por pocillo se cultivaron sustituyendo ½ de los medios (aproximadamente 100 µl) por 100 µl nuevos cada 3-4 días para cada pocillo. Se evitó la transferencia accidental de células de un pocillo a otro sustituyendo la punta utilizada para alimentar cada pocillo durante la sustitución del medio. Se requirió la sustitución completa del medio a medida que las células comenzaron a aproximarse a la confluencia en el pocillo. Una vez que las células alcanzaron la confluencia, se pasó cada candidato clonal a un pocillo de una placa de 48 pocillos para continuar la expansión. Se propagó cada clon y se pasó a un pocillo de una placa de 6 pocillos, seguido por un matraz T-25, seguido por un matraz T-75 cada vez que las células alcanzaron la confluencia. Una vez que las células clonales alcanzaron la confluencia en un matraz T-75, se prepararon al menos 2-3 viales de células criopreservadas que contenían 1-2x10⁶ células por vial.

20 *Selección de clones basada en el rendimiento.* Una vez que los clones candidatos se congelaron, se llevaron a cabo experimentos de cultivo de células para identificar el clon de mejor rendimiento y los clones de respaldo basándose en el rendimiento de producción de títulos y en los atributos de cultivo de células ideales. Se seleccionó el mejor clon basándose en (1) la capacidad del clon de proporcionar los títulos sostenidos más altos durante los 2-4 días posteriores con sustitución diaria del medio (véase la Figura 12 y la Tabla 2 a continuación); (2) la capacidad del virus producido para transferir la expresión del gen de interés deseado para una célula no expuesta a tratamiento anteriormente; (3) la capacidad del clon de dividirse razonablemente teniendo un tiempo de duplicación entre 18 - 30 horas y la capacidad de alcanzar una confluencia del 100% como una capa uniforme de células con una desunión mínima de células tras alcanzar la confluencia.

30 **Ejemplo de referencia 7. Infección de las líneas de células D-17 y Cf2-Th para preparar un combinado no clonal y líneas de células productoras de virus clonales posteriores.**

35 Para producir combinados productores de vectores de la línea de células D-17 (osteosarcoma de canino; ATCC n.º CCL-183) y Cf2-Th (timo de canino; ATCC n.º CRL-1430) y clones de dilución que expresan el retrovirus competente para la replicación del VLM, se utilizaron los mismos métodos exactos descritos anteriormente para que las células HT-1080 se utilizaran para crear líneas de células D-17 y Cf2-Th. En la Tabla 2 siguiente, se muestran los resultados.

Tabla 2: Datos para apoyar la creación de combinados productores y clones de dilución posteriores de HT-1080, vectores retrovéricos competentes para la replicación de D-17 y Cf2-Th

Línea de células productora de vectores para líneas de células	Línea de células progenitora expresada en vectores competentes para la replicación del VLM		Muestra de título	Títulos observados (UT/ml)*
HT1080+T5.0002 (Combinado no clonal)	AC3-yCD2	HT-1080	HT+T5.0002, Día 2 HT+T5.0002, Día 3 HT+T5.0002, Día 4 HT+T5.0002, Día 5,5	1,56E+06 2,23E+06 1,90E+07 2,57E+07
HT5.yCD2.128A (Clon de dilución)	AC3-yCD2	HT-1080	Clon 12-8, Día 0 Clon 12-8, Día 1 Clon 12-8, Día 2 Clon 12-8, Día 3	5,26E+06 7,94E+06 1,00E+07 1,02E+07
D17+T5.0002 (Combinado no clonal)	AC3-yCD2	D-17	D17+T5.0002, Día 2 D17+T5.0002, Día 3 D17+T5.0002, Día 4 D17+T5.0002, Día 5,5	4,20E+06 3,83E+06 4,87E+06 1,39E+06
D5.yCD2.1G7A (Clon de dilución)	AC3-yCD2	D-17	D5.yCD2.1G7A, Día 1 D5.yCD2.1G7A, Día 2 D5.yCD2.1G7A, Día 3	1,78E+06 2,54E+06 4,24E+06
CF2+T5.0002 (Combinado no clonal)	AC3-yCD2	Cf2-Th	CF2+T5.0002, Día 2 CF2+T5.0002, Día 3 CF2+T5.0002, Día 4 CF2+T5.0002, Día 5,5	4,17E+04 6,97E+03 4,97E+06 3,14E+06
CF5.yCD2.3A12A (Clon)	AC3-yCD2	Cf2-Th	CF5.yCD2.3A12A,	1,81E+07

Línea de células productora de vectores para líneas de células	Línea de células progenitora expresada en vectores competentes para la replicación del VLM		Muestra de título	Títulos observados (UT/ml)*
de dilución)			Día 1 CF5.yCD2.3A12A, Día 2 CF5.yCD2.3A12A, Día 3	2,68E+07 3,78E+06
*UT/ml indica unidades de transducción por ml como se determinó mediante los métodos de la qPCR cuantitativa para determinar el número de copias de genomas de VLM províricos integrados posteriores a la transducción en la titulación de la línea de células U-87 no expuesta anteriormente a tratamiento.				

Ejemplo de referencia 8. Adaptación de la línea de células HT-1080 productora del virus VLM competente para la replicación a partir de suero y dependencia a la adherencia de un cultivo en suspensión exento de suero.

5

Se llevó a cabo el proceso de adaptación exento de suero tras el cribado y la identificación del clon de dilución de la línea de células HT-1080 productora del virus competente para la replicación. Se puede llevar a cabo también el proceso de adaptación exento de suero con una línea de células HT1080 productora de vectores no clonales. El proceso de adaptación se inició sembrando aproximadamente 2×10^7 células en un matraz con agitador de 125 ml que contenía 10 ml de suero al 5% que contenía medio acondicionado y 10 ml de un medio de elección seleccionado exento de suero, dando como resultado una concentración en suero reducida del 2,5%. En este caso, el medio exento de suero era el medio de expresión FreeStyle 293 distribuido a través de Invitrogen Corp, Carlsbad, CA. El cultivo se colocó en una plataforma de agitación localizada en una incubadora de cultivo de tejidos con control de temperatura y CO₂ gas. La plataforma de agitación se ajustó a aproximadamente 80 RPM y la incubadora se ajustó a aproximadamente unas condiciones de 37°C y 5% de CO₂. Cada 3-7 días, el cultivo se realimentó recogiendo células que están en suspensión y resemebrándose un nuevo matraz con agitador que contenía 10 ml del mismo medio acondicionado inicial y 10 ml de medio exento de suero reciente manteniendo un nivel de suero de aproximadamente 2,5%. Se examinó el cultivo en cada evento de realimentación con recuentos de células viables llevados a cabo según sea necesario para comprobar la propagación celular. Cuando las células mostraron evidencias de crecimiento basándose en la duplicación celular o el consumo de glucosa, se dirigió a continuación una concentración en suero de 1,67% ajustando la cantidad de volumen de medio de acondicionamiento y medio exento de suero reciente. El cultivo se examinó de nuevo y se realimentó cada 3-7 días. Cuando las células mostraron evidencias de crecimiento, se dirigió una concentración en suero de 1,25% ajustando de nuevo el volumen del medio acondicionado y del medio exento de suero reciente. Se continuó este proceso dirigiendo las condiciones de suero posteriores de 1,0%, 0,9%, 0,83% hasta que las células estuvieron en condiciones exentas de suero del 100%. Durante este proceso de adaptación, el cultivo celular se expandió hasta aproximadamente un volumen de 200 ml en un matraz con agitación de 1.000 ml dirigiéndose a un cultivo viable mínimo de aproximadamente $0,5$ a $1,0 \times 10^6$ células/ml. Una vez que las células alcanzaron condiciones exentas de suero al 100%, las células se pasaron continuamente en condiciones exentas de suero aislando las células individuales suspendidas permitiendo que las células aglutinantes más pesadas sedimenten durante cortos periodos de tiempo sin agitación. Una vez que el cultivo consiste en una población de aproximadamente el 95% de la suspensión de células individuales, consistentemente, el cultivo podría congelarse en medio de preservación consistente en DMSO al 10% y medio exento de suero al 90% utilizando condiciones de congelación normalizadas de células de mamíferos.

35

Ejemplo de referencia 9. Técnica de producción vírica para retrovirus

El ejemplo describe una técnica de cultivo de células para el crecimiento de células adherentes productoras del virus de la leucemia murina (VLM), los virus relacionados (MLVRV) para la producción vírica y la posterior purificación vírica. Se utilizó la producción de un virus VLM anfotrópico (ATCC n.º VR-1450) como un ejemplo. Sin embargo, este proceso se puede usar también para todos los virus descritos en esta divulgación.

40

Se obtuvo MuLV natural de la ATCC, pero se puede generar también a partir de una construcción de plásmido (pAMS, ATCC n.º 45167) que codifica la secuencia genómica completa del MuLV con una envoltura anfotrópica diseñada mediante ingeniería genética que sustituye el gen de la envoltura ecotrópica original, y se transfeció transitoriamente en células utilizando las técnicas de transfección normalizadas. Preferentemente, se infectaron células HT1080 (ATCC CCL-121) con el virus y se propagaron en las condiciones preferidas de 37°C en condiciones de 5% de CO₂. Un matraz T-75 infectado recientemente que contenía células HT1080 infectadas con MuLV se a dos matraces T-175 y a continuación se cultivó posteriormente en diez matraces T-175 con el siguiente medio de crecimiento:

50

Componentes del medio DMEM completo:	Relación
1. DMEM con un contenido de glucosa elevado, sin rojo fenol y sin glutamina (Biowhittaker)	500 ml
2. FBS Defined (HyClone)	25 ml
3. GlutaMax (Gibco)	5 ml
4. Aminoácidos no esenciales (NEAA, Biowhittaker)	5 ml

Tras alcanzar la confluencia, se cosecharon las células con TrpZean (Sigma) y se neutralizaron con el mismo medio de crecimiento utilizando métodos de cultivo de células normalizados. Se sembraron las células en Cell Stacks de 5 capas (Corning) a una densidad de siembra preferida de $3,1 \times 10^4$ células viables/cm² en el mismo medio descrito anteriormente, para producir el virus. Cada Cell Stack contenía 1,1 l de medio de crecimiento. Las Cell Stacks se incubaron a 37°C y 5% de CO₂.

Dos días después de la siembra, los cultivos Cell Stack alcanzarán la confluencia. El medio de cada cultivo se sustituyó con medio reciente. Dos días después, el medio, que contenía virus producido, se recogió (Recogida n.º 1) y los cultivos se realimentaron con el mismo volumen (1,1 l) de medio reciente. Diez horas después, se llevó a cabo una segunda recogida (Recogida n.º 2) y los cultivos celulares se realimentaron con el mismo volumen (1,1 l) de medio de crecimiento reciente. Dieciséis horas después de la 2ª recogida, se llevó a cabo una a 3ª recogida (Recogida n.º 3). A continuación se combinaron las 3 recogidas para la purificación. En la siguiente tabla se relacionan los títulos víricos de las 3 recogidas y el combinado.

Recogida	Título vírico (n.º UT/ml)
Recogida n.º 1	$1,8 \times 10^6$
Recogida n.º 2	$2,4 \times 10^6$
Recogida n.º 3	$2,4 \times 10^6$
Combinado de 3 recogidas	$2,1 \times 10^6$

Ejemplo de referencia 10. Producción vírica mediante otra línea de células con la misma técnica

Se utilizaron las mismas técnicas de cultivo descritas anteriormente para producir cualquiera de los virus divulgados, en cualquiera de las células HT1080, células PC3, células LNCaP, células SupT1, células U87, células D17, células CF2, células 293, células Hela, células CV1, células CHO o líneas de células derivadas de cualquiera de estas. Tres recogidas, tal como se describe en el Ejemplo 9, se pueden recoger y combinarse. El título vírico en el combinado de recogidas que utilizan estas células es 10^5 UT/ml o mayor, usualmente aproximadamente 5×10^6 UT/ml.

Ejemplo de referencia 11. Adaptación de una línea productora de células a un cultivo en suspensión y producción de virus en un biorreactor para la producción a gran escala

Una línea de células productoras víricas HT1080 clonal o no clonal productora de virus relacionados con VLM se adaptó a condiciones cero de suero y crecimiento en suspensión utilizando una transición lenta del proceso de destete del medio acondicionado en suero al 5% a un medio exento de suero definido. El proceso de adaptación se inició sembrando aproximadamente 2×10^7 células en un matraz con agitador de 125 ml que contenía 10 ml de suero al 5% que contenía medio acondicionado y 10 ml de un medio de elección seleccionado exento de suero, dando como resultado una concentración en suero reducida del 2,5%. En este caso, el medio exento de suero es el medio de expresión FreeStyle 293 distribuido a través de Invitrogen Corp, Carlsbad, CA, suplementado con albúmina de suero humano al 0,1% (con una solución Baxter de suero humano al 25%). El cultivo se colocó en una plataforma de agitación localizada en una incubadora de cultivo de tejidos con control de temperatura y CO₂ gas. La plataforma de agitación se ajustó a aproximadamente 80 RPM y la incubadora se ajustó a aproximadamente unas condiciones de 37°C y 5% de CO₂. Cada 3-7 días, el cultivo se realimentó recogiendo células que están en suspensión y resembrándose en un nuevo matraz con agitador que contenía 10 ml del mismo medio acondicionado inicial y 10 ml de medio exento de suero reciente manteniendo un nivel de suero de aproximadamente 2,5%. Se examinó el cultivo en cada evento de realimentación con recuentos de células llevados a cabo según sea necesario para comprobar la propagación celular. Cuando las células mostraron evidencias de crecimiento basándose en la duplicación celular o el consumo de glucosa, se dirigió a continuación una concentración en suero de 1,67% ajustando la cantidad de volumen de medio de acondicionamiento y medio exento de suero reciente. El cultivo se examinó de nuevo y se realimentó como anteriormente cada 3-7 días. Cuando las células mostraron evidencias de crecimiento, se dirigió una concentración en suero de 1,25% ajustando de nuevo el volumen del medio acondicionado y del medio exento de suero reciente. Se continuó este proceso dirigiendo las condiciones de suero posteriores de 1,0%, 0,9%, 0,83%

hasta que las células estuvieron en condiciones exentas de suero del 100%. Durante este proceso de adaptación, el cultivo celular se expandió hasta aproximadamente un volumen de 200 ml en un matraz con agitación de 1.000 ml dirigiéndose a un cultivo viable mínimo de aproximadamente 0,5 a 1,0 x10⁶ células/ml. Una vez que las células alcanzaron condiciones exentas de suero al 100%, las células se pasaron continuamente en condiciones exentas de suero aislando las células individuales suspendidas de la mitad superior del cultivo permitiendo que las células aglutinantes más pesadas sedimenten durante cortos periodos de tiempo sin agitación. Una vez que el cultivo consiste en una población de aproximadamente el 95% de la suspensión de células individuales, consistentemente, el cultivo podría congelarse en medio de criopreservación consistente en DMSO al 10% y medio exento de suero al 90% utilizando condiciones de congelación normalizadas de células de mamíferos.

Las células en suspensión se expandieron en matraces con agitación de 125 ml (20 ml de cultivo), 250 ml (40 ml), 500 ml (100 ml), y 1 l (200 ml; todos de Corning), en el medio exento de suero completamente definido (Gibco n.º de Cat. 12338), suplementado con albúmina de suero humano al 0,1% (HSA de Baxter). Los cultivos se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ con una velocidad de agitador de 80 rpm (giro ¾" (1,905 cm)). Se utilizaron 5 cultivos en matraces con agitación de 1 l para inocular un biorreactor WAVE (WAVE 20/50 EHT, GE Healthcare) que contenía una Cellbag de 20 l con un volumen de trabajo de 10l. La densidad celular inicial en el biorreactor es una densidad preferida de 4 x 10⁵ células viables/ml (viabilidad del 91%). La temperatura es una temperatura preferida de 37°C. Las condiciones de funcionamiento iniciales son: 5% de CO₂, velocidad del balancín 15 rpm, ángulo 6°, caudal de aire 0,2 l/min. El control del pH se ajustó a 7,2 y el control de la DO al 40%. Se implementaron los controles de pH y DO mediante un sistema de consolas WAVE POD (GE Healthcare).

Después que la densidad celular alcanzó aproximadamente ~1 x 10⁶ células viables/ml, se inició un proceso de perfusión celular utilizando un cartucho de fibra hueca (GE Healthcare, n.º de parte CFP-6D-6A). La velocidad de alimentación (y el permeato) se ajustó inicialmente a 0,25 volúmenes/día, y aumentó progresivamente con la densidad celular durante hasta 3,8 volúmenes/día. Se recogieron un total de 180 l de permeato que contenía el virus en un periodo de 15 días. El título vírico en las recogidas de 180l es de 1x10⁵ UT/ml a 1x10⁷ UT/ml.

Ejemplo 12. Este ejemplo ilustra la detección de un anticuerpo humano contra el VLM en muestras de plasma de donantes.

Se desarrolló un ensayo ELISA de una IgG dirigida contra el VLM para la detección de anticuerpos específicos anti-VLM. El ensayo discrimina actualmente muestras positivas y negativas y proporciona un título para la respuesta del anticuerpo. Se usó un anticuerpo monoclonal, 83A25, específico de la proteína gp70 del VLM de Moloney como un control positivo del ensayo. 83A25 reconoce un epítipo de la proteína env gp70 que se encuentra universalmente en una variedad de virus de la leucemia murina incluyendo el virus anfitriónico de la leucemia (Evans et al., 1977, J. Virol., 24:865-874; Evans et al., 1990, J. Virol., 64(2):6176-6183). 83A25 es un anticuerpo IgG2a de rata. el mAb 83A25 se deriva de células de hibridoma (ATCC n.º de cat. HB-10392, Lote n.º 100005) utilizando procedimientos de purificación de anticuerpos normalizados. El ensayo se diseñó para detectar la presencia de anticuerpos dirigidos contra el VLM en muestras humanas. El control positivo del ensayo (83A25) es un anticuerpo de rata que se detecta con un anticuerpo secundario dirigido contra Ig de rata. Se utilizaron anticuerpos conjugados con HRP dirigidos contra IgG humana para la detección de la IgG humana.

Se desarrolló un ELISA específico de captura de anticuerpos dirigido contra el VLM para la detección del anticuerpo con controles positivos y negativos específicos de especie. En resumen, se incubaron 100 µl/pocillo de antígeno de captura (1,56 µg/ml) durante la noche a 2-8°C en placas de microtitulación ELISA de 96 pocillos (Costar). Las placas se bloquearon con tampón de bloqueo (1X PBS, BSA al 1%, TW20 al 0,05%, azida de sodio al 0,05%). Los sueros humanos o caninos recogidos en diferentes puntos temporales en la totalidad de los estudios se diluyeron 1:100 y se titularon en una serie 1:4 en PBS añadido a las placas revestidas con antígeno de captura y se incubaron durante 60-90 min a temperatura ambiente con agitación constante a 150 RPM. Se detectó cualquier anticuerpo unido con un anticuerpo de cabra conjugado con HRP dirigido contra IgG humana o un anticuerpo dirigido contra IgG de canino (Southern Biotech). Se lavaron los ELISA 5X con PBS y se desarrollaron usando un sustrato TMB (Southern Biotech) durante 10 min de incubación y se leyeron en un espectrofotómetro SpectraMax 190 a 450 nm. Se obtuvieron controles positivos a partir de animales inmunizados, se obtuvieron controles negativos a partir de animales sanos. Se cribaron los paneles de donantes humanos para identificar suero positivo y negativo humano.

Tabla 3: Título de muestras de suero humano utilizando un anticuerpo conjugado con HRP dirigido contra IgG humana solo o en combinación con un anticuerpo conjugado con HRP dirigido contra Ig de rata. Se evaluaron las muestras de individuos sanos para la presencia de un anticuerpo dirigido contra VLM utilizando un protocolo ELISA dirigido contra VLM.

Título de anticuerpo dirigido contra VLM en muestras humanas		
	Anticuerpo dirigido contra IgG humana solo	Anticuerpo dirigido contra IgG humana + contra Ig de rata
Sujeto n.º 1	1:100	1:100
Sujeto n.º 5	1:500	1:500
Sujeto n.º 9	1:100	1:100

Título de anticuerpo dirigido contra VLM en muestras humanas		
	Anticuerpo dirigido contra IgG humana solo	Anticuerpo dirigido contra IgG humana + contra Ig de rata
Sujeto n.º 14	1:100	1:100
Sujeto n.º 20	1:100	1:100
Sujeto n.º 24	1:100	1:100
Sujeto n.º 26	1:100	1:100

- 5 Suero humano de 10 diferentes donantes sanos, análisis negativo para HBsAg, VIH 1/2 Ab, ARN de HIV-1, Ab contra VHC, ARN de VHC y STS cribado verbalmente no han estado en contacto con ningún roedor (ratones, ratas, cobayas) incluyendo mascotas, así como primates y no se habían trabajado nunca con ningún virus, se adquirieron de BioReclamation Incorporation. Se cribaron todos los sueros utilizando un protocolo ELISA dirigido contra VLM y los sueros ensayados negativos para la presencia de anticuerpos dirigidos contra VLM anfotrópico se combinaron y utilizaron como suero control negativo. Los valores de la absorbancia (DO) a 450 nm se registraron generalmente por debajo de 0,400.
- 10 Se detectó la reactividad de 83A25 mediante un anticuerpo conjugado con HRP dirigido contra Ig de rata. Como se observa en la Figura 7 y en la Tabla 3, se puede añadir un cóctel conjugado (anticuerpo conjugado con HRP dirigido contra IgG de rata e IgG humana) a cualquiera de los lugares de ensayo y no alterar el valor del título generado. Como se ha observado en la Figura 2, la reactividad de AC (anticuerpo monoclonal 83A25) cuando se desarrolló con cualquier anticuerpo dirigido contra Ig de rata o el cóctel conjugado produjo una curva de dilución adecuada (Figura 15 8A). Aunque el cóctel generó valores de DO superiores en comparación con el anticuerpo dirigido contra Ig de rata solo, el título resultante de cada curva de dosis era 1:312500.

Ejemplo 13. Este ejemplo ilustra la detección de anticuerpos específicos dirigidos contra VLM en muestras humanas.

- 20 Para evaluar la detección de un anticuerpo específico dirigido contra VLM en una matriz de suero, el anticuerpo 83A25 se enriqueció en suero humano diluido 1:100 en tampón de dilución o tampón de dilución solo. Las preparaciones enriquecidas se diluyeron en serie y se evaluaron para el procedimiento ELISA dirigido contra VLM. Las Figuras 8A y 8B muestran las curvas de respuesta a la dosis generadas (cuadrado compacto) para cada 25 preparación enriquecida.

Ejemplo 14. Este ejemplo ilustra la especificidad y la sensibilidad del ensayo.

- 30 Usando una placa unida al vector vírico de VLM, se consiguió la detección de anticuerpos dirigidos contra IgG de VLM en suero o plasma humano utilizando un ensayo directo. Se puede llevar a cabo un ensayo competitivo utilizando un anticuerpo 83A25 que reconoce la proteína gp70-env procedente de un virus VLM anfotrópico. El título de las muestras de ensayo se estableció mediante dilución en serie 1:5 desde una dilución 1:100 de partida y comparando las muestras con el valor inicial; las señales positivas se definieron como aquellas por encima del corte establecido para este ensayo (mayores que el valor del control negativo promedio + 2 SD). Debido a que 83A25 es 35 un anticuerpo de rata, se utilizan valores umbral del ensayo basados en el promedio de los valores de DO + 2SD del tampón de dilución. La Tabla 4 y la Tabla 5 presentan el rendimiento interensayo con análisis replicado del control positivo del ensayo y del control negativo del suero.

Tabla 4. Reproducibilidad interensayo del control positivo del ensayo. Se analizaron las curvas de dilución en serie del control positivo del ensayo a través de seis experimentos. Se presentan la media, la desviación estándar (SD) y el porcentaje de CV (CV).

Dilución Factor	Media de DO del control positivo del ensayo y del análisis interensayo														Interensayo	
	Exp121-Ana		Exp122-Ana		Exp125-Ana		Exp072-DTV		Exp073-DTV		Exp074-DTV		Media	SD	%de CV	
	Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2				
10	2,648	2,647	2,175	2,179	2,175	2,265	1,978	2,037	2,434	2,478	2,253	2,305	2,298	0,216	9,40	
50	2,427	2,460	2,009	1,892	1,987	1,958	1,748	1,864	2,272	2,305	2,012	2,138	2,089	0,230	10,99	
250	2,372	2,250	1,859	1,696	1,855	1,879	1,703	1,559	2,047	2,118	1,918	1,885	1,928	0,235	12,17	
1250	1,928	1,844	1,481	1,400	1,440	1,438	1,298	1,307	1,782	1,606	1,450	1,390	1,530	0,211	13,82	
6250	0,903	0,758	0,640	0,643	0,653	0,635	0,558	0,612	0,803	0,773	0,636	0,699	0,693	0,098	14,11	
31250	0,322	0,276	0,289	0,271	0,235	0,239	0,202	0,210	0,282	0,276	0,253	0,250	0,259	0,034	13,22	
156250	0,163	0,159	0,180	0,174	0,136	0,124	0,116	0,119	0,140	0,139	0,145	0,131	0,144	0,021	14,62	
781250	0,137	0,131	0,162	0,141	0,105	0,105	0,087	0,104	0,107	0,110	0,114	0,107	0,118	0,021	17,79	

Tabla 5. Reproducibilidad interensayo de suero del control negativo. Se analizaron las curvas de dilución en serie del suero del control negativo (NC) a través de seis experimentos (dilución 1:100 solo). Se presentan la media, la desviación estándar (SD) y el % de CV (CV).

Media de DO del suero del control negativo y del análisis interensayo													
Exp121-Ana		Exp122-Ana		Exp125-Ana		Exp072-DTV		Exp073-DTV		Exp074-DTV		Interensayo	
Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2	Media	SD
0,316	0,301	0,326	0,319	0,238	0,243	0,250	0,252	0,248	0,256	0,252	0,239	0,270	0,034
												12,76	

Ejemplo 15. Este ejemplo ilustra la detección de anticuerpos que se producen naturalmente contra el VLM en una muestra de plasma humano.

Se cribaron muestras de plasma humano de donantes individuales utilizando el ensayo ELISA dirigido contra VLM humano. Las muestras que proporcionan valores de la media de DO_{450 nm} por debajo de 0,200 se combinaron y ensayaron para generar una muestra de plasma del control negativo (NC) para usar en futuros ensayos. Por el contrario, las muestras que proporcionan valores de la media de DO_{450 nm} altos se seleccionaron como candidatos potenciales para el plasma y del control positivo (PC). Estos candidatos se ensayaron mediante la transferencia Western en condiciones no reductoras para confirmar la presencia de anticuerpos específicos dirigidos contra VLM. La muestra que proporcionó la mejor reactividad anti-VLM, y un valor alto de DO_{450 nm} como el ensayado en ELISA, se seleccionó como el plasma del control positivo para usar en futuros ensayos.

Se obtuvieron plasmas de Bioreclamation Inc. (Westbury, NY) y se recogieron en tubos que contenían K-2 EDTA como un anticoagulante. Todas las muestras se ensayaron negativas para HBsAg, VIH 1 o 2 Ab, ARN de HIV-1, Ab contra VHC, ARN de hCV y STS como se notificó por el suministrador. Los donantes se indicaron como de raza negra, caucasiana o hispana y variaron de 20 a 78 años de edad. Tras la recepción, los plasmas se almacenaron a -80°C hasta el uso. Los plasmas de los donantes 866, 867, 871, 872 y 863 con unos valores de la media de DO_{450 nm} <0,200 (Tabla 6) se combinaron para generar un plasma humano del control negativo (Lote n.º OT02DV-123-19Feb10). En los ensayos, el plasma NC se diluyó 1:100 en tampón de bloqueo/dilución con 8 réplicas por pocillo por placa.

Donante ID	Muestra ID	Sexo	Edad del donante	Raza	Valor de la media de DO en ELISA
BRH338866	866	F	50	B	0,167 ± 0,010
BRH338867	867	F	52	B	0,127 ± 0,020
BRH338871	871	F	33	B	0,116 ± 0,017
BRH338872	872	F	55	C	0,174 ± 0,015
BRH338863	863	M	34	B	0,138 ± 0,007

Tabla 6 - Plasmas seleccionados para la generación de plasma humano del control negativo (NC). Plasmas humanos de 4 donantes femeninos (F) y 1 donante masculino (M) proporcionaron los valores de la media de DO_{450 nm} más bajos cuando se cribaron y se seleccionaron para la generación de plasma del control negativo. Estas muestras se combinaron en volúmenes iguales con alícuotas preparadas y almacenadas para la calificación y el uso. B - Negro; C - Caucasiano.

Las muestras de plasma de donantes que mostraron cualquiera de los valores de la media de DO OD_{450nm} altos o intermedios en el ELISA dirigido contra VLM (Tabla 7) se seleccionaron para ser analizadas además mediante transferencia Western. Este procedimiento podría confirmar la especificidad anti-VLM en las muestras. Además, los plasmas con una media de DO_{450 nm} alta servirían como candidatos potenciales para plasma humano del control positivo en futuros ensayos. El cribado adicional muestra individuos raros (alrededor de 1/200) con lecturas de ELISA en este ensayo de >3,0 unidades de DO.

Tabla 7 - Plasmas seleccionados para el análisis de la transferencia Western y como candidatos potenciales para el plasma humano del control positivo (PC).

Donante ID	Muestra ID	Sexo	Edad del donante	Raza	Valor de la media de DO en ELISA	Valor de DO relativo a todos los plasmas
BRH338856	856A	M	58	C	0,861 ± 0,077	Intermedio
BRH353131	131	M	42	B	1,766 ± 0,153	Alto
BRH353183	183	M	40	B	1,059 ± 0,110	Intermedio
BRH353194	194	M	50	B	1,906 ± 0,251	Alto

Los detalles de los plasmas humanos que mostraron valores de la media de DO_{450 nm} altos o intermedios como se cribaron utilizando el ensayo ELISA dirigido contra VLM y que se iban a analizar para la especificidad anti-VLM utilizando la transferencia Western. B - Negro; C - Caucasiano.

Ejemplo 16

El ejemplo ilustra la especificidad del antígeno vírico de VLM de las muestras humanas detectadas positivas para

ELISA. Las muestras de plasma que mostraron valores de la media de $DO_{450\text{ nm}}$ altos en el ELISA dirigido contra VLM se ensayaron para la especificidad del antígeno en la transferencia Western. Los plasmas seleccionados se incubaron con una membrana de PVDF que contenía antígenos de VLM que se habían separado mediante electroforesis, en condiciones no reductoras sin desnaturalización. Se incluyeron como muestras de antígenos adicionales hileras con lisados de células HT1080 y albúmina de suero bovino (BSA). Los anticuerpos en el plasma que reconocieron y se unieron a los diferentes antígenos de VLM se visualizaron a continuación utilizando un anticuerpo dirigido contra IgG humana conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP). El plasma del control negativo (Lote n.º OT02DV-123-19Feb10) se usó como un control en el ensayo.

La Figura 9 identifica aquellas muestras de plasma que se seleccionaron para una evaluación del control positivo o negativo en comparación con todos los plasmas cribados utilizando el ELISA dirigido contra VLM. Se identificaron las muestras 131 y 194 a partir del cribado de plasma humano que proporcionó los valores de la media de $DO_{450\text{ nm}}$ más altos que se ensayaron mediante ELISA. Para confirmar la presencia de anticuerpo contra VLM en las muestras 131 y 194, se llevó a cabo la transferencia Western utilizando la misma preparación del lote de antígeno de VLM utilizada en el ensayo ELISA. Las muestras 856A y 183 que mostraron valores de la media de $DO_{450\text{ nm}}$ se incluyeron también en el ensayo para comparar el nivel de reactividad anti-VLM. La muestra de plasma 856A se originó a partir del mismo donante pero se recogió en un día diferente de la muestra designada 856 (Fig. 10). El plasma del control negativo se utilizó como control.

En la Figura 10 se muestran los resultados del análisis de la transferencia Western. Las muestras que proporcionan valores de la media de $DO_{450\text{ nm}}$ altos e intermedios mostraron buena reactividad a numerosos antígenos de VLM de 68 kD, 50 kD, 30 kD y 17 kD de tamaño. Se observó la reactividad mayor en las muestras 131 y 183 contra los antígenos de 17 kD de tamaño. Como se ha señalado en ensayos similares llevados a cabo utilizando muestras de ratón y perro, se observó una pequeña correlación entre valores de la $DO_{450\text{ nm}}$ y el reconocimiento del antígeno. No se observó reactividad contra los antígenos de VLM o BSA (utilizados para revestir las placas ELISA) con el plasma NC, aunque se observó alguna reactividad contra los antígenos de preparaciones de lisados de células HT1080. Estos lisados se incluyeron en el ensayo debido a que esta línea de células se usó originalmente para general el lote de VLM. Sin embargo, no se esperaba que estuvieran presentes proteínas celulares en la muestra de VLM ya que estas se eliminaron durante los procedimientos normalizados de purificación vírica.

Se identificaron dos candidatos procedentes del cribado de plasma humano que proporcionaron valores de la media de $DO_{450\text{ nm}}$ más altos que los ensayados mediante ELISA (muestras 131 y 194). Para confirmar la presencia de anticuerpo contra VLM en las muestras 131 y 194, se llevó a cabo la transferencia Western utilizando la misma preparación del lote de antígeno de VLM utilizada en el ensayo ELISA. Se incluyeron también las muestras 856A y 183 adicionales que mostraron valores de la media de $DO_{450\text{ nm}}$ intermedios en el ensayo para comparar el nivel de reactividad anti-VLM (Figura 10). La muestra de plasma 856A se originó a partir del mismo donante, pero se recogió en un día diferente de la muestra designada 856 (Figura 10). El plasma del control negativo se utilizó como control. Las muestras que proporcionan valores de la media de $DO_{450\text{ nm}}$ altos e intermedios mostraron buena reactividad a numerosos antígenos de VLM de 68 kD, 50 kD, 30 kD y 17 kD de tamaño. Se observó la reactividad mayor en las muestras 131 y 183 contra los antígenos de 17 kD de tamaño. Como se ha señalado en ensayos similares llevados a cabo utilizando muestras de ratón y perro, se observó una pequeña correlación entre valores de la $DO_{450\text{ nm}}$ y el reconocimiento del antígeno. No se observó reactividad contra los antígenos de VLM o BSA (utilizados para revestir las placas ELISA) con el plasma NC, aunque se observó alguna reactividad contra los antígenos de preparaciones de lisados de células HT1080. Estos lisados se incluyeron en el ensayo debido a que esta línea de células se usó originalmente para general el lote de VLM. Sin embargo, no se esperaba que estuvieran presentes proteínas celulares en la muestra de VLM ya que estas se eliminaron durante los procedimientos normalizados de purificación vírica.

Se generó un plasma humano control positivo (PC) a partir del donante 131. Las muestras de plasma NC y PC generadas recientemente fueron un ejemplo de las curvas de titulación de PC presentadas en la Figura 11. Se calculó el título de PC a 1:250 para las dos réplicas de PC en la primera placa ELISA y 1:1250 para la segunda placa. Los valores de la media de $DO_{450\text{ nm}}$ para el NC fueron $0,156 \pm 0,009$ de 8 réplicas. Por consiguiente, los criterios de aceptación del ensayo se ajustaron a $PC \geq 1:250$ títulos y los valores de la media de la $DO_{450\text{ nm}}$ de NC fueron $< 0,300$. Se usó un control de especie emparejado humano como el control positivo en el ELISA dirigido contra VLM cuando se ensayaron muestras humanas.

Ejemplo 17

Este ejemplo ilustra la detección directa de un anticuerpo contra el VLM en de plasma de caninos. La producción de suero del control positivo para el ELISA de IgG dirigido contra VLM se consiguió estimulando un perro experimental con el virus y recogiendo los sueros a intervalos de tiempo especificados. Se utilizó Ampho MLV (T5.0002) para inmunizar un beagle con adyuvante (dilución 1:1 en adyuvante completo de Freund), se cebó por vía subcutánea y en el día 30, se reforzó con vector (40 μg /perro) se diluyó 1:1 en adyuvante incompleto de Freund. Se proporcionaron cinco inyecciones subcutáneas (8 μg cada una) en el día 15, 22 y 28 después del cebado; los días 6 y 14 después del cebado (días 36 y 44 después del cebado).

Se llevaron a cabo una serie de experimentos para evaluar las curvas de respuesta anti-VLM de los sueros de los perros inmunizados que se habían recogido en diferentes puntos temporales tras la inoculación. El suero se había separado y almacenado a -80°C hasta el uso. Los sueros recogidos en los días 15, 22 y 28 proporcionaron curvas de respuesta a anticuerpos débiles, pero progresivamente mayores, culminando con una fuerte respuesta a la dosis en los días 36 y 44. En la Figura 12 se muestra la similitud en las curvas de respuesta a la dosis de los sueros recogidos en al menos estos dos últimos puntos temporales, y una comparación con los sueros d36+d44 combinados a un factor de dilución 1:5. Para mejorar la parte lineal de la curva de respuesta a la dosis, se ensayaron diferentes factores de dilución (1:3, 1:4 y 1:5) y se compararon (Figura 13). Basándose en esta información, se seleccionó un factor de dilución 1:4 comenzando a una dilución 1:100 como óptimo.

Ejemplo 18

El ejemplo ilustra la selectividad, sensibilidad y reproducibilidad determinadas para la detección de los anticuerpo de VLM en muestras de canino.

Los resultados con suero del control positivo (procedentes con perros inmunizados con un vector vírico) y suero del control negativo (procedente de perros que no habían experimentado anteriormente tratamiento) sugieren que la señal en este ensayo es a su vez una reflexión de la unión de IgG al vector vírico unido a placa. El título de las muestras de ensayo se establecerá mediante dilución en serie 1:4 desde una dilución 1:100 de partida y comparando con las muestras que se habían extraído anteriormente; las señales positivas se definieron como aquellas por encima del corte establecido para este ensayo (mayores que el valor del control negativo promedio + 2 SD).

Para evaluar el rendimiento interensayo, se analizaron los datos de varios estudios, con análisis replicados del control positivo y los controles negativos (Tablas 8 y 9).

Tabla 8. Reproducibilidad interensayo de suero del control positivo.

	Exp067		Exp071		Exp119		Exp124	
Dilución	PC1	PC2	PC1	PC2	PC1	PC2	PC1	PC2
100	3,325	3,319	3,464	3,406	2,989	3,062	3,578	3,584
400	3,049	3,287	3,415	3,352	2,619	2,618	3,572	3,553
1600	2,889	2,967	3,274	3,145	2,234	2,113	3,441	3,374
6400	2,384	2,451	2,687	2,739	1,781	1,753	2,925	2,893
25600	1,184	1,142	1,495	1,433	0,639	0,788	1,318	1,358
102400	0,321	0,275	0,398	0,382	0,172	0,153	0,268	0,312
409600	0,061	0,057	0,077	0,078	0,062	0,037	0,053	0,049
1639400	0,005	0,007	0,010	0,011	0,044	0,000	0,010	0,007

Interensayo			
	Media	Desviación estándar	% de CV
	3,341	0,220	6,6
	3,183	0,385	12,1
	2,930	0,504	17,2
	2,452	0,463	18,9
	1,170	0,307	26,3
	0,285	0,088	31,0
	0,059	0,014	22,9
	0,012	0,014	116,0

Se analizaron las curvas de diluciones en serie del suero del control positivo (PC) a través de cuatro experimentos. Se muestran la media, la desviación estándar (SD) y el % de CV (CV).

Tabla 9. Reproducibilidad interensayo de suero del control negativo.

		Valor de la media	Desviación estándar	% de CV	
Exp067	NC1		0,272	0,014	5,3
	NC2		0,288	0,016	5,5
Exp071	NC1		0,407	0,029	7,1
	NC2		0,412	0,025	6,0
Exp119	NC1		0,195	0,026	13,1
	NC2		0,202	0,026	13,1
Exp124	NC1		0,447	0,025	5,6
	NC2		0,432	0,019	4,3
Interensayo	Media		0,332		

	Desviación estándar	0,104	
	% de CV	31,4	

Se analizaron el suero del control negativo (NC) a través de cuatro experimentos (dilución 1:100 solo). Se muestran la media, la desviación estándar (SD) y el % de CV (CV).

- 5 Se llevó a cabo un análisis de la curva de cuatro parámetros para los sueros del control positivo utilizando datos de algunos estudios. Se utilizó el promedio de los duplicados para generar los datos en la figura 14.

Ejemplo 19

- 10 El ejemplo ilustra la detección directa de anticuerpos contra VLM en sueros de pacientes que utilizan diferentes ensayos. Se llevaron a cabo dos estudios de caninos para evaluar las respuestas inmunitarias al VLM anfotrópico mediante administración intracraneal e intravenosa.

15 Se observó una respuesta inmunitaria al VLM en todos los grupos E7 de dosis altas de perros (N=4) y E9 (N=2) (Figura 15-16). En comparación con la preadministración de sueros de la dosis E7, los títulos de VLM de los cuatro beagle aumentaron en 4 veces (algunos animales individuales aumentaron en 16 veces). Se observó esta respuesta a los 30 días después de la administración de todos los animales y se mantuvieron los niveles durante 3 meses (sueros extraídos en semanas alternas) para dos de los cuatro animales (Fig. 15). La señal de los otros dos animales retornó a los títulos anteriores a la exposición al VLM en 75 días. Los beagle que no recibieron Toca 511 (N=2) no mostraron el aumento en los títulos en todos los puntos temporales ensayados (animales del control). En la dosis E9, se observó que un animal tenía un cambio de 16 veces del valor inicial tan pronto como en 7 días. Se observó una respuesta de anticuerpos dirigidos contra VLM de 64 veces el valor inicial del ensayo en ambos animales el día 28 (Fig. 16). En el día 60 y continuando hasta el día 90, la respuesta de la IgG dirigida contra VLM de ambos animales había disminuido hasta un aumento de 16 veces sobre el valor inicial (Fig. 16).

Ejemplo 20

El ejemplo ilustra la detección directa de la proteína vírica ENV anfotrópica en muestras humanas mediante la estrategia de inmunotransferencia directa.

30 Se diluyó en serie una partícula vírica de VLM anfotrópico para proporcionar las correspondientes cargas víricas desde 3.2×10^5 hasta 1×10^4 y se realizó la transferencia en una membrana de nitrocelulosa. Las muestras de plasma humano se diluyeron hasta 1:10, 1:20, 1:40 y 1:60 (final) y se enriquecieron con virus a 3.2×10^5 , 1.6×10^5 y 8×10^4 (final). Todas las muestras se desnaturalizaron/redujeron en tampón LDS que contenía 2-ME y se calentaron hasta 100°C .
35 tras el bloqueo, la membrana se incubó con un anticuerpo dirigido contra gp70 (clon: 83A25) a $1 \mu\text{g/ml}$ durante 1 h a TA. Se desarrollaron las membranas con un sistema de estreptavidina:HRP y se visualizaron con BioRad Imager (Fig. 17).

Ejemplo 21

40 El ejemplo ilustra la detección directa de las proteínas de XMRV mediante inmunotransferencia utilizando el clon 514 del anticuerpo.

45 La detección de la expresión de gp70 vírico en muestras de VLM y XMRV utilizando el anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra gp70 (clon 514) se ensayó mediante la transferencia Western. El virus TGFP6002-SEC purificado y los lisados celulares de células U87 infectadas con T5.0002-se compararon con los lisados celulares obtenidos de la línea de células 22Rv1. Se cargaron las muestras en un gel Bis-Tris al 4-12% (BioRad) a $1 \mu\text{g/pocillo}$ de proteína total (TGFP6002-SEC) y $40 \mu\text{g/pocillo}$ de proteínas totales para los lisados celulares. El gel se analizó a 200V durante 35 min. Las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de PVDF que se bloqueó durante la noche en un 5% de leche desnatada a 4°C . A continuación, la membrana se incubó con el clon 514 ($1 \mu\text{g/ml}$) durante 2h a TA en una placa con agitación. Tras lavar con TBS-Tween, se detectó la unión del anticuerpo dirigido contra gp70 utilizando un anticuerpo secundario marcado con HRP dirigido contra IgG de ratón (1:2000, 1 h 45 min, TA) y un sustrato quimioluminiscente. Un segundo anticuerpo dirigido contra gp70 (clon 83A25) se analizó como control (Figura 18).

Ejemplo 22

55 El ejemplo muestra la detección de anticuerpos con el ELISA en pacientes de glioma de grado alto (HGG) tratados con Toca 511 mediante inyección intracraneal en el tumor seguida por tratamiento con 5-fluorocitosina (5-FU). El ensayo es un estudio clínico multicentro, abierto, de dosis creciente sobre la seguridad y tolerabilidad de dosis crecientes de Toca 511 administradas a sujetos con HGG recurrente que se han sometido a cirugía seguida por radiación y quimioterapia complementarias. El objetivo primario del ensayo es identificar la dosis más alta, segura y bien tolerada de Toca 511 administrada por vía intratumoral mediante inyección transcraneal estereotáctica. Los

objetivos secundarios son: evaluar la seguridad y la tolerabilidad del tratamiento con 5-fluorocitosina (5-FC) a aproximadamente 130 mg/kg/día durante 6 días comenzando aproximadamente 3 semanas después de la administración de Toca 511 y de forma repetida aproximadamente cada 4 semanas; evaluar el índice de respuesta objetiva de la combinación Toca 511/5-FC utilizando los criterios de Macdonald, para evaluar el porcentaje de sujetos que no han progresado o muerto a los 6 meses (PFS-6); evaluar la seguridad y la tolerabilidad de Toca 511 administrada dentro de un tumor residual en el momento de la craneotomía y la resección parcial del glioma de grado alto reincidente (HGG) y seguido por el tratamiento cíclico con 5-FC.

5
10
15
20

Los sujetos de ensayo son adultos con HGG reincidente que han presentado recidiva tras la cirugía, radiación y quimioterapia. Aproximadamente tres semanas después de la administración del vector, los sujetos se sometieron inicialmente a una gammagrafía de IRM mejorada con gadolinio (Gd-IRM) y a continuación comenzaron el tratamiento con 5-FC oral a aproximadamente 130 mg/kg/día durante 6 días. Se repitieron ciclos de 6 días de 5-FC aproximadamente cada 4 semanas (\pm 1 semana) hasta inicio de un nuevo tratamiento antineoplásico para la progresión del tumor. Los Pts 101 y 102 se sometieron a extirpación del tumor en los marcos temporales que se muestran en la Figura 20. Se tomaron muestras de sangre en los puntos temporales que se muestran en la Figura 20 y ADN de sangre completa, se midieron los ADN procedentes de plasma y los anticuerpos procedentes de plasma mediante la PCR cuantitativa (ADN), mediante la RT-PCR cuantitativa (ARN) y mediante ELISA (anticuerpos dirigidos contra el virus).

20 **LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> Tocagen Inc.
Jolly, Douglas J.

25 <120> ENSAYOS DE ANTISUEROS PARA VIRUS RELACIONADOS CON VLM EN SERES HUMANOS Y OTROS MAMÍFEROS

<130> 00014-013WO1

30 <140> Sin asignar todavía
<141> 28/10/2011

<150> US 61/408.630
<151> 31/10/2010

35 <160> 11

<170> PatentIn versión 3.5

40 <210> 1
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Cebador de oligonucleótido

<400> 1
tttgattcct cagtgggctc 20

50 <210> 2
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Cebador de oligonucleótido

<400> 2
cgatacagtc ttagtcccca tg 22

60 <210> 3
<211> 26
<212> ADN
65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador de oligonucleótido

 <400> 3
 5 cccttttacc cgcgtcagtg aattct 26

 <210> 4
 <211> 21
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador de oligonucleótido

 <400> 4
 15 aacaagcggg tggaagacat c 21

 <210> 5
 <211> 21
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador de oligonucleótido
 25
 <400> 5
 caaaggcgaa gagaggctga c 21

 <210> 6
 <211> 25
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador de oligonucleótido

 <400> 6
 35 cccaccgtgc ccaaccctta caacc 25

 <210> 7
 <211> 11892
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> vector pAC3-yCD2 recombinante
 45
 <400> 7

ES 2 660 755 T3

tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata tggagttccg	60
cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgccatt	120
gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca	180
atgggtggag tatttacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc	240
aagtacgcc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgccagta	300
catgacctta tgggactttc ctacttgcca gtacatctac gtattagtca tcgctattac	360
catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg	420
attccaagt ctccaccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg	480
ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc ccattgacg caaatgggcg gtaggcgtgt	540
acggtgggag gtctatataa gcagagctgg tttagtgaac cggcgccagt cctccgattg	600
actgagtcgc ccgggtaccc gtgtatccaa taaaccctct tgcagttgca tccgacttgt	660
ggtctcgtg ttccettggga gggctctctc tgagtgattg actaccegtc agcggggggtc	720
tttcatttgg gggtcgtcc gggatcggga gaccctgcc cagggaccac cgaccacca	780

ES 2 660 755 T3

ccgggaggtg	agctggccag	caacttatct	gtgtctgtcc	gattgtctag	tgtctatgac	840
tgattttatg	cgctgcgtc	ggtactagtt	agctaaactag	ctctgtatct	ggcggacccc	900
tggtggaact	gacgagttcg	gaacaccccg	cgcgaaccct	gggagacgtc	ccagggactt	960
cgggggccgt	ttttgtggcc	cgacctgagt	ccaaaaatcc	cgatcgtttt	ggactctttg	1020
gtgcaccccc	cttagaggag	ggatatgtgg	ttctggtagg	agacgagaac	ctaaaacagt	1080
tcccgcctcc	gtctgaattt	ttgctttcgg	tttgggaccg	aagccgcgcc	gcgcgtcttg	1140
tctgctgcag	catcgttctg	tgttgtctct	gtctgactgt	gtttctgtat	ttgtctgaga	1200
atatgggcca	gactgttacc	actcccttaa	gtttgacctt	aggtcactgg	aaagatgtcg	1260
agcggatcgc	tcacaaccag	tcggtagatg	tcaagaagag	acgttggggt	accttctgct	1320
ctgcagaatg	gccaaccttt	aacgtcggat	ggccgcgaga	cggcaccttt	aaccgagacc	1380
tcatcaccca	ggttaagatc	aaggtctttt	cacctggccc	gcatggacac	ccagaccagg	1440
tcccctacat	cgtgacctgg	gaagccttgg	cttttgacct	ccctccctgg	gtcaagccct	1500
ttgtacaccc	taagcctccg	cctcctcttc	ctccatccgc	cccgctcttc	ccccttgaac	1560
ctcctcgttc	gaccccgcc	cgatcctccc	tttatccagc	cctcaactct	tctctaggcg	1620
ccaaacctaa	acctcaagtt	ctttctgaca	gtggggggcc	gctcatcgac	ctacttacag	1680
aagaccccc	gccttatagg	gacccaagac	caccccttc	cgacagggac	ggaaatggtg	1740
gagaagcgac	ccctgcggga	gaggcaccgg	accctcccc	aatggcatct	cgctacgtg	1800
ggagacggga	gccccctgtg	gccgactcca	ctacctcgca	ggcattcccc	ctccgcgcag	1860
gaggaaacgg	acagcttcaa	tactggccgt	tctcctcttc	tgacctttac	aactggaaaa	1920
ataataaccc	ttctttttct	gaagatccag	gtaaactgac	agctctgac	gagtctgttc	1980
tcatcaccca	tcagcccacc	tgggacgact	gtcagcagct	gttggggact	ctgctgaccg	2040
gagaagaaaa	acaacgggtg	ctcttagagg	ctagaaaggc	ggtgcggggc	gatgatgggc	2100
gccccactca	actgccaat	gaagtcgatg	ccgcttttcc	cctcgagcgc	ccagactggg	2160
attacaccac	ccaggcaggt	aggaaccacc	tagtccacta	tcgccagttg	ctcctagcgg	2220
gtctccaaaa	cgcgggcaga	agccccacca	atttggccaa	ggtaaaagga	ataacacaag	2280
ggcccaatga	gtctccctcg	gccttcctag	agagacttaa	ggaagcctat	cgcaggtaca	2340
ctccttatga	ccctgaggac	ccagggcaag	aaactaatgt	gtctatgtct	ttcatttggc	2400
agtctgcccc	agacattggg	agaaagttag	agaggttaga	agatttaaaa	aacaagacgc	2460
ttggagattt	ggttagagag	gcagaaaaga	tctttaataa	acgagaaacc	ccggaagaaa	2520
gagaggaacg	tatcaggaga	gaaacagagg	aaaaagaaga	acgccgtagg	acagaggatg	2580
agcagaaaaga	gaaagaaaga	gatcgtagga	gacatagaga	gatgagcaag	ctattggcca	2640

ES 2 660 755 T3

ctgtcgttag tggacagaaa caggatagac agggaggaga acgaaggagg tcccaactcg 2700
atcgcgacca gtgtgcctac tgcaaagaaa aggggcactg ggctaaagat tgtcccaaga 2760
aaccacgagg acctcgggga ccaagacccc agacctccct cctgacceta gatgactagg 2820
gaggtcaggg tcaggagccc ccccctgaac ccaggataac cctcaaagtc ggggggcaac 2880
ccgtcacctt cctggttagat actggggccc aacctccgt gctgacccaa aatcctggac 2940
ccctaagtga taagtctgcc tgggtccaag gggctactgg aggaaagcgg tatcgcctgga 3000
ccacggatog caaagtacat ctagctaccg gtaaggtcac ccactcttc ctccatgtac 3060
cagactgtcc ctatcctctg ttaggaagag atttgctgac taaactaaaa gcccaaatcc 3120
actttgaggg atcaggagcc caggttatgg gaccaatggg gcagcccctg caagtgttga 3180
ccctaaatat agaagatgag catcggctac atgagacctc aaaagagcca gatgtttctc 3240
tagggtccac atggctgtct gattttctc aggcctgggc ggaaaccggg ggcatgggac 3300
tggcagttcg ccaagctcct ctgatcatac ctctgaaagc aacctctacc cccgtgtcca 3360
taaaacaata ccccatgtca caagaagcca gactggggat caagccccac atacagagac 3420
tgttggacca ggaataactg gtaccctgcc agtccccctg gaacacgccc ctgctaccog 3480
ttaagaaacc agggactaat gattataggc ctgtccagga tctgagagaa gtcaacaagc 3540
gggtggaaga catccacccc accgtgccc acccttacia cctcttgagc gggctcccac 3600
cgtcccacca gtggtacact gtgcttgatt taaaggatgc cttttctgc ctgagactcc 3660
accccaccag tcagcctctc ttgcctttg agtggagaga tccagagatg ggaatctcag 3720
gacaattgac ctggaccaga ctcccacagg gtttcaaaaa cagtcccacc ctgtttgatg 3780
aggcactgca cagagacctc gcagacttcc ggatccagca cccagacttg atcctgctac 3840
agtacgtgga tgacttactg ctggccgcca cttctgagct agactgcca caaggtactc 3900
gggccctgtt acaaacccta gggaacctcg ggtatcgggc ctcgccaag aaagcccaaa 3960
tttgccagaa acaggtcaag tatctgggt atcttctaaa agagggtcag agatggctga 4020
ctgaggccag aaaagagact gtgatgggc agcctactcc gaagaccct cgacaactaa 4080
gggagttcct agggacggca ggcttctgtc gcctctggat ccctggggtt gcagaaatgg 4140
cagccccctt gtaccctctc accaaaacgg ggaactctgt taattggggc ccagaccaac 4200
aaaaggccta tcaagaaatc aagcaagctc ttctaactgc cccagccctg gggttgccag 4260
atgtgactaa gccctttgaa ctctttgtcg acgagaagca gggctacgcc aaaggtgtcc 4320
taacgcaaaa actgggacct tggcgtcggc cggcggccta cctgtccaaa aagctagacc 4380
cagtagcagc tgggtggccc ccttgccctac ggatggtagc agccattgcc gtactgacaa 4440
aggatgcagg caagctaacc atgggacagc cactagtcac tctggcccc catgcagtag 4500
aggcactagt caaacaaccc cccgaccgt ggctttccaa cgcccggatg actcactatc 4560

ES 2 660 755 T3

aggccttgct tttggacacg gaccgggtcc agttcggacc ggtggtagcc ctgaacccgg 4620
 ctacgctgct cccactgcct gaggaagggc tgcaacacaa ctgccttgat atcctggccc 4680
 aagcccacgg aacccgaccc gacctaacgg accagccgct cccagacgcc gaccacacct 4740
 ggtacacgga tggagcagc ctcttacaag agggacagcg taaggcggga gctgcggtga 4800
 ccaccgagac cgaggtaatc tgggctaaag cctgccagc cgggacatcc gctcagcggg 4860
 ctgaactgat agcactcacc caggccctaa agatggcaga aggtaagaag ctaaatgttt 4920
 atactgatag ccgttatgct tttgctactg cccatatcca tggagaaata tacagaaggc 4980
 gtgggttgct cacatcagaa ggcaaagaga tcaaaaataa agacgagatc ttggccctac 5040
 taaaagccct ctttctgccc aaaagactta gcataatcca ttgtccagga catcaaaagg 5100
 gacacagcgc cgaggctaga ggcaaccgga tggtgacca agcggcccga aaggcagcca 5160
 tcacagagac tccagacacc tctaccctcc tcatagaaaa ttcacacccc tacacctcag 5220
 aacattttca ttacacagtg actgatataa aggacctaac caagttgggg gccattttatg 5280
 ataaaacaaa gaagtattgg gtctaccaag gaaaacctgt gatgcctgac cagtttactt 5340
 ttgaattatt agactttctt catcagctga ctcacctcag cttctcaaaa atgaaggctc 5400
 tcctagagag aagccacagt cctactaca tgctgaaccg ggatcgaaca ctcaaaaata 5460
 tcaactgagac ctgcaaagct tgtgcacaag tcaacgccag caagtctgcc gttaaacagg 5520
 gaactagggc ccgcgggcat cggcccggca ctcatggga gatcgatttc accgagataa 5580
 agcccggatt gtatggctat aaatatcttc tagtttttat agataccttt tctggctgga 5640
 tagaagcctt cccaaccaag aaagaaaccg ccaaggtcgt aaccaagaag ctactagagg 5700
 agatcttccc caggttcggc atgcctcagg tattgggaac tgacaatggg cctgccttcg 5760
 tctccaaggt gagtcagaca gtggccgac tgttggggat tgattggaaa ttacattgtg 5820
 catacagacc ccaaagctca ggccaggtag aaagaatgaa tagaaccatc aaggagactt 5880
 taactaaatt aacgcttgca actggctcta gagactgggt gctcctactc cccttagccc 5940
 tgtaccgagc ccgcaacacg ccgggcccc atggcctcac cccatatgag atcttatatg 6000
 gggcaccccc gcccttgta aactccctg accctgacat gacaagagtt actaacagcc 6060
 cctctctcca agctcactta caggetctct acttagtcca gcacgaagtc tggagacctc 6120
 tggcggcagc ctaccaagaa caactggacc gaccggtggt acctcaccct taccgagtcg 6180
 gcgacacagt gtgggtccgc cgacaccaga ctaagaacct agaacctcgc tggaaaggac 6240
 cttacacagt cctgctgacc acccccaccg cctcaaaagt agacggcatc gcagcttgga 6300
 tacacgccgc ccacgtgaag gctgccgacc ccgggggtgg accatcctct agactgacat 6360
 ggcgcgttca acgctctcaa aacccctca agataagatt aaccctgga agcccttaat 6420

ES 2 660 755 T3

agtcatggga gtcctgtag gagtaggat ggcagagagc ccccatcagg tctttaatgt 6480
 aacctggaga gtcaccaacc tgatgactgg gcgtaccgcc aatgccacct cctcctctggg 6540
 aactgtacaa gatgccttcc caaaattata ttttgatcta tgtgatctgg tcggagagga 6600
 gtgggaccct tcagaccagg aaccgtatgt cgggtatggc tgcaagtacc ccgcagggag 6660
 acagcggacc cggacttttg acttttacgt gtgccctggg cataccgtaa agtcgggggtg 6720
 tgggggacca ggagagggct actgtggtaa atgggggtgt gaaaccaccg gacaggctta 6780
 ctggaagccc acatcatcgt gggaccta atcccttaag cgcggtaca cccctctggg 6840
 cacgggatgc tctaaagttg cctgtggccc ctgctacgac ctctccaaag tatccaattc 6900
 cttccaaggg gctactcgag ggggcagatg caaccctcta gtccctagaat tcaactgatgc 6960
 aggaaaaaag gctaactggg acgggcccac atcgtgggga ctgagactgt accggacagg 7020
 aacagatcct attaccatgt tctccctgac ccggcaggtc cttaatgtgg gaccccaggt 7080
 ccccataggg cccaaccag tattaccga ccaagactc ccttcctcac caatagagat 7140
 tgtaccggct ccacagccac ctagccccct caataccagt tacccccctt ccaactaccag 7200
 tacaccctca acctccccta caagtccaag tgtcccacag ccaccccag gaactggaga 7260
 tagactacta gctctagtca aaggagccta tcagggcgtt aacctacca atcccgacaa 7320
 gacccaagaa tgttggctgt gcttagtgc gggacctcct tattacgaag gagtagcgggt 7380
 cgtgggcaact tataccaatc attccaccgc tcgggccaac tgtacggcca cttcccaaca 7440
 taagcttacc ctatctgaag tgacaggaca gggcctatgc atgggggcag tacctaaaac 7500
 tcaccaggcc ttatgtaaca ccacccaaag cgcgggctca ggatcctact acctgcagc 7560
 acccgccgga acaatgtggg cttgcagcac tggattgact cctgcttgt ccaccacgggt 7620
 gctcaatcta accacagatt attgtgtatt agttgaactc tggcccagag taatttacca 7680
 ctccccgat tatatgtatg gtcagcttga acagcgtacc aatataaaa gagagccagt 7740
 atcattgacc ctggcccttc tactaggagg attaaccatg ggagggattg cagctggaat 7800
 agggacgggg accactgcct taattaaaac ccagcagttt gagcagcttc atgccgctat 7860
 ccagacagac ctcaacgaag tcgaaaagtc aattaccaac ctagaaaagt cactgacctc 7920
 gttgtctgaa gtagtcctac agaaccgcag aggcctagat ttgctattcc taaaggaggg 7980
 aggtctctgc gcagccctaa aagaagaatg ttgtttttat gcagaccaca cggggctagt 8040
 gagagacagc atggccaaat taagagaaag gcttaatcag agacaaaaac tatttgagac 8100
 aggccaagga tggttcgaag ggctgtttaa tagatcccc tggtttacca ccttaatctc 8160
 caccatcatg ggacctctaa tagtactctt actgatctta ctctttggac cttgcattct 8220
 caatcgattg gtccaatttg ttaaagacag gatctcagtg gtccaggctc tggttttgac 8280
 tcagcaatat caccagctaa aaccataga gtacagacca tgaacgcgtt actggccgaa 8340

ES 2 660 755 T3

gcccgttggg ataagggcgg tgtgcgtttg tctatatggt attttccacc atattgccgt 8400
cttttggcaa tgtgagggcc cggaaacctg gccctgtctt cttgacgagc attcctaggg 8460
gtctttcccc tctcgccaaa ggaatgcaag gtctgttgaa tgtcgtgaag gaagcagttc 8520
ctctggaagc ttcttgaaga caaacaacgt ctgtagcgac cctttgcagg cagcgggaacc 8580
ccccacctgg cgacaggtgc ctctgcgggc aaaagccacg tgtataagat acacctgcaa 8640
aggcggcaca accccagtg c acgttgtga gttggatagt tgtggaaaga gtcaaatggc 8700
tctcctcaag cgtattcaac aaggggctga aggatgccca gaaggtaacc cattgtatgg 8760
gatctgatct ggggcctcgg tgcacatgct ttacatgtgt ttagtcgagg ttaaaaaaac 8820
gtctaggccc cccgaaccac ggggacgtgg ttttcctttg aaaaacacga ttataaatgg 8880
tgaccggcgg catggcctcc aagtgggatc aaaagggcat ggatatcgct tacgaggagg 8940
ccctgctggg ctacaaggag ggcggcgtgc ctatcggcgg ctgtctgatc aacaacaagg 9000
acggcagtg gctgggcagg ggcacaaca tgaggttcca gaagggtcc gccaccctgc 9060
acggcgagat ctccacctg gagaactgtg gcaggctgga gggcaagggtg tacaaggaca 9120
ccaccctgta caccacctg tccccttgtg acatgtgtac cggcgctatc atcatgtacg 9180
gcatccctag gtgtgtgatc ggcgagaacg tgaacttcaa gtccaagggc gagaagtacc 9240
tgcaaaccag gggccacgag gtggtggttg ttgacgatga gaggtgtaag aagctgatga 9300
agcagttcat cgacgagagg cctcaggact ggttcgagga tatcggcgag taagcggccg 9360
cagataaaat aaaagatttt atttagtctc cagaaaaagg ggggaatgaa agaccccacc 9420
tgtaggtttg gcaagctagc ttaagtaacg ccattttgca aggcattgaa aaatacataa 9480
ctgagaatag agaagttcag atcaaggta ggaacagatg gaacagctga atatgggcca 9540
aacaggatat ctgtggtaag cagttcctgc cccggctcag ggccaagaac agatggaaca 9600
gctgaatatg ggccaaacag gatattctgtg gtaagcagtt cctgccccgg ctcagggcca 9660
agaacagatg gtccccagat gcggtccagc cctcagcagt ttctagagaa ccatcagatg 9720
ttccagggt gccccaagga cctgaaatga ccctgtgcct tatttgaact aaccaatcag 9780
ttcgcttctc gcttctgttc gcgcgcttct gctccccgag ctcaataaaa gagcccacaa 9840
cccctcactc ggggcgccag tcctccgatt gactgagtcg cccgggtacc cgtgtatcca 9900
ataaacctc ttgcagttgc atccgacttg tggctctcgt gttccttggg agggctctct 9960
ctgagtgatt gactaccctg cagcgggggt ctttcattac atgtgagcaa aaggccagca 10020
aaaggccagg aaccgtaaaa aggcgcggtt gctggcgttt ttccataggc tccgcccccc 10080
tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg cgaaaccgga caggactata 10140
aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc 10200

ES 2 660 755 T3

gcttaccgga tacctgtccg cctttctccc ttcgggaagc gtggcgcttt ctcaatgctc 10260
acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcaoga 10320
acccccggt cagccccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc 10380
ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt aacaggatta gcagagogag 10440
gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtgggtggcct aactacggct aactagaag 10500
gacagtattt ggtatctgog ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa gagttggtag 10560
ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg tagcgggtgt tttttgttt gcaagcagca 10620
gattacgcgc agaaaaaag gatctcaaga agatccttg atcttttcta cggggctga 10680
cgctcagtg aacgaaaact cacgttaagg gattttggtc atgagattat caaaaaggat 10740
cttcacctag atccttttaa attaaaaatg aagttttaa tcaatctaaa gtatatatga 10800
gtaaacttg tctgacagtt accaatgctt aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg 10860
totatttctg tcatcatag ttgctgact ccccgctgtg tagataacta cgatacggga 10920
gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat gataccgca gaccacgct caccgctcc 10980
agatttatca gcaataaacc agccagccgg aagggccgag cgcagaagtg gtctgcaac 11040
ttatccgcc tccatccagt ctattaattg ttgccgggaa gctagagtaa gtagttcgcc 11100
agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat tgctgcaggc atcgtggtgt cacgctgtc 11160
gtttggtatg gcttcattca gctccggttc ccaacgatca aggcgagtta catgatccc 11220
catgttgctg aaaaaagcgg ttagctcctt cggctcctcg atcgttgtca gaagtaagtt 11280
ggcgcagtg ttatcactca tggttatggc agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc 11340
atccgtaaga tgcttttctg tgactggtga gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg 11400
tatgcccga cagagttgct cttgcccggc gtcaacacgg gataataccg cgccacatag 11460
cagaacttta aaagtgtca tcattgaaa acgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat 11520
cttacogctg ttgagatcca gttogatgta acccactcgt gcaoccaaact gatcttcagc 11580
atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaa ggaaggcaaa atgcgcgaaa 11640
aaaggaata agggcgacac ggaaatggtg aatactcata ctcttccttt ttcaatatta 11700
ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat gagcggatac atatttgaat gtatttagaa 11760
aaataaaca ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaa gtgccacctg acgtctaaga 11820
aaccattatt atcatgacat taacctataa aaataggcgt atcacgaggc cctttcgtct 11880
tcaagaattc at 11892

<210> 8
<211> 11892
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> vector pAC3-yCD recombinante

5

<400> 8

ES 2 660 755 T3

tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata tggagttccg 60
cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt 120
gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca 180
atgggtggag tatttacggg aaactgccc cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc 240
aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta 300
catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tgcctattac 360
catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg 420
atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg 480
ggactttcca aatgctgta acaactccgc ccattgacg caaatgggcg gtaggcgtgt 540
acgggtgggag gtctatataa gcagagctgg tttagtgaac cggcgcagc cctccgattg 600
actgagtcgc ccgggtaccc gtgtatccaa taaaccctct tgcaattgca tccgacttgt 660
ggctctgctg ttcttggga gggctcctc tgagtgattg actaccgctc agcgggggctc 720
tttcatttgg gggctcgtcc gggatcggga gaccctgcc cagggaccac cgaccacca 780
ccgggaggta agctggccag caacttatct gtgtctgtcc gattgtctag tgtctatgac 840
tgattttatg cgctgcgctc ggtactagtt agctaactag ctctgtatct ggcggaccgc 900
tgggtggaact gacgagttcg gaacaccgcg ccgcaaccct gggagacgct ccagggactt 960
cgggggcccgt ttttgtggcc cgacctgagt ccaaaaatcc cgatcgtttt ggactctttg 1020
gtgcaccccc cttagaggag ggatatgtgg ttctggtagg agacgagaac ctaaaacagt 1080
tcccgctcc gtctgaattt ttgcttccg tttgggaccg aagccgcgcc gcgcgtcttg 1140
tctgctgcag catcgttctg tgttgtctct gtctgactgt gtttctgtat ttgtctgaga 1200
atatgggcca gactgttacc actccctaa gttgacctt aggtcactgg aaagatgtcg 1260
agcggatcgc tcacaaccag tcggtagatg tcaagaagag acgttgggtt accttctgct 1320
ctgcagaatg gccaacctt aacgtcggat ggccgcgaga cggcaccttt aaccgagacc 1380
tcatcaccca ggttaagatc aaggtctttt cacctggccc gcatggacac ccagaccagg 1440
tcccctacat cgtgacctgg gaagccttgg cttttgacct cctccctgg gtcaagccct 1500
ttgtacacc taagcctccg cctcctctc ctccatccgc cccgtctctc ccccttgaac 1560
ctcctcgttc gaccccgct cgatcctccc tttatccagc cctcactcct tctctaggcg 1620
ccaaacctaa acctcaagtt cttctgaca gtggggggcc gctcatcgac ctacttacag 1680
aagaccccc gccttatagg gacccaagac caccctctc cgacagggac ggaaatggtg 1740

ES 2 660 755 T3

gagaagcgac ccctgCGGga gaggcaccgg acccctcccc aatggcatct cgcctacgtg 1800
ggagacggga gccccctgtg gcgactcca ctacctcgca ggcatcccc ctcgcgcag 1860
gaggaaacgg acagcttcaa tactggcctg tctcctcttc tgacctttac aactggaaaa 1920
ataataaacc ttctttttct gaagatccag gtaaactgac agctctgatc gagtctgttc 1980
tcatcaccca tcagcccacc tgggacgact gtcagcagct gttggggact ctgctgaccg 2040
gagaagaaaa acaacgggtg ctcttagagg ctagaaaggc ggtgcggggc gatgatgggc 2100
gccccactca actgccaat gaagtcgatg cgccttttcc cctcgagcgc ccagactggg 2160
attacaccac ccaggcaggt aggaaccacc tagtccacta tcgccagttg ctctagcgg 2220
gtctcaaaaa cgcgggcaga agccccacca atttggcaa ggtaaaagga ataacacaag 2280
ggcccaatga gtctccctcg gccttcctag agagacttaa ggaagcctat cgcaggtaca 2340
ctccttatga ccctgaggac ccagggcaag aaactaatgt gtctatgtct ttcatttggc 2400
agtctgcccc agacattggg agaaagttag agaggttaga agatttaaaa aacaagacgc 2460
ttggagattt ggttagagag gcagaaaaga tctttaataa acgagaaacc ccggaagaaa 2520
gagaggaacg tatcaggaga gaaacagagg aaaaagaaga acgccgtagg acagaggatg 2580
agcagaaaga gaaagaaaga gatcgtagga gacatagaga gatgagcaag ctattggcca 2640
ctgtcgttag tggacagaaa caggatagac agggaggaga acgaaggagg tcccaactcg 2700
atcgcgacca gtgtgcctac tgcaaagaaa aggggactg ggctaaagat tgtcccaaga 2760
aaccacgagg acctcgggga ccaagacccc agacctcctt cctgacccta gatgactagg 2820
gaggtcaggg tcaggagccc cccctgaac ccaggataac cctcaaagtc ggggggcaac 2880
ccgtcacctt cctggtagat actggggccc aacctccgt gctgacccaa aatcctggac 2940
ccctaagtga taagtctgcc tgggtccaag gggctactgg aggaaagcgg tatcgtgga 3000
ccacggatcg caaagtacat ctagctaccg gtaaggctac ccactcttc ctccatgtac 3060
cagactgtcc ctatcctctg ttaggaagag atttgctgac taaactaaa gccccaatcc 3120
actttgaggg atcaggagcc caggttatgg gaccaatggg gcagcccctg caagtgttga 3180
ccctaaatat agaagatgag catcggctac atgagacctc aaaagagcca gatgtttctc 3240
tagggtccac atggctgtct gattttctc aggcctgggc ggaaaccggg ggcatgggac 3300
tggcagttcg ccaagctcct ctgatcatac ctctgaaagc aacctctacc ccogtgtcca 3360
taaaacaata cccatgtca caagaagcca gactggggat caagccccac atacagagac 3420
tgttggacca ggaataactg gtaccctgcc agtccccctg gaacacgccc ctgctacccg 3480
ttaagaaacc agggactaat gattatagc ctgtccagga tetgagagaa gtcaacaagc 3540
gggtggaaga catccacccc accgtgccc acccttaca cctctgagc gggctcccac 3600
cgtcccacca gtggtacact gtgcttgatt taaaggatgc cttttctgc ctgagactcc 3660

ES 2 660 755 T3

accccaccag tcagcctctc ttgcctttg agtggagaga tccagagatg ggaatctcag 3720
 gacaattgac ctggaccaga ctcccacagg gtttcaaaaa cagtcccacc ctgtttgatg 3780
 aggcactgca cagagaccta gcagacttcc ggatccagca ccagacttg atcctgctac 3840
 agtacgtgga tgacttactg ctggccgcca cttctgagct agactgccaa caaggtactc 3900
 gggccctggt acaaacccta gggaacctcg ggtatcgggc ctcgccaag aaagcccaaa 3960
 tttgccagaa acaggtcaag tatctggggg atcttctaaa agagggtcag agatggctga 4020
 ctgaggccag aaaagagact gtgatggggc agcctactcc gaagaccctc cgacaactaa 4080
 gggagttcct agggacggca ggcttctgtc gcctctggat ccctggggtt gcagaaatgg 4140
 cagccccctt gtaccctctc accaaaacgg ggactctggt taattggggc ccagaccaac 4200
 aaaaggccta tcaagaaatc aagcaagctc ttctaactgc ccagccctg gggttgccag 4260
 atttgactaa gccctttgaa ctctttgtcg acgagaagca gggctacgcc aaaggtgtcc 4320
 taacgcaaaa actgggacct tggcgtcggc cggtgcceta cctgtccaaa aagctagacc 4380
 cagtagcagc tgggtggccc cettgcctac ggatggtagc agccattgcc gtactgacaa 4440
 aggatgcagg caagctaacc atgggacagc cactagtcat tctggccccc catgcagtag 4500
 aggcactagt caaacaaccc ccgaccgct ggctttccaa cggccggatg actcactatc 4560
 aggccttgct tttggacacg gaccgggtcc agttcggacc ggtggtagcc ctgaacccgg 4620
 ctacgctgct cccactgcct gaggaagggc tgcaacacaa ctgccttgat atcctggccc 4680
 aagcccacgg aaccggaccg gacctaacgg accagccgct ccagacgcc gaccacacct 4740
 ggtacacgga tggaagcagt ctcttacaag agggacagcg taaggcggga gctgcggtga 4800
 ccaccgagac cgaggtaatc tgggctaaag ccctgccagc cgggacatcc gctcagcggg 4860
 ctgaactgat agcactcacc caggccctaa agatggcaga aggtaagaag ctaaagtgtt 4920
 atactgatag ccgttatgct tttgctactg cccatatcca tggagaaata tacagaaggc 4980
 gtgggttgct cacatcagaa ggcaaagaga tcaaaaataa agacgagatc ttggccctac 5040
 taaaagccct ctttctgccc aaaagactta gcataatcca ttgtccagga catcaaaaag 5100
 gacacagcgc cgaggctaga ggcaaccgga tggctgacca agcggccccg aaggcagcca 5160
 tcacagagac tccagacacc tctaccctcc tcatagaaaa ttcacaccc tacacctcag 5220
 aacatthtca ttacacagtg actgatataa aggacctaac caagttgggg gccatthtatg 5280
 ataaaacaaa gaagtattgg gtctaccaag gaaaacctgt gatgcctgac cagthtactt 5340
 ttgaattatt agactthctt catcagctga ctacctcag cthctcaaaa atgaaggctc 5400
 tcctagagag aagccacagt ccctactaca tgctgaaccg ggatcgaaca ctcaaaaata 5460
 tcactgagac ctgcaaagct tgtgcacaag tcaacgccag caagtctgcc gthaaacagg 5520

ES 2 660 755 T3

gaactagggt ccgcgggcat cggcccgga ctcattggga gatcgatttc accgagataa 5580
 agcccggatt gtatggctat aaatatcttc tagtttttat agataccttt tctggctgga 5640
 tagaagcctt cccaaccaag aaagaaaccg ccaaggtcgt aaccaagaag ctactagagg 5700
 agatcttccc caggttcggc atgcctcagg tattgggaac tgacaatggg cctgccttcg 5760
 tctccaaggt gagtcagaca gtggcogatac tgttggggat tgattggaaa ttacattgtg 5820
 catacagacc ccaaagctca gggcaggtag aaagaatgaa tagaaccatc aaggagactt 5880
 taactaaatt aacgcttgca actggctcta gagactgggt gctcctactc cccttagccc 5940
 tgtaccgagc ccgcaacacg ccgggcccc atggcctcac cccatatgag atcttatatg 6000
 gggcaccccc gcccttgta aacttcctg accctgacat gacaagagtt actaacagcc 6060
 octctctcca agctcactta caggctctct acttagtcca gcacgaagtc tggagacctc 6120
 tggcggcagc ctaccaagaa caactggacc gaccgggtgt acctcacctt taccgagtcg 6180
 gcgacacagt gtgggtccgc cgacaccaga ctaagaacct agaacctcgc tggaaaggac 6240
 cttacacagt cctgctgacc acccccaccg ccctcaaagt agacggcatc gcagcttggg 6300
 tacacgccgc ccacgtgaag gctgccgacc ccgggggtgg accatcctct agactgacat 6360
 ggcgcgttca acgctctcaa aacccctca agataagatt aaccctgga agcccttaat 6420
 agtcatggga gtccctgttag gagtagggat ggcagagagc ccccatcagg tctttaatgt 6480
 aacctggaga gtcaccaacc tgatgactgg gcgtaccgcc aatgccacct ccctcctggg 6540
 aactgtacaa gatgccttcc caaaattata ttttgatcta tgtgatctgg tcggagagga 6600
 gtgggaccct tcagaccagg aaccgtatgt cgggtatggc tgcaagtacc ccgcaggag 6660
 acagcggacc cggacttttg acttttacgt gtgccctggg cataccgtaa agtcggggtg 6720
 tgggggacca ggagagggt actgtggtaa atgggggtgt gaaaccaccg gacaggctta 6780
 ctggaagccc acatcatcgt gggacctaat ctcccttaag cgcggtaaca ccccctggga 6840
 cacgggatgc tctaaagtgt cctgtggccc ctgctacgac ctctccaaag tatccaattc 6900
 cttccaaggg gctactcgag ggggcagatg caaccctcta gtccctagaat tcaactgatc 6960
 aggaaaaaag gctaactggg acgggcccac atcgtgggga ctgagactgt accggacagg 7020
 aacagatcct attaccatgt tctccctgac ccggcaggtc cttaatgtgg gaccccgagt 7080
 ccccataggg cccaaccag tattaccoga ccaaagactc ccttcctcac caatagagat 7140
 tgtaccggct ccacagccac ctagccccct caataccagt tccccctt cactaccag 7200
 tacaccctca acctcccta caagtccaag tgtcccacag ccaccccag gaactggaga 7260
 tagactacta gctctagtca aaggagccta tcaggcgtt aacctacca atcccgacaa 7320
 gaccaagaa tgttggctgt gcttagtgtc gggacctcct tattacgaag gagtagcgtt 7380
 cgtgggcact tataccaatc attccaccgc tccggccaac tgtaccgcca cttccaaca 7440

ES 2 660 755 T3

taagcttacc	ctatctgaag	tgacaggaca	gggcctatgc	atgggggcag	tacctaaaac	7500
tcaccaggcc	ttatgtaaca	ccacccaaag	cgccggctca	ggatcctact	accttgcagc	7560
accgcocgga	acaatgtggg	cttgcagcac	tggattgact	ccctgcttgt	ccaccacggt	7620
gctcaatcta	accacagatt	attgtgtatt	agttgaactc	tggcccagag	taatttacca	7680
ctccccgat	tatatgtatg	gtcagcttga	acagcgtacc	aatataaaa	gagagccagt	7740
atcattgacc	ctggcccttc	tactaggag	attaaccatg	ggagggattg	cagctggaat	7800
agggacgggg	accactgcct	taattaaaac	ccagcagttt	gagcagcttc	atgccgctat	7860
ccagacagac	ctcaacgaag	tcgaaaagtc	aattaccaac	ctagaaaagt	cactgacctc	7920
gttgtctgaa	gtagtcctac	agaaccgcag	aggcctagat	ttgctattcc	taaaggagg	7980
aggctctctgc	gcagccctaa	aagaagaatg	ttgtttttat	gcagaccaca	cggggctagt	8040
gagagacagc	atggccaaat	taagagaaag	gcttaatcag	agacaaaaac	tatttgagac	8100
aggccaagga	tggttcgaag	ggctgtttaa	tagatcccc	tggtttacca	cettaatctc	8160
caccatcatg	ggacctctaa	tagtactctt	actgatctta	ctctttggac	cttgcattct	8220
caatogattg	gtccaatttg	ttaaagacag	gatctcagtg	gtccaggctc	tggttttgac	8280
tcagcaatat	caccagctaa	aacctataga	gtacgagcca	tgaacgcggt	actggccgaa	8340
gccgcttgga	ataaggccgg	tgtgcgtttg	tctatatggt	atthccacc	atattgccgt	8400
cttttgga	tgtgagggcc	cggaaacctg	gccctgtctt	cttgacgagc	attcctaggg	8460
gtctttcccc	tctcgccaaa	ggaatgcaag	gtctgttgaa	tgtcgtgaag	gaagcagttc	8520
ctctggaagc	ttcttgaaga	caaacaacgt	ctgtagcgac	cctttgcagg	cagcgggaacc	8580
ccccacctgg	cgacaggtgc	ctctgoggcc	aaaagccaag	tgtataagat	acacctgcaa	8640
aggcggcaca	acccagtg	cacgttgtga	gttgatagat	tgtggaaaga	gtcaaatggc	8700
tctcctcaag	cgtattcaac	aaggggctga	aggatgcccc	gaaggtacc	cattgtatgg	8760
gatctgatct	ggggcctcgg	tgacatgct	ttacatgtgt	ttagtcgagg	ttaaaaaac	8820
gtctaggccc	cccgaaccac	gggacgtgg	ttttcctttg	aaaaacacga	ttataaatgg	8880
tgacaggggg	aatggcaagc	aagtgggatc	agaagggtat	ggacattgcc	tatgaggagg	8940
cggccttagg	ttacaaagag	ggtggtgttc	ctattggcgg	atgtcttatc	aataacaaag	9000
acggaagtgt	tctcggtcgt	ggtcacaaca	tgagatttca	aaagggatcc	gccacactac	9060
atggtgagat	ctccactttg	gaaaactgtg	ggagattaga	gggcaaagtg	tacaaagata	9120
ccactttgta	tacgacgctg	tctccatg	acatgtgtac	agggtccatc	atcatgtatg	9180
gtattccacg	ctgtgttgtc	ggtgagaacg	ttaatttcaa	aagtaagggc	gagaaatatt	9240
tacaaactag	aggtcacgag	gttgtgtgtg	ttgacgatga	gaggtgtaaa	aagatcatga	9300

ES 2 660 755 T3

aacaatztat cgatgaaaga cctcaggatt ggtttgaaga tattggtgag taggcggccg 9360
cagataaaat aaaagathtt atttagtctc cagaaaaagg ggggaatgaa agaccccacc 9420
tgtaggtttg gcaagctagc ttaagtaacg ccattttgca aggcattgaa aaatacataa 9480
ctgagaatag agaagttcag atcaaggta ggaacagatg gaacagctga atatgggcca 9540
aacaggatat ctgtggttaag cagttcctgc cccggctcag ggccaagaac agatggaaca 9600
gctgaatatg ggccaaacag gatattctgtg gtaagcagtt cctgccccgg ctcagggcca 9660
agaacagatg gtccccagat gcggtccagc cctcagcagt ttctagagaa ccattcagatg 9720
ttccagggt gccccaagga cctgaaatga ccctgtgcct tatttgaact aaccaatcag 9780
ttcgcttctc gcttctgttc gcgctctctc gctccccgag ctcaataaaa gagcccacaa 9840
cccctcactc ggggcgccag tcctccgatt gactgagtcg cccgggtacc cgtgtatcca 9900
ataaacctc ttgcagttgc atccgacttg tggctcctct gttccttggg agggctctct 9960
ctgagtgatt gactaccctg cagcgggggt ctttcattac atgtgagcaa aaggccagca 10020
aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcggt gctggcgttt ttccataggc tccgcccccc 10080
tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg cgaaaaccga caggactata 10140
aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc 10200
gcttaccgga tacctgtccg cttttctccc ttogggaagc gtggcgcttt ctcaatgctc 10260
acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt cgttcctctc aagctgggct gtgtgcacga 10320
acccccggt cagcccagcc gctgcgcctt atccggtaac tctcgtcttg agtccaacct 10380
ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt aacaggatta gcagagcgag 10440
gtatgtaggc ggtgctacag agttctttaa gtgggtggct aactacggct aactagaag 10500
gacagtattt ggtatctcgc ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa gagttggtag 10560
ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg tagcgggtgt tttttgttt gcaagcagca 10620
gattacgcgc agaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cggggtctga 10680
cgctcagtg aacgaaaact cacgttaag gattttggtc atgagattat caaaaaggat 10740
cttcacctag atccttttaa attaaaaatg aagttttaa tcaatctaaa gtatatatga 10800
gtaaacttgg tctgacagtt accaatgctt aatcagtgag gcacctatct cagcagctg 10860
tctatttctg tcatccatag ttgcctgact ccccgctcgt tagataacta cgatacggga 10920
gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat gataccgcga gaccacgct caccggctcc 10980
agatttatca gcaataaacc agccagccgg aagggccgag cgcagaagtg gtctgcaac 11040
tttatccgcc tccatccagt ctattaattg ttgccgggaa gctagagtaa gtagtctgcc 11100
agttaatagt ttgcgcaacg ttgctgcat tgctgcaggc atcgtggtgt cacgctcgtc 11160
gtttggtatg gcttcattca gctccggttc ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc 11220

ES 2 660 755 T3

```

catggttgtc aaaaaagcgg ttagctcctt cggtcctcog atcgttggtca gaagtaagtt 11280
ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc 11340
atccgtaaga tgctttttctg tgactgggtga gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg 11400
tatgcggcga ccgagttgct cttgcccggc gtcaacacgg gataataccg cgccacatag 11460
cagaacttta aaagtgtca tcattggaaa acgttctctg gggcgaaaac tctcaaggat 11520
cttacogctg ttgagatcca gttcgatgta acccactcgt gcacccaact gatcttcage 11580
atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaca ggaaggcaaa atgccgcaaa 11640
aaagggtaata agggcgacac ggaaatgttg aatactcata ctcttccttt ttcaatatta 11700
ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat gagcggatac atatttgaat gtatttagaa 11760
aaataaacia ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaa gtgccacctg acgtctaaga 11820
aaccattatt atcatgacat taacctataa aaataggcgt atcacgaggc cctttcgtct 11880
tcaagaattc at 11892

```

```

<210> 9
<211> 11893
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

```

5

```

<220>
<223> vector pAC3-yCD2 recombinante
<400> 9

```

10

ES 2 660 755 T3

tagttattaa tagtaatcaa ttacgggggc attagttcat agcccatata tggagttccg	60
cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt	120
gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca	180
atgggtggag tatttacggt aaactgccc cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc	240
aagtacgcc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta	300
catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac	360
catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg	420
attccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg	480
ggactttcca aaatgtcgta acaactcgc ccattgacg caaatgggcg gtaggcgtgt	540
acggtgggag gtctatataa gcagagctgg tttagtgaac cggcgccagt cctccgattg	600
actgagtcgc ccgggtaccg gtgtatccaa taaacctct tgcagttgca tccgacttgt	660
ggtctcgctg ttccttggga gggctctctc tgagtgattg actaccgtc agcgggggtc	720
tttcatttgg gggctcgtcc gggatcggga gacctctgc cagggaccac cgaccacca	780
ccgggaggta agctggccag caacttatct gtgtctgtcc gattgtctag tgtctatgac	840

ES 2 660 755 T3

tgattttatg cgcctgcgtc ggtactagtt agctaactag ctctgtatct ggcggacccg 900
 tgggtggaact gacgagttcg gaacacccgg ccgcaaccct gggagacgtc ccagggactt 960
 cggggggccgt ttttgtggcc cgacctgagt ccaaaaatcc cgatcgtttt ggactctttg 1020
 gtgcaccccc cttagaggag ggatatgtgg ttctggtagg agacgagaac ctaaaacagt 1080
 tcccgcctcc gtctgaatth ttgctttcgg tttgggaccg aagccgcgcc gcgcgtcttg 1140
 tctgctgcag catcgttctg tgttgtctct gtctgactgt gtttctgtat ttgtctgaaa 1200
 atatgggcca gactgttacc actcccttaa gtttgacctt aggtcactgg aaagatgtcg 1260
 agcggatcgc tcacaaccag tcggtagatg tcaagaagag acgttggggtt accttctgct 1320
 ctgcagaatg gccaaccttt aacgtcggat ggccgcgaga cggcaccttt aaccgagacc 1380
 tcatcaccca ggttaagatc aaggcttttt cacctggccc gcatggacac ccagaccagg 1440
 tcccctacat cgtgacctgg gaagccttgg cttttgacct cctccctgg gtcaagccct 1500
 ttgtacaccc taagcctccg cctcctcttc ctccatccgc cccgtctctc ccccttgaac 1560
 ctctctgctc gaccccgccct cgatcctccc tttatccagc cctcactcct tctctaggcg 1620
 ccaaacctaa acctcaagtt ctttctgaca gtggggggcc gctcatcgac ctacttacag 1680
 aagaccccc gccttatagg gacccaagac caccoccttc cgacagggac ggaaatggtg 1740
 gagaagcgac cctgcgggga gaggaaccgg acccctcccc aatggcatct cgcctacgtg 1800
 ggagacggga gccccctgtg gccgactcca ctacctcgca ggcattcccc ctccgcgcag 1860
 gaggaaacgg acagcttcaa tactggccgt tctcctcttc tgacctttac aactggaaaa 1920
 ataataaccc ttctttttct gaagatccag gtaaactgac agctctgate gagtctgtcc 1980
 tcatcaccca tcagcccacc tgggacgact gtcagcagct gttggggact ctgctgaccg 2040
 gagaagaaaa acaacgggtg ctcttagagg ctagaaaggc ggtgcggggc gatgatgggc 2100
 gccccactca actgcccact gaagtcgatg ccgcttttcc cctcgagcgc ccagactggg 2160
 attacaccac ccaggcaggt aggaaccacc tagtccacta tcgccagttg ctcttagcgg 2220
 gtctccaaaa cgcgggcaga agccccacca atttggccaa ggtaaaagga ataacacaag 2280
 ggcccactga gtctccctcg gccttcctag agagacttaa ggaagcctat cgcaggtaca 2340
 ctcttatga ccctgaggac ccagggcaag aaactaatgt gtctatgtct ttcatthggc 2400
 agtetgcccc agacattggg agaaagttag agaggttaga agatttaaaa aacaagacgc 2460
 ttggagatth ggttagagag gcagaaaaga tctthtaataa acgagaaacc ccggaagaaa 2520
 gagaggaacg tatcaggaga gaaacagagg aaaaagaaga acgccgtagg acagaggatg 2580
 agcagaaaaga gaaagaaaaga gatcgttaga gacatagaga gatgagcaag ctattggcca 2640
 ctgtcgttag tggacagaaa caggatagac agggaggaga acgaaaggagg tcccactcg 2700
 atcgcgacca gtgtgcctac tgcaaagaaa aggggactg ggctaaagat tgtcccaaga 2760

ES 2 660 755 T3

aaccacgagg acctcgggga ccaagacccc agacctccct cctgacccta gatgactagg 2820
gaggtcaggg tcaggagccc cccoctgaac ccaggataac cctcaaagtc ggggggcaac 2880
ccgtcacctt cctggtagat actggggccc aacctccgt gctgacccaa aatcctggac 2940
ccctaagtga taagtctgcc tgggtccaag gggctactgg aggaaagcgg tatcgtgga 3000
ccacggatcg caaagtacat ctagctaccg gtaaggtcac ccactcttc ctccatgtac 3060
cagactgtcc ctatcctctg ttaggaagag atttgctgac taaactaaa gcccaaatcc 3120
actttgaggg atcaggagcc caggttatgg gaccaatggg gcagcccctg caagtgttga 3180
ccctaaatat agaagatgag tatcggctac atgagacctc aaaagagcca gatgtttctc 3240
tagggtccac atggctgtct gatcttctc aggcctgggc ggaaaccggg ggcattgggac 3300
tggcagttcg ccaagctcct ctgatcatac ctctgaaagc aacctctacc cccgtgtcca 3360
taaaacaata ccccatgtca caagaagcca gactggggat caagccccac atacagagac 3420
tgttggacca ggaatactg gtaccctgcc agtccccctg gaacacgccc ctgctaccog 3480
ttaagaaacc agggactaat gattataggc ctgtccagga tctgagagaa gtcaacaagc 3540
gggtggaaga catccacccc accgtgccc acccttaca cctcttgagc gggtcccac 3600
cgtcccacca gtggtacact gtgcttgatt taaaggatgc cttttctgc ctgagactcc 3660
accccaccag tcagcctctc ttgcctttg agtggagaga tccagagatg ggaatctcag 3720
gacaattgac ctggaccaga ctcccacagg gtttcaaaaa cagtcccacc ctgtttgatg 3780
aggcactgca cagagacctc gcagacttcc ggatccagca cccagacttg atcctgctac 3840
agtacgtgga tgacttactg ctggccgcca cttctgagct agactgcca caaggtactc 3900
gggccctgtt acaaacctc gggaaacctg ggtatcgggc ctcgccaag aaagccaaa 3960
tttgccagaa acaggtcaag tatctggggt atcttctaaa agagggtcag agatggctga 4020
ctgaggccag aaaagagact gtgatggggc agcctactcc gaagaccctc cgacaactaa 4080
gggagttcct agggacggca ggcttctgtc gcctctggat ccctggggtt gcagaaatgg 4140
cagccccctt gtaccctctc accaaaacgg ggactctgtt taattggggc ccagaccaac 4200
aaaaggccta tcaagaaatc aagcaagctc ttctaactgc ccagccctg gggttgccag 4260
atctgactaa gccctttgaa ctctttgtcg acgagaagca gggctacgcc aaaggtgtcc 4320
taacgcaaaa actgggacct tggogtcggc cgggtggccta cctgtccaaa aagctagacc 4380
cagtagcagc tgggtggccc ccttgccctac ggatggtagc agccattgcc gtactgacaa 4440
aggatgcagg caagctaacc atgggacagc cactagtcac tctggcccc catgcagtag 4500
aggcactagt caaacaaccc ccogaccgct ggctttccaa cgcccggatg actcactatc 4560
aggccttgct tttggacacg gaccgggtcc agttcggacc ggtggtagcc ctgaaccggg 4620

ES 2 660 755 T3

ctacgctgct cccactgcct gaggaagggc tgcaacacaa ctgccttgat atcctggccg 4680
aagcccacgg aacccgaccc gacctaacgg accagccgct cccagacgcc gaccacacct 4740
ggtacacgga tggaaacagt ctcttacaag agggacagcg taaggcggga gctgcggtga 4800
ccaccgagac cgaggtaatc tgggctaaag ccctgccagc cgggacatcc gctcagcggg 4860
ctgaactgat agcactcacc caggccctaa agatggcaga aggtaagaag ctaaagtgtt 4920
atactgatag ccgttatgct tttgctactg cccatatcca tggagaaata tacagaaggc 4980
gtggggtgct cacatcagaa ggcaaagaga tcaaaaataa agacgagatc ttggccctac 5040
taaaagccct ctttctgccc aaaagactta gcataatcca ttgtccagga catcaaaagg 5100
gacacagcgc cgaggctaga ggcaaccgga tggctgacca agcggcccga aaggcagcca 5160
tcacagagac tccagacacc tctaccctcc tcatagaaaa ttcacaccc tacacctcag 5220
aacattttca ttacacagtg actgatataa aggacctaac caagttgggg gccattttatg 5280
ataaaacaaa gaagtattgg gtctaccaag gaaaacctgt gatgcctgac cagtttactt 5340
ttgaattatt agactttctt catcagctga ctcaacctcag cttctcaaaa atgaaggctc 5400
tcctagagag aagccacagt cctactaca tgctgaaccg ggatcgaaca ctcaaaaata 5460
tcaactgagac ctgcaaagct tgtgcacaag tcaacgccag caagtctgcc gttaaacagg 5520
gaactagggg cgcggggcat cggcccggca ctcatgggga gatcgatttc accgagataa 5580
agcccggatt gtatggctat aaatatcttc tagtttttat agataccttt tctggctgga 5640
tagaagcctt cccaaccaag aaagaaaccg ccaaggtcgt aaccaagaag ctactagagg 5700
agatcttccc caggttcggc atgcctcagg tattgggaac tgacaatggg cctgccttcg 5760
tctccaaggt gagtcagaca gtggccgatc tgttggggat tgattggaaa ttacattgtg 5820
catacagacc ccaaagctca ggccaggtag aaagaatgaa tagaaccatc aaggagactt 5880
taactaaatt aacgcttgca actggctcta gagactgggt gctcctactc ccttagccc 5940
tgtaccgagc ccgcaacacg ccgggcccc atggcctcac cccatatgag atcttatatg 6000
gggcaccccc gcccttgta aacttcctg accctgacat gacaagagtt actaacagcc 6060
cctctctcca agctcactta caggctctct acttagtcca gcacgaagtc tggagacctc 6120
tggcggcagc ctaccaagaa caactggacc gaccgggtgt acctcacctt taccgagtcg 6180
gcgacacagt gtgggtccgc cgacaccaga ctaagaacct agaacctcgc tggaaaggac 6240
cttacacagt cctgctgacc acccccaccg ccctcaaagt agacggcatc gcagcttggg 6300
tacacgccgc ccacgtgaag gctgccgacc ccgggggtgg accatcctct agactgacat 6360
ggcgcgttca acgctctcaa aacccctca agataagatt aaccctgga agcccttaat 6420
agtcatggga gtctgttag gagtagggat ggcagagagc cccatcagg tctttaatgt 6480
aacctggaga gtcaccaacc tgatgactgg gcgtaccgcc aatgccacct cctcctggg 6540

ES 2 660 755 T3

aactgtacaa gatgccttcc caaaattata ttttgatcta tgtgatctgg toggagagga 6600
gtgggaccct tcagaccagg aaccgtatgt cgggtatggc tgcaagtacc ccgcagggag 6660
acagcggacc cggacttttg acttttacgt gtgccctggg cataccgtaa agtcgggggtg 6720
tgggggacca ggagagggct actgtggtaa atgggggtgt gaaaccaccg gacaggctta 6780
ctggaagccc acatcatcgt gggacctaata ctcccttaag cgcggtaaca ccccctggga 6840
cacgggatgc tctaaagttg cctgtggccc ctgctacgac ctctccaaag tatccaattc 6900
cttccaaggg gctactogag ggggcagatg caaccctcta gtccctagaat tccctgatgc 6960
aggaaaaaag gctaactggg acgggcccac atcgtgggga ctgagactgt accggacagg 7020
aacagatcct attaccatgt tctccctgac ccggcaggtc cttaatgtgg gaccccaggt 7080
ccccataggg cccaaccag tattaccoga ccaagactc ccttccctac caatagagat 7140
tgtaccggct ccacagccac ctagccccct caataccagt tccccccctt ccactaccag 7200
tacaccctca acctccccta caagtccaag tgtcccacag ccaccccag gaactggaga 7260
tagactacta gctctagtca aaggagccta tcaggcgctt aacctacca atcccgacaa 7320
gaccaagaa tgttggtgt gcttagtgtc gggacctcct tattacgaag gagtagcgggt 7380
cgtgggcact tataccaatc attccaccgc tccggccaac tgtaccgcca cttcccaca 7440
taagcttacc ctatctgaag tgacaggaca gggcctatgc atgggggag tacctaaaac 7500
tcaccaggcc ttatgtaaca ccacccaaag cgcggctca ggatccctact acctgacgc 7560
acccgcccga acaatgtggg cttgcagcac tggattgact cctgcttgt ccaccacgggt 7620
gctcaatcta accacagatt attgtgtatt agttgaactc tggcccagag taatttacca 7680
ctccccgat tatatgtatg gtcagcttga acagcgtacc aaatataaaa gagagccagt 7740
atcattgacc ctggcccttc tactaggagg attaaccatg ggagggattg cagctggaat 7800
agggacgggg accactgct taattaaaac ccagcagttt gagcagcttc atgccgctat 7860
ccagacagac ctcaacgaag tcgaaaagtc aattaccaac ctagaaaagt cactgacctc 7920
gttgtctgaa gtagtctac agaaccgag aggcctagat ttgctattcc taaaggaggg 7980
aggtctctgc gcagccctaa aagaagaatg ttgtttttat gcagaccaca cggggctagt 8040
gagagacagc atggccaaat taagagaaag gcttaatcag agacaaaaac tatttgagac 8100
aggccaagga tggttcgaag ggctgtttta tagatcccc tggtttacca ccttaatctc 8160
caccatcatg ggacctctaa tagtactctt actgatctta ctctttggac cttgcattct 8220
caatcgattg gtccaatttg ttaaagacag gatctcagtg gtccaggctc tggttttgac 8280
tcagcaatat caccagctaa aaccataga gtacgagcca tgaacgcggt actggccgaa 8340
gccgcttggg ataaggccgg tgtgcgtttg tctatatgtt attttccacc atattgccgt 8400

ES 2 660 755 T3

cttttggcaa tgtgagggcc cggaaacctg gccctgtcct cttgacgagc attcctaggg 8460
 gtctttcccc tctcgccaaa ggaatgcaag gtctgttgaa tgtcgtgaag gaagcagttc 8520
 ctctggaagc ttcttgaaga caaacaacct ctgtagcgac cctttgcagg cagcggaaacc 8580
 ccccacctgg cgacaggtgc ctctgcggcc aaaagccacg tgtataagat acacctgcaa 8640
 aggcggcaca accccagtgc cacgttgtga gttggatagt tgtggaaaga gtcaaattgg 8700
 tctcctcaag cgtattcaac aaggggctga aggatgcccc gaaggtagcc cattgtatgg 8760
 gatctgatct ggggcctcgg tgcacatgct ttacatgtgt ttagtcgagg ttaaaaaaac 8820
 gtctaggccc ccogaaccac ggggacgtgg ttttcctttg aaaaacacga ttataaatgg 8880
 tgaccggcgg catggcctcc aagtgggatc aaaagggcat ggatatcgct tacgaggagg 8940
 ccctgctggg ctacaaggag ggcggcgtgc ctatcggcgg ctgtctgatc aacaacaagg 9000
 acggcagtgt gctgggcagg ggcacaaca tgaggttcca gaagggtcc gccaccctgc 9060
 acggcgagat ctccaccctg gagaactgtg gcaggctgga gggcaagggt tacaaggaca 9120
 ccaccctgta caccaccctg tccccttggt acatgtgtac cggcgctatc atcatgtacg 9180
 gcatccctag gtgtgtgatc ggcgagaacg tgaacttcaa gtccaagggc gagaagtacc 9240
 tgcaaacccag gggccacgag gtggtggttg ttgacgatga gaggtgtaag aagctgatga 9300
 agcagttcat cgacgagagg cctcaggact gtttcgagga tatcggcgag taagcggccg 9360
 cagataaaat aaaagatfff atttagtctc cagaaaaagg ggggaatgaa agaccccacc 9420
 tgtaggtttg gcaagctagc ttaagtaacg ccattttgca aggcattgaa aaatacataa 9480
 ctgagaatag agaagttcag atcaaggcca ggaacagatg gaacagctga atatgggcca 9540
 aacaggatat ctgtggtaag cagttcctgc cccggctcag ggccaagaac agatggaaca 9600
 gctgaatatg ggccaaacag gatatctgtg gtaagcagtt cctgccccgg ctcaaggcca 9660
 agaacagatg gtccccagat gcgggtccagc cctcagcagt ttctagagaa ccatcagatg 9720
 tttccagggt gcccacagga cctgaaatga ccctgtgcct tatttgaact aaccaatcag 9780
 ttcgcttctc gcttctgttc gcgcgcttct gctccccgag ctcaataaaa gagcccacaa 9840
 cccctcactc ggggcgccag tectccgatt gactgagtcg cccgggtacc cgtgtatcca 9900
 ataaaccctc ttgcagttgc atccgacttg tggctcgcct gttccttggg aggtctcct 9960
 ctgagtgatt gactaccctg cagcgggggt ctttcattac atgtgagcaa aaggccagca 10020
 aaaggccagg aaccgtaaaa aggcgcgctt gctggcgctt ttccataggc tccgcccccc 10080
 tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg cgaaaccgca caggactata 10140
 aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgacctgcc 10200
 gcttaccgga tacctgtccg cttttctccc ttcgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc 10260
 acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga 10320

ES 2 660 755 T3

acccccggtt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac tategtcttg agtccaaccc 10380
 ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt aacaggatta gcagagcgag 10440
 gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtggtggcct aactacggct aactagaag 10500
 gacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa gagttggtag 10560
 ctcttgatcc ggcaaacaaa ccaccgctgg tagcgggtgg ttttttgttt gcaagcagca 10620
 gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cggggtctga 10680
 cgctcagtg aacgaaaact cacgttaagg gattttggct atgagattat caaaaaggat 10740
 cttcacctag atccttttaa attaaaaatg aagttttaaa tcaatctaaa gtatatatga 10800
 gtaaacttgg tctgacagtt accaatgctt aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg 10860
 tctatttcgt tcatccatag ttgctgact ccccgctgtg tagataacta cgatacggga 10920
 gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat gataccgcga gaccacgct caccggctcc 10980
 agatttatca gcaataaacc agccagccgg aagggccgag cgcagaagtg gtcctgcaac 11040
 tttatccgcc tccatccagt ctattaattg ttgcccggaa gctagagtaa gtagttcgcc 11100
 agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat tgctgcaggc atcgtggtgt cacgctcgtc 11160
 gtttggtatg gcttcattca gctccggttc ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc 11220
 catgttgctc aaaaaagcgg ttagctcctt cggctcctcg atcgttgctc gaagtaagtt 11280
 ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc 11340
 atccgtaaga tgcttttctg tgactggtga gtaactcaacc aagtcattct gagaatagtg 11400
 tatgcggcga ccgagttgct cttgcccggc gtcaacacgg gataataccg cccacatag 11460
 cagaacttta aaagtgctca tcattggaaa acgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat 11520
 cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta acccaactgt gcaccaact gatcttcagc 11580
 atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaca ggaaggcaaa atgccgcaaa 11640
 aaaggaata agggcgacac ggaaatggtg aatactcata ctcttccttt ttcaatatta 11700
 ttgaagcatt tatcaggggtt attgtctcat gagcggatag atatttgaat gtatttagaa 11760
 aaataaacia ataggggttc cgcgcacatt tcccggaaa gtgccacctg acgtctaaga 11820
 aaccattatt atcatgacat taacctataa aaatagcgt atcacgaggc cctttcgtct 11880
 tcaagaattc cat 11893

<210> 10
 <211> 8332
 <212> ADN
 <213> Virus de la leucemia murina de Moloney
 <400> 10

tatgcgectg cgtcggtact agttagctaa ctagctctgt atctggcgga cccgtggtgg

60

ES 2 660 755 T3

aactgacgag ttcggaacac cgggccgcaa ccctgggaga cgtcccaggg acttcggggg 120
cogtttttgt ggccccacct gagtccaaaa atcccgatcg ttttggactc tttggtgcac 180
cccccttaga ggaggggatat gtggttctgg taggagacga gaacctaaaa cagttcccgc 240
ctccgtctga atttttgctt tcggtttggg accgaagccg cgcgcgcgct ctgtctgct 300
gcagcatcgt tctgtgttgt ctctgtctga ctgtgtttct gtatttgtct gagaatatgg 360
gccagactgt taccactccc ttaagtttga ccttaggtca ctggaaagat gtcgagcgga 420
tcgctcacia ccagtcggta gatgtcaaga agagacgttg ggttacctc tgctctgcag 480
aatggccaac ctttaacgtc ggatggcgc gagacggcac ctttaaccga gacctcatca 540
cccaggttaa gatcaaggtc ttttcacctg gcccgcatgg acaccagac caggtccct 600
acatcgtgac ctgggaagcc ttggctttt accccctcc ctgggtcaag ccctttgtac 660
accctaagcc tccgcctcct ctctcctcat ccgccccgtc tctccccctt gaacctctc 720
gttcgacccc gcctcgatcc tccctttatc cagccctcac tccttctcta ggcgccaac 780
ctaaacctca agttctttct gacagtgggg ggccgctcat cgacctactt acagaagacc 840
ccccgoccta tagggaccca agaccacccc ctccgacag ggacggaaat ggtggagaag 900
cgacccctgc gggagaggca ccggaccct cccaatggc atctcgcta cgtgggagac 960
gggagcccc tgtggccgac tccactacct cgcaggcatt ccccctccgc gcaggaggaa 1020
aoggacagct tcaatactgg ccgttctcct ctctgacct ttacaactgg aaaaataata 1080
accottttt ttctgaagat ccaggtaaac tgacagctct gatcgagtct gttctcatca 1140
cccatcagcc cacctgggac gactgtcagc agctgttggg gactctgctg accggagaag 1200
aaaaacaacg ggtgctctta gaggctagaa aggcggtgcg gggcgatgat gggcgccca 1260
ctcaactgcc caatgaagtc gatgccgctt tccccctcga gcgcccagac tgggattaca 1320
ccaccagggc aggtaggaac cacctagtcc actatcgcca gttgctccta gcgggtctcc 1380
aaaaocgggg cagaagcccc accaatttgg ccaaggtaaa aggaataaca caagggccca 1440
atgagtctcc ctccgccttc ctagagagac ttaaggaagc ctatcgagg tacactcctt 1500
atgaccctga ggaccaggg caagaaacta atgtgtctat gtctttcatt tggcagtctg 1560
ccccagacat tgggagaaaag ttagagaggt tagaagattt aaaaaacaag acgcttggag 1620
atthggttag agaggcagaa aagatcttta ataacgaga aaccccgga gaaagagagg 1680
aacgtatcag gagagaaaca gaggaaaaag aagaacgccc taggacagag gatgagcaga 1740
aagagaaaga aagagatcgt aggagacata gagagatgag caagctattg gccactgtcg 1800
ttagtggaca gaaacaggat agacagggag gagaacgaag gaggtccca ctcgatcgcg 1860
accagtgtgc ctactgcaaa gaaaaggggc actgggctaa agattgtccc aagaaaccac 1920

ES 2 660 755 T3

gaggacctcg gggaccaaga ccccagacct ccctcctgac cctagatgac tagggaggtc 1980
agggtcagga gccccccct gaaccagga taacctcaa agtcgggggg caaccogtca 2040
ccttcctggt agatactggg gcccaacact ccgtgctgac ccaaaatcct ggaccocctaa 2100
gtgataagtc tgcoctgggtc caaggggcta ctggaggaaa gcggtatcgc tggaccacgg 2160
atcgcaaagt acatctagct accggtaagg tcaccactc tttcctccat gtaccagact 2220
gtccctatcc tctgttagga agagatttgc tgactaaact aaaagcccaa atccactttg 2280
agggatcagg agctcaggtt atggggaccaa tggggcagcc cctgcaagtg ttgaccctaa 2340
atatagaaga tgagcatcgg ctacatgaga cctcaaaaga gccagatggt tctctagggt 2400
ccacatggct gtctgatttt cctcaggcct gggcggaac ogggggcatg ggactggcag 2460
ttcgccaagc tcctctgac atacctctga aagcaacctc taccocctg tccataaaac 2520
aataccocat gtcacaagaa gccagactgg ggatcaagcc ccacatacag agactggttg 2580
accaggaat actggtacct tgccagtccc cctggaacac gccctgcta cccgttaaga 2640
aaccagggac taatgattat aggcctgtcc aggatctgag agaagtcaac aagcgggtgg 2700
aagacatcca cccaccgtg cccaaccott acaacctctt gagcgggctc ccaccgtccc 2760
accagtggta cactgtgctt gatttaaagg atgccttttt ctgcctgaga ctccacccca 2820
ccagtcagcc tctcttcgcc tttgagtgga gagatccaga gatgggaatc tcaggacaat 2880
tgacctggac cagactccca cagggtttca aaaacagtcc caccctgttt gatgaggcac 2940
tgcacagaga cctagcagac ttccggatcc agcaccocaga cttgatcctg ctacagtacg 3000
tggatgactt actgctggcc gccacttctg agctagactg ccaacaaggt actcgggccc 3060
tgttacaaa cctagggaac ctccgggtatc gggcctcggc caagaaagcc caaatttgcc 3120
agaaacaggt caagtatctg gggatcttc taaaagagg tcagagatgg ctgactgagg 3180
ccagaaaaga gactgtgatg gggcagccta ctccgaagac ccctcgacaa ctaagggagt 3240
tcctagggac ggcaggcttc tgtcgcctct ggatccctgg gtttgacaga atggcagccc 3300
ccttgtacce tctcaccaa acggggactc tgtttaattg gggcccagac caacaaaagg 3360
cctatcaaga aatcaagcaa gctcttctaa ctgcccagc cctgggggtg ccagatttga 3420
ctaagccctt tgaactcttt gtcgacgaga agcagggcta cgccaaaggt gtcctaacgc 3480
aaaaactggg accttggcgt cggccgggtg cctacctgtc caaaaagcta gaccagtag 3540
cagctgggtg gccccttgc ctacggatgg tagcagccat tgccgtactg acaaaggatg 3600
caggcaagct aaccatggga cagccactag tcattctggc ccccatgca gtagaggcac 3660
tagtcaaaca acccccgcac cgtggcttt ccaacgccc gatgactcac tatcaggcct 3720
tgcttttggc cacggaccgg gtccagttcg gaccggtggt agccctgaac ccggctacgc 3780
tgctcccact gcctgaggaa gggctgcaac acaactgcct tgatatcctg gccgaagccc 3840

ES 2 660 755 T3

acggaacccg acccgaccta acggaccagc cgctcccaga cgccgaccac acctggtaca 3900
 cggatggaag cagtctctta caagagggac agcgttaaggc gggagctgcg gtgaccaccg 3960
 agaccgaggt aatctgggct aaagccctgc cagccgggac atccgctcag cgggctgaac 4020
 tgatagcact caccagggcc ctaaagatgg cagaaggtaa gaagctaaat gtttatactg 4080
 atagccgtta tgcttttgct actgcccata tccatggaga aatatacaga aggcgtgggt 4140
 tgctcacatc agaaggcaaa gagatcaaaa ataaagacga gatcttggcc ctactaaaag 4200
 ccctctttct gcccaaaaga cttagcataa tccattgtcc aggacatcaa aagggacaca 4260
 gcgcccaggc tagaggcaac cggatggctg accaagcggc ccgaaaggca gccatcacag 4320
 agactccaga cacctctacc ctctcatag aaaattcatc accctacacc tcagaacatt 4380
 ttcattacac agtgactgat ataaaggacc taaccaagt gggggccatt tatgataaaa 4440
 caaagaagta ttgggtctac caaggaaaac ctgtgatgcc tgaccagttt acttttgaat 4500
 tattagactt tcttcatcag ctgactcacc tcagcttctc aaaaatgaag gctctcctag 4560
 agagaagcca cagtccctac tacatgctga accgggatcg aacctcaaa aatatcactg 4620
 agacctgcaa agcttgtgca caagtcaacg ccagcaagtc tgccgttaaa cagggaaacta 4680
 gggtcgcggg gcatcgccc gccactcatt gggagatcga tttcacogag ataaagcccg 4740
 gattgtatgg ctataaatat cttctagttt ttatagatac cttttctggc tggatagaag 4800
 ccttcccaac caagaaagaa accgcccaag tcgtaaccaa gaagctacta gaggagatct 4860
 tcccaggtt cggcatgcct caggtattgg gaactgacaa tgggcctgcc ttcgtctcca 4920
 aggtgagtca gacagtggcc gatctggtgg ggattgattg gaaattacat tgtgcataca 4980
 gaccccaaag ctcaggccag gtagaaagaa tgaatagaac catcaaggag actttaacta 5040
 aattaacgct tgcaactggc tctagagact gggtgctcct actcccctta gccctgtacc 5100
 gagcccgcaa cacgcccggc ccccatggcc tcaccccata tgagatctta tatggggcac 5160
 ccccgccct tgtaaaactc cctgaccctg acatgacaag agttactaac agcccctctc 5220
 tccaagctca cttacaggct ctctacttag tccagcacga agtctggaga cctctggcgg 5280
 cagcctacca agaacaactg gaccgaccgg tggtaacctca cccttaccga gtcggcgaca 5340
 cagtgtgggt ccgccgacac cagactaaga acctagaacc tcgctggaaa ggaccttaca 5400
 cagtctgct gaccacccc accgccctca aagtagacgg catcgcagct tggatacacg 5460
 ccgcccacgt gaaggctgcc gaccccgggg gtggaccatc ctctagactg acatggcggc 5520
 ttcaacgctc tcaaaacccc ttaaaaataa ggttaacccg cgaggcccc taatcccctt 5580
 aattcttctg atgctcagag ggtcagtac tgcttcgccc ggctccagtc ctcatcaagt 5640
 ctataatata acctgggagg taaccaatgg agatcgggag acggtatggg caacttctgg 5700

ES 2 660 755 T3

caaccaccct ctgtggacct ggtggcctga ccttaccoca gatttatgta tgttagccca 5760
ccatggacca tcttattggg ggctagaata tcaatcccct ttttcttctc ccccggggcc 5820
cccttgttgc tcagggggca gcagcccagg ctgttccaga gactgogaag aacctttaac 5880
ctccctcacc cctcggtgca acaactgcctg gaacagactc aagctagacc agacaactca 5940
taaatacaat gagggatfff atgtttgccc eggccccac cgcccccgag aatccaagtc 6000
atgtgggggt ccagactcct tctactgtgc ctattggggc tgtgagacaa ccggtagagc 6060
ttactggaag cctcctcat catgggattt catcacagta aacaacaatc tcacctctga 6120
ccaggctgtc caggtatgca aagataataa gtggtgcaac cccttagtta ttcggtttac 6180
agacgccggg agacgggtta ctctctggac cacaggacat tactggggct tacgtttgta 6240
tgtctccgga caagatccag ggcttacatt tgggatccga ctcagatacc aaaatctagg 6300
acccccgctc ccaatagggc caaaccccgt tctggcagac caacagccac tctccaagcc 6360
caaacctggt aagtgcctt cagtcaccaa accaccagc gggactcctc tctcccctac 6420
ccaacttcca ccggcgggaa cggaaaatag gctgctaaac ttagtagacg gagcctacca 6480
agccctcaac ctaccagtc ctgacaaaac ccaagagtgc tggttgtgtc tagtagcggg 6540
acccccctac taogaagggg ttgccgtcct gggtagctac tccaaccata cctctgctcc 6600
agccaactgc tccgtggcct cccaacacaa gttgaccctg tccgaagtga ccggacaggg 6660
actctgcata ggagcagttc ccaaaacaca tcaggcccta tgtaatacca ccagacaag 6720
cagtcgaggg tctattatc tagttgccc tacaggtacc atgtgggctt gtagtaccgg 6780
gcttactcca tgcactcca ccaccatact gaaccttacc actgattatt gtgttcttgt 6840
cgaactctgg ccaagagtca cctatcattc cccagctat gtttacggcc tgtttgagag 6900
atccaaccga cacaaaagag aaccgggtgc gttaacctg gccctattat tgggtggact 6960
aaccatgggg ggaattgccg ctggaatagg aacagggact actgctctaa tggccactca 7020
gcaattccag cagctccaag ccgcagtaca ggatgatctc agggaggttg aaaaatcaat 7080
ctctaaccta gaaaagtctc tcaactccct gtctgaagtt gtccacaga atcgaagggg 7140
cctagacttg ttatttctaa aagaaggagg gctgtgtgct gctctaaaag aagaatgttg 7200
cttctatgcg gaccacacag gactagttag agacagcatg gccaaattga gagagaggct 7260
taatcagaga cagaaactgt ttgagtcaac tcaaggatgg tttgagggac tgtttaacag 7320
atccccttgg tttaccact tgatatctac cattatggga ccctcattg tactcctaata 7380
gattttgctc ttcggaccct gcattcttaa tcgattagtc caatttgta aagacaggat 7440
atcagtggtc caggctctag ttttgactca acaatatcac cagctgaagc ctatagagta 7500
cgagccatag ataaaataaa agatfffatt tagtctccag aaaaaggggg gaatgaaaga 7560
ccccacctgt aggtttggca agctagctta agtaacgcca ttttgcaagg catggaaaaa 7620

ES 2 660 755 T3

tacataactg	agaatagaga	agttcagatc	aaggtcagga	acagatggaa	cagctgaata	7680
tgggccaaac	aggatatctg	tggttaagcag	ttcctgcccc	ggctcagggc	caagaacaga	7740
tggaacagct	gaatatgggc	caaacaggat	atctgtggta	agcagttcct	gccccggctc	7800
agggccaaga	acagatggtc	cccagatgcg	gtccagccct	cagcagtttc	tagagaacca	7860
tcagatgttt	ccagggtgcc	ccaaggacct	gaaatgacct	tgtgccttat	ttgaactaac	7920
caatcagttc	gcttctcgct	tctgttcgcg	cgcttctgct	ccccgagctc	aataaaagag	7980
cccacaacc	ctcactcggg	gcgccagtc	tccgattgac	tgagtcgccc	gggtaccogt	8040
gtatccaata	aaccctcttg	cagttgcagc	gccagtcctc	cgattgactg	agtcgcccgg	8100
gtaccogtgt	atccaataaa	ccctcttgca	gttgcacccg	acttgtggtc	tcgctgttcc	8160
ttgggaggg	ctcctctgag	tgattgacta	cccgtcagcg	ggggtcttcc	atttgggggc	8220
tcgtccggga	tcgggagacc	cctgcccagg	gaccaccgac	ccaccaccgg	gaggtaaagct	8280
ggccagcaac	ttatctgtgt	ctgtccgatt	gtctagtgtc	tatgactgat	tt	8332

<210> 11
 <211> 8185
 <212> ADN
 <213> Virus xenotrópico de la leucemia murina

 <400> 11

5

ES 2 660 755 T3

gogccagtca tccgatagac tgagtcgccc gggtagccgt gttoccaata aagccttttg	60
ctgtttgcat ccgaagcgtg gcctcgcctgt tccttgggag ggtctcctca gagtgattga	120
ctaccagct cgggggtctt tcatttgggg gctcgtccgg gattcggaga cccccgcca	180
gggaccaccg acccaccgtc gggaggtaag ccggccggcg atcgttttgt ctttgtctct	240
gtctttgtgc gtgtgtgtgt gtgcggcat ctaatcctcg cgctcgcgtc tgaatctgta	300
ctagttagct aactagatct gtatctggcg gttccgcgga agaactgacg agttcgtatt	360
cccggccgca gccctgggag acgtcccage ggcctcgggg gcccgtttg tggcccattc	420
tgtatcagtt aacctaccog agtcggactt tttggagtgg ctttgttggg ggacgagaga	480
cagagacact tcccgcccc gtctgaattt ttgctttcgg ttttaagccg aaaccgcgcc	540
gcgcgtctga tttgttttgt tgttctctg ttcttcgta gttttctct ctctttaagt	600
gttctcgaga tcatgggaca gaccgtaact acccctctga gtctaacctt gcagcaactgg	660
ggagatgtcc agcgcattgc atccaaccag tctgtggatg tcaagaagag gcgctgggtt	720
accttctggt ccgccgaatg gccaaacttc aatgtaggat ggcctcagga tggtaactttt	780
aatttaggtg ttatctctca ggtcaagtct agagtgtttt gtccctggcc ccacggacac	840
ccggatcagg tcccatatat cgtcacctgg gaggcacttg cctatgaccc cctccgtgg	900
gtcaaaccgt ttgtctctcc taaacccct cctttaccga cagctccctg cctcccgcc	960

ES 2 660 755 T3

ggtccttctg cgcaacctcc gtcccgatct gccctttacc ctgcccttac cccctctata 1020
 aagtoaaaac ctccctaagcc ccaggttctc cctgatagcg gcggacctct cattgacctt 1080
 ctcacagagg atcccccgcc gtacggagca caaccttctc cctctgccag ggagaacaat 1140
 gaagaagagg cggccaccac ctccgagggt tccccccctt ctcccatggt gtctcgactg 1200
 cggggaagga gagacctcc cgcagcggac tccaccacct cccaggcatt cccactccgc 1260
 atggggggag atggccagct tcagtactgg ccgttttctc cctctgattt atataattgg 1320
 aaaaataata acccttctct ttctgaagat ccaggtaaat tgacggcctt gattgagtcc 1380
 gtccctcatca cccaccagcc cacctgggac gactgtcagc agttgttggg gaccctgctg 1440
 accggagaag aaaagcagcg ggtgctccta gaggctagaa aggcagtccg gggcaatgat 1500
 ggacgccccca ctcagttgcc taatgaagtc aatgctgctt tccccttga gcgccccgat 1560
 tgggattaca ccactacaga aggtaggaac cacctagtcc tctaccgcca gttgctctta 1620
 gcgggtctcc aaaacgcggg caggagcccc accaatttgg ccaaggtaaa agggataacc 1680
 cagggacctt atgagtctcc ctccagcctt ttagagagac tcaaggaggc ctatcgcagg 1740
 tacactcctt atgacctga ggaccaggg caagaaacca atgtgtccat gtcattcatc 1800
 tggcagtctg ccccgatat cggacgaaag ttagagcggg tagaagattt aaagagcaag 1860
 accttaggag acttagtgag ggaagctgaa aagatcttta ataagcgaga aacccccgaa 1920
 gaaagagagg aacgtatcag gagagaaata gaggaaaaag aagaacgccg tagggcagag 1980
 gatgagcaga gagagagaga aagggaccgc agaagacata gagagatgag caagctcttg 2040
 gccactgtag ttattggtca gagacaggat agacaggggg gagagcggag gaggccccaa 2100
 cttgataagg accaatgccc ctactgcaaa gaaaagggac actgggctaa ggactgcccc 2160
 aagaagccac gagggccccg aggaccgagg cccagacct cctcctgac cttaggtgac 2220
 tagggaggtc agggtcagga gccccccct gaaccagga taacctcaa agtcgggggg 2280
 caaccogtca ccttctggt agatactggg gcccaacct ccgtgctgac ccaaaatcct 2340
 ggacccctaa gtgacaagtc tgcttgggtc caaggggcta ctggaggaaa gcggtatcgc 2400
 tggaccacgg atcgcaaagt acatctggct accggtaagg tcaccactc tttcctccat 2460
 gtaccagact gccctatcc tctgctagga agagacttgc tgactaaact aaaagcccaa 2520
 atccactttg agggatcagg agctcagggt gtgggaccga tgggacagcc cctgcaagtg 2580
 ctgacagtaa acatagaaga tgagtattgg ctacatgata ccaggaaaga gccagatggt 2640
 cctctaggggt ccacatggct ttctgatttc cttcaggcct gggcggaaac cgggggcatg 2700
 ggactggcag ttcgccaagc tcctctgata atacctctga aggcaacctc tccccctgtg 2760
 tccataaaac aatacccat gtcacaagaa gccagactgg ggatcaagcc ccacatacag 2820

ES 2 660 755 T3

aggctgttg accagggat actggtaccc tgccagtcct cctggaacac gcccctgcta 2880
 cccgttaaga aaccagggac taatgattat aggctgtcc aggatctgag agaagtcaac 2940
 aagcgggtgg aagacatcca ccccaccgtg cccaaccctt acaacctctt gagcgggctc 3000
 ccaccgtccc accagtggta cactgtgctt gatttaaagg atgccttttt ctgcctgaga 3060
 ctccacccca ccagtcagcc tctcttcgcc tttgagtgga gagatccaga gatgggaatc 3120
 tcaggacaac tgacctggac cagactccca cagggtttca aaaacagtcc caccctgttt 3180
 gatgaggcac tgcacagaga cctagcagat ttccggatcc agcaccacaga cttgatcctg 3240
 ctacagtacg tggatgactt actgctggcc gccacttctg agcaagactg ccaacgaggt 3300
 actcggggccc tattacaaac cctagggaac ctccgggtatc gggcctcggc caagaaagcc 3360
 caaatttgcc agaaacaggt caagtatctg gggatatctc taaaagaggg acagagatgg 3420
 ctgactgagg ccagaaaaga gactgtgatg gggcagccca ctccgaagac ccctcgacaa 3480
 ctaagggagt tcctagggac ggcaggcttc tgtcgcctct ggatccctgg gtttgacagaa 3540
 atggcagccc ccttgtaccc tcttaccaaa acggggactc tgtttaattg gggcccagac 3600
 cagcaaaagg cctatcaaga aatcaaacag gctcttctaa ctgccccgc cctgggattg 3660
 ccagatttga ctaagccctt tgaactcttt gtgcagcaga agcagggcta cgccaaaggc 3720
 gtcctaacgc aaaaactggg accttggcgt cggcctgtgg cctacctgtc caaaaagcta 3780
 gaccagtgag cagctgggtg gccccttgc ctacggatgg tagcagccat tgccgttctg 3840
 acaaaaaatg caggcaagct aactatggga cagccgctag tcattctggc ccccatgcg 3900
 gtagaagcac tggcacaaca acccctgac cgttggctat ccaatgccg catgaccac 3960
 tatcaggcaa tgctcctgga tacagaccgg gttcagttcg gaccgggtgg ggcctcaac 4020
 ccggccaccc tgctccccct accggaaaag gaagcccccc atgactgcct cgagatcttg 4080
 gctgagacgc acggaaccag accggacctc accgaccagc ccatcccaga cgctgattac 4140
 acttgggtaca cagatggaag cagcttccta caagaaggac aacggagagc tggagcagcg 4200
 gtgactactg agaccgaggt aatctggcgc agggctctgc cggctggaac atccgccccaa 4260
 cgagccgaac tgatagcact cacccaagcc ttaaagatgg cagaaggtaa gaagctaaat 4320
 gtttactctg atagccgcta tgccttcgcc accggccatg tccatggaga aatatatagg 4380
 aggcgagggg tgctgacctc agaaggcaga gaaattaaaa acaagaacga gatcttggcc 4440
 ttgctaaaag ctctctttct gcccaaocga cttagtataa ttcactgtcc aggacatcaa 4500
 aaaggaaaca gtgctgaggc cagaggcaac cgtatggcag atcaagcagc ccgagaggca 4560
 gccatgaagg cagttctaga aacctctaca ctctcatag aggactcaac cccgtatacg 4620
 cctccccatt tccattacac cgaaacagat ctcaaaagac tacgggaact gggagccacc 4680
 tacaatcaga caaaaggata ttgggtccta caaggcaaac ctgtgatgcc cgatcagtc 4740

ES 2 660 755 T3

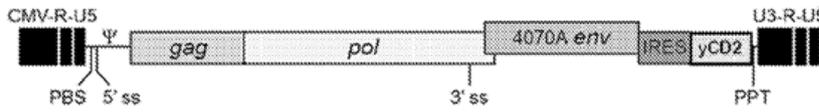
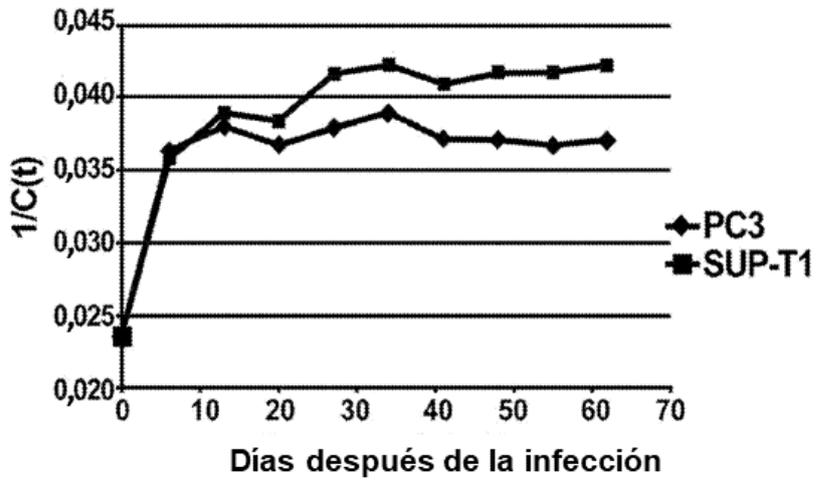
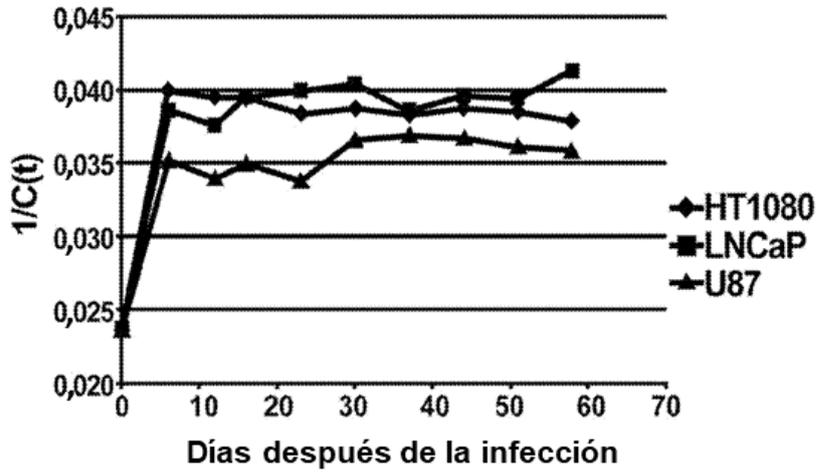
gtgtttgaac tgtagactc cctacacaga ctcacccatc tgagccctca aaagatgaag 4800
 gcactcctcg acagagaaga aagcccctac tacatgttaa accgggacag aactatccag 4860
 tatgtgactg agacctgcac cgctgtgcc caagtaaagc ccagcaaagc caaaattggg 4920
 gcaggggtgc gagtacgagg acatcggcca ggcacccatt ggggaagtga tttcacggaa 4980
 gtaaagccag gactgtatgg gtacaagtac ctccctagtgt ttgtagacac cttctctggc 5040
 tgggtagagg cattccccgac caagcgggaa actgcccaagg tcgtgtccaa aaagctgtta 5100
 gaagacattt ttccgagatt tggaatgccg caggtattgg gatctgataa cgggcctgcc 5160
 ttccgctccc aggtaagtca gtcagtggcc gatttactgg ggatcgattg gaagttacat 5220
 tgtgcttata gaccccagag ttcaggacag gtagaaagaa tgaatagaac aattaaggag 5280
 actttgacca aattaacgct tgcactctggc actagagact gggactcct actcccctta 5340
 gccctctacc gagcccggaa tactccgggc ccccacggac tgactccgta tgaattctg 5400
 tatggggcac ccccgcccct tgtcaatttt catgatcctg aatgtcaaa gttaactaat 5460
 agtccctctc tccaagctca cttacaggcc ctccaagcag tacaacaaga ggtctggaag 5520
 ccgctggccg ctgcttatca ggaccagcta gatcagccag tgataccaca cccttccgt 5580
 gtcggtgacg ccgtgtgggt acgcccgcac cagactaaga acttagaacc tcgctggaag 5640
 ggaccctaca ccgtcctgct gacaaccccc accgctctca aagtagacgg catctctgcg 5700
 tggatacacg ccgctcacgt aaaggcggcg acaactcctc cggccggaac agcatggaag 5760
 gtccagcggt ctcaaaacct cttaaagata agattaacct gtggggcccc ctgataatta 5820
 tggggatctt ggtgagggca ggagcctcag tacaacgtga cagccctcac caggtcttta 5880
 atgtcacttg gaaaattacc aacctaataa caggacaaac agctaatact acctccctcc 5940
 tggggacgat gacagacact ttccctaaac tatattttga cttgtgtgat ttagttggag 6000
 acaactggga tgacccgga cccgatattg gagatggttg ccgctctccc gggggaagaa 6060
 aaaggacaag actatatgat ttctatgttt gcccgggtca tactgtatta acaggggtgtg 6120
 gagggccgag agagggctac tgtggcaaat ggggatgtga gaccactgga caggcatact 6180
 ggaagccatc atcatcatgg gacctaattt cccttaagcg aggaaacact cctaagggtc 6240
 agggccccctg ttttgattcc tcagtgggct ccggtagcat ccaggggtgcc acaccggggg 6300
 gtcgatgcaa ccccctagtc ctagaattca ctgacgcggg taaaagggcc agctgggatg 6360
 cccccaaaac atggggacta agactgtatc gatccactgg ggcggacccg gtgaccctgt 6420
 tctctctgac ccgccaggtc ctcaatgtag ggccccgcgt cccattggg cctaattccc 6480
 tgatcactga acagctacct ccctcccaac ccgtgcagat catgctcccc aggactcctc 6540
 gtccctctcc ttcaggcgcg gcctctatgg tgccctggggc tccccgcct tctcaacaac 6600

ES 2 660 755 T3

ctgggacggg agacaggctg ctaaacctgg tagaaggagc ctacctagcc ctcaacctca 6660
 ccagtcccga caaaacccaa gagtgctggc tgtgtctagt atcgggaccc ccoctactacg 6720
 aaggggtggc cgtcctaggt acttactcca accatacctc tgccccgggt aactgctccg 6780
 tgacctcca acacaagctg accctgtccg aagtgaccgg gcagggactc tgcataggag 6840
 cagttcccaa aacccatcag gccctgtgta ataccaacca gaagacgagc gacgggtcct 6900
 actatattggc ctctcccgcc gggaccattt gggcttgagc caccgggctc actccctgtc 6960
 tatctactac tgtgcttaac ttaaccactg attactgtgt cctgggtgaa ctctggccaa 7020
 aggtaacctc ccactcccct aattatgttt atggccagtt tgaaaagaaa actaaatata 7080
 aaagagagcc ggtgtcatta actctggccc tgctgttggg aggacttact atggggcggca 7140
 tagctgcagg agttggaaca gggactacag ccctagtggc caccaaaca ttcgagcagc 7200
 tccaggcagc catacataca gaccttgggg ccttagaaaa atcagtcagt gccctagaaa 7260
 agtctctgac ctcgttgtct gaggtggtcc tacagaaccg gaggggatta gatctactgt 7320
 tcctaaaaga aggaggatta tgtgctgcc taaaagaaga atgctgtttt tacgcgacc 7380
 aactggcgt agtaagagat agcatggcaa agctaagaga aaggttaac cagagacaaa 7440
 aattgttoga atcaggacaa ggggtggttg agggactggt taacaggtcc ccattggttca 7500
 cgaccctgat atccaccatt atgggccctc tgatagtact tttattaatc ctactcttcg 7560
 gacctgtat tctcaaccgc ttggtccagt ttgtaaaaga cagaatttcg gtagtgcagg 7620
 ccttggttct gacccaacag tatcaccaac tcaaatcaat agatccagaa gaagtggaat 7680
 cacgtgaata aaagatttta ttcagtttcc agaaagaggg gggaatgaaa gaccccacca 7740
 taaggcttag cacgctagct acagtaacgc catthtgcaa ggcattgaaa agtaccagag 7800
 ctgagttctc aaaagttaca aggaagttta attaaagaat aaggctgaat aacctggga 7860
 caggggcaa acaggatatc tgtagtcagg cacctgggcc cggctcagg gccagaaca 7920
 gatggtcctc agataaagcg aaactaaca cagtttctgg aaagtccac ctgagtttca 7980
 agttcccaa aagaccgga aatacccaa gccttattta aactaacc aa tcagctcgct 8040
 tctcgcttct gtaccgcgc ttttgctcc ccagtoctag ccotataaaa aaggggtaag 8100
 aactccacac tggcgcgc agtcatccga tagactgagt cggccgggta cccgtgttcc 8160
 caataaagcc ttttgctgtt tgcaa 8185

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para detectar anticuerpos antivíricos contra el virus anfotrópico de la leucemia murina (VLM) o un virus relacionado con el virus de la leucemia murina (MLVRV) en una muestra biológica que comprende:
- 10 a) incubar una muestra de fluido biológico con un reactivo de captura inmovilizado sobre un soporte sólido para unir al reactivo de captura múltiples anticuerpos antivíricos contra un VLM o MLVRV anfotrópico, donde el reactivo de captura comprende una preparación de partículas víricas completas exentas de suero de VLM o MLVRM;
- 10 b) detectar los anticuerpos antivíricos unidos al reactivo de captura inmovilizado poniendo en contacto los anticuerpos antivíricos unidos con un agente secundario de detección marcado.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, donde la muestra de fluido biológico se aísla de un mamífero y se selecciona de plasma, suero, orina, saliva, aspiración con aguja fina, semen, secreción vaginal y leche.
3. El método de la reivindicación 2, donde el mamífero es un ser humano.
- 20 4. El método de la reivindicación 2 o la reivindicación 3, donde el mamífero tiene un trastorno autoinmunitario, una infección vírica, un cáncer, o está inmunosuprimido.



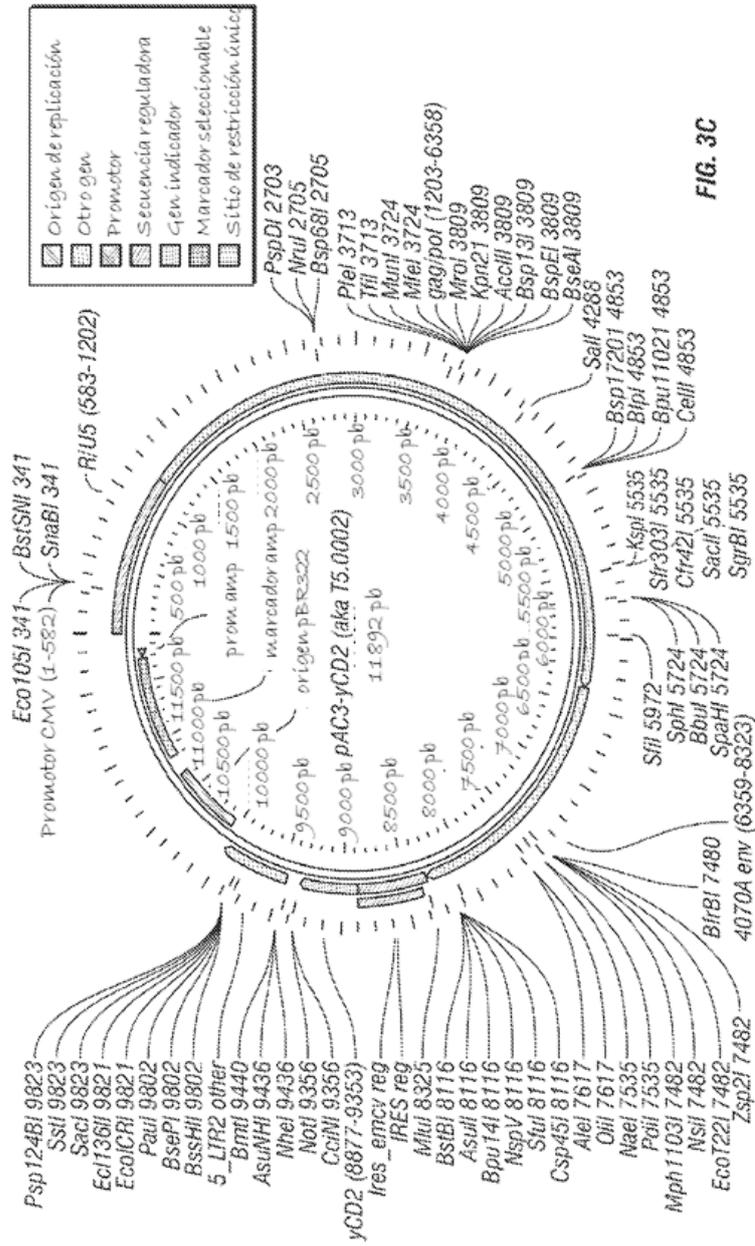


FIG. 3C

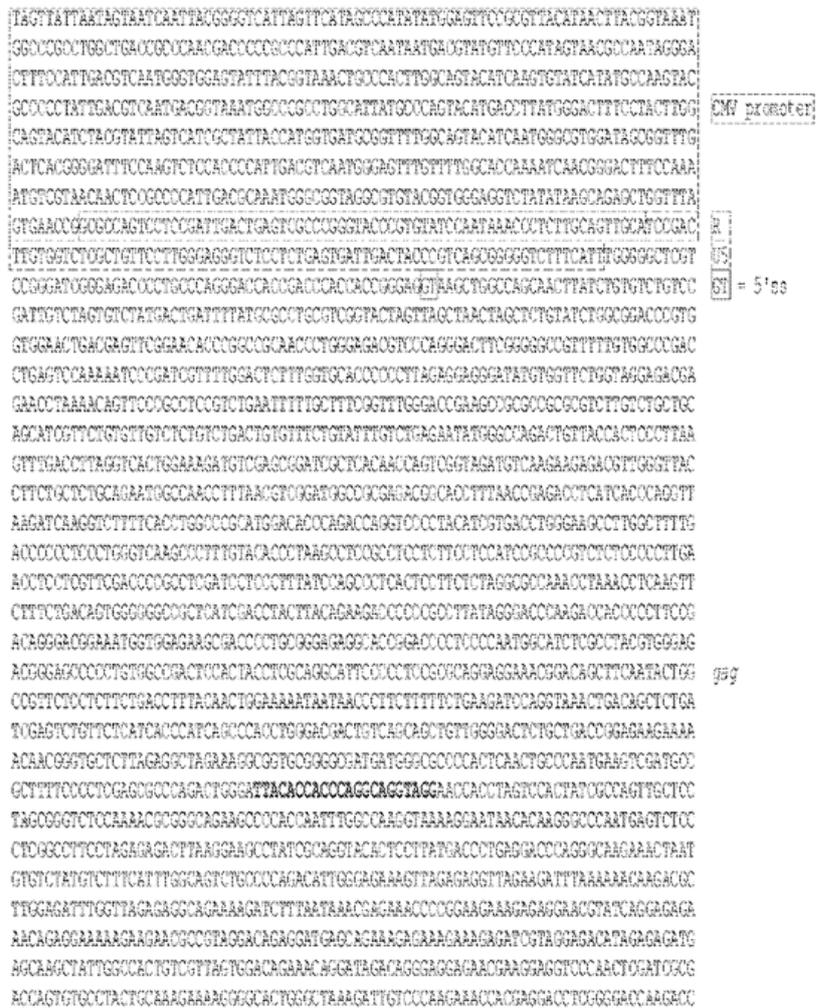


FIGURA 3D

CCAGACCTCCCTCCAGCCCTAGATGACTAGGGAGTCAAGGTCAGGAGCCGCCCTGAAACCAGGATAACCCCTCAAGTC
GGGGGCACACCCGTCACCTTCTGATAGTACTGGGGCCACACACTCCGTCGACCCAAATCCCTGACCCCTAAGTGATA
AGTCTGCCCTGGTCCAGGGCTACTGGAGCAAGGGGTATCCCTGGACCCAGGATGCCAAGTACTCTAGCTACCGGTA
GGTACCCACTCTTCCCTGCATGTACGACACTGTCCTATGCTCTGTTAGGAGAGATTTGCTGACTAACTAAAAGGCCAA
ATCCACTTTGAGGGTCAAGAGCCAGGTTATGGGACCAATGGGGCAGCCCTGCAAGTGTGACCTAAATATAGAAGATG
AGCATCGCTACATGAGACCTCAAAAGAGCCAGATGTTCTCTAGGGTCCACATGGCTGTCTGATTTCTCAGGCCCTGGGC
GGAAACCGGGCCATGGGACTGGGACTTGGCAAGTCCCTCTGATCATACTCTGAAAGCAACTCTACCCCGTGTCCATA
AAACAAATACCCCATGTCTCAGAGAGCCGACTGGGATCAAGCCCACTACAGAGACTGTTGGACGAGGATCTGGTAC
CCTGCCAGTCCCCCTGGANACGCCCTGCTACCCGTTAAGAAACCAGGGACTAATGATTAATAGCCCTGTCCAGGATCTGAG
AGAAGTCAACAAGCGGTTGGAAGACTCCACCCACCCGGCCCAACCTTACAACTCTTGAGCGGCTCCACCGTCCAC
CAGTGGTACACTGTCTTGAATTAAGGATGCTTTTCTGCTGAGACTCCACCCACAGTCCAGCCCTCTCTGCTTGG
AGTGGAGAGATCCAGAGATGGGATCTCAGGACAAATGAGCTGGACAGACTCCACAGGGTTCACAAAACAGTCCACCCCT
GTCTGATGAGGCACTGCACAGACCTTAGCAGACTTCCGGATCCAGCACCCAGATTTGATCTGCTACACTAGTGGATGAC
TTACTGCTGGCCCACTTCTGAGCTAGACTGCCACAGCTACTCGGCTCTGTTACAAACCTTAGGGAACCTGGGTATC
GGCTCGACCCAGAAAGCCAAATTTGCCAGAAACAGGTCAGTATCTGGGATCTCTAAAGAGGGTCAAGATGGCT
GACTGAGGCCAGAAAGAGACTGTGATGGGGCAGCTACTCCGAGACCCCTCGACAACTAAGGGATTCCTAGGGAGGGCA
GGCTTCTGTGCTCTGGHCCCTGGGTTTGCAGAAATGCLAGCCCTTGTACCCCTCCACAAAACGGGACTCTGTTTA
ATTTGGGCCAGACCAACAAAGGCTATCCAGAAATCAAGCAAGCTCTTCTAAGTCCCCAGCCCTGGGTTTGCAGATT
GACTAAGCCCTTGAATCTTTGTGACGAGAGCCAGGCTACGCCAAAGGTGCTCTAACCCAAAACCTGGACCTTGGGCT
CGGCCGTGGCTTACTGTCAAAAGCTAGACCCAGTACACTGGTGGCCCTTGGCTACGGATGGTAGCAGCTTGT
CCGTACTGACAAAGGATGCAAGCAAGCTAAGCATGGGACAGCCACTAGTCAATTCGGCCCCCAATGAGTAGGGCACTAGT
CAAGACACCCCGAGCCGTGGCTTCCACAGCCCGGATGACTCACTACAGGCTTGGCTTTGGACACGACCCGGTCCAG
TTGGAGCCGTGTAGCCCTGAAACCCGCTACCTGCTCCACTGCTGAGGAGGGCTGCAACACACTGCTTACTGATCC
TGGCCGAAACCCAGGAAACCGCCGACTAAGGGACCGCCCTCCAGACCCGACCAADTGTACTACGGATGGAG
CAGTCTTTAACAAGAGGACAGCTAAGGCAGGACTGGGCTGGGAGCCAGGACCGAGGATTAATCTGGCTAAGGCCCTGCCA
GCCGGGACATCCCTCAGGGGCTGAACTGATAGCACTCAACCAGGCCAAAGATGGCAAGGTTAGAACTAAAGTGT
ATACTGATAGCCCTTATGCTTTGCTACTGCCCATCTCCAGGAAATATAAGAGGCGTGGTGTCTCAGATCAGAAAG
CAAGAGATCAAAATTAAGAGGAGATCTTGGCCCTACTAAAAGCCCTCTTTCTGCCAAAAGACTTAGCAATCAATTTGT
CCAGGATACAAAAGGACAGGGCCGAGGCTAGAGGCAACCGGATGCTGACCAAGGGCCCGAAGGACAGCACTACAG
AGACTCCAGACACTCTAACCCTCTATGAAATTCATCAACCTACACTCAGAAATTTTCAATACAGTACTGAT

FIGURA 3D (Cont.)

```

AARGACCTAACCAAGTTGGGGGCAATTTATGATAAALCAAAGAAAGTETGGGCTACCGRGGAAACCTGTGATGCTGAC
CAGTTTACCTTTGAATATATAGACTTTCTTCATCAGCTGACTCACCCTAGCTTCTCAAARATGAAAGGCTCTCCTTAGAGHAA
GCCACAGTCCCTACTACTACTGCTGAAACGGGATCGACACTCAAAAAATACACTGAGACCTGCAAGGCTTGTGCACAGTCA
GGCAGCAAGTCTCCCTTAAACAGGCACTAGGCTCCCGGGCATGCGCCCGGACTCATTTGGAGATCGATTTCACCGAG
ATAAAGCCCGGATTTGATGGCTATAAAATATCTTTAGTTTATATAGATACCTTTCTGGCTGATACAGGCTTCCCAACCA
AGAAAGAAACCGCAAGGTGATACCAAGAGCTACTAGAGGAGATCTTCCAGGTGGGCTGCTCAGGTTATGGGAAC
TGCACATGGGCTGCTTCTCTCAGGGTGGATCAGACAGTGGCCGATCTGTTGGGGATGATTTGAAATTCATTTGCTA
TACAGACCCCAAGCTCAGGCCAGGTAGAAAGATGAATAGAACATCAGGGAGACTTAACTAAATTAAGCTTTCGAACTG
GCTCTAGAGACTGGGTGCTCTACTCTCTAGCTTCTGATCCAGGCCCACACAGCCGGCCCTCCATGGCTTCAGCCCAT
TGAGATCTTATATGGGGCACCCCGCCCTTGTAACTTCTCTGACCCGACATGACAAAGTTPATACAGCCCTCTCTC
CAGCTCACTTACAGGCTCTCTACTTAGTCCAGCAGGAACTCTGGGAGACTCTGGCCGGCAGCTACCCAGAACACTGGGCT
GAAAGGGTACTTACACCTTACCGAGTCTGGGACAGAGTGGGTTCCGCGACACAGACTAGAACCTTAGAACCTTGGCTG
GAAAGGACTTACACAGCTCTCTGACCCCTCCCTCCCTCCCTCAGAGTAGAGCCATCCAGCTTGGATACACCCCGCCGCT
CTGAGGCTGCTGACTCCGGGGGTGAGCTTCTCTAGACTGACTGGGGCTTCCAGGCTCTCAAACTCCCTCAGATAA
GTTTAACTCCGGTGGAGCCCTTAAATCTCTAGGGACTCTCTTAGAGATAGGATGGCAGAGCCCTCCATCGGCTTTAA
CTAACTCCGAGGCTCACCACTCTGATCTGGGGTAAOCCAAAGCCCTCTCTCTGGGACTGTAAGATGCTCTCTCT
CAAAATATAATTTGATCTATGATCTGGTGGGAGGGAGTGGGACCTTCAGACAGGAACTGATGTTGGGATAGGCTG
CAGTATCCCTGAGGAGACAGCTGGACTCCGCTTTTGAATTTTACTGTTGCTCTGGCTTACCTGAGGCTGGGCTTGGG
GGACTCAGGAGGGCTACTCTGTAATGGGGGTGTAACCCCTGGAGAGGCTTACTGGAGCCAGATCATCTCTGGGCT
TAACTCTCCCTTAAAGCCGTTAAACCCCTTGGGACAGGGATGCTTAATTTGCTGCTGGCCCTGCTAGACTCTCCAA
AGTATCCATCTCTCCAGGGGCTACTGAGGGGTCAGATGCAACCTCTAGTCTTGAATTCAGTATGAGGAAAGAA
CTACTAGGGGAGGGCTCAATCTGGGACTGAGACTGTACCGGACAGGAGATGCTTACATGTTCTCTCTCTGAGCC
GGCAGGCTCTTAAATGGGGCTCCGAGTCCCATAGGCTCAADGCAATTAOCCGACAGGACTCTCTCTCTCAACAA
AGGATGTTACTGGCTCTCAGCCGCTTGGCCCTCAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
CTTACAGTCCAGGCTCCATAGGCTCCAGGCTCCAGGCTCCAGGCTCCAGGCTCCAGGCTCCAGGCTCCAGGCTCC
TTAACTCCAGGCTCCAGGCTCCAGGCTCCAGGCTCCAGGCTCCAGGCTCCAGGCTCCAGGCTCCAGGCTCCAGG
CTGGGGCTCTTAAAGGCTCCAGGCTCCAGGCTCCAGGCTCCAGGCTCCAGGCTCCAGGCTCCAGGCTCCAGG
ACAGGAGGGGCTATGATGGGGGCACTTAAATCTCCAGGCTCCAGGCTCCAGGCTCCAGGCTCCAGGCTCCAGG
CTTACTTACTGAGGCTCCAGGCTCCAGGCTCCAGGCTCCAGGCTCCAGGCTCCAGGCTCCAGGCTCCAGGCT
CTTAACTCCAGGCTCCAGGCTCCAGGCTCCAGGCTCCAGGCTCCAGGCTCCAGGCTCCAGGCTCCAGGCTCC
CAACAGGCTCCAGGCTCCAGGCTCCAGGCTCCAGGCTCCAGGCTCCAGGCTCCAGGCTCCAGGCTCCAGGCT
CAGGATGTTGCTTCTTAAAGGAGGGGCTCTGGGAGGCTTAAAGAGAGATGTTTATGAGGAGGCTCCAGGCT
TAGTGGAGGAGGCTGGGCAATTAAGAGAGGCTTAAATCAGAGGAGGAGGCTTAAAGAGGAGGAGGCTTAA
AGGCTGTTTAAAGATCCCTGCTTGGCTTAACTTAACTCCAGGCTCCAGGCTCCAGGCTCCAGGCTCCAGGCT
CTCTTTGGACTTGCATTTCTCAATGGATGGTCCAAATTTTAAAGGAGGATCTCAGTGGTCCAGGCTTCTGACT
AGCAATTCAGGCTTAAAGGCTTAAAGGCTTAAAGGCTTAAAGGCTTAAAGGCTTAAAGGCTTAAAGGCTTAA
CGTTTGTCTATGTTTATTTCTCCCAATTTGCTGCTTTTTGGCAATGTTGAGGGCTGGGAACTGGCTGCTTCTT
AGGATCTCTAGGGGCTCTTCCCTCTCTGGCAAGGAGTCCAGGCTCTGTTGATGCTCTGAGGAGGAGGCTTCT
CTCTCTGAGGCTCCAGGCTCCAGGCTCCAGGCTCCAGGCTCCAGGCTCCAGGCTCCAGGCTCCAGGCTCCAG
AAAGGCTCTCTCTAGGCTTCTCAAGGGGCTGAGGATGCTCCAGGCTCCAGGCTCCAGGCTCCAGGCTCCAG
CTCTGGGCTCCAGGCTTCTTAAAGGCTTAAAGGCTTAAAGGCTTAAAGGCTTAAAGGCTTAAAGGCTTAA
TTTCAAAAGGCTTAAAGGCTTAAAGGCTTAAAGGCTTAAAGGCTTAAAGGCTTAAAGGCTTAAAGGCTTAA
GGCTCTCTCTGAGGCTTAAAGGCTTAAAGGCTTAAAGGCTTAAAGGCTTAAAGGCTTAAAGGCTTAAAG
GGCTCAACATGAGGCTTCCAGGAGGCTTCCAGGCTTCCAGGCTTCCAGGCTTCCAGGCTTCCAGGCTTCCAG
CCAGGCTTCCAGGAGGCTTCCAGGCTTCCAGGCTTCCAGGCTTCCAGGCTTCCAGGCTTCCAGGCTTCCAG
CCCTAGGCTTCCAGGAGGCTTCCAGGCTTCCAGGCTTCCAGGCTTCCAGGCTTCCAGGCTTCCAGGCTTCC
GTGTTGAGGAGGCTTAAAGGCTTAAAGGCTTAAAGGCTTAAAGGCTTAAAGGCTTAAAGGCTTAAAGGCT

```

AG = 3'aa

497A env

MuH1

BMY IRES

PstII

yCD2

FIGURA 3D (Cont.)

ES 2 660 755 T3

```
CMV Promotor (1-582)>>>
|
1  TAGTTATTAATAGTAAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCMRTATGGAGTTCCG 60
   ATCAATAATTATCATTAGTTAATGCCCCAGTAATCAAGTATCGGGTATATACCTCAAGGC

61  CGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCCTGGCTGACCCGCCAACGACCCCGCCATT 120
   GCAATGTATTGAATGCCATTTACCGGGCGGACCGACTGGCGGGTTGCTGGGGCGGGTAA

121  GACCTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCA 180
   CTGCAGTTTACTCTGCATACAAGGGTATCATTTGGGTTATCCCTGAAAGGTAAGTGCAGT

181  ATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCC 240
   TACCCACCTCATAAATGCCATTTGACGGGTGAACCGTCATGTAGTTCCACATAGTATAAGG

241  AAGTAGCCCCCTATGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCCGCTGGCATTATGCCAGTA 300
   TTCATCGGGGGATAACTGCAGTTACTGCCATTTACCGGGCGGACCGTAATACGGGTCAAT

                                     Eco105I
                                     |
                                     SnaBI
                                     |
                                     BstSNI
                                     |
301  CATGACCTTATGGGACTTTCCACTTGGCACTACATCTACGTATTAGTTCATCCCTATTAC 360
   GTACTGGAAATACCCCTGAAAGGATGAACCGTCATGTAGATGCATTAATCAGTAGCGGATAATG

361  CATGGTGTATCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGGTGGATAGCGGTTTGACTCAGCGGG 420
   GTACCACTAGCCAAACCGTCACTGACTTACCCGACCTATCCCAACTGAGTGGCCCC

421  ATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAAG 480
   TAAAGGTTACAGGGTGGGTAACCTGCAGTTACCCCTCAAACAAACCGTGGTTTTACTTGC

481  GGACTTTCCAAAATGTGCTAACAACCTCCGCCCATTTGACGCAAAATGGGGGTAGGGGTGT 540
   CCTGAAAGGTTTTACAGCAATTTGAGGCGGGTAACTGGCTTTACCCGCATCCGCACA

                                     R region (583-650)>>>
                                     |
541  ACGGTGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGGGCCACTCCFCCGATTG 600
   TGCCACCCCTCCAGATATATTCGTCTCGACCAATCACTTGGCCGGGTCAGGAGGCTAAC
```

FIGURA 3E

ES 2 660 755 T3

U5 region (551-1202)>>>
|
601 ACTGAGTCGGCCGGGTACCCGTGTATGCCAATAAACCCCTCTTGGCAGTTGCATCCGACTTGT 660
TGACTCAGCGGGCCCATGGGCACATAGGTTATTGGGAGACGGTCAACGTAGGCTGAACA
661 GGTCCTCGGTGTTCCCTGGGAGGGTCTCCCTCTGAGTGATTGACTACCCGTCAGCGGGGGTC 720
CCAGAGCGACAGGAAACCCCTCCAGAGGAGACTCACTAATGATGGGCAGTCGCCCCACG
721 TTTCATTTGGGGGCTCGTCCGGATCGGGAGACCCCTGCCACGGGACCCAGCCACCA 780
AAAGTAAACCCCGAGCAAGGCCCTAGCCCTCTGGGGACGGGTCCCTGCTGGCTGGGTGGT
5'SS (788)
|
781 CCGGGAGGTAAGCTGCCAGCACTTATCTGTCTCTCCGATTGTCAGTGTCTATGAC 840
GGCCCTCCATTGACCGGTCTGTTGATGACACAGACAGGCTAACAGATCACAGATACTG
841 TGATTTTATGGCCCTGCCCTCGGTACTAGTTAGCTAAGCTGTGTATCTGGCGGACCCG 900
ACTNAAATACCGGACCCAGCCATGATCAATCGATTGATCGAGACATAGACCGCCTGGGC
901 TGGTGGAACTGACAGGTTCCGGAAACCCCGCCCAACCCCTGGGAGACGTCCACAGGACTT 960
ACCCCTTGCATGCTCAAGCTTCTGGGCGCGGCTTGGGACCTCTGACAGGTTCCCTGAA
961 CCGGGGCGTTTTTTGTGGCCGACCTGATCCAAAATCCCGATCCTTTGGACTCTTTG 1020
GCCCCCGCAAAAACACCGGGCTGGACTCAGGTTTTTAGGGCTAGCAAAAACCTGAGAAAC
1021 GTGCACCCCTTTAGAGGAGGATATGTGCTTCTGTAGGAGCGGAAACCTAAAACAGT 1080
CAGCTGGGGGAACTCCCTCCCTATACCCAGACCATCCTCTGCTCTGGATTTTGTCA
1081 TCCCGCCTCCGCTGATTTTTTGCCTTCGGTTTGGGACCGAAGCCCGCCGCGCTCTTG 1140
AGGGCGAGGACAGACTTAAAACCAAGCCCAACCTTCCCTTCCGGCGCGCCGACAGAC
1141 TCTGCTGCAGCATCGTCTGCTGTCTCTGCTGACTGTGTTTTCTGTATTTGTCTGAG 1200
AGACGACCTCTAGCAAGACCAACAGGACAGACTGACACCAAGACATAAACAGACTCT
gag (1203, 2319)>>>
|
1201 ATATGGGCGAGACTGTACCACTCCCTTAAAGTTTGNCTTAGGTCACCTGGAAAGATGTGG 1260
TATACCCGCTCTGCAATGCTGAGGGAATCAAACTGGATTCAGTGAACCTTTCTACAGC
1261 AGCGGATCGCTCACAAACAGTGGCTAGATCTCAAGNAGAGACGTTGGGTTACCTTCTGCT 1320
TCGCCATAGCGAGTGTGGTCAGCCATCTACAGTTCTTCTCTGCAACCCATGGAGAGCGA
1321 CTGCAGATGGCCACCTTTAACKCTCGGATGGCCCGAGACGGCACCTTAAACGGAGACC 1380
GACGCTTACCGGTTGGAARTTGGAGCTTACCGGGCTCTGCGGTGGABATTGGCTCTGG
1381 TCAATACCCAGGTTAAGATCAAGSTTTTTTCACCTGGCCCGCATGGACCCAGACCAAG 1440
AGTACTGGGTCCARTTCTAGTCCAGAAAAGTGGACCGGGGTACCTGTGGGTCTGGTCC
1441 TCCCTACATCGTGAACCTGGGAGCCCTTGGCTTTTGAACCCCTCCCTGGGTCAAGCCCT 1500
AGGGGATGTAGCACTGGACCTTCCGAAACGAAACTGGGGGAGGAAACCACTTCAGGA

FIGURA 3E (Cont.)

ES 2 660 755 T3

1501 TTGTACACCCCTAAGCCTCCGCCTCCTCTTCCCTCCATCCGCCCGTCTCTCCCCCTTGAAC 1560
AACATGTGGGATTCGGAGGCGGAGGAGAAGGAGGTAGCGGGGCAGAGAGGGGAACTTG

1561 CTCTCTGTTTCGACCCCGCTCGATCCCTCCCTTTATCCAGCCCTCACTCTCTCTAGGCG 1620
GAGGAGCAAGCTGGGGCGGAGCTAGGAGGGAATAGGTCCGGAGTGAGGAAGAGATCCGC

1621 CCAACCTAAACCTCAAGTCTTTCTGACAGTGGGGGCGCTCATCGACCTACTTACAG 1680
GGTTTGGATTTGGAGTTCAGAAGACTGTCAACCCCGCGAGTAGCTGGATGAATGTC

1681 AAGACCCCGCCCTTATAGGSAACCAAGACCACCCCTTCCGACAGGACGGAATGGTG 1740
TTCTGGGGCGGAATATCCCTGGGTCTGTTGGGGGAAGCTGTCCCTGCCTTTACCAC

1741 GAGAAGCGACCCCTGCGGGAGAGGACCCGACCCCTCCCAATGGCATCTCTGGCTACGTG 1800
CTCTTCGCTGGGGACGCCCTCTCCGTGGCTGGGGAGGGTTACCGTAGAGCGGATGGAC

1801 GGAGACGGGAGCCCTGTGGCGGACTCCACTACCTCGCAGGCATTCCCCTCCGCGCAG 1860
CCTCTGCCCTGCGGGACACCGGCTGAGGTGATGGAGCGTCCCTAAGGGGAGGCGCTC

1861 GAGGAACGGACAGCTTCATACTGGCCCTTCTCCTCTCTGACCTTTACACTGGAAAA 1920
CTCCTTTGCCTGTGANGTATGACCGGCANGAGGAGAAGACTGGAATGTTGACCTTTT

1921 ATATAACCCCTCTTTTTCTGAAGATCCAGGTAACTGACAGCTCTGATCGAGTCTGTTC 1980
TATTAATGGGAGAAAAAGACTTCTAGGTCCATTTGACTGTGAGACTAGCTCAGACAAG

1981 TCATCACCCATCAGCCACCTGGGAAGACTGTCAGCAGCTGTTGGGGACTCTGCTGACCG 2040
AGTAGTGGGTAGTCCGGTGGACCTGCTGACAGTCCGTCGACAACCCCTGAGACGACTGGC

3121 ACTTTGAGGATCAGGAGCCAGGTTATGGGACCAATGGGGCAGCCCTGCAAGTGTGGA 3180
TGAAACTCCCTAGTCTCCGGTCCATACCCTGGTTACCCCGTGGGGACGTTCACAACT

3181 CCCTAANTATAGAAGATGAGCATCGGGCTACATGAGACCTCAAAAGAGCCAGATGTTTCTC 3240
GGGATTTATATCTTCTACTCGTAGCCGATGTACTCTGGAGTTTTCTCGGTCTACAAAGAG

3241 TAGGGTCCACATGGCTGTCTGATTTTCCTCAGGCTGGGCGAAACCGGGGCAATGGGAC 3300
ATCCCAGGTGTACCGACAGACTAAAAGGAGTCCCGACCCGCTTTGGCCCCGTACCCCTG

3' SS (3314)

3301 TGGCAGTTCGCCAAGCTCTCTCTGATCATACCTCTGAAAGCAACCTCTACCCCGTGTCCA 3360
ACCGTCAAGCGGTTCGAGGAGACTAGTATGGAGACTTTCGTTGGAGATGGGGCACAGGT

3361 TAAACANTACCCCTGTACACAGAAGCCAGACTGGGGATCAAGCCCCACATACAGAGAC 3420
ATTTTGTATGGGGTACAGTGTCTTCGGTCTGACCCCTAGTTGCGGGTGTATGTCTGTG

3421 TGTTGGAACAGGGAATACTGGTACCCTGCCAGTCCCCCTGGACAGGCCCTGTCTACCG 3480
ACAACTGGTCCCTTATGACCTGGGACGCTCAGGSGGACCTTGTGCGGGGACGATGGGC

3481 TTAAAGAACAGGGAATGATGATATAGGCCCTGCCAGGATCTGAGAGAACTCAACRAGC 3540
AATTCCTTGGTCCCTGATTAATATCCGACAGGTCCCTAGACTCTCTTCACTGTCTCG

FIGURA 3E (Cont.)

ES 2 660 755 T3

```

3541 GGGTGGAGACATCCACCCACCGTGCCCAACCCCTTACAACCTCTTGAGCGGGCTCCAC 3600
      CCCACCTTCTGTAGGTGGGTGGCACCGGTTGGGAATGTTGGAGAACTCGCCCCGAGGGTG

3631 CGTCCACCCAGTGGTACACTGTGCTTAAAGGATGCCTTTTCTGCCTGAGACTCC 3660
      GCAGGGTGGTCACCATGTGACACGAACTAANTTCTACGGAAAAAGACGGACTCTGAGG

                                     PfeI
                                     |
                                     TfiI
                                     |
3661 ACCCCACCACTCAGCCTCTCTTGGCCTTTGAGTGGAGAGATCCAGAGATGGGAATCTCAG 3720
      TGGGGTGGTCAGTCGGAGAGAGCGGAACTCACCTCTCTAGGTCCTTACCCCTTAGAGTC

      MfeI
      |
      MunI
      |

3721 GACAATTGACCTGGACCAGACTCCCAACAGGGTTTCAAAAACAGTCCCACCTGTTTGATG 3780
      CTGTTAACTGGACCTGGTCTGAGGGTCTCCCAAAGTTTTTGTGAGGGTGGGACAAACTAC

                                     MroI
                                     |
                                     BseAI
                                     |
                                     Bsp13I
                                     |
                                     BspEI
                                     |
                                     Kpn2I
                                     |
                                     AccIII
                                     |

3781 AGGCACATGCACAGAGACCTAGCAGACTTCCGGATCCAGCAACCAGACTTGATCCTGCTAC 3840
      TCCGTGACGTGTCTCTGGATCGTCTGAAGGCCCTAGGTCGTGGGTCTGAAC TAGGACCATG

3841 AGTACGTGGATGACTTACTGCTGGCCGCCACTTCTGAGCTAGACTGCCAACAAAGGTACTC 3900
      TCATGCACCTACTGAATGACGACCGGCGTGAAGACTCGATCTGACGGTTGTTCCATGAG

3121 ACTTTGAGGGATCAGGAGCCAGGTTATGGGACCAATGGGGCAGCCCTGCAAGTGTGTA 3180
      TGAAACTCCCTAGTCCCTCGGGTCCAAATACCTGTTTACCCCGTCGGGGACGTTCCACAAT

3181 CCCTAAATATAGAAATGAGCATCGGCTACATGAGACCTCAAAAGAGCCAGATSTTTCTC 3240
      GGGATTTATATCTTCTACTCGTAGCCGATGTACTCTGGAGTTTTCTCGGCTACAAAGAG

3241 TAGGGTCCACATGGCTGTCTGATTTTCTCAGGCCTGGGCGGAAACCGGGGCAATGGGAC 3300
      ATCCCAGGTGTACCGACAGACTAAAAGGAGTCCGGACCCCGCTTTGGCCCCGATACCCCTG

```

FIGURA 3E (Cont.)

ES 2 660 755 T3

3841 AGTACGTGGATGACTTACTGCTGGCCGCACTTCTGAGCTAGACTGCCAACRAGGTACTC 3900
TCATGCACCTACTGANTGACGACCGGGGTTGAAGACTCGATCTGACGGTTGTTCCATGAG

3901 GGGCCCTGTTACAAACCCTAGGGAACCTCGGTATCGGGCCCTCGGCCAAGAAAGCCCAA 3960
CCCGGGACAATGTTTGGGATCCCTGAGAGCCATAGCCCGAGCCGTTCTTTTGGGTTT

3961 TTTGCCAAGAACAGGTCAGTATCTGGGTATCTTCTAAAAGAGGGTCAGAGATGGCTGA 4020
AAACGGTCTTTGTCCAGTTCATAGACCCCATAGAGATTTCTCCCGTCTCTACCGACT

4021 CTGAGGCCAGAAAAGAGACTGTGATGGGGCAGCCTACTCCGAAGACCCCTCGACAACTAA 4080
GACTCCGGTCTTTTCTCTGACACTACCCCGTCCGGATGAGGCTTCTGGGGAGCTGTTGATT

4081 GGGACTTCCTAGGGACGGCAGGCTTCTGTCCCTCTGGATCCCTGGGTTTGCAGAAATGG 4140
CCCTCAAGGATCCCTCCGTCGGAAGACAGCCGAGACCTAGGGACCCAAACGCTTTTACC

4141 CAGCCCCCTTGTACCTCTCACCAAAACGGGGACTCTGTTTAAATGGGGCCAGACCAAC 4200
GTCGGGGAAACTGGGAGACTGGTTTGGCCCTGAGACAAATTAACCCCGGCTCTGGTTG

4201 AAAAGGCTATCAAGAANTCAAGCAAGCTCTTCTAACTGCCCCAGCCCTGGGTTGCCAG 4260
TTTTCCGGATAGTTCCTTAGTTCGTTCCGAGAAGATTGACGGGGTCCGGACCCCAACGGTC

Sal I
|

4261 ATTTGACTAAGCCCTTTGAACTCTTTGTCCGACGAGAGCAGGGCTACGCCAAAGGTGTC 4320
TAAACTGATTCGGGAACCTTGAGAAACAGCTGCTCTTCCGTCGGATGCGGTTTCCACAGG

4321 TAACGCAAAACTGGGACCTTGGCGTGGCCGCTGGCCTACCTGCCAAAAGCTGAGCC 4380
ATTGCGTTTGTGACCTGGAACCGCAGCCGGCCACCGGATGGACAGGTTTTTCGATCTGG

4381 CAGTAGCAGCTGGGTGGCCCCCTTGCCTACGGATGGTAGCAGCCATTGCCGTACTGACAA 4440
GTCATCGTCGACCCACCGGGGAACGGATGCC TACCATCGTCCGTAACGGCATGACTGTT

4441 AGGATGCAGGCAAGCTAAACCATGGGACAGCCACTAGTCATTCTGGCCCCCATGCAAGTAG 4500
TCCTACGTCGGTTCGATTTGGTACCCCTGTGGGTGATCAGTAAGACCCGGGGGTACGTCATC

4501 AGGCACTAGTCAAAACAACCCCGACCGCTGGCTTTCCACGCCCGGATGACTCACTATC 4560
TCCGTGATCAGTTTGTGGGGGCTGGCGACCGAAAGGTTGCGGGCTACTGAGTGATAG

4561 AGGCCTTGCTTTTGGACACGGACCGGTCAGTTCCGACCGGTTGGTAGCCCTGAACCCGG 4620
TCCGGAAAGAAACCTGTGCTTGGCCAGGTCAGCCCTGGCCACCATCGGGACTTGGGCC

4621 CTAAGCTGCTCCCACTGCTGAGGAAGGGCTGC AACACA ACTGCTTGATATCCTGGGCG 4680
GATGCCAGCAGGGTGAAGGACTCCTTCCGACGTTGTGTTGACGGAACATATAGGACCGGC

4681 AAGCCCAAGGAACCCGACCCAGCTAACGGACCGCCCTCCAGACCGCCAGCCACACT 4740
TTCCGGTGCCTTGGGCTGGCTGGATTGCTTGGTGGGGAGGGTTCGGGCTGGTGTGA

4741 GGTACACGGATGGAAGCAGTCTCTTACAAGAGGGACAGCGTAAGGGGGGAGCTGCGGTGA 4800
CCATGTGCCTACCTTCGTGAGAGANTGTTCTCCCTGTCGCATTCGCCCTCGACGCCACT

FIGURA 3E (Cont.)

ES 2 660 755 T3

5521 GAACTAGGCTCCGGGGCCATCGGGCCGGCCTCATTGGGAGATCGATTTACCGAGATAA 5580
CTTGATCCCAGGGCCCGTAGCCGGCCCTGAGTAACCCTCTAGCTAAAGTGGCTCTATT

5581 AGCCCGGATTGTATGGCTATAAATATCTTCTAGTTTTATAGATACCTTTTCTGGCTGGA 5640
TCGGGCCATAACATACCGATATTTATAGAGATCAAAAATATCTATGGAAAAGACCGACCT

5641 TAGAAGCCTTCCCAACCAAGAAAAGAACCGCCAAAGTCTGAACCAAGAGCTACCTAGGG 5700
ATCTTCGGNAGGGTTGGTTCTTTCTTTGGCGGTTCCAGCATGGTTCTTCGATGATCTCC

PaeI
:
BbuI
:
SpaHI
:
SphI
:

5701 AGATCTTCCCAGGTTGGCCTGCGCTCAGGTATTGGGAAGTACCAATGGGCCTGCCTTG 5760
TCTAGAGGGGTCCAGCCGTACGGAGTCCATAACCCTTGACTGTTACCCGGACGGAGC

6901 CTTCCAGGGGCTACTCGAGGGGGCAGATGCAACCCCTCTAGTCTAGANTTCACTGATGC 6960
GAAGGTTCCCGATGAGCTCCCGGCTACGTTGGGAGATCAGGATCTTAAGTACTAGC

6961 AGGAAAAGGGCTAACTGGGACGGGCCAANTCGTGGGACTGAGACTGTACCCGGACAGG 7020
TCCTTTTTCCGATGACCTGCCCCGGTTTAGCACCCCTGACTCTGACATGGCCCTGCC

7021 AACAGATCCTATTACCATGTTCTCCCTGACCCGGCAGGTCTTAAAGTGGGACCCCGAGT 7080
TTGTCTAGGATAATGGTACAGAGGGACTGGCCGTCAGGAATTACACCCCTGGGGCTCA

7081 CCCCATAGGGCCCAACCCAGTATTACCCGACCAAGACTCCCTTCCCTCACCANTAGAGAT 7140
GGGGTATCCCGGTTGGGTCATAATGGGCTGGTTTCTGAGGGAAGGAGTGGTTATCTCTA

7141 TGTACCGGCTCCACAGCCACCTAGCCCCCTCAATACCAGTTACCCCCCTTCCACTACCAG 7200
ACATGGCCGAGGTGTCTGGTGGATCGGGGAGTTATGGTCAATGGGGGAAGGTGATGGTC

7201 TACACCTCAACCTCCCTACAAGTCCAAGTGTCCACAGCCACCCCTCAGGACTGGAGA 7260
ATGTGGGAGTTGGAGGGGATGTTCAAGGTTCAAGGGTGTCTGGGGGTCCTTGACCTCT

7261 TAGACTACTAGCTCTAGTCAAAGGAGCCTATCAGGCGCTTAACTCACCANTCCCGACAA 7320
ATCTGATGATCGAGATCAGTTTCTCGGATAGTCCCGAATTTGAGTGGTTAGGGCTGTT

7321 GACCAAGAAATGTTGGCTGTGCTTAGTGTCCGGACCTCCTTATTACGAAGGAGTAGCGGT 7380
CTGGGTTCTTACACCGACACGAATCACAGCCCTGGAGGAATAATGCTTCTCATCGCCA

7381 CGTGGGCACTTATACCAATCATTCACCCGCTCCGGCCAACTGTACGGCCACTTCCCAACA 7440
GCACCCGTGAATATGCTTACTAAGGTGGCGAGGCCGCTTGACATCCCGGTGAAGGGTGT

FIGURA 3E (Cont.)



FIGURA 3E (Cont.)

```

7081  CCCCATAGGGCCCAACCCAGTATTACCCGACCAAGACTCCCTTCCTCACCAATAGAGAT 7140
      GGGGTATCCCGGGTTGGGTCATAATGGGCTGGTTTC TGAGGGAAGGAGTGGTTATCTCTA

7141  TGTACCGGCTCCACAGCCACCTAGCCCCCTCAATACCAGTTACCCCCCTCCACTACCAG 7200
      ACATGGCCGAGGTGTGGGTGGATCGGGGGAGTTATGGTCAATGGGGGAAGGTGATGGTC

7201  TACACCCCTCAACCTCCCTFACAAGTCCAAGTGTCCCACAGCCACCCCAAGGAAGTGGAGA 7260
      AFTGGGAGTTGGAGGGGATGTTTCAGGTTTACAGGGTGTGGTGGGGTCCCTTGACCTCT

7261  TAGACTACTAGCTCTAGTCAAAGGAGCCATCAGGGCGCTTAACCTCACCAATCCCGACAA 7320
      ATCTGATGATCGAGATCAGTTTCTCGGATAGTCCGCGAATTTGGAGTGGTTAGGGCTGTT

7321  GACCCAAAGAATGTTGGCTGTGCTTAGTGTGGGACCTCCTTATTACGAAGGAGTAGCGGT 7380
      CTGGGTTCCTTACAAACGACACGAATCACAGCCCTGGAGGAATAATGCTTCCTCATCGCCA

7381  CGTGGGCACCTTATACCAATCATTCACCCGCTCCGGCCACTGTACGGCCACTTCCCAACA 7440
      GCACCCGTGAATATGGTTAGTAAGGTGGCGAGGCGGTTGACATGCCGGTGAAGGGTGT

                                     EcoT22I
                                     |
                                     NsiI
                                     |
                                     Mph1103I
                                     |
                                     Zsp2I
                                     |
                                     BfrBI
                                     |
                                     |

7441  TAAGTTACCTATCTGAAGTGCACAGGACAGGGCCTATGCATGSGGGCAGTACCTAAAAC 7500
      ATTCGAATGGGATAGACTTCACCTGTCTGTCCCGGATACGTACCCCGTCAATGGATTTG

                                     NaeI
                                     |
                                     PdiI
                                     |
                                     MroNI
                                     |
                                     NgoMIV
                                     |
                                     |

7501  TCACCAGGCTTATGTAACACCACCCAAAGCGCGGCTCAGGATCCTACTACCTTGCAGC 7560
      AGTGGTCCCGAATACATGTGGTGGGTTTCGGCGCCGAGTCCTAGGATGATGGAACGTGG
    
```

FIGURA 3E (Cont.)

ES 2 660 755 T3

```

                                                    AleI
                                                    |
                                                    OIII
                                                    |
7561 ACCGCGCGAACAATGTGGGCTTGCAGCACTGGATTGACTCCCTGCTTGTCCACCACGGT 7620
    TGGGCGGCCCTTGTACACCGAACGTCGTGACCTAACTGAGGGAACAGGTGGTGCCTA

7621 GCTCAATCTAACCACAGATTATTGTATTAGTTGAACTCTGGCCAGAGTAAATTTACCA 7680
    CGAGTTAGATTGGTGTCTAATAACACATAATCAACTTGAGACCGGGTCTCATTTAATGGT

7681 CTCCCCGATTATATGTATGGTCAGCTTGAACAGCGTACCAAAATATAAAAGAGAGCCAGT 7740
    GAGGGGGCTAAATACATACACAGTCGAACCTGTCCGATGGTTATATTTTCTCTCGGPCA

7741 ATCATTGACCCCTGGCCCTTCTACTAGGAGGATTAACCATGGGAGGGATTGCAGCTGGAAT 7800
    TAGTAACTGGGACCGGGAAGATGATCCCTAATTGGTACCCTCCCTAACGTCGACCTTA

7801 AGGGACGGGACCACTGCCTTAATTAACCAGCAGTTTGGAGCAGCTTCATGCCGCTAT 7860
    TCCCTGCCCTGTGACGGATTAATTTGGGTGGTCAAACCTCGTCCAAGTACGGCGATA

7861 CCAGACAGACTCAGCGAAGTCGAAAAGTCAATTACCAACTAGAAAAGTCACTGACCTC 7920
    GGTCGTCTGGAGTTGCTCAGCTTTTCAGTTAATGGTTGGATCTTTTCAGTACTGGAG

7921 GTTGTCTGAAGTAGTCTACAGAACCGCAGAGGCTAGATTTGCTATTCCCTAAAGGAGGG 7980
    CAACAGACTTCATCAGGATGTCCTTGGCGTCTCCGGATCTAAACGATAGGATTTCCCTCC

7981 AGCTCTCTGCCAGCCCTAAAAGAAAGATGTTGTTTTATGCAGCCACACGGGGCTAGT 8040
    TCCAGAGACCGGTCGGGATTTTCTTTTACACAAAATACGTCGTGGTGTGCCCGGATCA

8041 GAGAGACAGCATGGCCAAATTAAGAGAAAGGCTTATCAGAGACAAAACATTTTGAGAC 8100
    CTCCTCTGTGTACCGGTTTAAATCTCTTTCCGAATTAGTCTCTGTTTTGATAAACTCTG

NspV
|
BstBI
|
Esp119I
|
AsuII
|
Csp45I
|
SfuI
|
Bpu14I
|
BspT104I
|
8101 AGGCCAAGSATGGTTCGAAGGGCTGTTTAAATAGATCCCGCTGGTTTACCACCTTAATCTC 8160
    TCCGGTTCCTACCAAGCTTCCCGACAAATTAATCTAGGGGACCAATGGTGAATTAGAG

```

FIGURA 3E (Cont.)

ES 2 660 755 T3

```

8161 CACCATCATGGGACCTCTAATAGTACTCTTACTGATCTTACTCTTTGGACCTTGCATTCT 8220
      GTGGTAGTACCCTGGAGATTATCATGAGAATGACTAGAATGAGAAACCTGGAACCTAAGA

8221 CAATCGATTGGTCCAATTTGTTAAGACAGGATCTCAGTGGTCCAGGCTCTGGTTTTGAC 8280
      GTTAGCTAACCAGGTTAACAATTTCTGTCCTAGAGTCACCAGGTCAGAGACCAAAACTG

                                     IRES reg(8327,8876) >>>
                                     |
                                     MluI (8325)
                                     ||
8281 TCAGCAATATCACCAGCTAAAACCCATAGAGTACGAGCCATGAACGGCTTACTGGCCGAA 8340
      AGTCGTTATAGTGGTCGATTTTGGGTATCTCATGCTCGGTACTTCGCCAATGACCGGCTT

                                     ires_emcv reg(8378,8876) >>>
                                     |
8341 GCGCGTTGGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATATTGCCGT 8400
      CGGCGAACCCTTATTCGGCCACACGCCAAACAGATATACAATAAAGGTTGTTATAACGGCA

8401 CTTTTGGCAATSTGAGGGCCCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCCTAGGG 8460
      GAARACCGTTACACTCCCGGGCCTTTGGACCGGACAGAGAAGACTGCTCGTAAGGATCC

8461 GTCTTTCCCTCTCGCCAAAGCAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGCTCAAGGAAGCAGTTC 8520
      CAGAAAGGGGAGAGCGGTTTCTTACGTTCCAGACAACCTTACAGCATTCTCTCGTCAAG

8521 CTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACACGTTCTGTAGCGACCCCTTTGCAGGCAGCGGAACC 8580
      GAGACCTTCGAAGAACTTCTGTTTGTTCAGACATCGCTGGGAAACGTCCTCGGCTTGG

8581 CCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTTGATAAGATACACCTGCAA 8640
      GGGGTGGACCGCTGTCCACGGACGACCGCGTTTTTCGCTGCACATATTCTATGTGGACGTT

8641 AGGCGGCACAACCCAGTCCCAGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAAATGCC 8700
      TCCGCCGTGTTGGGGTCACGGTGCAACACTCAACCTATCAACACCTTTCTCAGTTTACCG

8701 TCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCAGAGSTACCCATTGTATGG 8760
      AGAGGAGTTCGCATAAGTTGTTCCCGACTTCCACGGGTCCTCCATGGGGTAACATACC

8761 GATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTAGTCGAGGTTAAAAAACC 8820
      CTAGACTAGACCCCGGAGCCAGTGTACGAAATGTACACAAATCAGCTCCAATTTTTTTG

```

FIGURA 3E (Cont.)

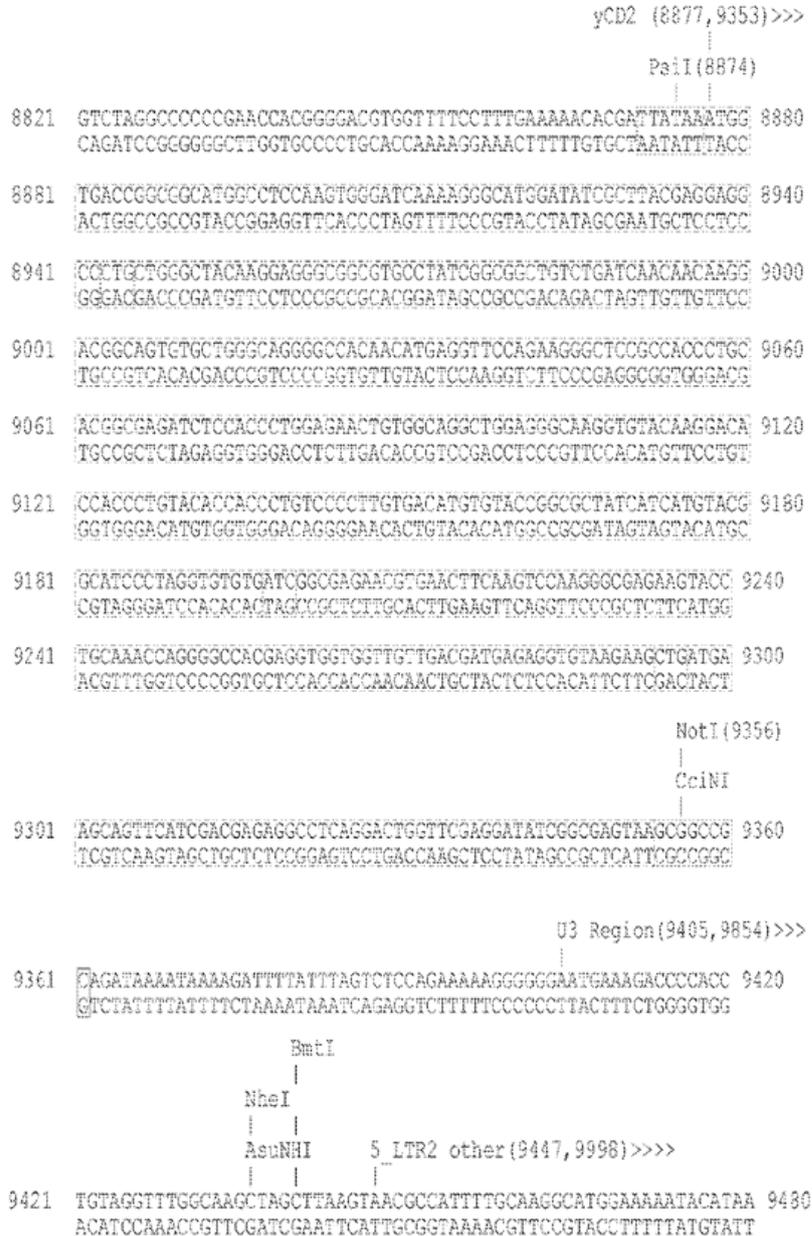


FIGURA 3E (Cont.)

ES 2 660 755 T3



FIGURA 3E (Cont.)

ES 2 660 755 T3

10201 GCTTACCGGATACCTGTCCGCCCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCAATGCTC 10260
CGAATGGCCTATGGACAGGCGGAAGAGGGGAAGCCCTTCGCACCGCGAAGAGGTTACGAG

10261 ACCCTGTAGSTATCTCAGTTCGGTSTAGTCCCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGA 10320
TCCGACATCCATAGAGTCAAGCCACATCCAGCAAGCGAGGTTCCGACCCGACACACGTGCT

10321 ACCCCCCGTTACGCCCGACCGCTGGCCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAAACC 10380
TGGGGGGCAAGTCGGGCTGGCGACGCGAATAGGCCATTGATAGCAGAACTCAGGTTGGG

10381 GGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAG 10440
CCATTCTGTGCTGAATAGCGGTGACCGTGTGGTGGACATTGTCTAATCGTCTCGCTC

10441 GTATGTAGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCAACTACGGCTACACTAGAAG 10500
CATACATCCGCCACGATGTCTCAAGAACTTCACCCACCGATTGATGCCGATGTGATCTTC

10501 GACAGTATTTGGTATCTGGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAGAGTTGGTAG 10560
CTGTCAAAACCTAGACCGGAGACGACTTCGGTCAATGGAAGCCTTTTCTCAACCATC

10561 CTCTTGATCCGGCAAAACAAACCCAGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTGCAAGCAGCA 10620
GAGAAGTAGGCCGTTTGTGGTGGCGACCATCGCCACCAAAAAACAAACGTTCTGCTGG

10621 GATTACGGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGA 10680
CTAATGCGGCTCTTTTTTCTAGAGTCTCTTAGGAACTAGAAAAGATGCCCCAGACT

10681 CGCTCAGTGGAAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCAATGAGATTATCAAAAAGGAT 10740
GCGAGTCACTTTGCTTTTGGAGTGCATTCCTAAAAACAGTACTCTAATAGTTTTTCTTA

10741 CTTACCTAGATCCTTTTAAATTAANAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGA 10800
GAAGTGGATCTAGGAAAATTTAATTTTACTTCAAATTTAGTTAGATTTCAATATACT

amp marker (10819,11679)<<<
|

10801 GTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCCACCTATCTCAGCGATCTG 10860
CAITTTGAACCAGACTGTCAATGGTTACGAATTAGTCACTCCGTGGATAGAGTCCGTAGAC

10861 TCTATTTCTGTTCCATCAGTTGCCTGACTCCCGTCTGTAGATAACTACGATAAGGGA 10920
AGATAAAGCAAGTAGGTATCAACGSACTGAGGGGCAGCACATCTATTGATGCTATGCCCT

10921 GGGCTTACCATCTGGCCCCAGTCTGCAATGATACCGCGAGACCCAGCTCACCGGCTCC 10980
CCCGAATGGTAGACCGGGGTCACGACGTTACTATGGCGCTCTGGGTGCGAGTGGCCGAGG

10981 AGATTTATCAGCATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAGTGGTCCCTGCAAC 11040
TCTAATAGTCTTATTTGGTGGTGGGCTTCCCGGCTCCGGTCTTACCAGGACGTTG

FIGURA 3E (Cont.)

ES 2 660 755 T3

```

11041 TTTATCCGCCCTCCATCCAGTCTATTAATTTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCC 11100
      AANTAGGCGGAGGTAGGTCAGATANTTAACAACGGCCCTTCGATCTCATTCATCAAGCGG
11101 AGTTAANTAGTTTGGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTGCAGGCATCGTGGTGTACGGTCCGTC 11160
      TCAATTTATCAAAACGGCTTGCAACAACGGTAAACGCGTCCGTAGGACCCACAGTGGCAGGCAG
11161 GTTTGGTATGGCTTCATTTCAGCTCCGGTTCCTCAACGATCAAGGGGAGTTACATGATCCCC 11220
      CAACCATACCGAAGTAAGTCGAGGCCAAGGGTTGCTAGTTCGGTCAATGTACTAGGGG
11221 CATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCCTCCGATCGTTGTCAGAAAGTAAGTT 11280
      GTACAACACGTTTTTTTCGCCAATCGAGGAAGCCAGGAGGCTAGCAACAGTCTTCATTCCA
11281 GGCCTCAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTTACTGTCTATGCC 11340
      CCGCGCTCACAATAGTGAGTACCAATACCGTCCGTGACGTATTAAGAGAATGACAGTACGG
11341 ATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTG 11400
      TAGGCATTTCTACGAAAAGACACTGACCACCTCATGAGTTGGTTCAGTAAGACTCTTATCAC
11401 TATGGGGGACCGAGTTGCTCTTGCCTCCGCGTCAACACGGGATAATACCGCGCCACATAG 11460
      ATACCGCGCTGGCTCAACGAGAACGGGCGCAGTTGTGCCCTATTATGGCGGGGTGATC
11461 CAGAACTTTAAAAGTGCTCATATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGAT 11520
      GTCTTGAAAATTTTACGAGTAGTAACTTTTGAAGAAGCCCGCTTTTGAGAGTTCTTA
11521 CTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCCACTGATCTTCAGC 11580
      GAATGGCGACAACCTTAGGTCAAGCTACATTTGGGTGAGCACCTGGGTTGACTAGCAAGTCC
11581 ATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAA 11640
      TAGAAAATGAAAGTGGTGCAAAGACCCACTCGTTTTTGTCCCTTCGGTTTTACGGCGTTT
11641 AAAGGGAMTAAGGGCGACCGGAANTGTTGAANTACTCATACTCTTCCTTTTTCAMTATTA 11700
      TTTCCCTTATTCGGCTGTGCCTTTACAACCTTATGAGTATGAGAAGGAAAAGTTATAAT
      amp prom(11721,11749)<<<
      |
11701 TTGAAGCATTTCAGGGTTATTTGTTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGATTTAGAA 11760
      AACTTCGTAANTAGTCCCAATAACAGAGTACTCGCOTATGTATAAACTTACATAAATCTT
11761 AATAAACAATAGGGGTTCCCGGCACATTTCCCGNAAAAGTCCACCTGACCTCTRAGA 11820
      TTTATTTGTTTATCCCAAGGCGCGTGTAAAGGGGCTTTTCAGGTTGGACTGCAGATTCI
11821 AACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAANTAGGCGTATCAGGAGGCCCTTTCCGTCT 11880
      TTGGTAATAATAGTACTGTAATTTGGATATTTTATCCGCATAGTGTCCGGGAAGCAGA
11881 TCAAGAATTCAT 11892
      AGTTCTTAAGTA

```

FIGURA 3E (Cont.)

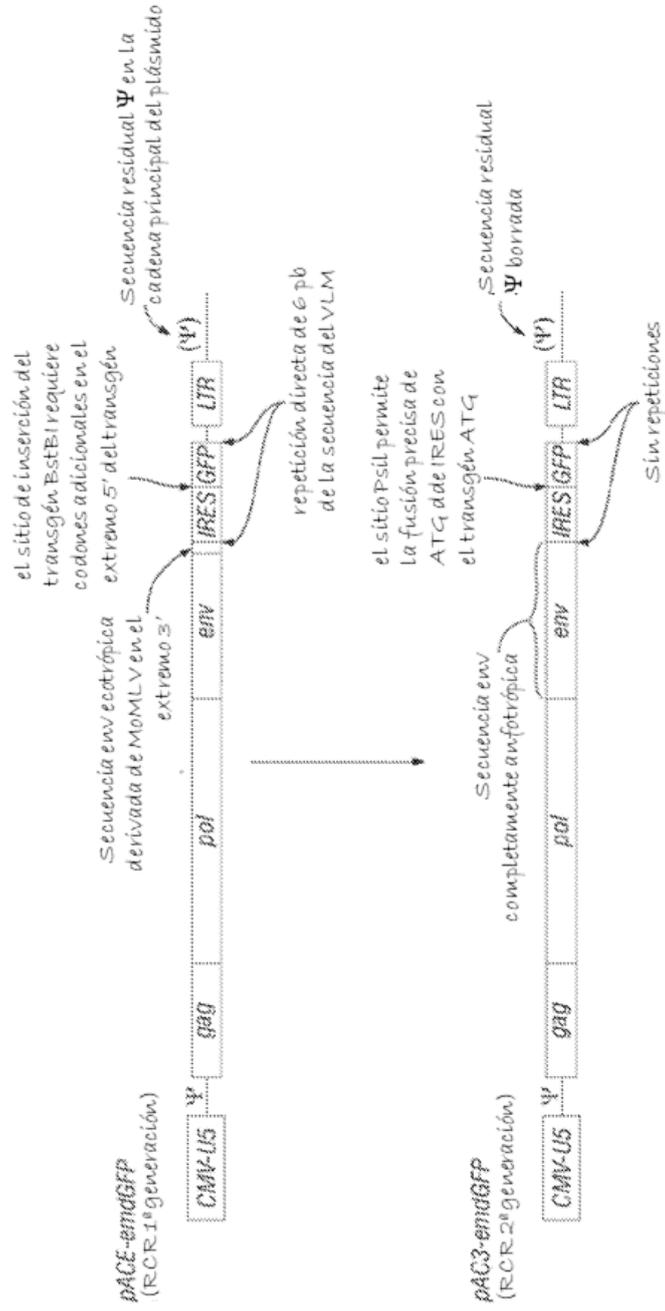


FIGURA 3F

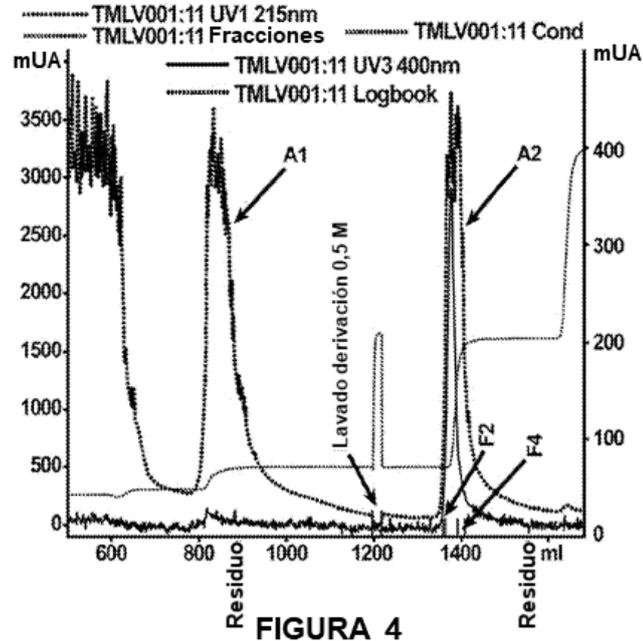


FIGURA 4

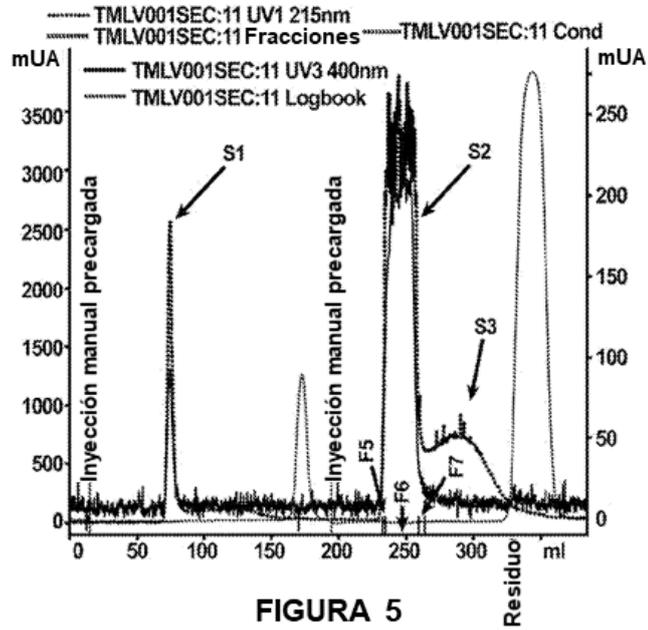


FIGURA 5

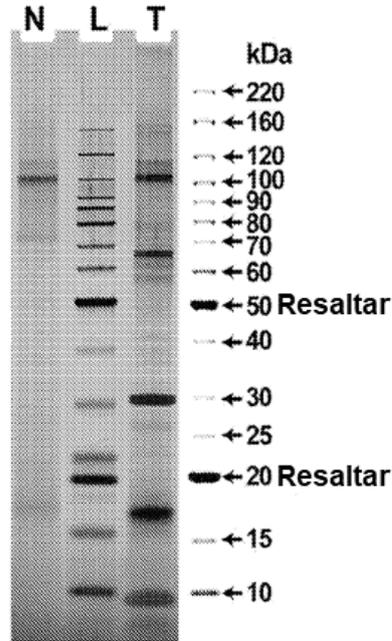


FIGURA 6

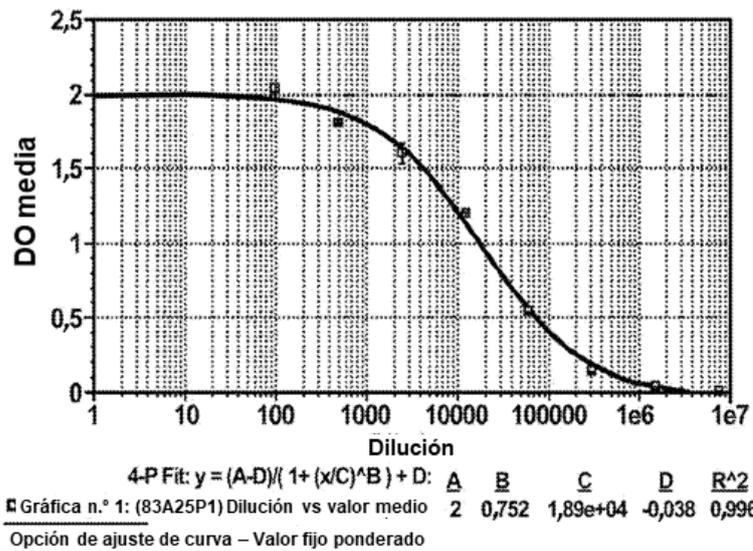


FIGURA 7

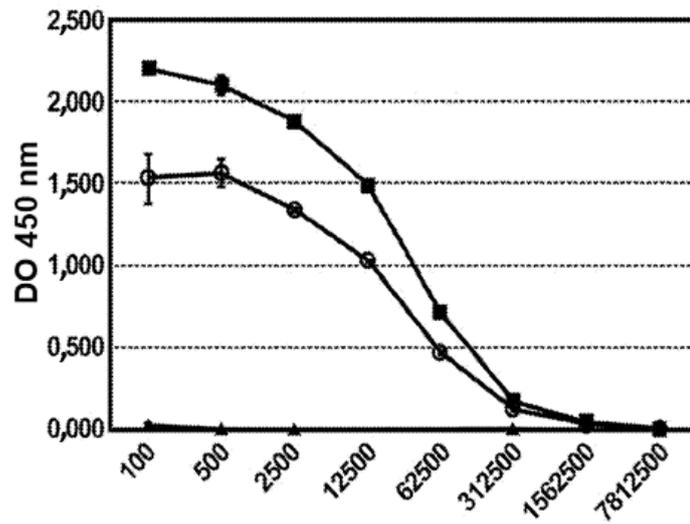


FIGURA 8A

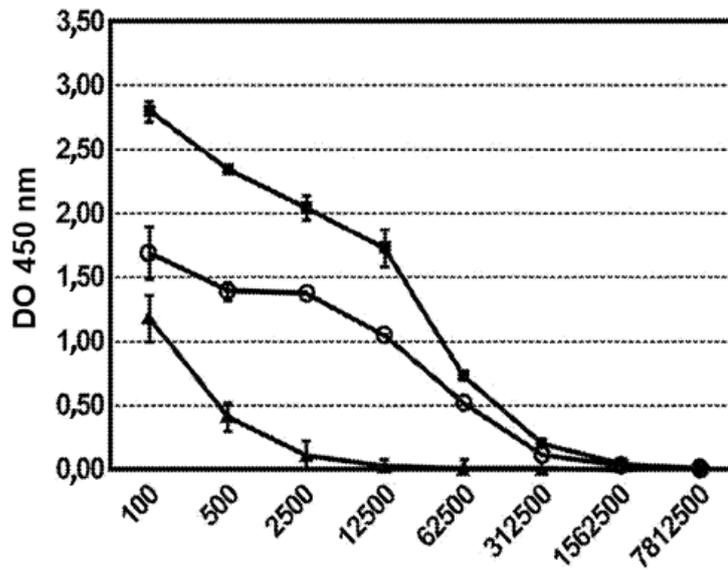


FIGURA 8B

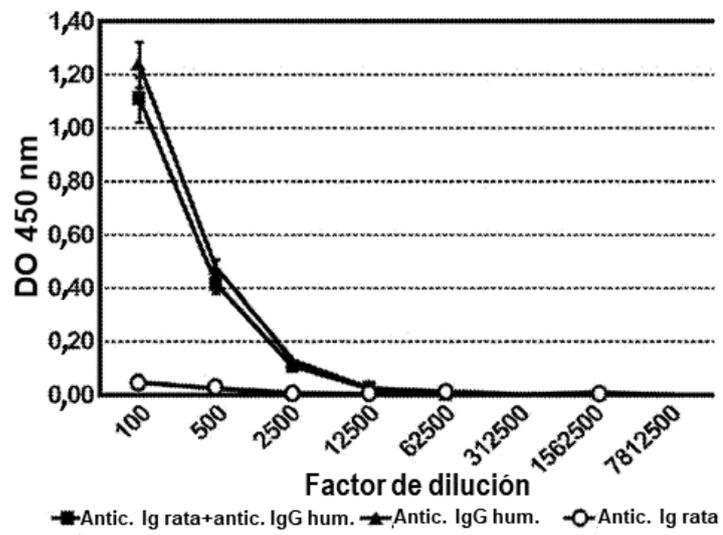


FIGURA 8C

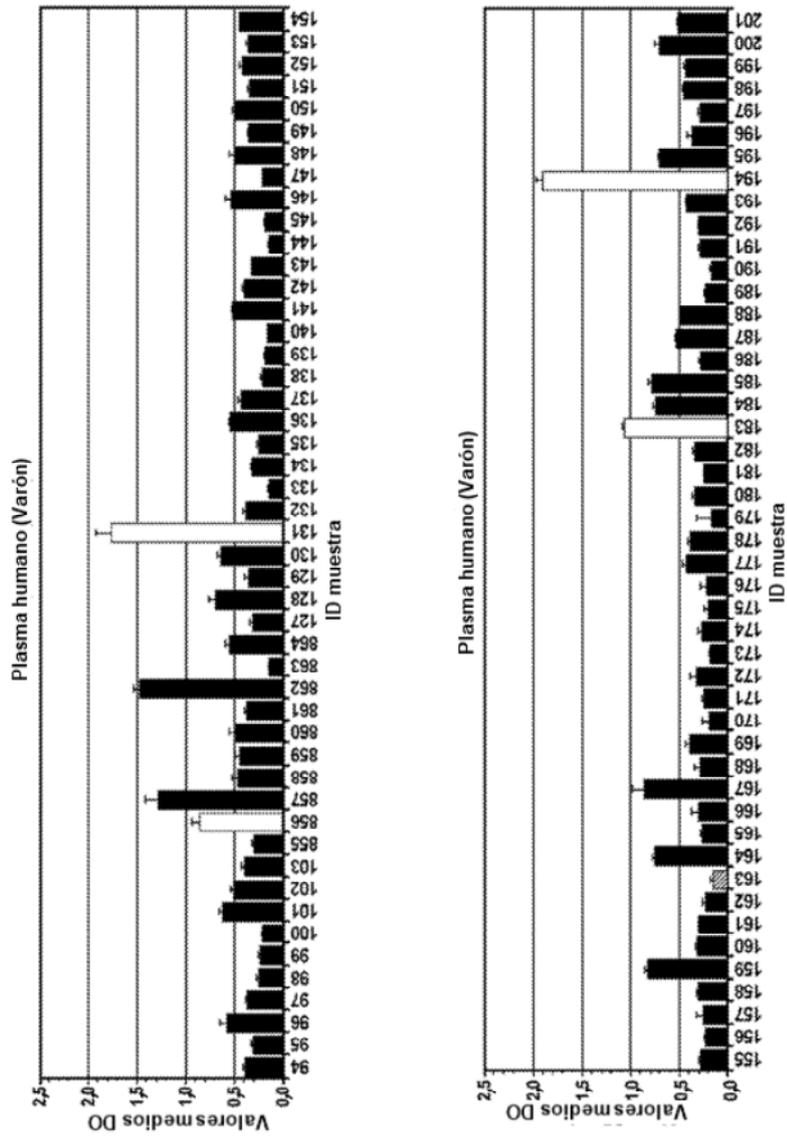


FIGURA 9

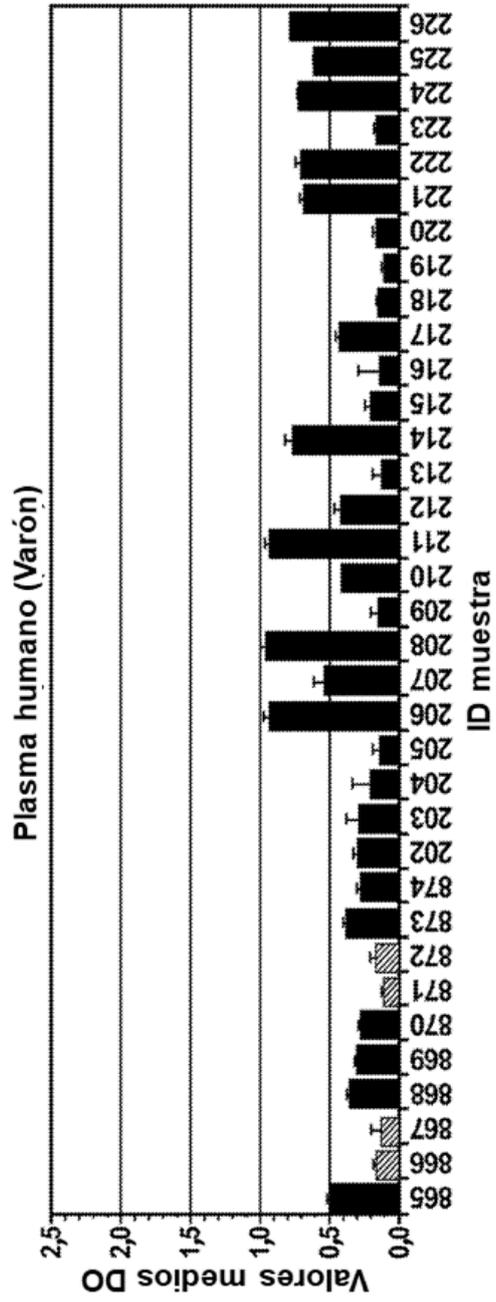


FIGURA 9 (Cont.)

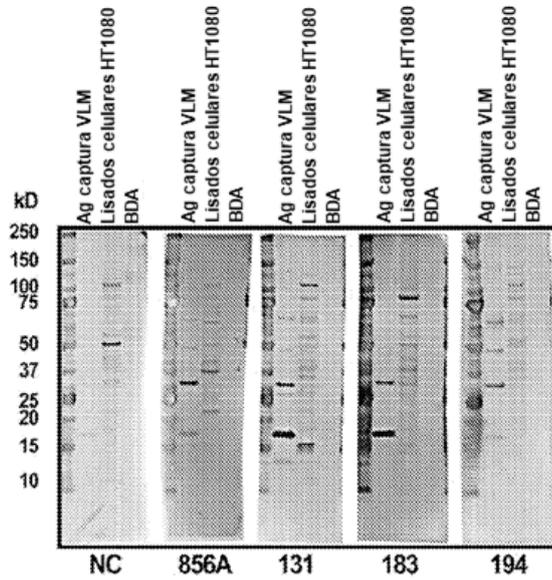


FIGURA 10

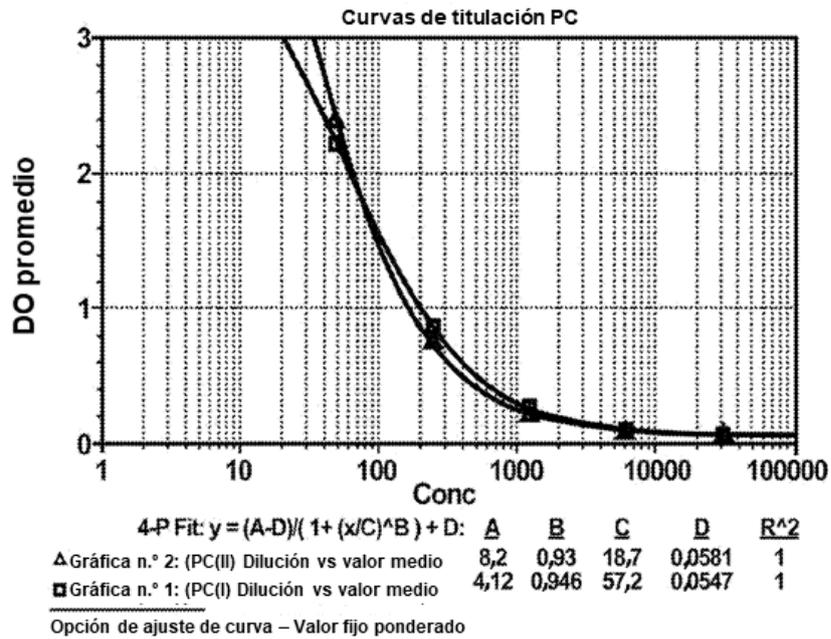


FIGURA 11

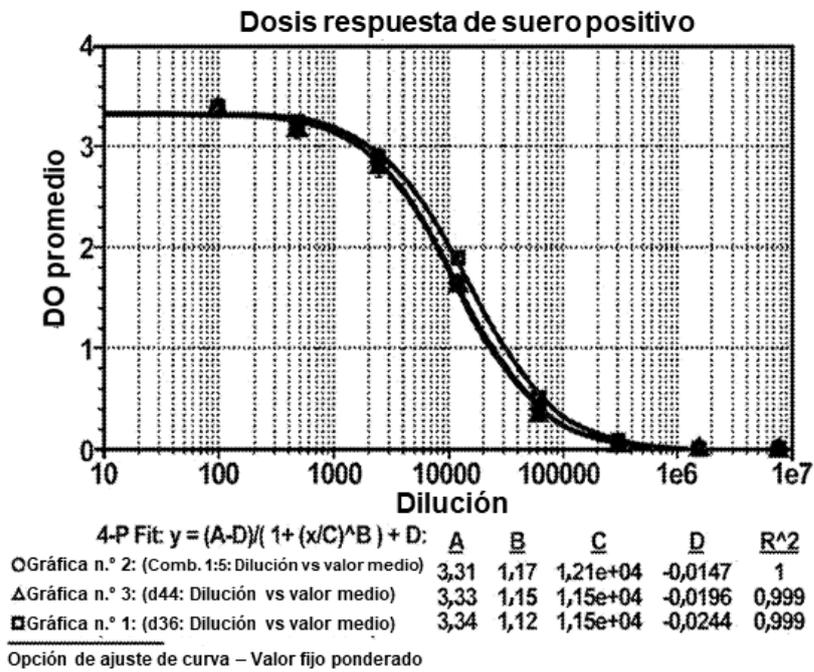


FIGURA 12

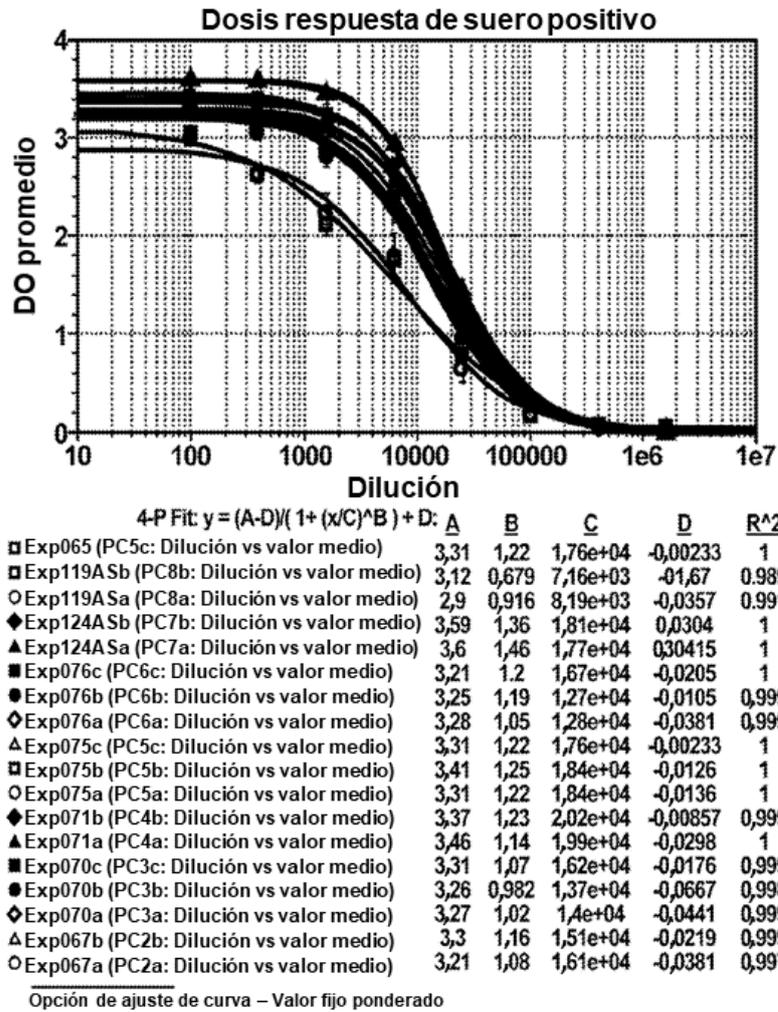
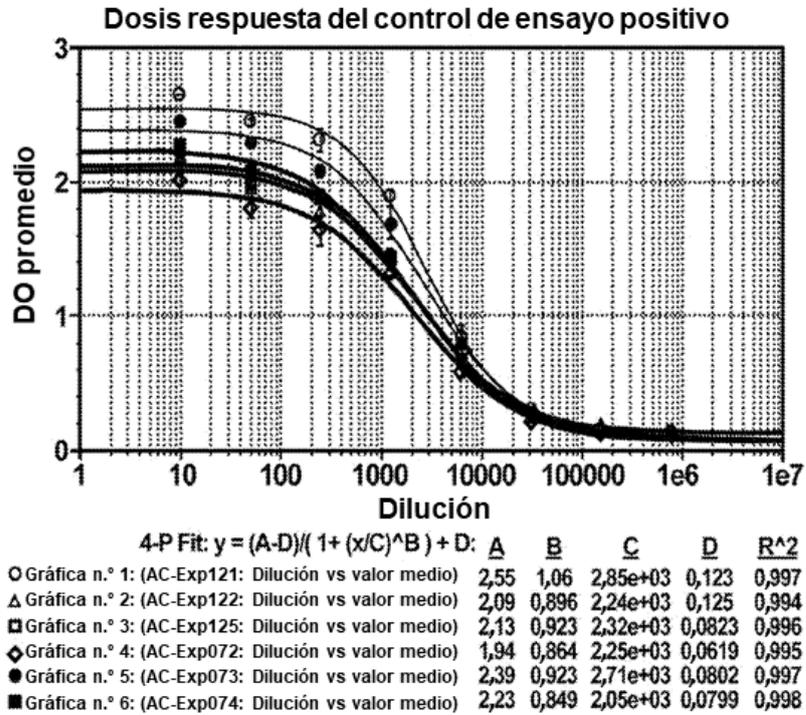


FIGURA 13



Opción de ajuste de curva – Valor fijo ponderado

FIGURA 14

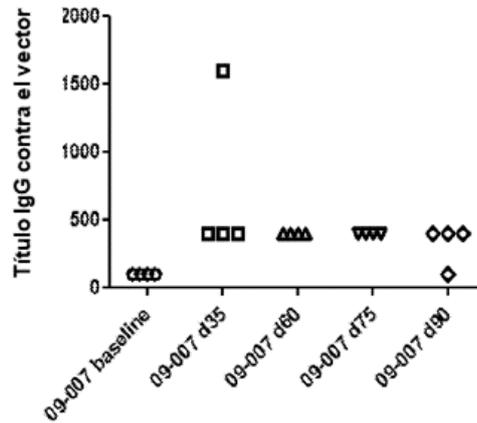


FIGURA 15

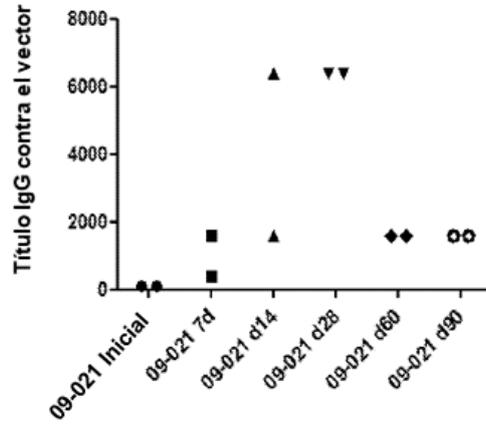


FIGURA 16

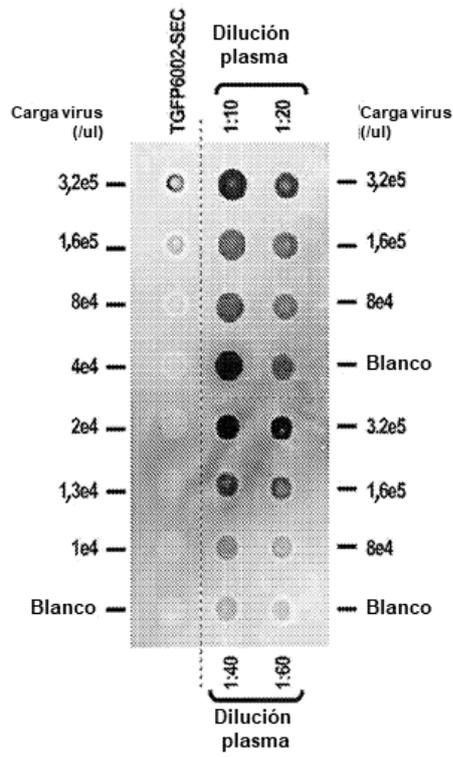


FIGURA 17

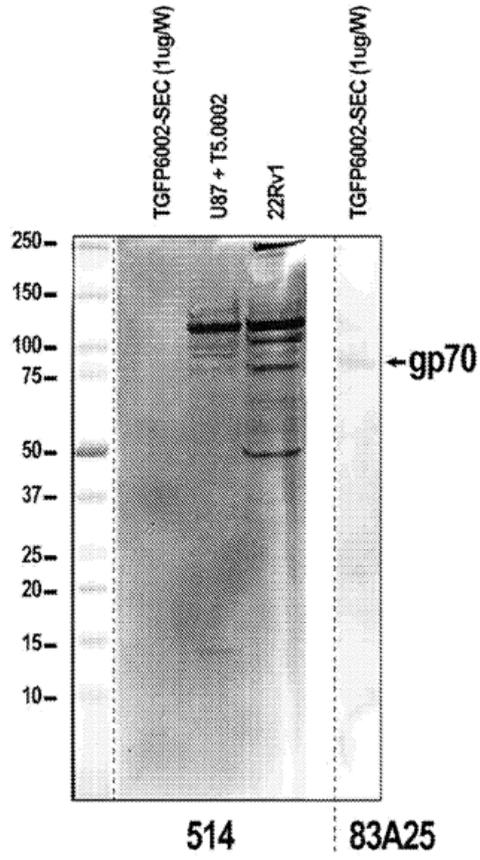


FIGURA 18

ES 2 660 755 T3

Query	1029	<u>CTTCAATACTGGCCGTTCTCCTCTTCTGACCTT-TACAAC</u> <u>TGGAAAAATAATAACCCCTTC</u>	1087
Sbjct	1279	CTTCAGTACTGGCCGTTTCTCCTCTGA-TTTATATAATTGGAAAAATAATAACCCCTTC	1337
Query	1088	<u>TTTTCTGAAGATCCAGGTAAACTGACAG-CTCTGATCGAGTCTGTTTCATCACCCATC</u>	1146
Sbjct	1338	CTTTCTGAAGATCCAGGTAAATTGACGGCCT-TGATTGAGTCCGTCCTCATCACCCACC	1396
Query	1147	<u>AGCCCACCTGGGACGACTGTGACGAGCTGTTGGGGACTCTGCTGACCCGAGAAGAAAAAC</u>	1206
Sbjct	1397	AGCCCACCTGGGACGACTGTGACGAGTTGTTGGGGACCCCTGCTGACCCGAGAAGAAAAAGC	1456
Query	1207	AACGGGTGCTCTTAGAGGCTAGAAAAGCGGTGCGGGGCGATGATGGGCGCCCACTCAAC	1266
Sbjct	1457	AGCGGGTGCTCCTAGAGGCTAGAAAAGCAGTCCGGGGCAATGATGGACGCCCACTCAGT	1516
Query	1267	TGCCCAATGAAGTCGATGCCGCTTTTCCCTCGAGCGCCAGACTGGGATTACACCAC-C	1325
Sbjct	1517	TGCCTAATGAAGTCAATGCTGCTTTTCCCTTGAGCGCCCGATTGGGATTACACCACCTA	1576
Query	1326	<u>CAGGCAGGTAGGAACCACCTAGTCCACTATCGCCAGTTGCTCCTAGCGGGTCTCCAAAAAC</u>	1385
Sbjct	1577	CA-GAAGGTAGGAACCACCTAGTCCCTTACCGCCAGTTGCTCTTAGCGGGTCTCCAAAAAC	1635
Query	1386	<u>GCGGGCAGAAGCCCCACCAATTTGGCCAAGGTAAAAGGAATAACACAAGGG-CCCAATGA</u>	1444
Sbjct	1636	GCGGGCAGGAGCCCCACCAATTTGGCCAAGGTAAAAGGGATAAC-CCAGGGACCTAATGA	1694
Query	1445	<u>GTCTCCCTCGGCCCTTCCTAGAGAGACTTAAGGAAGCCTATCGCAGGTACACTCCTTATGA</u>	1504
Sbjct	1695	GTCTCCCTCAGCCTTTTTAGAGAGACTCAAGGAGCCTATCGCAGGTACACTCCTTATGA	1754
Query	1505	<u>CCCTGAGGACCCAGGGCAAGAAACTAATGTGTCTATGTCTTTCATTGGCAGTCTGCCCC</u>	1564
Sbjct	1755	CCCTGAGGACCCAGGGCAAGAAACCAATGTGTCCATGTCATTTCATCTGGCAGTCTGCCCC	1814
Query	1565	AGACATTGGGA-GAAAGTTAGAGAGGTTAGAAGATTTAAAAACHAGACGCTT-GGAGAT	1622
Sbjct	1815	GGATATCGG-ACGAAAGTTAGAGCGGTTAGAAGATTTAAGAGCAAGAC-CTTAGGAGAC	1872
Query	1623	<u>TTGGTTAGAGAGGCAGAAAAGATCTTTAAT</u> <u>asqgagaaacccctaaqgaaagaaayrs</u>	1682
Sbjct	1873	TTAGTGAGGAAGCTGAAAAGATCTTTAATAAGCGAGAAAACCCGGAAGAAAGAGAGGAA	1932
Query	1683	<u>qgtafcnyyrtggsaacgagctraaaagbsgbsacggcctatgacagagqatgagaycysaa</u>	1742
Sbjct	1933	CGTATCAGGAGAGAAATAGAGGAAAAAGAAGAACGCCGTAGGGCAGAGGATGAGCAGAGA	1992
Query	1743	<u>gagaasgsaagqg</u> <u>TCGTAGGAGACATAGAGAGATGAGCAAGCTATTGGCCACTGTCGTT</u>	1802
Sbjct	1993	GAGAGAGAAAGGGACCGCAGAAGACATAGAGAGATGAGCAAGCTCTTGGCCACTGTAGTT	2052
Query	1803	AGTGGACAGAAACAGGATAGACAGGGAGGAGAACGAAGGAGGTCCCAACTCGATC-GCGA	1861
Sbjct	2053	ATTGGTCAGAGACAGGATAGACAGGGGGGAGAGCGGAGGAGGCCCAACTTGATAAG-GA	2111

FIGURA 19 (Cont.)

ES 2 660 755 T3

Query 2700 GAAGACATCCACCCACCGTGCCCAACCCCTACAACCTCTTGAGCGGGCTCCCACCGTCC 2759
 |||
 Sbjct 2950 GAAGACATCCACCCACCGTGCCCAACCCCTACAACCTCTTGAGCGGGCTCCCACCGTCC 3009

Query 2760 CACCAGTGGTACACTGTGCTTGATTTAAAGGATGCCITTTCTGCCTGAGACTCCACCCC 2819
 |||
 Sbjct 3010 CACCAGTGGTACACTGTGCTTGATTTAAAGGATGCCITTTCTGCCTGAGACTCCACCCC 3069

Query 2820 ACCAGTCAGCCTCTCTTCGCCTTTGAGTGGAGAGATCCAGAGATGGGAATCTCAGGACAA 2879
 |||
 Sbjct 3070 ACCAGTCAGCCTCTCTTCGCCTTTGAGTGGAGAGATCCAGAGATGGGAATCTCAGGACAA 3129

Query 2880 TTGACCTGGACCAGACTCCCACAGGGTTCAAAAACAGTCCCACCCTGTTTGATGAGGCA 2939
 |||
 Sbjct 3130 TTGACCTGGACCAGACTCCCACAGGGTTCAAAAACAGTCCCACCCTGTTTGATGAGGCA 3189

Query 2940 CTGCACAGAGACCTAGCAGACTTCCGGATCCAGCACCCAGACTTGATCCTGCTACAGTAC 2999
 |||
 Sbjct 3190 CTGCACAGAGACCTAGCAGACTTCCGGATCCAGCACCCAGACTTGATCCTGCTACAGTAC 3249

Query 3000 GTGGATGACTTACTGCTGGCCGCCACTTCTGAGCTAGACTGCCAACAGGTACTCGGGCC 3059
 |||
 Sbjct 3250 GTGGATGACTTACTGCTGGCCGCCACTTCTGAGCAAGACTGCCAACAGGTACTCGGGCC 3309

Query 3060 CTGTTACAAACCCCTAGGGAACCTCGGGTATCGGGCCCTCGGCCAAGAAAGCCCAAAATTTGC 3119
 |||
 Sbjct 3310 CTATTACAAACCCCTAGGGAACCTCGGGTATCGGGCCCTCGGCCAAGAAAGCCCAAAATTTGC 3369

Query 3120 CAGAAACAGGTCAAGTATCTGGGGTATCTTCTAAAAGAGGGTCAGAGATGGCTGACTGAG 3179
 |||
 Sbjct 3370 CAGAAACAGGTCAAGTATCTGGGGTATCTTCTAAAAGAGGGACAGAGATGGCTGACTGAG 3429

Query 3180 GCCAGAAAAGAGACTGTGATGGGGCAGCCCTACTCCGAAGACCCCTCGACAACCTAAGGGAG 3239
 |||
 Sbjct 3430 GCCAGAAAAGAGACTGTGATGGGGCAGCCCTACTCCGAAGACCCCTCGACAACCTAAGGGAG 3489

Query 3240 TTCTTAGGGACGGCAGGCTTCTGTCGCCTCTGGATCCCTGGGTTTGAGAAATGGCAGCC 3299
 |||
 Sbjct 3490 TTCTTAGGGACGGCAGGCTTCTGTCGCCTCTGGATCCCTGGGTTTGAGAAATGGCAGCC 3549

Query 3300 CCCTTGTAACCTCTCACCAAAACGGGGACTCTGTTTAAATGGGGCCAGACCAACAAAAG 3359
 |||
 Sbjct 3550 CCCTTGTAACCTCTCACCAAAACGGGGACTCTGTTTAAATGGGGCCAGACCAACAAAAG 3609

Query 3360 GCCTATCAAGAAATCAAGCAAGCTCTTCTAAGTCCCGCCAGCCCTGGGGTTGCCAGATTG 3419
 |||
 Sbjct 3610 GCCTATCAAGAAATCAAGCAAGCTCTTCTAAGTCCCGCCAGCCCTGGGGTTGCCAGATTG 3669

Query 3420 ACTAAGCCCTTTGAACTCTTTGTCGACGAGAAGCAGGGCTACGCCAAAGGTGTCTTAACG 3479
 |||
 Sbjct 3670 ACTAAGCCCTTTGAACTCTTTGTCGACGAGAAGCAGGGCTACGCCAAAGGCTCTTAACG 3729

Query 3480 CAAAAACCTGGGACCTTGGCGTCGGCCGGTGGCCTACCTGTCCAAAAGCTAGACCCAGTA 3539
 |||
 Sbjct 3730 CAAAACCTGGGACCTTGGCGTCGGCCGGTGGCCTACCTGTCCAAAAGCTAGACCCAGTA 3789

FIGURA 19 (Cont.)

ES 2 660 755 T3

```

Query 3540 GCAGCTGGGTGGCCCCCTTGCCCTACGGATGGTAGCAGCCATTGCCGFACTGACAAAAGGAT 3599
          |||
Sbjct 3790 GCAGCTGGGTGGCCCCCTTGCCCTACGGATGGTAGCAGCCATTGCCGTCTGACAAAAAAT 3849

Query 3600 GCAGGCAAGCTAACCATGGGACAGCCACTAGTCATTCTGGCCCCCATGCAGTAGAGGCA 3659
          |||
Sbjct 3850 GCAGGCAAGCTAACATATGGGACAGCCGCTAGTCATTCTGGCCCCCATGCGGTAGAAGCA 3909

Query 3660 CTAGTCAAACAACCCCCGACCGCTGGCTTTCCAACGCCCGGATGACTCATTATCAGGCC 3719
          |||
Sbjct 3910 CTGGTCAAACAACCCCCGACCGCTGGCTATCCAATGCCCGCATGACCCACTATCAGGCA 3969

Query 3720 TTGCTTTGGACACGGACCGGGTCCAGTTCGGACCGGTGGTAGCCCTGAACCCGGCTACG 3779
          |||
Sbjct 3970 ATGCTCCTGGATACAGACCGGGTTCAGTTCGGACCGGTGGTGGCCCTCAACCCGGCCACC 4029

Query 3780 CTGCTCCCCTGCTGAGGAAGGGCTGCAACACA--ACTGCCTTGATATCCTGGCCGAAG 3837
          |||
Sbjct 4030 CTGCTCCCCTACCGGAA-AAGGAA-GCCCCCATGACTGCCTCGAGATCTTGCTGA-G 4086

Query 3838 CC-CACGGAACCCGACCGACCTAACGGACCAGCCGC-TCCCAGACGCGACCACACCTG 3895
          |||
Sbjct 4087 ACGCACGGAACCCAGACCGGACCTCACGGACCAGCC-CATCCCAGACGCTGATTACACTG 4145

Query 3896 GTACACGGATGGAAGCAGTCT-CTTACAAGAGGGACAGCGTA-AGCGGGAGCTGCGGTG 3953
          |||
Sbjct 4146 GTACACAGATGGAAGCAG-CTTCTACAAGAAGGACAACGGAGAG-CTGGAGCAGCGGTG 4203

Query 3954 ACCACCGAGACCGAGGTAATCTGGGCTAAAGCCCTGCCAGCCGGGACATCCGCTCAGCGG 4013
          |||
Sbjct 4204 ACTACTGAGACCGAGGTAATCTGGGCGAGGGCTCTGCCGCTGGAACATCCGCCCAACGA 4263

Query 4014 GCTGAACTGATAGCACTCACCCAGGCCCTAAAGATGGCAGAAGGTAAGAAGCTAAATGTT 4073
          |||
Sbjct 4264 GCCGAACTGATAGCACTCACCAAGCCCTAAAGATGGCAGAAGGTAAGAAGCTAAATGTT 4323

Query 4074 TATACTGATAGCCGTTATGCTTTTGCTACTGCCCATATCCATGGAGAAATATACAGAAGG 4133
          |||
Sbjct 4324 TAACTGATAGCCGCTATGCCTTCGCCACGGCCCATGTCCATGGAGAAATATATAGGAGG 4383

Query 4134 CGTGGTTGCTCACATCAGAAGGCAAAGAGATCAAAAATAAGA-CGAGATCTTGGCCCT 4192
          |||
Sbjct 4384 CGAGGGTTGCTGACCTCAGAAGGCAGAGAAATTA AAAACAA-GAACGAGATCTTGGCCCT 4442

Query 4193 ACTAAAAGCCCTCTTTCTGCCAAAAGACTTAGCATAATCCATTGTCCAGGACATCAAAA 4252
          |||
Sbjct 4443 GCTAAAAGCTCTCTTTCTGCCAAAACGACTTAGTATAATTCAGTGTCCAGGACATCAAAA 4502

Query 4253 GGGACACAGCCCGAGGCTAGAGGCAACCGGATGGCTGACCAAGCGGCCGAAAGGCAGC 4312
          |||
Sbjct 4503 AGGAAACAGTGTGAGGCCAGAGGCAACCGTATGGCAGATCAAGCAGCCCGAGAGGCAGC 4562

Query 4313 CATCACAGAG-ACTCC-AGACACCTCTACCCTCCTCATAGAAAATTCATCACCC-TACAC 4369
          |||
Sbjct 4563 CATGA-AG-GCAGTCTAGAAACCTCTACACTCCTCATAGAGGACTCAAC-CCCGTATAC 4619
    
```

FIGURA 19 (Cont.)

ES 2 660 755 T3

```

Query 5190 GACATGACAAGAGTTA-CTAACAGCCCTCTCTCCAAGCTCACTTACAGGCTCTCTACTT 5248
|| ||| ||| |||| |||| ||| ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 5440 GAAATGTCAA-AGTTAACTAATAGTCCCTCTCTCCAAGCTCACTTACAGGCCCTCCAAGC 5498

Query 5249 AGTCCAGCACGAAGTCTGGA-GACCTCTGGCGGCAGCCTACCAAGAACAACCTGGACC-GA 5306
||| ||| ||| ||| ||||| ||| ||| ||||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 5499 AGTACAACAAGAGTCTGGAAG-CCGCTGGCCGCTGCTTATCAGGACCAGCTAGATCAG- 5556

Query 5307 CCGGTGGTACCTCACCC-TTACCGAGTCGGCGACACAGTGTGGGTCGGCCGACACCAGAC 5365
|| ||| |||| |||| || ||| ||||| ||| | ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 5557 CCAGTGATACCACACCCCTT-CCGTGTCGGTGACGCCGTGTGGGTACGCCCGCACCCAGAC 5615

Query 5366 TAAGAACCTAGAACCTCGCTGGAAAGGACCCTTACACAGTCCCTGCTGACCACCCCAACCCG 5425
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 5616 TAAGAACTTAGAACCTCGCTGGAAAGGACCCTACACCGTCCCTGCTGACAACCCCAACCCG 5675

Query 5426 CCTCAAAGTAGACGGCATCGCAGCTTGGATACACGCCGCCACGTGAAGGCTGCCGAC 5483
||||| ||||| ||||| ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 5676 TCTCAAAGTAGACGGCATCTCTGCGTGGATACACGCCGCTCACGTAAGGCGGC-GAC 5732

..
.
.
.

Query 6436 GGGAACGGAAAATAGGCTGCTAAACTTAGTAGACGGAGCCTACCAAGCCCTCAACCTCAC 6495
||| |||| | | ||||| ||||| | ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 6603 GGG-ACGGGAGACAGGCTGCTAAACCTGGTAGAAGGAGCCTACCTAGCCCTCAACCTCAC 6661

Query 6496 CAGTCCTGACAAAACCAAGAGTGTGGTTGTGTCTAGTAGCGGGACCCCTACTACGA 6555
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 6662 CAGTCCCGACAAAACCAAGAGTGTGGCTGTGTCTAGTATCGGGACCCCTACTACGA 6721

Query 6556 AGGGGTTGCCGTCTGGGTACCTACTCCAACCATACCTCTGCCTCCAGCCAACCTGCTCCGT 6615
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 6722 AGGGGTGGCCGCTCTAGTACTTACTCCAACCATACCTCTGCCCGGTAACCTGCTCCGT 6781

Query 6616 GGCCTCCCAACACAAGTTGACCCTGTCCGAAGTGACCGGACAGGGACTCTGCATAGGAGC 6675
| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 6782 GACCTCCCAACACAAGCTGACCCCTGTCCGAAGTGACCGGGCAGGGACTCTGCATAGGAGC 6841

Query 6676 AGTTCCCAAAACACATCAGGCCCTATGTAATACCACCCAGACA-A-GCAGTCGA-GGGTC 6732
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 6842 AGTTCCCAAAACCATCAGGCCCTGTGTAATACCACCCAGA-AGACG-AG-CGACGGGTC 6898

Query 6733 CTATTATCTAGT-TGC-CCCTACAGGTACCATGTGGGCTTGTAGTACCGGGCTTACTCCA 6790
||| ||| | | | ||| | | ||| ||||| ||||| ||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 6899 CTACTATTGGCCT-CTCCCGCCGGG-ACCATTGGGCTTGCAGCACCGGGCTCACTCCC 6956

Query 6791 TG-C-ATCTCCACCACCATACTGAACCTTA-CCACTGATTATTGTGTTCTTGTGCAACTC 6847
|| | |||| | | | | | ||| ||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 6957 TGTCTATCT--ACTACTGTGCTTAAC-TTAACCACTGATTACTGTGCTGCTGGTTGAACTC 7013

```

FIGURA 19 (Cont.)

ES 2 660 755 T3

Query	6848	TGGCCAAGAG-TCACCTATCATCCCCCAGCTATGTTTACGGCCTGTTTGAGA-GATCCA	6905
Sbjct	7014	TGGCCAA-AGGTAACCTACCACTCCCCTAATTATGTTTATGGCCAGTTGAAAAGAA--A	7070
Query	6906	ACCGAC-ACAAAAGAGAACC GGTTGTCGTTAACCCCTGGCCCTATTATTGGGTGGACTAACCC	6964
Sbjct	7071	ACTAAATATAAAAGAGAGCCGGTGCATTAACTCTGGCCCTGCTGTTGGGAGACTTACT	7130
Query	6965	ATGGGGGAATTGCCGCTGGAATAGGAACAGGGACTACTGCTCTAATGGCCACTCAG-CA	7023
Sbjct	7131	ATGGGGCGCATAGCTGCAGGAGTTGGAACAGGGACTACAGCCCTAGTGGCCAC-CAAACA	7189
Query	7024	ATTCAGCAGCTCCAAGCCGC-AGTACAGG-ATGATCTCAGGGAGGTT-GAAAAATCAAT	7080
Sbjct	7190	ATTCGAGCAGCTCCAGGCAGCCA-TACATACA-GACCTTGGGGCC-TTAGAAAAATCAGT	7246
Query	7081	CTCTAACCTAGAAAAGTCTCTCACTTCCCCTGCTGAAGTTGCTCTACAGAATCGAAGGGG	7140
Sbjct	7247	CAGTGCCTAGAAAAGTCTCTGACCTCGTTGCTGAGGTGGTCTACAGAACC GGAGGGG	7306
Query	7141	CCTAGA-CTTGTTATTCTAAAAGAAGGAGGGCTGTGTGCTGCTCTAAAAGAAGAATGTT	7199
Sbjct	7307	ATTAGATCTACTG-TTCTAAAAGAAGGAGGATTATGTGCTGCCCTAAAAGAAGAATGCT	7365
Query	7200	GCTTCTATGCGGACCACACAGGAC-TAGTGAGAGACAGCATGGCCAAAT-TGAGAGAGAG	7257
Sbjct	7366	GTTTTACGCGGACCACACTGG-CGTAGTAAGAGATAGCATGGC-AAAGCTAAGAGAAAG	7423
Query	7258	GCTTAATC-AGAGACAGAACTGTTGAGTCAACTCAAGGATGGTTGAGGGACTGTTTA	7316
Sbjct	7424	G-TTAAACCAGAGACAAAATTTGTTGGAATCAGGACAAGGGTGGTTTGGAGGACTGTTTA	7482
Query	7317	<u>ACAGATCC</u> CTTGGTTTACCACCTTGATACTACCATTATGGGACCC-CTCATTGTACTC	7375
Sbjct	7483	ACAGGTCCCCTATGGTTACGACCCCTGATATCCACCATTATGGG-CCCTCTGATAGTACTT	7541
Query	7376	CTAATGATTTGCTCTTCGGACCCTGCATTCTTAATCGATTAGTCCAATTTGTTAAAGAC	7435
Sbjct	7542	TTATTAATCCTACTCTTCGGACCCTGTATTCTCAACCGCTTGGTCCAGTTTGTAAGAGAC	7601
Query	7436	AGGATATCAGTGGTCCAGGCCTAGTTTGTACTCAACAATATCACCAGCTGAAGCCTATA	7495
Sbjct	7602	AGAATTTCCGTAGTGCAGGCCCTGGTTCTGACCCAACAGTATCACCACCTCAAATCAATA	7661
Query	7496	GAGTAC-GA-GCCA-TAGA-TAA----AATAAAAGATTTTATTAGTCTCCAGAAAAGG	7547
Sbjct	7662	GA-TCCAGAAGA-AGTGGAAATCAGTGAATAAAAGATTTATTTCAGTTTCAGAAAAGAGG	7719
Query	7548	<u>GGGGAATGAAAGACCC</u> CTGTA-GGTTTGGCAAGCTAGCTTA- <u>AGTAACGCCATTTTG</u>	7605
Sbjct	7720	GGGGAATGAAAGACCCACCA-TAAGGCTTAGCACGCTAGCT-ACAGTAACGCCATTTTG	7777
Query	7606	<u>CAAGGCATGG</u> AAAATAC-ATAACTGAGAA-T-AGAGAAGTT-CA-G-A--TC-AAGGTC	7656
Sbjct	7778	CAAGGCATGGAAAAGTACCAGAGCTGAGTTCTCA-A-AAGTTACAAGGAAGTTAAT-TA	7834

FIGURA 19 (Cont.)

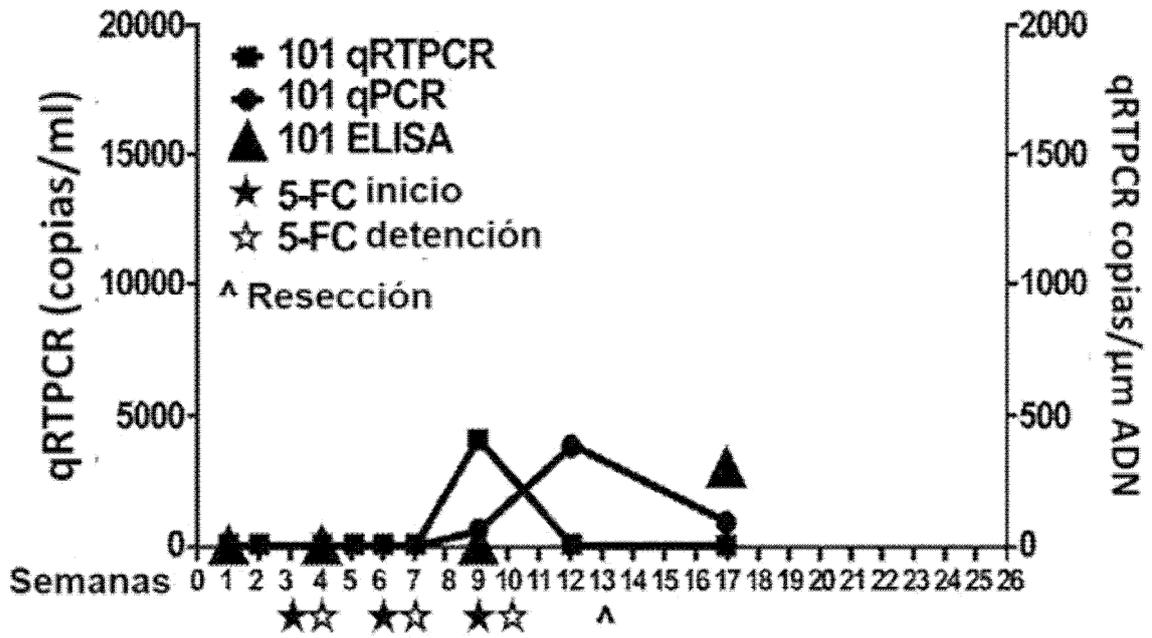


Figura 20A

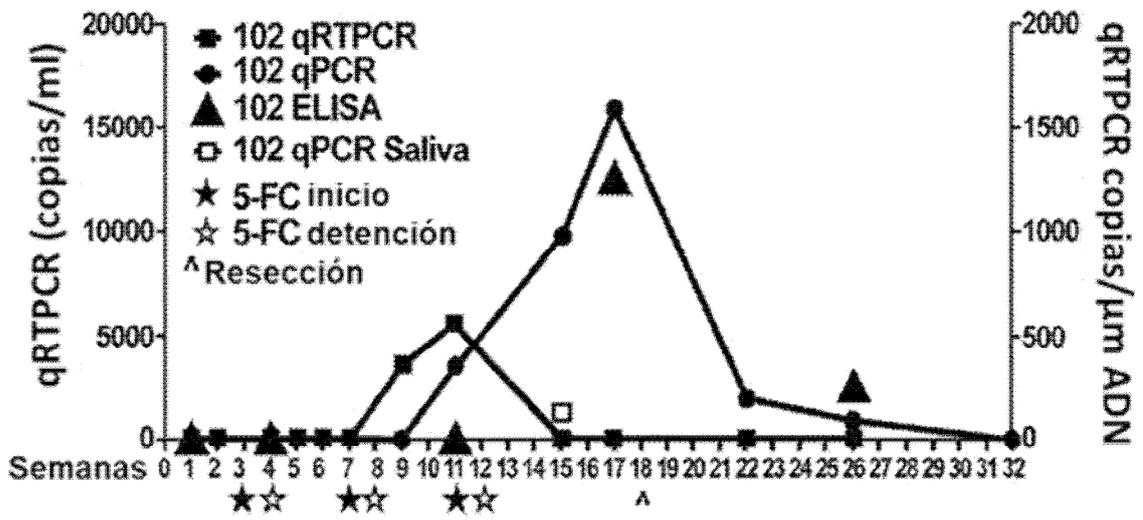


Figura 20B

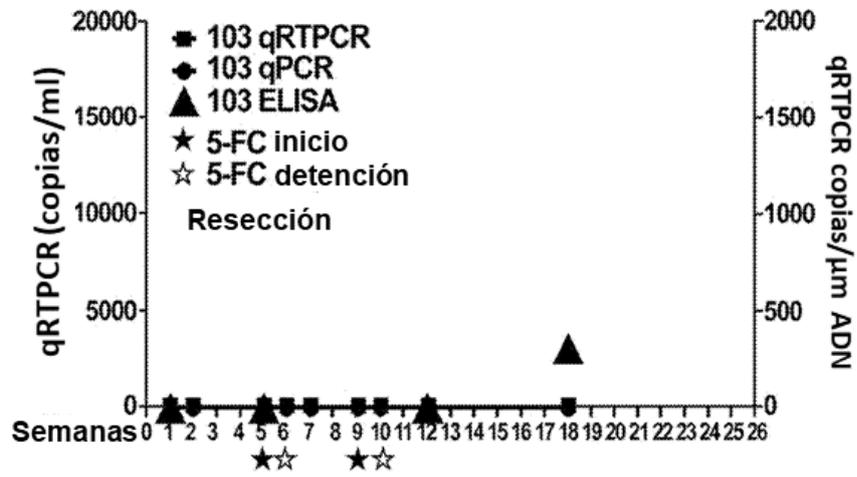


Figura 20C