



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 355 027**

⑫ Número de solicitud: 200802766

⑮ Int. Cl.:
C12Q 1/70 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)
C12R 1/92 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **30.09.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **22.03.2011**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
22.03.2011

⑰ Solicitante/s:
**Universidade de Santiago de Compostela
Edificio EMPRENDIA - Campus Sur
15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES
Nanogap Sub-NM-Powder, S.A.**

⑱ Inventor/es: **Regueiro García, Benito José**

⑳ Agente: **No consta**

㉔ Título: **Plásmidos que incluyen la secuencia del VIH-1 y sus usos.**

㉕ Resumen:
Plásmidos que incluyen la secuencia del VIH-1 y sus usos. En la presente invención se proveen cuatro plásmidos en los que se han creado mutaciones dirigidas al tercer nucleótido del codón sin cambio en la traducción de la secuencia original, así como los usos para utilizar estas construcciones en la evaluación de sistemas de extracción de ácidos nucleicos, en la clonación de fragmentos del gen *pol* y del gen que codifica para la proteasa del virus VIH-1 y en el análisis de la resistencia fenotípica de VIH-1 de muestras clínicas a antirretrovirales, así como los correspondientes métodos para realizar la evaluación de los sistemas de extracción de ácidos nucleicos y para la construcción de los plásmidos.

ES 2 355 027 A1

DESCRIPCIÓN

Plásmidos que incluyen la secuencia del VIH-1 y sus usos.

En la presente invención se proveen cuatro plásmidos en los que se han creado mutaciones dirigidas al tercer nucleótido del codón sin cambio en la traducción de la secuencia original, así como los usos para utilizar estas construcciones en la evaluación de sistemas de extracción de ácidos nucleicos, en la clonación de fragmentos del gen *pol* y del gen que codifica para la proteasa del virus VIH-1 y en el análisis de la resistencia fenotípica de VIH-1 de muestras clínicas a antirretrovirales, así como los correspondientes métodos para realizar la evaluación de los sistemas de extracción de ácidos nucleicos y para la construcción de los plásmidos.

Estado de la técnica anterior

Las pruebas diagnósticas moleculares pueden seguir tres pasos consecutivos: extracción, amplificación/detección y análisis de datos. El primero de estos pasos, la extracción, condiciona el tiempo de respuesta de la prueba y, a su vez, éste está condicionado por el tipo y cantidad de la muestra, que debe ser siempre representativo del compartimento que se pretende analizar. El diseño de sistemas para la extracción de ácidos nucleicos, paso previo a cualquier detección molecular diagnóstica, se basa cada vez de forma más acentuada en el uso de nanopartículas magnéticas y lleva asociada una química diseñada para lograr la absorción inespecífica del ácido nucleico a la nanopartícula. El control de los métodos de producción y el rendimiento de los sistemas de extracción se ha basado en el posterior funcionamiento del sistema de detección que incluye una reacción de amplificación. Este proceso de expansión de la diana, imprescindible en la mayor parte de los test diagnósticos en uso, hace que el paso previo de extracción haya tenido sólo una importancia relativa, pero cada vez más, debido a las condiciones previamente apuntadas (duración del test e importancia del compartimento que se quiere analizar), este paso inicial cobra más transcendencia.

Se conocen dos tipos de soluciones alternativas para el control de la extracción y valoración de su calidad: 1) Colecciones o paneles de sueros estándar (Ronsin *et al.*, 2006. *J. Clin. Microbiol.*, 44:4, 1390-1399) y 2). Uso de muestras aleatorias obtenidas de pacientes.

Las evaluaciones encontradas hasta la fecha, no incluyen ni los plásmidos propuestos en esta invención, ni su combinación (Loens *et al.*, 2007. *J. Clin. Microbiol.* 45:2, 421-425). En el mercado se encuentra disponible OptiQual® un set de controles de ARN de VIH-1 que provee una herramienta para testar los resultados obtenidos mediante diferentes metodologías, evaluando o comparando nuevos procedimientos basados en el uso de ácidos nucleicos para la determinación del virus VIH-1.

Los plásmidos objeto de la presente invención ofrecen un método alternativo para evaluar y comparar la calidad de la extracción de los sistemas de extracción de ácido nucleicos, cuya eficacia se muestra en el correspondiente ejemplo de la presente invención.

Además, aunque NL4.3 ha sido usado para la evaluación fenotípica de resistencias de VIH a los antirretrovirales, los sistemas comerciales y experimentales similares al que se presenta en esta invención, no son capaces de facilitar la discriminación en la aportación de diferentes regiones de los fragmentos clonados en la resistencia de diversos fenotipos de VIH a antirretrovirales. Por tanto, se provee de un modelo capaz de caracterizar los genes y las subregiones genómicas de VIH-1 implicadas en la resistencia a antirretrovirales. Con ello se permite la clonación y el estudio de fragmentos progresivamente más largos del mismo gen, con lo que se puede determinar la aportación de las porciones diferentes del espacio de secuencia correspondiente al gen *pol*, usando cada una de las construcciones tras pseudotiparlas con la secuencia correspondiente del paciente en la valoración de la resistencia a los antirretrovirales.

Las regiones de la proteasa y de la retrotranscriptasa son reguladoras de la actividad del virus VIH-1 en etapas clave del proceso de infección y, por tanto, fundamentales para el éxito de la integración del ADN viral en el ADN del huésped. La proteasa actúa cortando unidades de las proteínas Gag, Pol y de la Gag-Pol. La retrotranscriptasa tiene la función de sintetizar el ADN de doble cadena del provirus usando como patrón la cadena singular del ARN viral; es una ADN-polimerasa actúa como dependiente del ARN. Una parte de los fármacos empleados para evitar la progresión del ciclo vital del virus VIH son inhibidores de la función de estos genes, así pues, los pseudotipos virales contruidos usando secuencias de los genes de los virus aislados en los pacientes en las construcciones de la presente invención, permiten valorar el comportamiento *in vivo* de estos fármacos en la infección por VIH en experimentos de inhibición de la infección usando concentraciones crecientes de antiretrovirales.

Explicación de la invención

En la presente invención se proveen cuatro plásmidos en los que se han creado mutaciones dirigidas al tercer nucleótido del codón sin cambio en la traducción de una secuencia original, así como los usos para dos aplicaciones alternativas (1) evaluar los sistemas de extracción de ácidos nucleicos; cantidad, pureza e integridad de los fragmentos de ácidos nucleicos ADN y ARN eluidos y (2) valoración de la resistencia fenotípica de VIH-1 a antirretrovirales, es decir, el análisis fenotípico de resistencias VIH que permite valorar el "fitness" genético del virus o el papel de mutaciones compensatorias al usar secuencias más largas de la que habitualmente se usa en este tipo de análisis con

NL4.3, que es la integración en el vector del fragmento *ApaI-PinAI*. Asimismo, la presente invención provee el método de construcción de estos plásmidos, así como el método para evaluar la calidad de los sistemas de extracción de ADN y ARN eluidos.

Las cuatro construcciones están basadas en un virus VIH tipo NL4.3 (Adachi *et al.*, 1986. *J. Virol.* 59:284-291.) *NIH AIDS Reagent Reference Program* (Cat. Num.: 144.), en las que se han creado mutaciones dirigidas al tercer nucleótido del codón, de forma que, siendo la expresión de aminoácidos idéntica a la de la secuencia original, se generen sitios únicos de restricción en posiciones sucesivas del gen *pol* del virus VIH-1. La ventaja de este sistema es que es posible obtener ácidos nucleicos con cuatro polimorfismos de un solo nucleótido (de las siglas en inglés SNP, *Single nucleotide polymorphism*) y además, al tener secuencias conocidas, podemos obtener la construcción como ADN lineales (por corte en lugares únicos comunes como *ApaI*) o circulares. Alternativamente puede obtenerse por transfección con CalphosTM (Invitrogen) en células empaquetadoras (por ejemplo, células 293T/17), viriones VIH infecciosos que puedan usarse como origen de ARNs o en el otro uso alternativo de la invención como herramienta para la infección experimental “*in vivo*” y la posible valoración de la capacidad inhibitoria de los antiretrovirales.

Para evaluar el rendimiento de los sistemas de extracción de ácidos nucleicos, se lleva a cabo la extracción de los plásmidos integrados en una mezcla estándar cuya cantidad y composición inicial es conocida. Una aplicación colateral desarrollada, es la posibilidad de un rápido análisis clonal que detecte sesgos en el proceso de extracción que puede realizarse por pirosecuenciación, con pares de cebadores que hemos diseñado y reconocen de forma específica cada uno de los plásmidos de la presente invención permitiendo valorar la calidad de la extracción realizada. Los sistemas convencionales de análisis clonal mediante los cuales se determina la calidad del proceso de extracción, son procesos que no determinan sesgos, que recuperan de forma equilibrada todas las especies de ácidos nucleicos, y que se suelen hacer por transfección en bacterias y análisis individual de clones bacterianos que crecen de la placa de cultivo tras la transformación. Éste es un método largo y laborioso. En la presente invención esta determinación se puede hacer de forma rápida utilizando cebadores mediante los que, por pirosecuenciación, se detectan los diferentes polimorfismos y permiten comparar el porcentaje de especies de cada uno de los cuatro tipos de ácido nucleico incluidos en la presente invención tras el proceso de extracción en cuestión de horas.

La producción de reactivos para la detección de VIH y extracción de ADN de VIH es un aspecto que posee una clara aplicación industrial. Los sistemas automáticos de extracción y detección se han basado en el paso de detección para garantizar la calidad del producto comercializado. Los plásmidos y el sistema propuesto en la presente invención permiten establecer criterios de normalización de los reactivos de extracción de forma alternativa e independiente al resto del procedimiento, de forma que el uso del sistema de extracción no esté restringido a un proceso de detección específico y los lotes de nanopartículas magnéticas o de cartuchos de filtración puedan utilizarse con distintas técnicas de detección y análisis (secuenciación, PCR, Lipa, etc.).

Otra posible aplicación clínica o de desarrollo con las construcciones diseñadas en esta invención es la evaluación de la resistencia de los diferentes fenotipos de VIH-1 a antirretrovirales comerciales o en vías de ensayo.

Para evaluar la resistencia de diferentes fenotipos de virus a antirretrovirales, es necesaria la clonación, en los plásmidos de la invención, de los fragmentos deseados de los virus presentes en los pacientes por medio de su amplificación por PCR mediante el uso de un cebador directo común y diferentes cebadores reversos, incluyendo estos últimos, sitios de restricción correspondientes a cada uno de los sitios obtenidos por mutagénesis dirigida en los plásmidos.

En este sentido, un primer aspecto de la presente invención es un plásmido seleccionado de la lista que comprende SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4. En adelante nos referiremos a este plásmido/s como “el plásmido de la presente invención” o “los plásmidos de la invención”.

La secuencia de cada uno de los plásmidos está basada en la del plásmido pNL4.3 que incluye parte de la secuencia del virus VIH-1. Asimismo, también se considera cualquier combinación de los plásmidos de la lista. A continuación describimos las características de las secuencias:

SEQ ID NO: 1. Se sustituyó el nucleótido que ocupaba la posición 4243 del plásmido original pNL4.3 correspondiente al gen *pol* que cambió el codón ATA (codifica para el aminoácido isoleucina) por ATC (también codifica para el aminoácido isoleucina), generándose de ese modo un nuevo sitio de restricción *Clal*.

SEQ ID NO: 2. Se sustituyó el nucleótido que ocupaba la posición 4403 del plásmido original pNL4.3 correspondiente al gen *pol* que cambió el codón CCA (codifica para el aminoácido prolina) por CCG (también codifica para el aminoácido prolina), generándose de ese modo un nuevo sitio de restricción *XmaI*.

SEQ ID NO: 3. Se sustituyeron dos nucleótidos que ocupaban las posiciones 4625 y 4626 del plásmido original pNL4.3 correspondiente al gen *pol* que cambió la secuencia TGGGCG por TGCCCG. Se produjeron dos cambios de aminoácido TGG (codifica para el aminoácido triptófano) por TGC (codifica para el aminoácido cisteína) y GCG (codifica para el aminoácido alanina) por CCG (codifica para el aminoácido prolina), generándose de ese modo un nuevo sitio de restricción *XmaI*.

SEQ ID NO: 4. Se sustituyó el nucleótido que ocupaba la posición 4688 del plásmido original pNL4.3 correspondiente al gen *pol* que cambió el codón TCT (codifica para el aminoácido serina) por TCG (también codifica para el aminoácido serina), generándose de ese modo un nuevo sitio de restricción *ClaI*.

En este aspecto de la invención también se incluyen aquellos plásmidos derivados de los plásmidos SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4. Por plásmidos derivados se entienden aquellos que conservan las mutaciones que los caracterizan y permiten reconocer las enzimas de restricción que se han descrito anteriormente para cada uno de ellos.

Un segundo aspecto de la presente invención es el uso de una célula empaquetadora transfectada con cualquiera de los plásmidos de la invención.

El término “célula empaquetadora” hace referencia a cualquier célula modificada para expresar los genes correspondientes a las proteínas virales necesarias para que se pueda constituir la partícula viral infectiva a partir de la construcción que se transfecta.

El término célula “transformada” o “transfectada” hace referencia a la célula procariota o eucariota, respectivamente, en la que se ha introducido material genético externo mediante plásmidos, vectores víricos u otras herramientas de transferencia de este tipo de material.

Un tercer aspecto de la presente invención es un virión que contiene el ARN codificado por cualquiera de los plásmidos descritos en el primer aspecto de la presente invención. El término “virión” se refiere a la partícula viral infectiva compuesta al menos por:

Ácido nucleico vírico: el ácido nucleico es ARN de cadena sencilla.

Proteínas víricas: Pueden ser proteínas estructurales como las que forman la cubierta externa o cápside (por ejemplo las proteínas ENV de los plásmidos de la presente invención), o también pueden ser otro tipo de proteínas enzimáticas (por ejemplo POL, VIF, VPR, TAT, etc...).

Los viriones de la presente invención se obtienen como consecuencia de la transfección de células empaquetadoras mediante un plásmido caracterizado por las secuencias del primer aspecto de la presente invención. Los viriones son liberados al medio en el que se cultivan las células empaquetadoras transfectadas.

Un cuarto aspecto de la presente invención es el uso de una célula *reporter* transfectada con cualquiera de los viriones según el aspecto anterior.

El término “célula *reporter*” hace referencia a la célula que contiene un gen foráneo cuya proteína puede ser detectada por la medida de su fluorescencia o cualquier otro gen cuya proteína sea detectable.

Un quinto aspecto es el uso del plásmido de la presente invención, o cualquiera de sus combinaciones, para evaluar la calidad de los sistemas de extracción de ADN. Por “calidad de los sistemas de extracción de ADN” se entiende la evaluación de la concentración, pureza y composición de las especies de ácidos nucleicos obtenidos tras el proceso de extracción. El uso descrito en este aspecto de la invención permite evaluar el nivel de estandarización de un sistema de extracción de ácidos nucleicos (por ejemplo un lote de nanopartículas) que debería poseer unas condiciones fijas en la capacidad de recuperación de los mismos. Estas condiciones fijas se ven alteradas por el efecto de impurezas presentes, otros ácidos nucleicos o compuestos aromáticos y otros agentes contaminantes que interfieren la capacidad de absorción de las matrices que se usan para purificar y extraer ácidos nucleicos.

Para poder determinar la calidad de la extracción se comparan los datos de concentración y los porcentajes de bases nucleotídicas obtenidos después de la extracción de la mezcla de las construcciones, mediante los métodos de extracción de ácidos nucleicos que se deseen probar, con la mezcla estándar compuesta por todos los plásmidos en una concentración conocida y con un porcentaje de bases conocido. En este proceso, se usa una cantidad alta de ADN, superior a la que son capaces de absorber las nanopartículas utilizadas, así podemos ver el rendimiento del proceso. La pureza se calcula por espectrofotometría; la relación de lecturas A280/A260 debe ser en torno a 1,8 para un 90% de pureza y los sesgos se valoran rápidamente por pirosecuenciación (ejemplo 2).

La pirosecuenciación es un tipo de secuenciación basada en la síntesis. Se utiliza una hebra del ADN inmovilizada y se sintetiza su hebra complementaria medio de la enzima ADN polimerasa empleando otra enzima quimioluminiscente. De este modo se consigue detectar de una forma rápida base por base según son adicionadas en la síntesis de la hebra complementaria. El uso que se propone para la pirosecuenciación, es el del análisis de cada una de las construcciones ya que permite valorar rápidamente si hay sesgos en el proceso de extracción y si se recuperan todas las especies o algunas con preferencia a otras. La composición de las especies de ácidos nucleicos recuperadas de la mezcla estándar se puede evaluar por medio de la determinación del porcentaje de la presencia en la mezcla de los nucleótidos mutados por pirosecuenciación, los porcentajes de la tabla 6 representan el porcentaje de SNPs en las mezclas tras la extracción por distintas plataformas.

Una realización preferida es un método de evaluación de la calidad de los sistemas de extracción de ácidos nucleicos que comprende:

- a. obtener una mezcla estándar de ADN,
- b. aplicar la mezcla estándar de (a) al sistema de extracción de ADN,
- c. cuantificar la concentración de ADN extraído en el paso (b) y/o pirosecuenciar un fragmento de dicho ADN, y
- d. comparar los resultados obtenidos en (c) con los valores de concentración y/o composición nucleotídica de la mezcla estándar.

El término “mezcla estándar de ADN” tal como se entiende en la presente invención es una mezcla de cantidades iguales de al menos cualquier combinación de los plásmidos SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4. Para obtener el ADN plasmídico que forma parte de la mezcla estándar, es necesario cultivar células que expresen cualquiera de los plásmidos de la invención y extraer el ADN plasmídico de las células anteriores de forma que el ADN que se obtenga esté libre de otros ácidos nucleicos o componentes. En este caso la extracción del ADN plasmídico puede realizarse, por ejemplo, mediante un sistema de extracción plasmiprep, miniprep, midiprep o maxiprep, sin excluir de esta lista otros sistemas de extracción.

Las células que expresan cualquiera de los plásmidos de la invención pueden ser todas aquellas que admitan la replicación de los plásmidos descritos con el objeto de conseguir amplificar el número de copias de cada uno de los citados plásmidos.

La calidad en el proceso de extracción de los ácidos nucleicos se entiende como la medida de la concentración y pureza del ADN eluido (ADN recuperado tras el proceso de extracción), que se hace por medio de espectrofotometría y/o fluorimetría (en la presente invención se ha utilizado el método fluorométrico Invitrogen Qubit™). La determinación de la composición del ADN eluido se puede llevar a cabo por medio de la determinación del porcentaje de la presencia en la mezcla de los nucleótidos mutados que se puede obtener por medio de pirosecuenciación.

Un sexto aspecto es la posibilidad de uso del virión VIH según el tercer aspecto de la presente invención, o cualquiera de sus combinaciones, para evaluar la calidad de los sistemas de extracción de ARN. Una ventaja de este uso es que se puede utilizar el ADN plasmídico o se pueden obtener viriones de cada una de las construcciones y mezclarlos, de forma que, en lugar de usar ADN circular o lineal se puede usar ARN del virión del sobrenadante del cultivo de las células infectadas o de las propias células. Esto hace muy versátil el sistema ya que casi todas las combinaciones son posibles.

Como se ha mencionado anteriormente, los viriones definidos en la presente invención contienen el ARN codificado por la secuencia de los plásmidos SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4. El virión contiene la secuencia del virus VIH-1, compuesto por dos copias de ARN de cadena sencilla (sARN) en las cuales se encuentra la secuencia de la retrotranscriptasa y la proteasa.

Asimismo, una realización preferida es un método de evaluación de la calidad de los sistemas de extracción de ácidos nucleicos que comprende:

- a. cultivar cualquiera de las células empaquetadoras que contienen los plásmidos de la invención,
- b. recoger los viriones liberados al medio de cultivo por las células del apartado (a),
- c. extraer el ARN de los viriones del apartado (b),
- d. obtener una mezcla estándar con el ARN de (c),
- e. aplicar la mezcla estándar de (d) al sistema de extracción de ARN,
- f. cuantificar la concentración de ARN extraído en el paso (e) y/o pirosecuenciarlo
- g. comparar los resultados obtenidos en (f) con los valores de concentración y/o composición nucleotídica de la mezcla estándar.

El término “mezcla estándar de ARN” tal como se entiende en la presente invención es una mezcla de cantidades iguales de al menos cualquier combinación del ARN codificado en los plásmidos SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4, es decir, el ARN de los viriones que son generados como consecuencia de la transfección de células empaquetadoras con los plásmidos de la invención.

La extracción del ARN de los viriones liberados al medio se lleva a cabo mediante sistemas de extracción, de forma que el ARN que se obtenga esté libre de otros ácidos nucleicos o componentes.

La calidad en el proceso de extracción se evalúa mediante la medida de la concentración y pureza del ARN eluido (ARN recuperado tras el proceso de extracción), que se hace por medio de espectrofotometría y/o fluorimetría. La determinación de la composición del ARN eluido se puede llevar a cabo por medio de la determinación del porcentaje de la presencia en la mezcla de los nucleótidos mutados que se puede obtener por medio de pirosecuenciación.

Un séptimo aspecto de la presente invención es el uso del plásmido de la invención, o cualquiera de sus combinaciones, para clonar fragmentos del gen *pol* y de la proteasa del virus VIH-1.

Los fragmentos del gen *pol* y del gen que codifica para la proteasa proceden de muestras aisladas de personas infectadas. Una vez amplificados los fragmentos, éstos pueden clonarse mediante la linearización por la acción de enzimas de restricción y su posterior ligamiento, es decir, mediante el empleo de técnicas de clonación que forman parte del conocimiento general común. Las enzimas de restricción óptimas para llevar a cabo las clonaciones son los pares de enzimas *ApaI/ClaI* y *ApaI/XmaI* para los plásmidos mutados siempre que se hayan empleado cebadores para amplificar los fragmentos deseados de la secuencia del VIH-1 que contengan las secuencias nucleotídicas reconocidas por las enzimas *ApaI*, *ClaI* y *XmaI*. Estos fragmentos solo pueden clonarse en los plásmidos obtenidos en la invención. *ApaI* es un sitio único común en todas las construcciones de pNL4.3 ya que aparece en la secuencia original.

Tres aspectos más de la presente invención son los usos del plásmido de la invención, o cualquiera de sus combinaciones, los viriones que se obtienen con los plásmidos tal como se ha descrito anteriormente y la célula *reporter* según el cuarto aspecto de la presente invención, o cualquiera de sus combinaciones, para evaluar la resistencia de fenotipos del virus VIH-1 a antirretrovirales.

El término “fenotipo” hace referencia a cualquier característica detectable de un organismo (estructural, bioquímica, fisiológica o conductual) determinada por una interacción entre su genotipo y el medio en el que se desarrolla.

El término “antirretroviral” hace referencia a una sustancia química o fármaco que es capaz de tratar la infección por el virus VIH. Los antirretrovirales actúan en varias etapas del ciclo vital del virus VIH. Los tipos de antirretrovirales pueden ser: Inhibidores de transcriptasa inversa (inhibidores de transcriptasa análogos de nucleósidos, inhibidores de transcriptasa no análogos de nucleótidos (NNRT) e inhibidores de transcriptasa análogos de nucleótidos (NRT)), Inhibidores de proteasa (IP), inhibidores de la integrasa, inhibidores de fusión, anticuerpos monoclonales dirigidos contra co-receptores, además se pueden usar diversas mezclas de los anteriores, así como potenciadores de su efecto.

Las mutaciones que caracterizan a los virus VIH, cuya tasa de replicación es muy elevada y no tienen sistema de reparación genética, pueden provocar cambios en la resistencia de los virus a los diferentes antirretrovirales que existen en la actualidad. La resistencia puede deberse a cambios en algún aminoácido, estructurales o de cualquier otro tipo que puede tener como consecuencia la pérdida de afinidad del antirretroviral por la proteína con la que interactúa.

Para evaluar la resistencia de diferentes fenotipos de virus VIH a antirretrovirales, es necesaria la clonación, en los plásmidos de la invención, de los fragmentos del gen que codifica para la polimerasa y/o del gen que codifica para la proteasa del virus VIH presente en los pacientes por medio de su amplificación por PCR mediante el uso de un cebador directo común y diferentes cebadores reversos, incluyendo estos últimos, sitios de restricción correspondientes a cada uno de los sitios obtenidos por mutagénesis dirigida en los plásmidos. Posteriormente, se transfectarían estos plásmidos en una línea celular empaquetadora, se recogerían los viriones liberados, se emplearían los viriones para infectar células *reporter*, y tras añadir un antirretroviral a dichas células se mediría la fluorescencia, dando una idea de la resistencia al antirretroviral en cuestión.

Otro aspecto de la presente invención es un método de construcción de un plásmido que comprende:

- a. amplificar la región de ADN del VIH-1 contenida en el plásmido pNL4.3 mediante los cebadores SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6,
- b. clonar la región amplificada en (a) en un vector de expresión,
- c. realizar mutagénesis dirigidas independientes en el vector del apartado anterior mediante el empleo de pares de cebadores donde el cebador de selección es SEQ ID NO: 11 y el cebador mutagénico se selecciona de la lista que comprende SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10,
- d. reclonar de forma independiente cada uno de los 4 fragmentos obtenidos obtenidos en (c), en el vector original pNL4.3.

Para la construcción de los cuatro plásmidos de la invención se ha llevado a cabo un procedimiento estándar de mutagénesis dirigida que se realizó mediante amplificación por PCR de la región de ADN del VIH-1 contenida en el plásmido pNL4.3 con los cebadores que se describen en el paso (a) del presente aspecto. Esta región se clona en un vector de expresión como por ejemplo el vector TOPO TA (Invitrogen) por el procedimiento que indica el proveedor de dicho vector. Un vector de expresión se define como aquel vector que se puede utilizar para clonar al menos un gen y además contiene las secuencias reguladoras necesarias para que la expresión del gen pueda someterse a experimentación. Este tipo de vectores posee, al menos, un origen de replicación, un marcador de selección, uno o varios sitios de clonación.

Tras sucesivas digestiones y realización de electroforesis en geles de agarosa, o bien secuenciación, se puede comprobar la correcta orientación de la región amplificada. Posteriormente se llevan a cabo cuatro procedimientos de mutagénesis dirigida de forma individual que origina los plásmidos que se reivindican en la presente invención. Para poder llevar a cabo el procedimiento de mutagénesis dirigida, se puede emplear el “*Transformer site-directed*”
 5 *mutagenesis kit*” y los siguientes cebadores: cebador de selección SEQ ID NO: 11 y cebador mutagénico seleccionado de la lista que comprende SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10. Tras obtener las mutaciones en cada uno de los plásmidos de manera independiente se puede seleccionar el fragmento de ADN comprendido entre los sitios de restricción *ApaI/PflmI* y reclonarlo en el vector original pNL4.3 tras ser digerido previamente con los mismos enzimas de restricción *ApaI* y *PflmI*, en este caso. La presente descripción no limita el uso de otros vectores
 10 de expresión, métodos de llevar a cabo la mutagénesis dirigida así como los enzimas de restricción necesarios para reclonar el fragmento amplificado.

Por otra parte, el plásmido original del que se amplifica una región determinada de ADN del virus VIH-1 y en el cual se reclona el fragmento una vez realizadas las mutaciones descritas en la presente invención, podría ser otro
 15 distinto al pNL4.3 como por ejemplo, el plásmido pCHUS. El plásmido pCHUS es un plásmido mínimo desarrollado y publicado por los inventores de la presente invención que contiene el genoma completo del VIH-1 procedente del vector pNL4.3, así como el gen de resistencia a ampicilina y el origen de replicación derivados de pUC18, que permiten su propagación en *E. coli*. El plásmido tiene un tamaño de 11.538 bp y posee varios sitios de restricción únicos nuevos. Este vector minimizado puede facilitar no sólo su propia manipulación genética, sino también los procesos
 20 de transformación tanto en *E. coli* como en otros cultivos celulares e incluso podría permitir la mutagénesis *in vitro* directamente, sin necesidad de clonaciones y subclonaciones, siendo una alternativa compatible con las utilidades antes indicadas.

Otro aspecto de la presente invención es un kit para evaluar la calidad de los sistemas de extracción de ácidos
 25 nucleicos que comprende una mezcla estándar de ADN y/o ARN.

La mezcla estándar de ADN es una mezcla de cantidades iguales de al menos cualquier combinación de los plásmidos SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4. La mezcla estándar de ARN es una mezcla de cantidades iguales de al menos cualquier combinación del ARN codificado en los plásmidos SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4, es decir, el ARN de
 30 los viriones que son generados como consecuencia de la transfección de células empaquetadoras con los plásmidos de la invención. Las mezclas anteriores no excluyen la adición de otros ADNs y/o ARNs como por ejemplo el plásmido original pNL4.3 y/o el ARN codificado por la secuencia nucleotídica de los viriones obtenidos por la transfección de células empaquetadoras con pNL4.3.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la
 40 presente invención.

Descripción de las figuras

Fig 1. Muestra el mapa genético del plásmido pNL4.3 CLA 4254 definido por la secuencia SEQ ID NO: 1.

En el mapa se muestra la posición relativa de los genes *gag* (GAG), *pol* (POL), *env* (ENV) y otros fragmentos (LTR; *Long Terminal Repeat*, pUC18; fragmento procedente del vector pUC18,...) así como los sitios de restricción más comunes para llevar a cabo cortes por enzimas de restricción. También se muestra la posición de la mutación que da lugar a este plásmido, en el nucleótido que ocupa la posición 4254.
 45

Fig 2. Muestra el mapa genético del plásmido pNL4.3 XMA 4411 definido por la secuencia SEQ ID NO: 2.

En el mapa se muestra la posición relativa de los genes *gag* (GAG), *pol* (POL), *env* (ENV) y otros fragmentos (LTR; *Long Terminal Repeat*, pUC18; fragmento procedente del vector pUC18,...) así como los sitios de restricción más comunes para llevar a cabo cortes por enzimas de restricción. También se muestra la posición de la mutación que da lugar a este plásmido, en el nucleótido que ocupa la posición 4411.
 50

Fig 3. Muestra el mapa genético del plásmido pNL4.3 XMA 4634 definido por la secuencia SEQ ID NO: 3.

En el mapa se muestra la posición relativa de los genes *gag* (GAG), *pol* (POL), *env* (ENV) y otros fragmentos (LTR; *Long Terminal Repeat*, pUC18; fragmento procedente del vector pUC18,...) así como los sitios de restricción más comunes para llevar a cabo cortes por enzimas de restricción. También se muestra la posición de la mutación que da lugar a este plásmido, en el nucleótido que ocupa la posición 4634.
 55

Fig 4. Muestra el mapa genético del plásmido pNL4.3 CLA 4696 definido por la secuencia SEQ ID NO: 4.

En el mapa se muestra la posición relativa de los genes *gag* (GAG), *pol* (POL), *env* (ENV) y otros fragmentos (LTR; *Long Terminal Repeat*, pUC18; fragmento procedente del vector pUC18,...) así como los sitios de restricción más comunes para llevar a cabo cortes por enzimas de restricción. También se muestra la posición de la mutación que da lugar a este plásmido, en el nucleótido que ocupa la posición 4696.

Fig 5. Muestra el patrón de migración en gel de agarosa de los diferentes fragmentos diferenciales de los plásmidos definidos por las secuencias SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4.

Patrón electroforético de los cortes de los plásmidos con enzimas de restricción: (A) Control PM, (B) pNL4.3 cortado con *ApaI* y *PvuII* (fragmento 1480 bp), (C) pNL4.3 C4254 (SEQ ID NO: 1) cortado con *ApaI* y *ClaI* (fragmento 2248 bp), (D) pNL4.3 X4411 (SEQ ID NO: 2) cortado con *ApaI* y *XmaI* (fragmento 2405 bp), (E) pNL4.3 X4634 (SEQ ID NO: 3) cortado con *ApaI* y *XmaI* (fragmento 2628 bp) y (F) pNL4.3 X4696 (SEQ ID NO: 4) cortado con *ApaI* y *ClaI* (fragmento 2690 bp).

Fig 6. Muestra los pasos del análisis fenotípico de resistencias de VIH-1 a antirretrovirales.

En esta figura se muestra el esquema de los procesos llevados a cabo para evaluar la resistencia de los diferentes virus VIH-1 a antirretrovirales.

El plásmido construido se transfecta en células 293T/17. Los viriones infecciosos con el fragmento del gen *pol* se titulan en células MT2 formadoras de sinticios y, a continuación, se infectan células CEM-GFP para que pueda medirse el nivel de fluorescencia emitida tras añadir fármacos antirretrovirales.

Fig 7. Muestra un ejemplo demostrativo de las curvas de inhibición de las células CEM-GFP infectadas con SEQ ID NO: 1 respecto de las infectadas con pNL4.3 (control) cuando son tratadas con el antirretroviral INDINAVIR.

NL4.3 con la mutación 4254 hace referencia a SEQ ID NO: 1.

Fig 8. Muestra un ejemplo demostrativo de las curvas de inhibición de las células CEM-GFP infectadas con SEQ ID NO: 2 respecto de las infectadas con pNL4.3 (control) cuando son tratadas con un antirretroviral INDINAVIR.

NL4.3 con la mutación 4411 hace referencia a SEQ ID NO: 2.

Fig 9. Muestra un ejemplo demostrativo de las curvas de inhibición de las células CEM-GFP infectadas con SEQ ID NO: 4 respecto de las infectadas con pNL4.3 (control) cuando son tratadas con un antirretroviral INDINAVIR.

NL4.3 con la mutación 4696 hace referencia a SEQ ID NO: 4.

Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores que describen la obtención de los nuevos plásmidos y su ensayo en la evaluación de los sistemas de extracción de ácidos nucleicos así como en la evaluación de su resistencia a antirretrovirales.

Ejemplo 1

Construcción de los cuatro plásmidos (pseudotipos) por mutación dirigida

Las construcciones se crearon con mutaciones dirigidas a un sitio concreto en el gen *pol* del virus VIH-1.

Para ello, la región del pNL4.3 entre los lugares de secuencia 1548 y 5979 se amplificó con el cebador directo SEQ ID NO: 5 y con el cebador reverso SEQ ID NO: 6. Ambos corresponden a porciones de secuencia en el gen *pol*, se usó con este propósito polimerasa de alta fidelidad (*Expand high fidelity PCR System*). El fragmento amplificado se clonó en el vector TOPO TA (Invitrogen). Una vez probada la correcta orientación de los insertos realizados se procedió a llevar a cabo cuatro de mutagénesis dirigidas individuales (*Transformer Site-Directed Mutagenesis Kit* (Clontech)) usando los cuatro cebadores para mutagénesis siguientes: SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10.

Se utilizó otro cebador para selección que incluye el sitio de restricción *NcoI* definida por la secuencia SEQ ID NO: 11. Tras obtener las mutaciones se cortó el fragmento, *ApaI/PvuII* que incluye cada mutación y se reinsertó en el fragmento correspondiente obtenido en pNL4.3, de esta forma se obtuvieron los cuatro plásmidos mutados.

Los cuatro plásmidos que se obtuvieron tras el proceso de mutagénesis dirigida fueron:

- SEQ ID NO: 1 (pNL4.3 CLA 4254) (Fig 1): Se substituyó el nucleótido que ocupaba la posición 4243 del plásmido original pNL4.3 correspondiente al gen *pol* que cambió el codón ATA (codifica para el aminoácido isoleucina) por ATC (también codifica para el aminoácido isoleucina), generándose de ese modo un nuevo sitio de restricción *ClaI*. El fragmento generado va desde la posición que ocupa el sitio de restricción *ApaI* a *ClaI* con un tamaño de 2248 pb.

- SEQ ID NO: 2 (pNL4.3 XMA 4411) (Fig 2): Se substituyó el nucleótido que ocupaba la posición 4403 del plásmido original pNL4.3 correspondiente al gen *pol* que cambió el codón CCA (codifica para el aminoácido prolina) por CCG (también codifica para el aminoácido prolina), generándose de ese modo un nuevo sitio de restricción *XmaI*. El fragmento generado va desde la posición que ocupa el sitio de restricción *ApaI* a *XmaI* con un tamaño de 2405 pb.

- SEQ ID NO: 3 (pNL4.3 XMA 4634) (Fig 3): Se substituyeron dos nucleótidos que ocupaban las posiciones 4625 y 4626 del plásmido original pNL4.3 correspondiente al gen *pol* que cambió la secuencia TGGGCG por TGCCCG. Se produjeron dos cambios de aminoácido TGG (codifica para el aminoácido triptófano) por TGC (codifica para el aminoácido cisteína) y GCG (codifica para el aminoácido alanina) por CCG (codifica para el aminoácido prolina), generándose de ese modo un nuevo sitio de restricción *XmaI*. El fragmento generado va desde la posición que ocupa el sitio de restricción *ApaI* a *XmaI* con un tamaño de 2628 pb. El virus producido resultó no infeccioso e incapaz de producir sinticios, por tanto, puede ser considerado como control negativo.

- SEQ ID NO: 4 (pNL4.3 CLA 4696) (Fig 4): Se substituyó el nucleótido que ocupaba la posición 4688 del plásmido original pNL4.3 correspondiente al gen *pol* que cambió el codón TCT (codifica para el aminoácido serina) por TCG (también codifica para el aminoácido serina), generándose de ese modo un nuevo sitio de restricción *ClaI*. El fragmento generado va desde la posición que ocupa el sitio de restricción *ApaI* a *ClaI* con un tamaño de 2690 pb.

El control de las mutaciones se llevó a cabo mediante digestión de los plásmidos con las enzimas de restricción apropiadas así como mediante la secuenciación de las construcciones. En la columna 1 de la Fig 5 se muestra el patrón de bandas de un ADN control cuyo tamaño de banda (nº de pares de bases) es conocido y por tanto, sirve de referencia para determinar el tamaño de las bandas obtenidas tras la digestión de cada uno de los plásmidos construidos. En el resto de columnas se muestran dos bandas correspondientes a ADN lineal obtenido mediante corte por digestión de los enzimas de restricción *ApaI/Pin AI*, *ApaI/ClaI*, *ApaI/XmaI*, *ApaI/XmaI* y *ApaI/ClaI* que proceden de los plásmidos pNL4.3 (plásmido original), p4254 (SEQ ID NO: 1), p4411 (SEQ ID NO: 2), p4634 (SEQ ID NO: 3) y p4696 (SEQ ID NO: 4), respectivamente. La banda más grande (migra más lentamente), correspondiente a cada uno de los plásmidos, pertenece a la mayor parte del ADN del plásmido y las bandas más pequeñas (migran más lentamente) pertenecen al ADN de parte del gen *gag* y *pol* del virus VIH-1.

Ejemplo 2

Evaluación de los métodos de extracción de ácidos nucleicos

Utilizando métodos fluorométricos y espectrofotométricos para calcular los contenidos de ADN circular y lineal, se construyó un estándar. Dicho estándar incluye las cuatro especies de ADN plasmídico de la presente invención más el plásmido original pNL4.3. Un ejemplo de la aplicación de este estándar es su uso con varios sistemas que usan nanopartículas magnéticas o un sistema comercial de extracción por columnas de filtración de uso habitual.

El ADN de la mezcla estándar se aplicó a los sistemas de extracción. El ADN presente en la mezcla estándar es ADN plasmídico previamente obtenido desde una plasmiprep y mezclado después de digerir (con *ApaI*) para obtener el ADN linearizado o sin digerir. Éste ADN se valoró por fluorimetría y se mezclaron volúmenes equivalentes de los cinco plásmidos. Se utilizó una concentración de partida de 2740 ng, pero pueden usarse otras concentraciones obtenidas por concentración mediante precipitación con etanol o por dilución que pueden permitir el diseño de curvas de saturación que permita valorar el rendimiento de cualquier proceso de extracción. Otra alternativa que plantean los inventores es el empleo del sobrenadante de cultivo de células 293T transfectadas con cada uno de los plásmidos. De esta forma la mezcla estaría compuesta, en lugar de ADN lineal o circular, por los cinco tipos de viriones y su ácido nucleico sería ARN. La concentración de cada plásmido puede variarse y la de los viriones titularse de forma independiente con células MT2 o valorando la presencia de la proteína p24 (que es sintetizada si el virión es infeccioso).

En la tabla 1 se muestran los valores iniciales de la mezcla estándar y los porcentajes de cada población obtenidos tras pasar la muestra estándar (como ADN lineal, tras corte con el enzima *ApaI*, o como ADN circular, en forma circular) por varios sistemas de extracción automática comerciales: Siemens, Easymag (Biomerieux), Ampliprep, Magnapure (Roche) y Qiagen. Todos ellos están basados en nanopartículas magnéticas y extracción estándar en Qiagen (basado en filtración por columna).

TABLA 1

ADN de la mezcla estándar extraído utilizando cada uno de los sistemas

Método	Muestra*	Concentración obtenida	Total extraído (ng)	Rendimiento (%)
Mezcla estándar.	Contenido inicial	13,7 mg/ml x 200 ml	2740	100
Siemens	ADN lineal	3.6 ± 0,31 mg/ml x 70 ml	252	9,1
	ADN circular	4.3 ± 0,34 mg/ml x 70 ml	301	10,9
Easymag	ADN lineal	0.25 ± 0,01 mg/ml x 55 ml	13,72	0,5
	ADN circular	0.38 ± 0,01 mg/ml x 55 ml	21,25	0,7
Ampliprep	ADN lineal	0.30 ± 0,04 mg/ml x 70 ml	21	0,7
	ADN circular	0.50 ± 0,01 mg/ml x 70 ml	35	1,2
Magnapure	ADN lineal	23.5 ± 0,01 mg/ml x 200 ml	1175	42,8
	ADN circular	18.2 ± 1 mg/ml x 200 ml		3,2
Quiagen	ADN lineal	9.4 ± 0,3 mg/ml x 200 ml	1890	69
	ADN circular	4.3 ± 1 mg/ml x 200 ml	859	31,3

* El ADN lineal fue obtenido mediante corte enzimático con *Apal*. La concentración de ADN fue medida mediante el sistema Qubit™ (Invitrogen).

La capacidad de extracción de los diferentes ácidos nucleicos integrados en la mezcla estándar se puede evaluar, tras la extracción del ADN, por análisis clonal por pirosecuenciación.

Así pues, cada set de cebadores permite analizar el porcentaje de presencia de especies de ADN con el nucleótido (SNP) mutado o sin mutar, cada set corresponde a cada una de las mutaciones estudiadas y nos permite ver si las especies individuales de ADN extraído se ven afectadas en el proceso de absorción inespecífica que tiene lugar al utilizar diferentes nanopartículas o matrices durante la extracción. Para llevar a cabo la pirosecuenciación se ha empleado el sistema PYROMARK (Isogen):

ES 2 355 027 A1

Los set de cebadores son:

TABLA 2

Set 1: Correspondientes a SEQ ID NO: 1

Secuencia de cebadores para SEQ ID NO: 1		Puntuación: 93 Calidad: Alta.		
Cebador	Secuencia	Tamaño (pb)	Tm, °C	%GC
Directo	SEQ ID NO: 13	24	70.4	37.5
Reverso	SEQ ID NO: 14	23	69.6	43.5
Secuenciación	SEQ ID NO: 15	16	51.5	43.8

TABLA 3

Set 1.2: Correspondiente a SEQ ID NO: 2

Secuencia de cebadores para SEQ ID NO: 2		Puntuación: 83 Calidad: Media.		
Cebador	Secuencia	Tamaño (pb)	Tm, °C	%GC
Directo	SEQ ID NO: 16	22	71.7	50.0
Reverso	SEQ ID NO: 17	21	69.8	52.4
Secuenciación	SEQ ID NO: 18	17	51.1	47.1

ES 2 355 027 A1

TABLA 4

Set 1.3: Correspondiente a SEQ ID NO: 3

Secuencia de cebadores para SEQ ID NO: 3		Puntuación: 74 Calidad: Media.		
Cebador	Secuencia	Tamaño (pb)	Tm, °C	%GC
Directo	SEQ ID NO: 19	24	72,2	41,7
Reverso	SEQ ID NO: 20	22	73,3	45,5
Secuenciación	SEQ ID NO: 21	15	55,4	53,3

TABLA 5

Set 1.4: Correspondiente a SEQ ID NO: 4

Secuencia de cebadores para SEQ ID NO: 4		Puntuación: 88 Calidad: Alta.		
Cebador	Secuencia	Tamaño (pb)	Tm, °C	%GC
Directo	SEQ ID NO: 22	22	72,5	50.0
Reverso	SEQ ID NO: 23	24	69,5	41,7
Secuenciación	SEQ ID NO: 24	20	46,8	35,0

Los porcentajes de las bases nucleotídicas que integran las secuencias de cada uno de los sets, se describen en la tabla 6.

TABLA 6

Resultados de la pirosecuenciación

	Set 1		Set 1.2		Set 1.3		Set 1.4	
	T	G	T	C	G	C	T	G
Mezcla estándar	74,35%	26,00%	83,30%	16,70%	54,60%	45,40%	49,80%	50,20%
M20 Magna Pure Apa I (lineal)	72,85%	27,15%	85,70%	14,30%	41,40%	58,16%	69,40%	30,60%
M20 Magna Pure (circular)	71,95%	28,05%	85,00%	15,00%	47,90%	52,10%	63,05%	28,60%
M20 EasyMag Apa I (lineal)	58,30%	41,70%	84,30%	15,70%	42,60%	57,40%	71,40%	28,60%
M20 EasyMag (circular)	79,35%	20,65%	86,90%	13,10%	70,85%	29,15%	57,65%	42,35%
M20 Siemens (lineal)	73,50%	26,50%	82,10%	17,90%	39,85%	60,15%	71,68%	28,33%
M20 Siemens (circular)	75,10%	24,90%	87,05%	12,95%	38,15%	61,85%	71,68%	28,33%
M20 Qiagen (lineal)	69,60%	30,40%	88,30%	11,70%	41,65%	58,35%	65,90%	34,10%
M20 Qiagen (circular)	72,25%	27,75%	87,95%	12,05%	51,50%	48,50%	59,05%	40,95%

Ejemplo 3

*Clonación de fragmentos del gen *pol* del virus VIH-1 de pacientes infectados*

Mediante el empleo de la técnica de amplificación por RT-PCRs se obtuvieron fragmentos del gen *pol* del virus VIH-1 de pacientes infectados. Se usaron los pares de cebadores SEQ ID NO: 12 (cebador directo con el sitio de restricción *ApaI*) y SEQ ID NO: 7 (cebador reverso con el sitio de restricción *ClaI*), SEQ ID NO: 8 (cebador reverso con el sitio de restricción *XmaI*), SEQ ID NO: 9 (cebador reverso con el sitio de restricción *XmaI*) o SEQ ID NO: 10 (cebador reverso con el sitio de restricción *ClaI*).

Los cebadores fueron diseñados con la ayuda del programa *Primer3 Output* (<http://www-genome.wi.mit.edu>) incluyendo el sitio de restricción de *ApaI* en el cebador directo y el *XmaI/ClaI* en cada cebador reverso, necesarios para el posterior ligamiento de los fragmentos de *ApaI-XmaI/ClaI* del paciente en cada uno de los cuatro plásmidos generados.

Es decir, se generaron cuatro alternativas viables para la construcción de virus para el análisis de resistencias fenotípicas con fragmentos más largos que los tradicionalmente usados *ApaI-PlnAI*.

Ejemplo 4

Análisis de la resistencia de fenotipos de VIH-1 a antirretrovirales

Experimento I

Para construir un sistema de valoración fenotípica de la infección del VIH-1, que ampliase las posibilidades de pseudotipado del virus VIH-1 con el fragmento de la región *gag-pol* estudiada actualmente (*ApaI*2010-*PinAI*3486 = 1476 pb), fueron introducidas en el gen *pol* cuatro mutaciones mediante mutagénesis dirigida de manera que se formaran cuatro nuevos sitios de reconocimiento para enzimas de restricción (dos sitios para *ClaI* y dos para *XmaI*). De este modo se amplían los posibles fragmentos genéticos a estudiar en los virus recombinados a 2248, 2405, 2628 y 2690 pb hasta abarcar toda la región de la proteasa y de la retrotranscriptasa.

Las mutaciones se realizaron en el vector pNL4.3, tras lo cual cada uno fue transfectado mediante fosfato cálcico en la línea celular empaquetadora 293-T. 48-72 horas post-transfección se cosecharon los sobrenadantes que contenían los viriones liberados al medio y se titularon por el método de formación de sincitios en la línea celular MT-2. En este punto conviene recordar que el virus que incluye el plásmido definido por SEQ ID NO: 3 (pNL4.3X4634) (Fig 3) resultó no infeccioso e incapaz de producir sincitios, por tanto, puede ser considerado como control negativo. Se utilizaron inóculos virales de 5×10^5 dosis infectivas/ml para infectar células *reporter* CEM-GFP. Los ensayos de infección *in vitro* se optimizaron y protocolizaron para su aplicación en la determinación de la replicación viral (Fig 6).

Las células CEM-GFP son células T humanas que contienen un promotor LTR (*Long Terminal Repeat*) que dirigen la expresión de la proteína “*reporter*” GFP (*Green Fluorescent Protein*). El promotor LTR tiene una región, *transactivating responsive sequence* (TAR), que reconoce la proteína TAT (Trans-activating proteína). La proteína TAT es liberada al medio extracelular por las células infectadas y es recogida por las células sanas donde activa la replicación del virus VIH induciendo la fosforilación del dominio C-terminal de la ARN polimerasa II. Las células infectadas por el virus VIH (en el caso de esta invención, los plásmidos que contienen la secuencia de los genes *gag-pol* del virus) expresan el gen GFP tanto más cuanto mayor es la infección. De este modo, cuando se añade un antirretroviral después de una infección por VIH, la medida de la expresión del gen GFP variará en base al nivel de resistencia del virus infectado.

Las mediciones de los niveles de fluorescencia emitidos por las células en cultivo en cada caso fueron realizadas mediante fluorimetría, procesadas en una hoja de cálculo creada con el programa Excel (Microsoft) y utilizada para el cálculo de las IC 50 que se realizó con el programa GraFit32.

Se ensayaron *in vitro* infecciones del plásmido base pNL4.3, de un plásmido semejante pero con mutaciones que lo hacen resistente a inhibidores de proteasa, pL10R/M46I/L63P/V82T/184V* (L10R), y de los plásmidos de la presente invención, mutados en el gen *pol*. A partir de los resultados obtenidos en estos ensayos se pudo establecer la dinámica de la infección con estos virus y comparar su comportamiento modificando de forma secuencial las características de su gen *pol*.

Tras los primeros resultados, se consiguieron testar las construcciones de la presente invención con los métodos de la empresa VIRCO. Los resultados se presentan en la tabla 7.

TABLA 7

Resultados de las medidas de fluorescencia para cada una de las construcciones (primera columna) cuando se aplican diferentes antirretrovirales. Los antirretrovirales empleados causan disminución en la actividad del virus VIH-1. Se han resaltado en **negrita** los valores que indican resistencia a los respectivos antirretrovirales

	AZT (NRTI)	Lamivudina (NRTI)	Emtricitabina (NRTI)	Didanosina (NRTI)
	Fenotipado	Fenotipado	Fenotipado	Fenotipado
L10R	0,94± 0,19	0,96± 0,05	1,10± 0,62	0,93± 0,10
rt10R 4245C	1,91± 0,65	1,10± 0,05	1,66± 1,47	1,53± 0,13
rt10R 4411X	1,51± 0,42	0,96± 0,23	1,45± 1,28	1,23± 0,32
rt10R 4696C	0,62± 0,03	0,88± 0,06	1,06± 0,55	0,98± 0,15
rt10R Apa/PinAI	0,73± 0,35	0,92± 0,28	0,73± 0,05	1,03± 0,49
NL4.3	1± 0,00	1± 0,00	1± 0,00	1± 0,00
NL4.3 4245C	1,14± 0,67	0,98± 0,27	1,34± 1,31	1,43± 0,84
NL4.3 4411X	0,83± 0,58	1,22± 0,53	0,68± 0,25	1,69± 1,05
NL4.3 4696C	0,89± 0,19	1,23± 0,06	1,43± 1,34	1,07± 0,23
rt4.3 4245C	1,16± 0,53	1,06± 0,29	1,62± 1,05	1,22± 0,37
rt4.3 4411X	1,08± 0,18	1,45± 0,62	0,91± 0,30	1,54± 0,48
rt4.3 4696C	0,70± 0,15	0,73± 0,18	0,75± 0,57	0,75± 0,19
rt4.3 Apa/PinAI	1,49± 0,32	1,11± 0,15	1,55± 1,03	1,16± 0,02

	Stavudina (NRTI)	Abacavir (NRTI)	Tenofovir (NTRI)	Efavirenz (NNRTI)
	Fenotipado	Fenotipado	Fenotipado	Fenotipado
L10R	1,14± 0,33	0,95± 0,27	1,09± 0,00	0,85± 0,24
rt10R 4245C	2,07± 1,41	1,70± 0,45	0,93± 0,19	0,90± 0,08
rt10R 4411X	1,60± 0,82	1,40± 0,07	0,82± 0,12	1,43± 0,22
rt10R 4696C	0,87± 0,30	0,83± 0,08	0,63± 0,02	0,69± 0,01
rt10R Apa/PinAI	1,01± 0,77	0,89± 0,34	0,86± 0,31	1,96± 0,93
NL4.3	1± 0,00	1± 0,00	1± 0,00	1± 0,00

NL4.3 4245C	1,01± 0,19	1,31± 0,66	0,92± 0,26	0,91± 0,19
NL4.3 4411X	0,87± 0,41	1,18± 0,08	1,26± 0,56	1,22± 0,74
NL4.3 4696C	1,03± 0,18	0,97± 0,14	0,81± 0,06	0,71± 0,08
rt4.3 4245C	1,03± 0,23	1,14± 0,14	0,91± 0,26	0,98± 0,20
rt4.3 4411X	1,15± 0,29	1,31± 0,26	1,25± 0,10	1,30± 0,14
rt4.3 4696C	0,66± 0,15	0,87± 0,07	0,46± 0,13	0,48± 0,04
rt4.3 Apa/PinAI	1,19± 0,04	1,18± 0,49	0,83± 0,15	1,06± 0,31

	<u>Nevirapina</u> <u>(NNRTI)</u>	<u>Atazanavir</u> <u>(IP)</u>	<u>Indinavir</u> <u>(IP)</u>	<u>Saquinavir</u> <u>(IP)</u>
	Fenotipado	Fenotipado	Fenotipado	Fenotipado
L10R	1,08± 0,13	5,45± 1,86	8,54± 2,88	1,98± 0,40
rt10R 4245C	1,41± 0,08	5,73± 2,00	11,31± 1,61	3,85± 2,99
rt10R 4411X	1,89± 0,29	7,92± 1,62	12,05± 5,13	4,96± 4,35
rt10R 4696C	0,91± 0,62	2,89± 0,44	3,4± 1,92	1,28± 0,66
rt10R Apa/PinAI	1,28± 0,71	4,75± 1,51	8,32± 4,80	2,11± 0,88
NL4.3	1± 0,00	1± 0,00	1± 0,00	1± 0,00
NL4.3 4245C	1,09± 0,20	1,22± 0,64	1,23± 0,04	1,48± 1,00
NL4.3 4411X	1,01± 0,01	1,31± 0,58	0,96± 0,03	0,62± 0,28
NL4.3 4696C	1,04± 0,27	0,93± 0,14	1,07± 0,66	0,83± 0,20
rt4.3 4245C	1,18± 0,23	0,88± 0,27	1,44± 0,55	1,06± 0,06
rt4.3 4411X	1,13± 0,30	1,20± 0,41	1,37± 0,71	1,21± 0,59
rt4.3 4696C	0,80± 0,01	0,87± 0,24	0,89± 0,35	0,71± 0,31
rt4.3 Apa/PinAI	1,04± 0,26	1,01± 0,10	1,33± 0,08	1,37± 0,62

	<u>Nelfinavir</u> <u>(IP)</u>	<u>Amprenavir</u> <u>(IP)</u>	<u>Lopinavir</u> <u>(IP)</u>
	Fenotipado	Fenotipado	Fenotipado
L10R	4,33± 2,65	3,89± 0,46	8,61± 0,42
rt10R 4245C	7,80± 5,13	8,01± 1,83	17,18± 1,23
rt10R 4411X	8,63± 6,52	6,10± 0,64	14,86± 3,01
rt10R 4696C	2,60± 0,93	3,07± 0,67	6,47± 0,82
rt10R Apa/PinAI	5,10± 2,34	4,04± 0,69	10,73± 4,11
NL4.3	1± 0,00	1± 0,00	1± 0,00
NL4.3 4245C	1,20± 1,10	1,23± 0,85	0,84± 0,30
NL4.3 4411X	0,67± 0,19	0,97± 0,09	0,91± 0,35
NL4.3 4696C	0,84± 0,54	1,15± 0,05	0,86± 0,00
rt4.3 4245C	1,07± 0,21	1,60± 0,40	1,17± 0,25
rt4.3 4411X	0,80± 0,24	1,44± 0,16	1,22± 0,21
rt4.3 4696C	0,70± 0,42	0,83± 0,10	0,95± 0,02
rt4.3 Apa/PinAI	1,66± 1,31	1,50± 0,52	1,11± 0,06

Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor (NRTI),

Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor (NNRTI),

Protease Inhibitor (IP)

Los resultados realizados por triplicado y en colaboración con VIRCO (Mechelen (Bélgica)) mostraron la concordancia entre las predicciones fenotípicas y genotípicas al comparar los resultados del fenotipado con las predicciones del sistema *VIRCOType*.

El valor a partir del cual se considera resistente fue establecido por la empresa VIRCO (www.vircolab.com) y se basa en valores en la lectura de fluorescencia de más de 3 y criterios de respuesta clínica.

Conclusión preliminar: Las construcciones realizadas y su funcionamiento tras la inclusión de los fragmentos correspondientes posibilita el trabajo con fragmentos más amplios y es aplicable al estudio de efectos de mutaciones a más distancia de las convencionales *ApaI-PinAI*.

Experimento II

Se ha desarrollado según lo previsto en el proyecto un método de evaluación de las resistencias fenotípicas propio. Dicho método presentó diferencias con las estrategias de evaluación del método desarrollado por VIRCO o *Virologic* pero los resultados obtenidos fueron coherentes con los obtenidos en las pruebas realizadas en colaboración con VIRCO.

TABLA 8

Resultados de las medidas de fluorescencia para cada una de las construcciones (primera columna) cuando se aplican diferentes antirretrovirales. Los antirretrovirales empleados causan disminución en la actividad del virus VIH-1. Se han resaltado en negrita los valores que indican resistencia a los respectivos antirretrovirales

	<u>VIRCO</u>	<u>VIRCO</u>	<u>CHUS</u>	<u>CHUS</u>
	<u>AZT</u>	<u>Indinavir</u>	<u>AZT</u>	<u>Indinavir</u>
	Fenotipado	Fenotipado	Fenotipado	Fenotipado
L10R	0,94± 0,19	8,54± 2,88		27,93
rt10R 4245C	1,91± 0,65	11,31± 1,61		
rt10R 4411X	1,51± 0,42	12,05± 5,13		
rt10R 4696C	0,62± 0,03	3,4± 1,92		
rt10R				
Apa/PinAI	0,73± 0,35	8,32± 4,80		18,95
NL4.3	1± 0,00	1± 0,00		
NL4.3 4245C	1,14± 0,67	1,23± 0,04	1,05	1,17
NL4.3 4411X	0,83± 0,58	0,96± 0,03	1,1	1,23
NL4.3 4696C	0,89± 0,19	1,07± 0,66	1,42	1,04
rt4.3 4245C	1,16± 0,53	1,44± 0,55	3,39	0,5
rt4.3 4411X	1,08± 0,18	1,37± 0,71	1,05	0,87
rt4.3 4696C	0,70± 0,15	0,89± 0,35	1,17	0,62
rt4.3 Apa/PinAI	1,49± 0,32	1,33± 0,08		

Los valores en negrita indican resistencia a antirretrovirales.

El plásmido pCHUS es un vector mínimo que contiene el genoma completo HIV procedente de pNL4.3, así como el gen de resistencia a ampicilina y el origen de replicación derivados de pUC18, que permiten su propagación en *E. coli*. El plásmido tiene un tamaño de 11.538 pb y posee varios sitios de restricción únicos nuevos. Este vector minimizado puede facilitar no sólo su propia manipulación genética, sino también los procesos de transformación tanto en *E. coli* como en cultivos celulares e incluso podría permitir la mutagénesis *in vitro* directamente, sin necesidad de clonaciones y subclonaciones (*Molecular Biotechnology*. 2004. 28:87-95).

Conclusión preliminar: el modelo desarrollado y su medida posibilita el estudio de la infección por virus VIH en un modelo fenotípico con un rendimiento adecuado y permitiría testar antirretrovirales convencionales usando las construcciones de la presente invención personalizadas con secuencias *pol* del virus de pacientes.

En las Fig 7, 8 y 9 se muestran las curvas de respuesta de los plásmidos definidos según las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4 respectivamente.

ES 2 355 027 A1

A continuación mostramos los resultados numéricos de cada una de las curvas de respuesta.

Datos numéricos de las curvas de respuesta de la figura 7; tablas 9 y 10

TABLA 9

Datos correspondientes a la curva de inhibición de las células CEM-GFP infectadas con SEQ ID NO: 1 cuando son tratadas con el antirretroviral INDINAVIR

Parámetro	Valor	Error estadístico
Rango Y	100,5539	2,2888
IC ₅₀	0,0681	0,0013
Factor de la pendiente	-8,7671	1,1476
Fondo	-13,3565	1,8378

TABLA 10

Datos correspondientes a la curva de inhibición de las células CEM-GFP infectadas con pNL4.3 cuando son tratadas con el antirretroviral INDINAVIR (respuesta control)

Parámetro	Valor	Error estadístico
Rango Y	89,6941	0,7481
IC ₅₀	0,0578	0,0004
Factor de la pendiente	-7,1535	0,2513
Fondo	1,5899	0,6198

IC₅₀: 1,17

Datos numéricos de las curvas de respuesta de la figura 8; tablas 11 y 12

TABLA 11

Datos correspondientes a la curva de inhibición de las células CEM-GFP infectadas con SEQ ID NO: 2 cuando son tratadas con el antirretroviral INDINAVIR

Parámetro	Valor	Error estadístico
Rango Y	99,9653	4,3807
IC ₅₀	0,0714	0,0242
Factor de la pendiente	-36,6243	189,8832
Fondo	-10,0760	3,4629

TABLA 12

Datos correspondientes a la curva de inhibición de las células CEM-GFP infectadas con pNL4.3 cuando son tratadas con el antirretroviral INDINAVIR (respuesta control)

Parámetro	Valor	Error estadístico
Rango Y	89,6941	0,7481
IC ₅₀	0,0578	0,0004
Factor de la pendiente	-7,1535	0,2513
Fondo	1,5899	0,6198

IC₅₀: 1,23

Datos numéricos de las curvas de respuesta de la figura 9; tablas 13 y 14

TABLA 13

Datos correspondientes a la curva de inhibición de las células CEM-GFP infectadas con SEQ ID NO: 4 cuando son tratadas con el antirretroviral INDINAVIR

Parámetro	Valor	Error estadístico
Rango Y	85,3287	0,5191
IC ₅₀	0,0603	0,0004
Factor de la pendiente	-11,6884	0,3656
Fondo	4,7227	0,4361

TABLA 14

Datos correspondientes a la curva de inhibición de las células CEM-GFP infectadas con pNL4.3 cuando son tratadas con el antirretroviral INDINAVIR (respuesta control)

Parámetro	Valor	Error estadístico
Rango Y	89,6941	0,7481
IC ₅₀	0,0578	0,0004
Factor de la pendiente	-7,1535	0,2513
Fondo	1,5899	0,6198

IC₅₀: 1,04

REIVINDICACIONES

- 5 4. 1. Plásmido seleccionado de la lista que comprende SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.
- 10 2. Célula empaquetadora transfectada con cualquiera de los plásmidos según la reivindicación 1.
3. Virión que contiene el ARN codificado por cualquiera de los plásmidos según la reivindicación 1.
- 10 4. Célula *reporter* transfectada con cualquiera de los viriones según la reivindicación 3.
- 15 5. Uso del plásmido según la reivindicación 1, o cualquiera de sus combinaciones, para evaluar la calidad de los sistemas de extracción de ADN.
- 15 6. Uso del virión según la reivindicación 3, o cualquiera de sus combinaciones, para evaluar la calidad de los sistemas de extracción de ARN.
- 20 7. Uso del plásmido según la reivindicación 1, o cualquiera de sus combinaciones, para clonar fragmentos del gen *pol* y de la proteasa del ADN del virus VIH-1.
- 25 8. Uso del plásmido según la reivindicación 1, o cualquiera de sus combinaciones, para evaluar la resistencia de fenotipos del virus VIH-1 a antirretrovirales.
- 25 9. Uso del virión según la reivindicación 3, o cualquiera de sus combinaciones, para evaluar la resistencia de fenotipos del virus VIH-1 a antirretrovirales.
- 30 10. Uso de la célula según la reivindicación 4, o cualquiera de sus combinaciones, para evaluar la resistencia de fenotipos del virus VIH-1 a antirretrovirales.
- 30 11. Método de construcción de un plásmido según la reivindicación 1 que comprende:
 - a. amplificar la región de ADN del VIH-1 contenida en el plásmido pNL4.3 mediante los cebadores SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6,
 - 35 b. clonar la región amplificada en (a) en un vector de expresión,
 - c. realizar mutagénesis dirigidas independientes en el vector del apartado anterior mediante el empleo de pares de cebadores donde el cebador de selección es SEQ ID NO: 11 y el cebador mutagénico se selecciona de la lista que comprende SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10, y
 - 40 d. reclonar de forma independiente cada uno de los 4 fragmentos obtenidos en (c), en el vector original pNL4.3.
- 45 12. Método de evaluación de la calidad de los sistemas de extracción de ácidos nucleicos que comprende:
 - a. obtener una mezcla estándar de ADN,
 - 50 b. aplicar la mezcla estándar de (a) al sistema de extracción de ADN,
 - c. cuantificar la concentración de ADN extraído en el paso (b) y/o pirosecuenciar un fragmento de dicho ADN, y
 - 55 d. comparar los resultados obtenidos en (c) con los valores de concentración y/o composición nucleotídica de la mezcla estándar.
- 60 13. Método de evaluación de la calidad de los sistemas de extracción de ácidos nucleicos que comprende:
 - a. cultivar cualquiera de las células según la reivindicación 2,
 - b. recoger los viriones liberados al medio de cultivo por las células del apartado (a),
 - 65 c. extraer el ARN de los viriones del apartado (b),
 - d. obtener una mezcla estándar con el ARN de (c),

ES 2 355 027 A1

e. aplicar la mezcla estándar de (d) al sistema de extracción de ARN,

f. cuantificar la concentración de ARN extraído en el paso (e) y/o pirosecuenciarlo y

5 g. comparar los resultados obtenidos en (f) con los valores de concentración y/o composición nucleotídica de la mezcla estándar de ARN.

10 14. Kit para evaluar la calidad de los sistemas de extracción de ácidos nucleicos que comprende los medios adecuados para llevar a cabo los métodos de cualquiera de las reivindicaciones 12-13.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

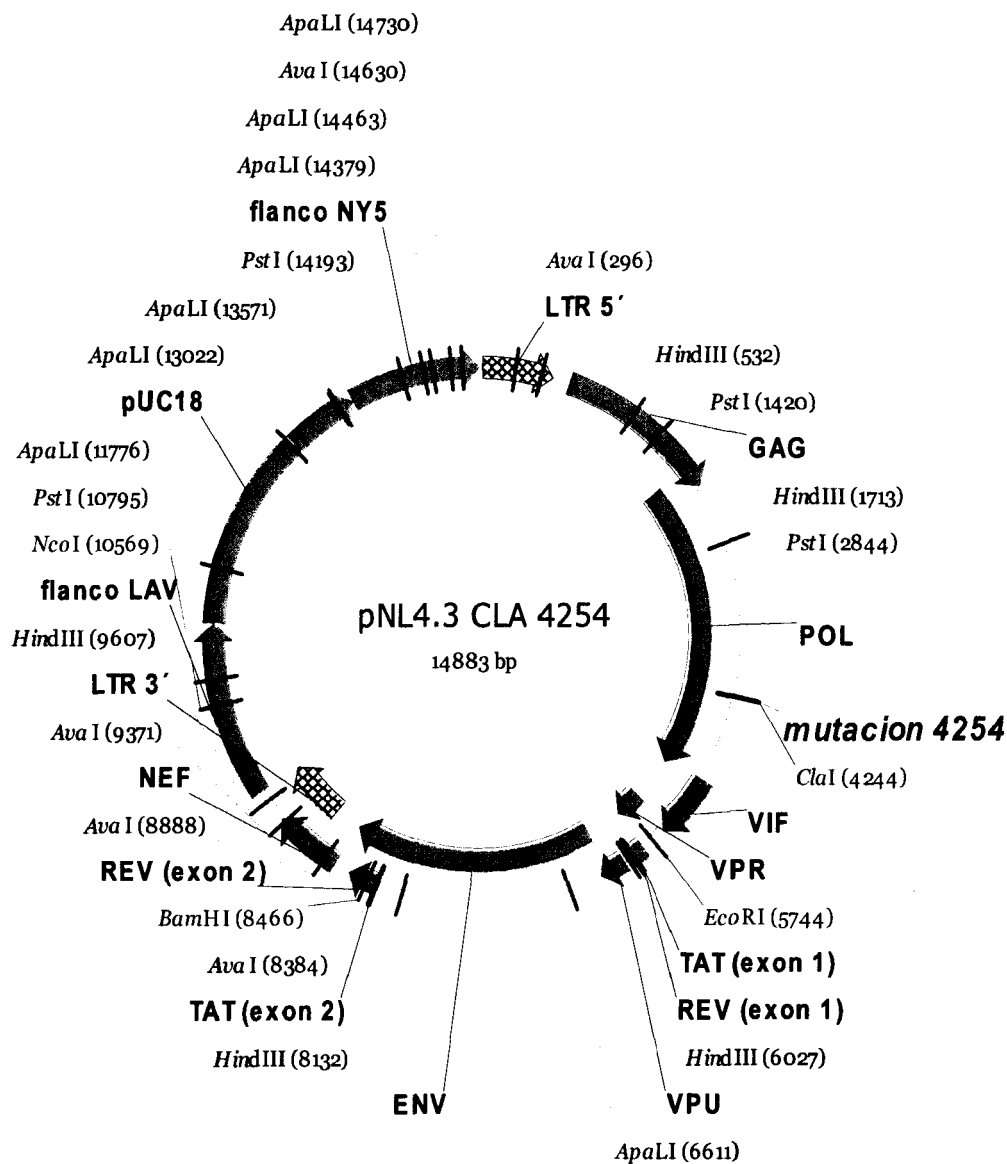


FIG. 1

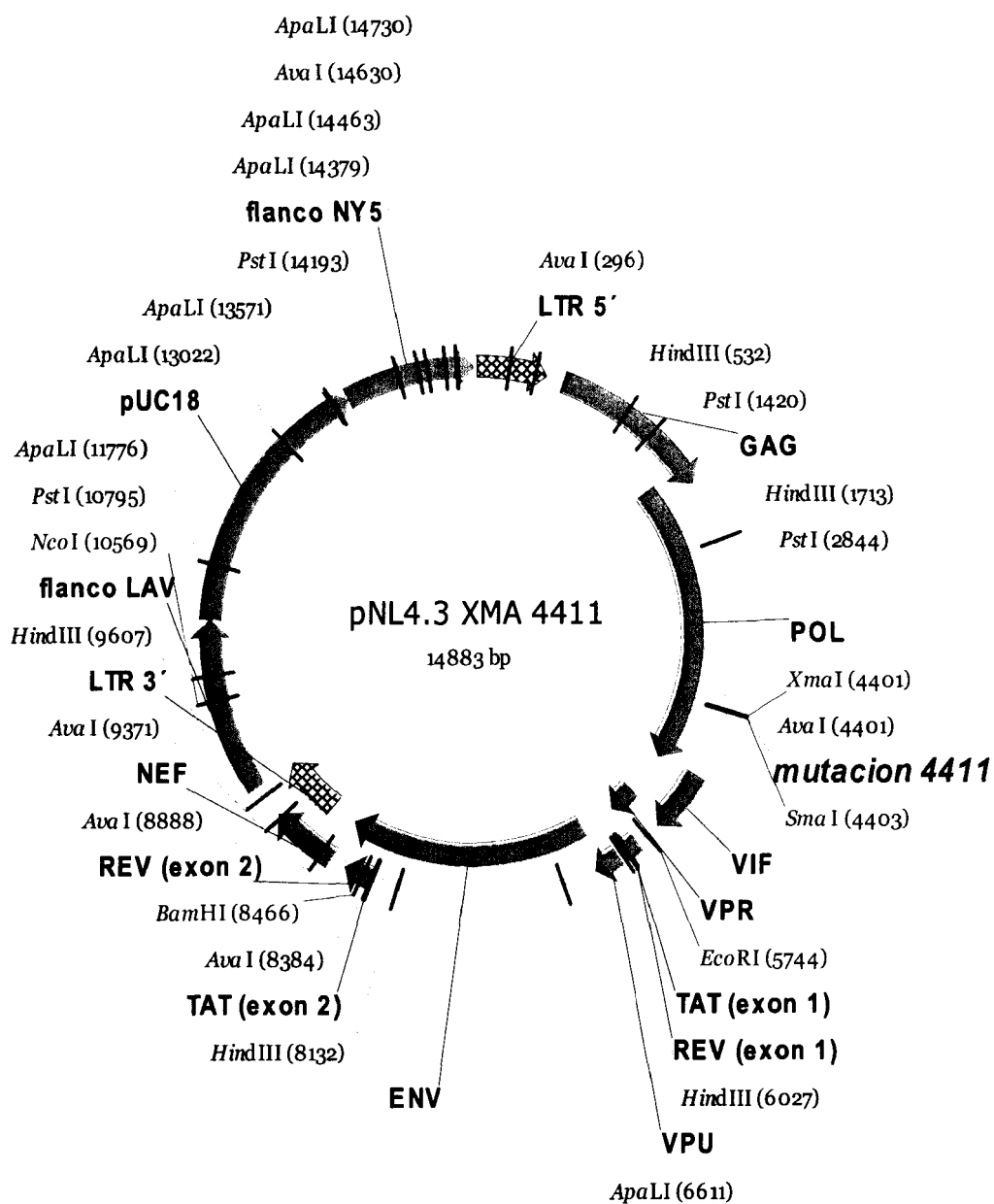


FIG. 2.

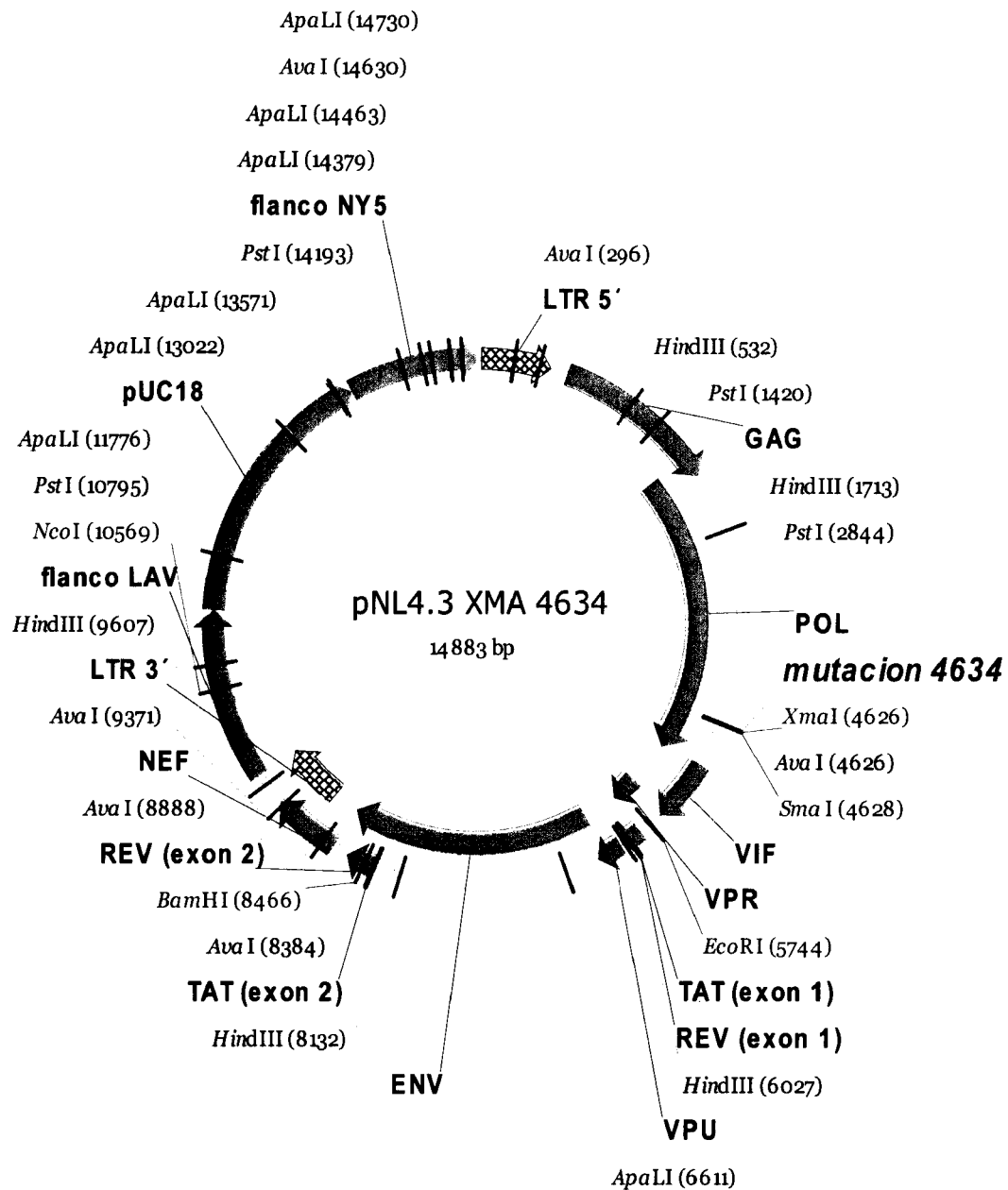


FIG. 3

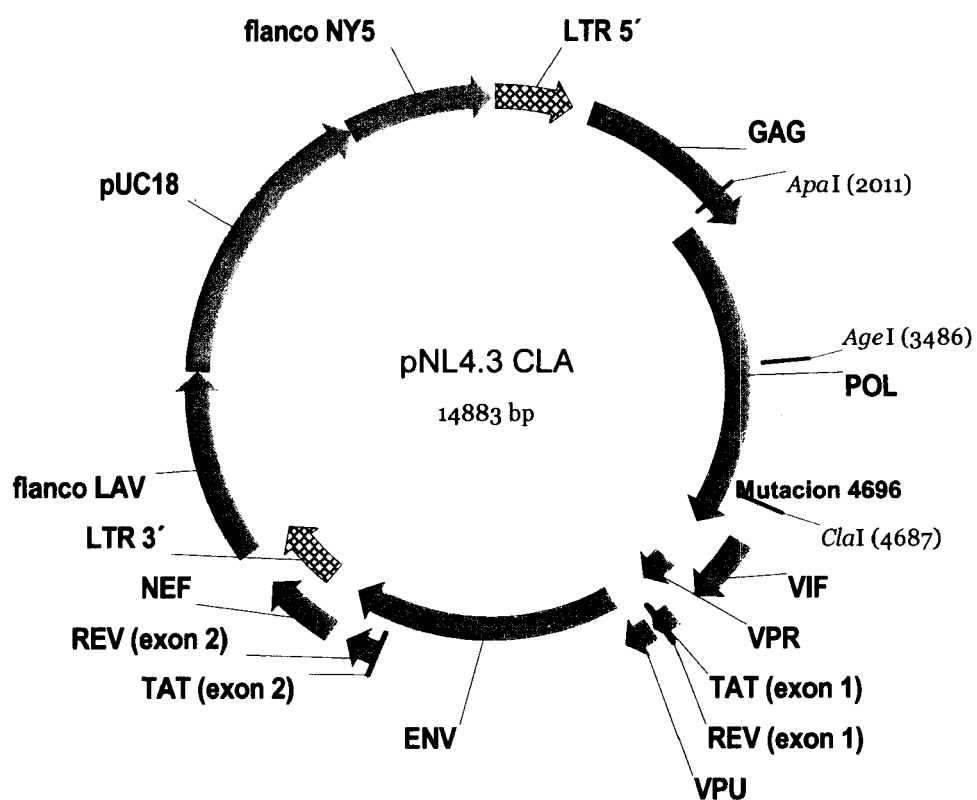


FIG. 4

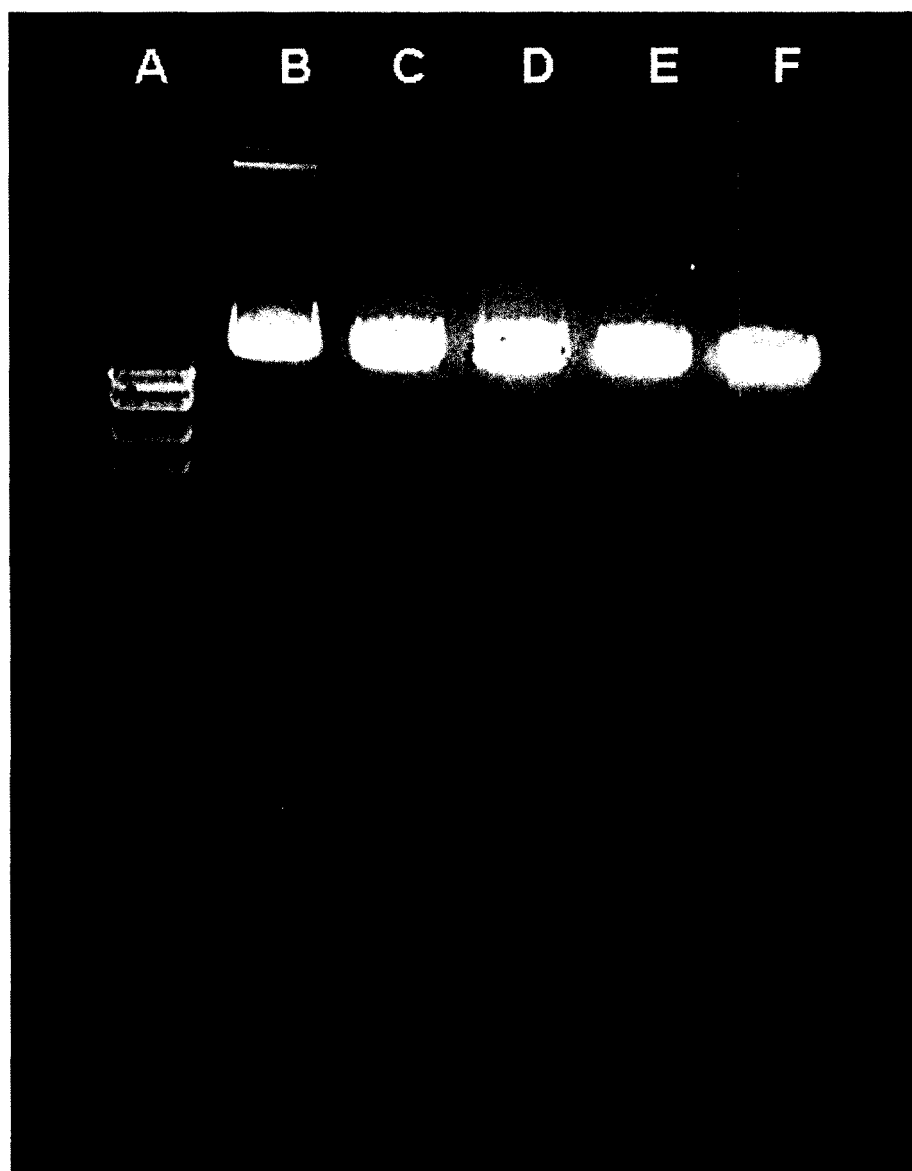


FIG. 5

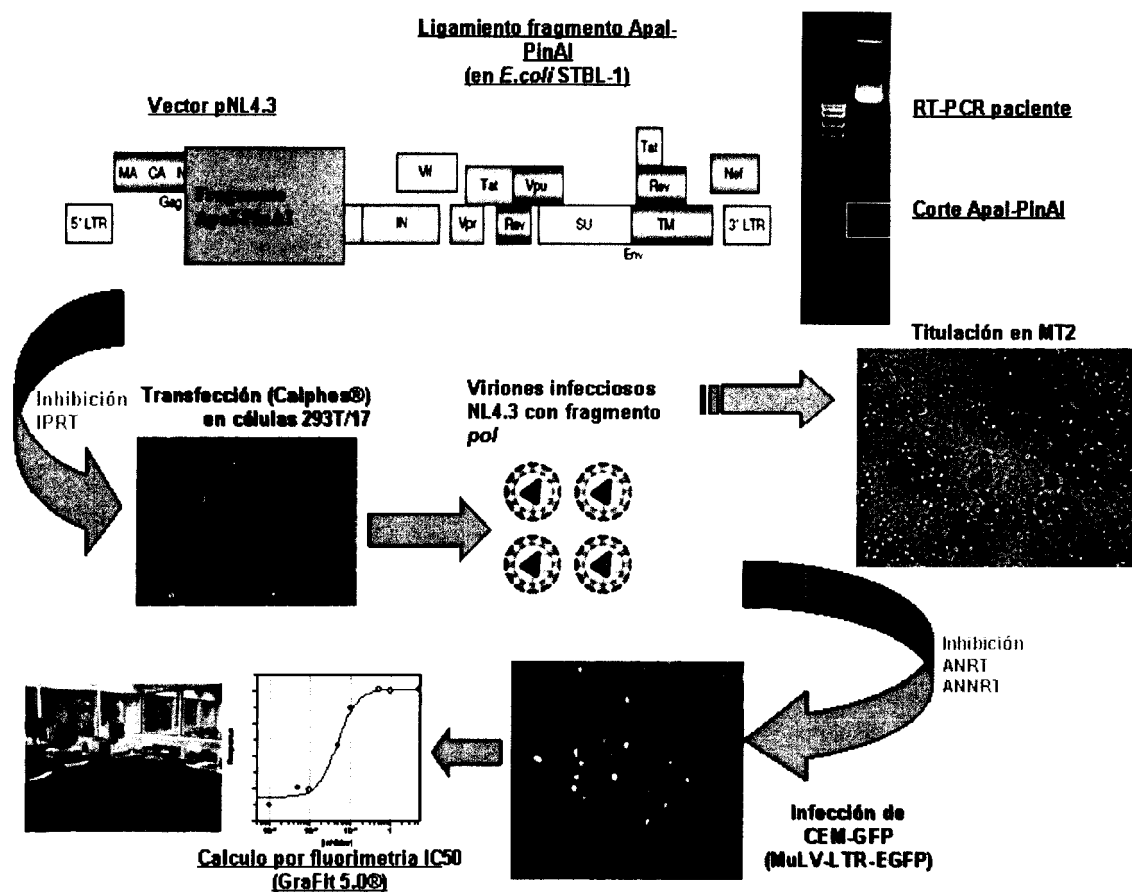


FIG. 6

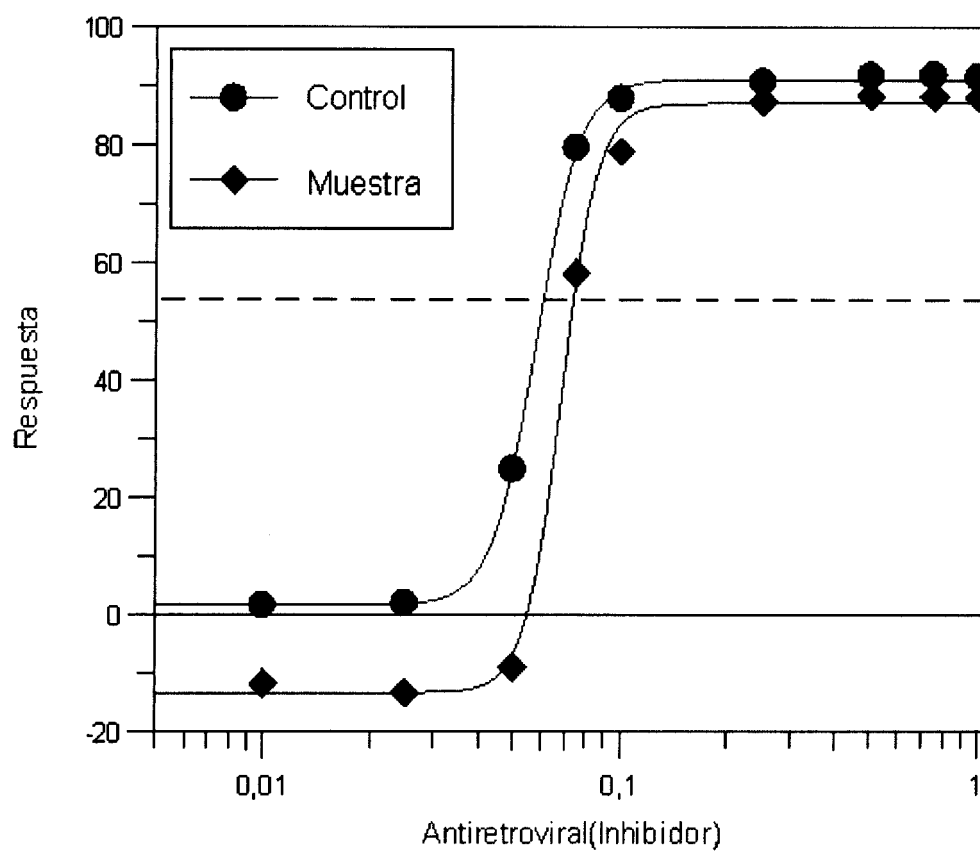


FIG. 7

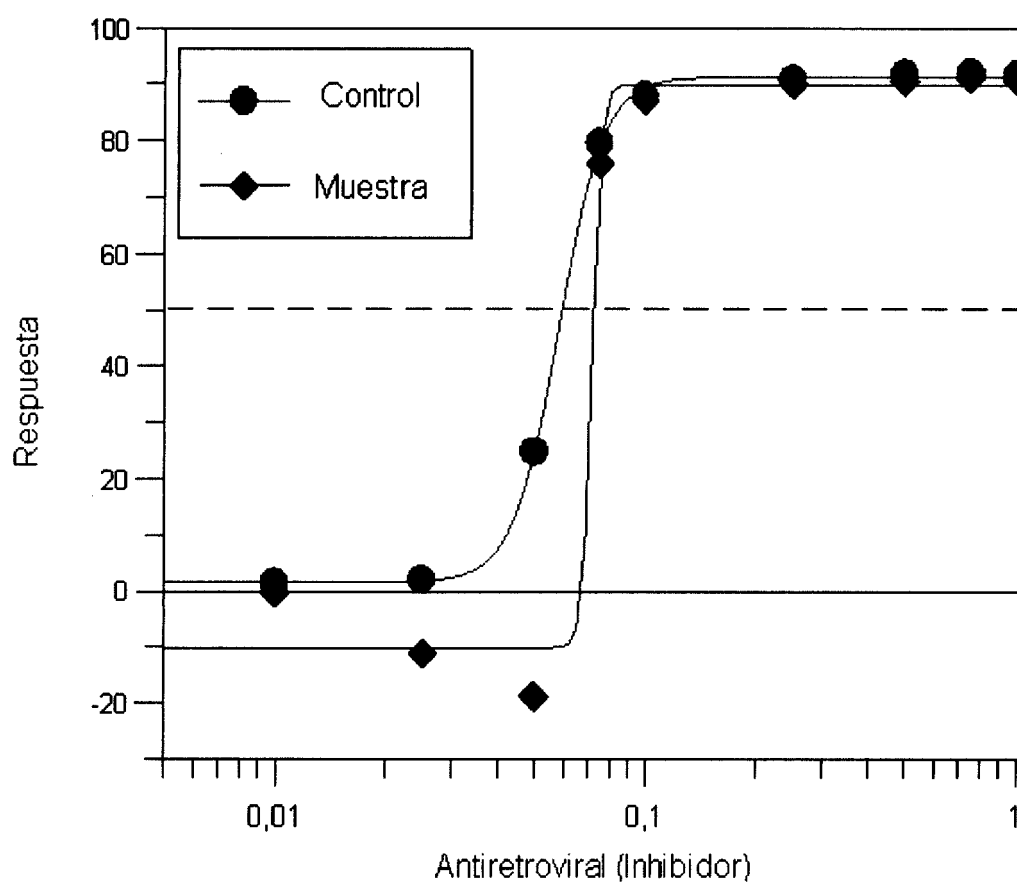


FIG. 8

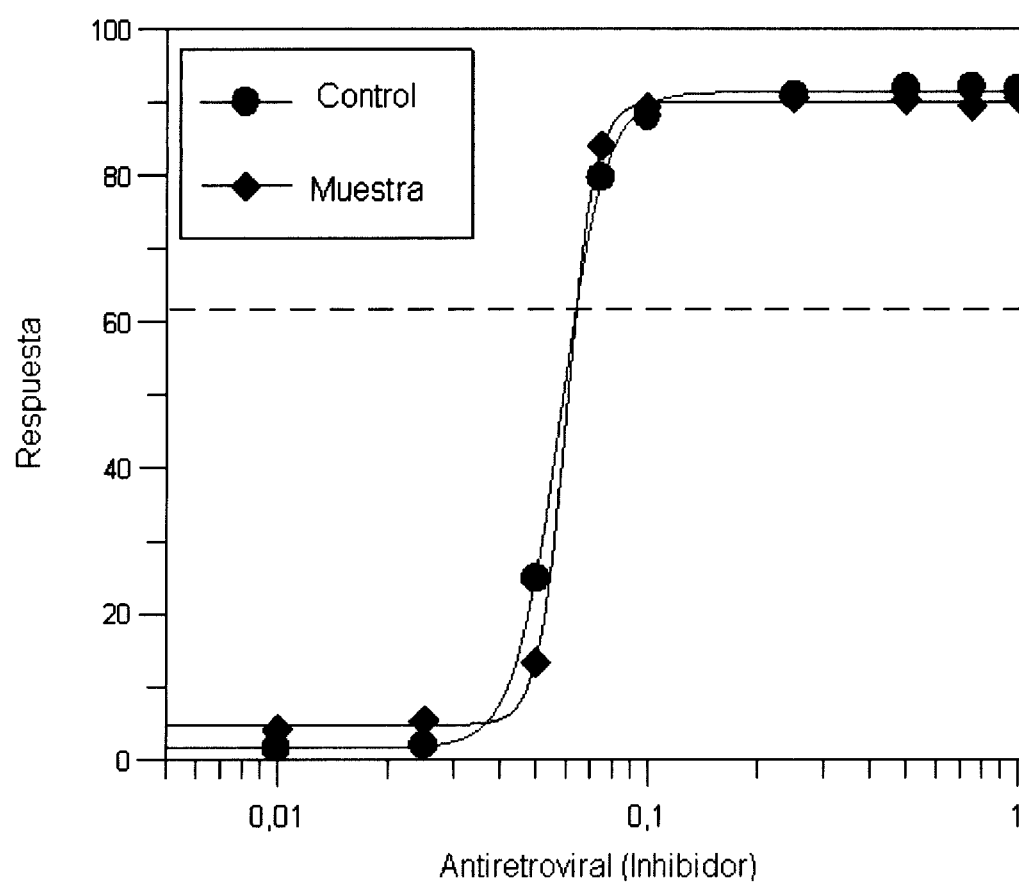


FIG. 9

ES 2 355 027 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidade de Santiago de Compostela
Nanogap

<120> Plásmidos que incluyen la secuencia del virus VIH-1 y sus usos

<130> 1596.15-1

<160> 24

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 14883

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220> misc_recomb

<223> Plásmido p4254

<400> 1

30	tggaagggct aatttgggtcc caaaaaagac aagagatcct tgatctgtgg atctaccaca	60
	cacaaggcta cttccctgat tggcagaact acacaccagg gccagggatc agatatccac	120
	tgacctttgg atggtgcttc aagtttagtac cagttgaacc agagcaagta gaagaggcca	180
35	aataaggaga gaagaacagc ttgttacacc ctatgagcca gcatgggatg gaggaccgag	240
	agggagaagt attagtgtgg aagtttgaca gcctcctagc atttcgtcac atggcccgag	300
	agctgcatcc ggagtactac aaagactgct gacatcgagc tttctacaag ggactttccg	360
40	ctggggactt tccagggagg tgtggcctgg gcgggactgg ggagtggcga gccctcagat	420
	gctacatata agcagctgct ttttgcctgt actgggtctc tctggttaga ccagatctga	480
	gcctgggagc tctctggcta actaggggaa ccactgctta agcctcaata aagcttgcct	540
45	tgagtgtctca aagtagtgtg tgcccgtctg ttgtgtgact ctggtaacta gagatccctc	600
	agaccctttt agtcagtgtg gaaaatctct agcagtggcg cccgaacagg gacttgaaag	660
	cgaaagtaaa gccagaggag atctctcgac gcaggactcg gcttgctgaa gcgcgcacgg	720
	caagaggcga ggggcggcga ctggtgagta cgccaaaaat tttgactagc ggaggctaga	780
50	aggagagaga tgggtgagc agcgtcggtt ttaagcgggg gagaattaga taaatgggaa	840
	aaaattcggg taaggccagg gggaaagaaa caatataaac taaaacatat agtatgggca	900
	agcagggagc tagaacgatt cgcagttaat cctggccttt tagagacatc agaaggctgt	960
55	agacaaatac tgggacagct acaaccatcc cttcagacag gatcagaaga acttagatca	1020
	ttatataata caatagcagt cctctattgt gtgcatcaaa ggatagatgt aaaagacacc	1080
	aaggaagcct tagataagat agaggaagag caaaacaaaa gtaagaaaaa ggcacagcaa	1140
60	gcagcagctg acacaggaaa caacagccag gtcagccaaa attaccctat agtcagaaac	1200
	ctccaggggc aaatggtaca tcaggccata tcacctagaa ctttaaatgc atgggtaaaa	1260
	gtagtagaag agaaggcttt cagcccagaa gtaataccca tgttttcagc attatcagaa	1320
65	ggagccaccc cacaagattt aaataccatg ctaaacacag tgggggggaca tcaagcagcc	1380

ES 2 355 027 A1

	atgcaaatgt taaaagagac catcaatgag gaagctgcag aatgggatag attgcatcca	1440
	gtgcatgcag ggcctattgc accaggccag atgagagaac caaggggaag tgacatagca	1500
5	ggaactacta gtacccttca ggaacaaata ggatggatga cacataatcc acctatccca	1560
	gtaggagaaa tctataaaag atggataatc ctgggattaa ataaaatagt aagaatgtat	1620
10	agccctacca gcattctgga cataagacaa ggaccaaagg aaccctttag agactatgta	1680
	gaccgattct ataaaactct aagagccgag caagcttcac aagaggtaaa aaattggatg	1740
	acagaaacct tgttgggtcca aaatgcgaac ccagattgta agactatttt aaaagcattg	1800
15	ggaccaggag cgacactaga agaaatgatg acagcatgtc agggagtggg gggacccggc	1860
	cataagcaa gagttttggc tgaagcaatg agccaagtaa caaatccagc taccataatg	1920
20	atacagaaaag gcaatttttag gaaccaaaga aagactgtta agtgtttcaa ttgtggcaaa	1980
	gaagggcaca tagccaaaaa ttgcagggcc cctaggaaaa agggctgttg gaaatgtgga	2040
	aaggaaggac accaaatgaa agattgtact gagagacagg ctaatttttt aggggaagatc	2100
25	tggccttccc acaaggggaag gccaggggaat tttcttcaga gcagaccaga gccaacagcc	2160
	ccaccagaag agagcttcag gtttggggaa gagacaacaa ctccctctca gaagcaggag	2220
	ccgatagaca aggaactgta tccttttagct tccctcagat cactcttttg cagcgacccc	2280
30	tcgtcacaat aaagataggg gggcaattaa aggaagctct attagatata ggagcagatg	2340
	atacagtatt agaagaaatg aatttgccag gaagatggaa accaaaaatg atagggggaa	2400
35	ttggagggtt tatcaaagta agacagtatg atcagatact catagaaatc tgcggacata	2460
	aagctatagg tacagtatta gtaggaccta cacctgtcaa cataattgga agaaatctgt	2520
	tgactcagat tggctgcact ttaaattttc ccattagtcc tattgagact gtaccagtaa	2580
40	aattaaagcc aggaatggat ggcccaaaaag ttaaacaatg gccattgaca gaagaaaaaa	2640
	taaaagcatt agtagaaatt tgtacagaaa tggaaaagga aggaaaaatt tcaaaaattg	2700
45	ggcctgaaaa tccatacaat actccagtat ttgccataaa gaaaaaagac agtactaaat	2760
	ggagaaaaatt agtagatttc agagaactta ataagagaac tcaagatttc tgggaagtgc	2820
	aattaggaat accacatcct gcaggggttaa aacagaaaaa atcagtaaca gtactggatg	2880
50	tgggcgatgc atatttttca gttcccttag ataaagactt caggaagtat actgcattta	2940
	ccatacctag tataaacaat gagacaccag ggattagata tcagtacaat gtgcttcac	3000
	agggatggaa aggatcacca gcaatattcc agtgtagcat gacaaaaatc ttagagcctt	3060
55	ttagaaaaa aaatccagac atagtcatct atcaatacat ggatgatttg tatgtaggat	3120
	ctgacttaga aatagggcag catagaacaa aaatagagga actgagacaa catctgttga	3180
60	ggtggggatt taccacacca gacaaaaaac atcagaaaga acctccattc ctttggatgg	3240
	gttatgaact ccatcctgat aaatggacag tacagcctat agtgctgcca gaaaaggaca	3300
	gctggactgt caatgacata cagaaattag tgggaaaatt gaattgggca agtcagatgt	3360
65	atgcagggat taaagtaagg caattatgta aacttcttag gggaaccaa gcactaacag	3420
	aagtagtacc actaacagaa gaagcagagc tagaactggc agaaaacagg gagattctaa	3480

ES 2 355 027 A1

	aagaaccggt	acatggagt	tattatgacc	catcaaaaga	cttaatagca	gaaatacaga	3540
	agcaggggca	aggccaatg	acatatcaaa	tttatcaaga	gccatttaaa	aatctgaaaa	3600
5	caggaaaaata	tgcaagaatg	aaggggtgcc	acactaatga	tgtgaaacaa	ttaacagagg	3660
	cagtacaaaa	aatagccaca	gaaagcatag	taatatgggg	aaagactcct	aaattttaaat	3720
10	taccataca	aaaggaaaca	tgggaagcat	ggtggacaga	gtattggcaa	gccacctgga	3780
	ttcctgagt	ggagtttgtc	aatacccctc	ccttagtgaa	gttatggtac	cagttagaga	3840
	aagaacccat	aataggagca	gaaactttct	atgtagatgg	ggcagccaat	agggaaacta	3900
15	aattaggaaa	agcaggatat	gtaactgaca	gaggaagaca	aaaagttgtc	cccctaacgg	3960
	acacaacaaa	tcagaagact	gagttacaag	caattcatct	agctttgcag	gattcgggat	4020
20	tagaagtaaa	catagtga	gactcacaat	atgcattggg	aatcattcaa	gcacaaccag	4080
	ataagagtga	atcagagtta	gtcagtcaaa	taatagagca	gttaataaaa	aaggaaaaag	4140
	tctacctggc	atgggtacca	gcacacaaag	gaattggagg	aaatgaacaa	gtagataaat	4200
25	tggtcagtgc	tggaatcagg	aaagtactat	ttttagatgg	aatcgataag	gccaagaag	4260
	aacatgagaa	atatcacagt	aattggagag	caatggctag	tgattttaac	ctaccacctg	4320
	tagtagcaaa	agaaatagta	gccagctgtg	ataaatgtca	gctaaaaggg	gaagccatgc	4380
30	atggacaagt	agactgtagc	ccaggaatat	ggcagctaga	ttgtacacat	ttagaaggaa	4440
	aagttatctt	ggtagcagtt	catgtagcca	gtggatatat	agaagcagaa	gtaattccag	4500
35	cagagacagg	gcaagaaaca	gcatacttcc	tcttaaaatt	agcaggaaga	tggccagtaa	4560
	aaacagtaca	tacagacaat	ggcagcaatt	tcaccagtac	tacagttaag	gccgcctgtt	4620
	ggtgggcg	gatcaagcag	gaatttggca	ttccctacaa	tcccaaag	caaggagtaa	4680
40	tagaatctat	gaataaagaa	ttaaagaaaa	ttataggaca	ggtaagagat	caggctgaac	4740
	atcttaagac	agcagtacaa	atggcagtat	tcattccaca	ttttaaaaga	aaagggggga	4800
	ttggggggta	cagtgcaggg	gaaagaatag	tagacataat	agcaacagac	atacaaacta	4860
45	aagaattaca	aaaacaaatt	acaaaaattc	aaaattttcg	ggttttattac	agggacagca	4920
	gagatccagt	ttggaagga	ccagcaaagc	tcctctggaa	aggtgaaggg	gcagtagtaa	4980
50	tacaagataa	tagtgacata	aaagtagtgc	caagaagaaa	agcaaagatc	atcagggtatt	5040
	atggaaaaca	gatggcaggt	gatgattgtg	tggcaagtag	acaggatgag	gattaacaca	5100
	tggaaaagat	tagtaaaaca	ccatatgtat	atttcaagga	aagctaagga	ctggttttat	5160
55	agacatcact	atgaaagtac	taatccaaaa	ataagttcag	aagtacacat	cccactaggg	5220
	gatgctaaat	tagtaataac	aacatattgg	ggtctgcata	caggagaaag	agactggcat	5280
60	ttgggtcagg	gagtctccat	agaatggagg	aaaaagagat	atagcacaca	agtagaccct	5340
	gacctagcag	accaactaat	tcattctgcac	tattttgatt	gtttttcaga	atctgctata	5400
	agaaatacca	tattaggacg	tatagttagt	cctaggtgtg	aatatcaagc	aggacataac	5460
65	aaggtaggat	ctctacagta	cttggcacta	gcagcattaa	taaaaccaa	acagataaag	5520

ES 2 355 027 A1

	ccacctttgc ctagtgttag gaaactgaca gaggacagat ggaacaagcc ccagaagacc	5580
	aagggccaca gagggagcca tacaatgaat ggacactaga gcttttagag gaacttaaga	5640
5	gtgaagctgt tagacatttt cctaggatat ggctccataa cttaggacaa catatctatg	5700
	aaacttacgg ggatacttgg gcaggagtgg aagccataat aagaattctg caacaactgc	5760
10	tgtttatcca tttcagaatt ggggtgtcgac atagcagaat aggcgttact cgacagagga	5820
	gagcaagaaa tggagccagt agatcctaga ctagagccct ggaagcatcc aggaagtcag	5880
	cctaaaactg cttgtacca tttgtattgt aaaaagtgtt gctttcattg ccaagtttgt	5940
15	ttcatgacaa aagccttagg catctcctat ggcaggaaga agcggagaca gcgacgaaga	6000
	gctcatcaga acagtcagac tcatcaagct tctctatcaa agcagtaagt agtacatgta	6060
20	atgcaacctt taatagtagc aatagtagca ttagtagtag caataataat agcaatagtt	6120
	gtgtggtcca tagtaatcat agaatatagg aaaatattaa gacaaagaaa aatagacagg	6180
	ttaattgata gactaataga aagagcagaa gacagtggca atgagagtga aggagaagta	6240
25	tcagcacttg tggagatggg ggtggaaatg gggcaccatg ctccttgga tattgatgat	6300
	ctgtagtgct acagaaaaat tgtgggtcac agtctattat ggggtacctg tgtggaagga	6360
	agcaaccacc actctatttt gtgcatcaga tgctaaagca tatgatacag aggtacataa	6420
30	tgtttgggcc acacatgcct gtgtaccac agacccaac ccacaagaag tagtattggt	6480
	aaatgtgaca gaaaatttta acatgtggaa aaatgacatg gtagaacaga tgcattgagga	6540
35	tataatcagt ttatgggatc aaagcctaaa gccatgtgta aaattaacc cactctgtgt	6600
	tagtttaaag tgcactgatt tgaagaatga tactaatacc aatagtagta gcgggagaat	6660
	gataatggag aaaggagaga taaaaaactg ctctttcaat atcagcacia gcataagaga	6720
40	taagggtgcag aaagaatatg cattctttta taaacttgat atagtacaa tagataatac	6780
	cagctatagg ttgataagtt gtaacacctc agtcattaca caggcctgtc caaaggatc	6840
45	ctttgagcca attcccatc attattgtgc cccggctggt tttgctgatt taaaatgtaa	6900
	taataagacg ttcaatggaa caggaccatg tacaaatgtc agcacagtac aatgtacaca	6960
	tggaaatcagg ccagtagtat caactcaact gctgttaaat ggcagtctag cagaagaaga	7020
50	tgtagtaatt agatctgcc aatttcacaga caatgctaaa accataatag tacagctgaa	7080
	cacatctgta gaaattaatt gtacaagacc caacaacaat acaagaaaa gtatccgtat	7140
	ccagagggga ccaggagag catttggttac aataggaaaa ataggaaata tgagacaagc	7200
55	acattgtaac attagtagag caaaatggaa tgccacttta aaacagatag ctagcaaatt	7260
	aagagaacaa tttggaaata ataaaacaat aatctttaag caatcctcag gaggggaccc	7320
	agaaattgta acgcacagtt ttaattgtgg aggggaattt ttctactgta attcaacaca	7380
60	actgtttaat agtacttggt ttaatagtac ttggagtact gaagggtcaa ataactgta	7440
	aggaagtgc acaatcacac tcccatgcag aataaaacaa tttataaaca tgtggcagga	7500
65	agtaggaaaa gcaatgtatg cccctcccat cagtggacaa attagatgtt catcaaatat	7560
	tactgggctg ctattaacaa gagatggtgg taataacaac aatgggtccg agatcttcag	7620

ES 2 355 027 A1

	acctggagga ggcgatatga gggacaattg gagaagtga ttatataaat ataaagtagt	7680
	aaaaattgaa ccattaggag tagcacccac caaggcaaag agaagagtgg tgacagagaga	7740
5	aaaaagagca gtgggaatag gagctttgtt ccttggggtt ttgggagcag caggaagcac	7800
	tatgggcgca gcgtcaatga cgctgacggt acaggccaga caattattgt ctgatatagt	7860
	gcagcagcag aacaatttgc tgagggtctat tgaggcgcaa cagcatctgt tgcaactcac	7920
10	agtctggggc atcaaacagc tccaggcaag aatcctggct gtggaaagat acctaaagga	7980
	tcaacagctc ctggggattt ggggttgctc tggaaaactc atttgacca ctgctgtgcc	8040
15	ttggaatgct agttggagta ataaatctct ggaacagatt tggaataaca tgacctggat	8100
	ggagtgggac agagaaatta acaattacac aagcttaata cactccttaa ttgaagaatc	8160
	gcaaaaccag caagaaaaga atgaacaaga attattggaa ttagataaat gggcaagttt	8220
20	gtggaattgg tttaacataa caaattggct gtggtatata aaattattca taatgatagt	8280
	aggaggcttg gtaggtttta gaatagtttt tgctgtactt tctatagtga atagagttag	8340
	gcagggatat tcaccattat cgtttcagac ccacctcca atcccgagg gacccgacag	8400
25	gcccgaagga atagaagaag aaggtggaga gagagacaga gacagatcca ttcgattagt	8460
	gaacggatcc ttagcactta tctgggacga tctgcggagc ctgtgcctct tcagctacca	8520
30	ccgcttgaga gacttactct tgattgtaac gaggattgtg gaacttctgg gacgcagggg	8580
	gtgggaagcc ctcaaattt ggtggaatct cctacagtat tggagtcagg aactaaagaa	8640
	tagtgctgtt aacttgctca atgccacagc catagcagta gctgagggga cagataggg	8700
35	tatagaagta ttacaagcag cttatagagc tattcgccac atacctagaa gaataagaca	8760
	gggcttggaaggattttgc tataagatgg gtggcaagtgt gtcaaaaagt agtgtgattg	8820
40	gatggcctgc tgtaagggaaggaaatgagac gagctgagcc agcagcagat ggggtgggag	8880
	cagtatctcg agacctagaa aaacatggag caatcacaag tagcaatata gcagctaaca	8940
	atgctgcttg tgcctggcta gaagcacaag aggaggaaga ggtgggtttt ccagtcacac	9000
45	ctcaggtacc tttaagacca atgacttaca aggcagctgt agatcttagc cactttttaa	9060
	aagaaaaggg gggactggaa gggctaattc actcccaaag aagacaagat atccttgatc	9120
	tgtggatcta ccacacacaa ggctacttcc ctgattggca gaactacaca ccagggccag	9180
50	gggtcagata tccactgacc tttggatggg gctacaagct agtaccagtt gagccagata	9240
	aggtagaaga ggccaataaa ggagagaaca ccagcttggt acaccctgtg agcctgcatg	9300
55	gaatggatga ccctgagaga gaagtgttag agtggagggt tgacagccgc ctagcatttc	9360
	atcacgtggc ccgagagctg catccggagt acttcaagaa ctgctgacat cgagcttgct	9420
	acaagggact ttccgctggg gactttccag ggaggcgtgg cctgggcggg actggggagt	9480
60	ggcgagccct cagatgctgc atataagcag ctgctttttg cctgtactgg gtctctctgg	9540
	ttagaccaga tctgagcctg ggagctctct ggctaactag ggaaccact gcttaagcct	9600
65	caataaagct tgccttgagt gcttcaagta gtgtgtgccc gtctgttgtg tgactctgg	9660

ES 2 355 027 A1

	aactagagat	ccctcagacc	cttttagtca	gtgtggaaaa	tctctagcac	ccccaggag	9720
	gtagaggttg	cagtgaacca	agatcgcgcc	actgcattcc	agcctgggca	agaaaacaag	9780
5	actgtctaaa	ataataataa	taagttaagg	gtattaaata	tatttataca	tggagggtcat	9840
	aaaaatatat	atatttgggc	tgggcgcagt	ggctcacacc	tgcgcccggc	cctttgggag	9900
	gccgaggcag	gtggatcacc	tgagtttggg	agttccagac	cagcctgacc	aacatggaga	9960
10	aacccttct	ctgtgtat	ttagtagatt	ttattttatg	tgtattttat	tcacaggtat	10020
	ttctggaaaa	ctgaaactgt	ttttcctcta	ctctgatacc	acaagaatca	tcagcacaga	10080
15	ggaagacttc	tgtgatcaaa	tgtggtggga	gagggagggt	ttcaccagca	catgagcagt	10140
	cagttctgcc	gcagactcgg	cgggtgtcct	tcggttcagt	tccaacaccg	cctgcctgga	10200
	gagaggtcag	accacagggg	gagggctcag	tcccaagac	ataaacaccc	aagacataaa	10260
20	caccaaacag	gtccacccc	cctgctgccc	aggcagagcc	gattcaccaa	gacgggaatt	10320
	aggatagaga	aagagtaagt	cacacagagc	cggctgtgcg	ggagaacgga	gttctattat	10380
	gactcaaatc	agtctcccca	agcattcggg	gatcagagtt	tttaaggata	acttagtgtg	10440
25	tagggggcca	gtgagttgga	gatgaaagcg	tagggagtcg	aaggtgtcct	tttgcgccga	10500
	gtcagttcct	gggtgggggc	cacaagatcg	gatgagccag	tttatcaatc	cgggggtgcc	10560
30	agctgatcca	tggagtgcag	ggtctgcaaa	atatctcaag	cactgattga	tcttaggttt	10620
	tacaatagtg	atgttacccc	aggaacaatt	tggggaaggt	cagaatcttg	tagcctgtag	10680
	ctgcatgact	cctaaacat	aatttctttt	ttgttttttt	ttttttat	ttgagacagg	10740
35	gtctcactct	gtcacctagg	ctggagtgc	gtggtgcaat	cacagctcac	tgcagcctca	10800
	acgtcgtgaag	ctcaagcgat	cctcccacct	cagcctgcct	ggtagctgag	actacaagcg	10860
40	acgccccagt	taatttttgt	atttttggta	gaggcagcgt	tttgccgtgt	ggccctggct	10920
	ggtctcgaac	tcctgggctc	aagtgatcca	gcctcagcct	cccaaagtgc	tgggacaacc	10980
	ggggccagtc	actgcacctg	gccctaaacc	ataatttcta	atcttttggc	taatttggtta	11040
45	gtcctacaaa	ggcagtcctag	tccccaggca	aaaagggggg	ttgtttcggg	aaagggctgt	11100
	tactgtcttt	gtttcaaact	ataaactaag	ttctccttaa	acttagttcg	gcctacaccc	11160
	aggaatgaac	aaggagagct	tggagggttag	aagcacgatg	gaattggtta	ggtcagatct	11220
50	ctttcactgt	ctgagttata	attttgcaat	ggtggttcaa	agactgccc	cttctgacac	11280
	cagtcgctgc	attaatgaat	cggccaacgc	gcggggagag	gcggtttg	tattggcgct	11340
55	cttccgcttc	ctcgtcact	gactcgctgc	gctcggtcgt	tcggctgcgg	cgagcggtat	11400
	cagtcactc	aaaggcggt	atacggttat	ccacagaatc	aggggataac	gcaggaaaga	11460
	acatgtgagc	aaaaggccag	caaaaggcca	ggaaccgtaa	aaaggccg	ttgctggcgt	11520
60	ttttccatag	gctccgcccc	cctgacgagc	atcacaaaaa	tcgacgctca	agtcagaggt	11580
	ggcgaaaccc	gacaggacta	taaagatacc	aggcggttcc	ccctggaagc	tccctcgtgc	11640
	gctctcctgt	tccgaccctg	ccgcttaccg	gatacctgtc	cgcctttctc	ccttcgggaa	11700
65	gcgtggcgct	ttctcaatgc	tcacgctgta	ggtatctcag	ttcggtgtag	gtcgttcgct	11760

ES 2 355 027 A1

	ccaagctggg	ctgtgtgcac	gaaccccccg	ttcagcccga	ccgctgcgcc	ttatccggtg	11820
	actatcgtct	tgagtccaac	ccggtaaagac	acgacttatc	gccactggca	gcagccactg	11880
5	gtaacaggat	tagcagagcg	aggtatgtag	gcggtgctac	agagttcttg	aagtgggtggc	11940
	ctaactacgg	ctacactaga	aggacagtat	ttggtatctg	cgctctgctg	aagccagtta	12000
10	ccttcggaaa	aagagttggt	agctcttgat	ccggcaaaca	aaccaccgct	ggtagcgggtg	12060
	gtttttttgt	ttgcaagcag	cagattacgc	gcagaaaaaa	aggatctcaa	gaagatcctt	12120
	tgatcttttc	tacgggggtct	gacgctcagt	ggaacgaaaa	ctcacgttaa	gggatttttg	12180
15	tcgatgagatt	atcaaaaagg	atcttcacct	agatcctttt	aaattaaaaa	tgaagtttta	12240
	aatcaatcta	aagtatatat	gagtaaactt	ggtctgacag	ttaccaatgc	ttaatcagtg	12300
	aggcacctat	ctcagcgatc	tgtctatttc	gttcatccat	agttgcctga	ctccccgtcg	12360
20	tgtagataac	tacgatacgg	gagggccttac	catctggccc	cagtgtctga	atgataccgc	12420
	gagaccacg	ctcaccggct	ccagatttat	cagcaataaa	ccagccagcc	ggaagggccg	12480
25	agcgcagaag	tggtcctgca	actttatccg	cctccatcca	gtctattaat	tgttgccggg	12540
	aagctagagt	aagtagttcg	ccagttaata	gtttgcgcaa	cgttgttgcc	attgctacag	12600
	gcatcgtggg	gtcacgctcg	tcgtttggta	tggcttcatt	cagctccggt	tcccaacgat	12660
30	caaggcgagt	tacatgatcc	cccatgttgt	gcaaaaaagc	ggttagctcc	ttcggctctc	12720
	cgatcgttgt	cagaagtaag	ttggccgcag	tgttatcact	catggttatg	gcagcactgc	12780
35	ataattctct	tactgtcatg	ccatccgtaa	gatgcttttc	tgtgactggg	gagtactcaa	12840
	ccaagtcatt	ctgagaatag	tgtatgcggc	gaccgagttg	ctcttgcccg	gcgtcaatac	12900
	gggataatac	cgcgccacat	agcagaactt	taaaagtgct	catcattgga	aaacgttctt	12960
40	cggggcgaaa	actctcaagg	atcttaccgc	tgttgagatc	cagttcgatg	taaccactc	13020
	gtgcacccaa	ctgatcttca	gcatctttta	ctttcaccag	cgtttctggg	tgagcaaaaa	13080
	caggaaggca	aaatgccgca	aaaaagggaa	taagggcgac	acggaaatgt	tgaatactca	13140
45	tactcttcct	ttttcaatat	tattgaagca	tttatcaggg	ttattgtctc	atgagcggat	13200
	acatatttga	atgtatttag	aaaaataaac	aaataggggt	tccgcgca	tttccccgaa	13260
50	aagtgccacc	tgacgtctaa	gaaaccatta	ttatcatgac	attaacctat	aaaaataggc	13320
	gtatcacgag	gccctttcgt	cttcaagaac	tgctcgcgc	gtttcgggtg	tgacggtgaa	13380
	aacctctgac	acatgcagct	cccggagacg	gtcacagctt	gtctgtaagc	ggatgccggg	13440
55	agcagacaag	cccgtcaggg	cgctcagcg	ggtgttgggc	ggtgtcgggg	cgcagccatg	13500
	accagtcac	gtagcgatag	cggagtgtac	tggcttaact	atgcggcatc	agagcagatt	13560
	gtactgagag	tgcaccatat	gcggtgtgaa	ataccgcaca	gatgcgtaag	gagaaaatac	13620
60	cgcatcaggc	gccattcgcc	attcaggctg	cgcaactgtt	gggaagggcg	atcgggtcgg	13680
	gcctcttcgc	tattacgcca	gcgcggggag	gcagagattg	cagtaagctg	agatcgcagc	13740
65	actgcactcc	agcctggggc	acagagtaag	actctgtctc	aaaaataaaa	taaataaatc	13800

ES 2 355 027 A1

	aatcagatat	tccaatcttt	tcctttat	ttttat	ttttat	ggaaacacag	13860
	tccttcctta	ttccagaatt	acacatat	tctat	ttttat	ccagtttttt	13920
5	ttagaccttc	acctgaaatg	tgtgtataca	aaatctaggc	cagtccagca	gagcctaaag	13980
	gtaaaaaata	aaataataaa	aaataaataa	aatctagctc	actccttcac	atcaaaatgg	14040
	agatacagct	gtagcatta	aataccaaat	aacccatctt	gtcctcaata	attttaagcg	14100
10	cctctctcca	ccacatctaa	ctcctgtcaa	aggcatgtgc	cccttccggg	cgctctgctg	14160
	tgctgccaac	caactggcat	gtggactctg	caggggtcct	aactgccaag	ccccacagtg	14220
	tgccctgagg	ctgccccttc	cttctagcgg	ctgccccac	tcggctttgc	ttccctagt	14280
15	ttcagttact	tgcgttcagc	caaggctga	aactaggtgc	gcacagagcg	gtaagactgc	14340
	gagagaaaga	gaccagcttt	acagggggtt	tatcacagtg	caccctgaca	gtcgtcagcc	14400
	tcacaggggg	tttatcacat	tgaccctga	cagtcgtcag	cctcacaggg	ggtttatcac	14460
20	agtgcaccct	tacaatcatt	ccatttgatt	cacaat	ttagtctcta	ctgtgcctaa	14520
	cttgtaagtt	aaatttgatc	agagggtgtg	tcccagaggg	gaaaacagta	tatacaggg	14580
	tcagtactat	cgcat	gcctccacct	gggtcttga	atgtgtccc	cgaggggtga	14640
25	tgactacctc	agttggatct	ccacaggcca	cagtgcacac	agataaccaa	gacacctccc	14700
	aaggctacca	caatgggccg	ccctccacct	gcacatggcc	ggaggaactg	ccatgtcgga	14760
30	ggtgcaagca	cacctgcgca	tcagagtcct	tggtgtggag	ggagggacca	gcgcagcttc	14820
	cagccatcca	cctgatgaac	agaacctagg	gaaagcccca	gttctactta	caccaggaaa	14880
	ggc						14883

35
 <210> 2
 <211> 14883
 <212> DNA
 40 <213> Secuencia artificial
 <220> misc_recomb
 45 <223> p4411
 <400> 2

50	tggaagggct	aatttggtcc	caaaaaagac	aagagatcct	tgatctgtgg	atctaccaca	60
	cacaagggcta	cttccctgat	tggcagaact	acacaccagg	gccagggatc	agatatccac	120
	tgaccttttg	atggtgcttc	aagtttagtac	cagttgaacc	agagcaagta	gaagaggcca	180
55	aataaggaga	gaagaacagc	ttgttacacc	ctatgagcca	gcatgggatg	gaggaccggg	240
	aggggagaagt	attagtgtgg	aagtttgaca	gcctcctagc	atttcgtcac	atggcccagag	300
	agctgcatcc	ggagtactac	aaagactgct	gacatcgagc	tttctacaag	ggactttccg	360
60	ctggggactt	tccagggagg	tgtggcctgg	gcgggactgg	ggagtggcga	gccctcagat	420
	gctacatata	agcagctgct	ttttgcctgt	actgggtctc	tctggttaga	ccagatctga	480
	gcctggggagc	tctctggcta	actaggggaa	ccactgctta	agcctcaata	aagcttgcc	540
65	tgagtgtctca	aagtagtgtg	tgcccgctctg	ttgtgtgact	ctggtaacta	gagatccctc	600
	agaccctttt	agtcagtggtg	gaaaatctct	agcagtgggc	cccgaacagg	gacttgaaa	660

ES 2 355 027 A1

	cgaaagtaaa gccagaggag atctctcgac gcaggactcg gcttgctgaa gcgcgcacgg	720
	caagaggcga ggggcggcga ctggtgagta cgccaaaaat tttgactagc ggaggctaga	780
5	aggagagaga tgggtgagag agcgtcggta ttaagcgggg gagaattaga taaatgggaa	840
	aaaattcggg taaggccagg gggaaagaaa caatataaac taaaacatat agtatgggca	900
	agcagggagc tagaacgatt cgcagttaat cctggccttt tagagacatc agaaggctgt	960
10	agacaaatac tgggacagct acaaccatcc cttcagacag gatcagaaga acttagatca	1020
	ttatataata caatagcagt cctctattgt gtgcatcaaa ggatagatgt aaaagacacc	1080
15	aaggaagcct tagataagat agaggaagag caaaacaaaa gtaagaaaaa ggcacagcaa	1140
	gcagcagctg acacaggaaa caacagccag gtcagccaaa attaccctat agtgcagaac	1200
	ctccaggggc aaatggtaca tcaggccata tcacctagaa ctttaaatgc atgggtaaaa	1260
20	gtagtagaag agaaggcttt cagcccagaa gtaataccca tgttttcagc attatcagaa	1320
	ggagccaccc cacaagattt aaataccatg ctaaacacag tggggggaca tcaagcagcc	1380
	atgcaaatgt taaaagagac catcaatgag gaagctgcag aatgggatag attgcatcca	1440
25	gtgcatgcag ggcctattgc accaggccag atgagagaac caaggggaag tgacatagca	1500
	ggaactacta gtacccttca ggaacaaata ggatggatga cacataatcc acctatccca	1560
30	gtaggagaaa tctataaaaag atggataatc ctgggattaa ataaaatagt aagaatgtat	1620
	agccctacca gcattctgga cataagacaa ggaccaaagg aacccttttag agactatgta	1680
	gaccgattct ataaaactct aagagccgag caagcttcac aagaggtaaa aaattggatg	1740
35	acagaaacct tgttggtcca aaatgcgaac ccagattgta agactatttt aaaagcattg	1800
	ggaccaggag cgacactaga agaaatgatg acagcatgtc agggagtggg gggacccggc	1860
40	cataaagcaa gagttttggc tgaagcaatg agccaagtaa caaatccagc taccataatg	1920
	atacagaaag gcaatttttag gaaccaaaga aagactgtta agtgtttcaa ttgtggcaaa	1980
	gaagggcaca tagccaaaaa ttgcagggcc cctaggaaaa agggctgttg gaaatgtgga	2040
45	aaggaaggac accaaatgaa agattgtact gagagacagg ctaatttttt agggaagatc	2100
	tggccttccc acaaggggaag gccagggaat tttcttcaga gcagaccaga gccaacagcc	2160
	ccaccagaag agagcttcag gtttggggaa gagacaacaa ctccctctca gaagcagc	2220
50	ccgatagaca aggaactgta tccttttagct tccctcagat cactcttttg cagcgacccc	2280
	tcgtcacaat aaagataggg gggcaattaa aggaagctct attagataca ggagcagatg	2340
55	atacagtatt agaagaaatg aatttgccag gaagatggaa accaaaaatg atagggggaa	2400
	ttggagggttt tatcaaagta agacagtatg atcagatact catagaaatc tgcgacata	2460
	aagctatagg tacagtatta gtaggacctt cacctgtcaa cataattgga agaaatctgt	2520
60	tgactcagat tggctgcact ttaaattttc ccattagtcc tattgagact gtaccagtaa	2580
	aattaaagcc aggaatggat ggcccaaaaag ttaaacaatg gccattgaca gaagaaaaaa	2640
65	taaaagcatt agtagaaatt tgtacagaaa tggaaaagga aggaaaaatt tcaaaaattg	2700

ES 2 355 027 A1

	ggcctgaaaa	tccatacaat	actccagtat	ttgccataaa	gaaaaaagac	agtactaaat	2760
	ggagaaaatt	agtagatttc	agagaactta	ataagagaac	tcaagatttc	tgggaagttc	2820
5	aattaggaat	accacatcct	gcagggttaa	aacagaaaaa	atcagtaaca	gtactggatg	2880
	tgggcgatgc	atatttttca	gttcccttag	ataaagactt	caggaagtat	actgcattta	2940
10	ccatacctag	tataaacaat	gagacaccag	ggattagata	tcagtacaat	gtgcttccac	3000
	agggatggaa	aggatcacca	gcaatatctc	agtgtagcat	gacaaaaatc	ttagagcctt	3060
	ttagaaaaca	aatccagac	atagtcatct	atcaatacat	ggatgatttg	tatgtaggat	3120
15	ctgacttaga	aatagggcag	catagaacaa	aatagagga	actgagacaa	catctgttga	3180
	ggtggggatt	taccacacca	gacaaaaaac	atcagaaaga	acctccattc	ctttggatgg	3240
	gttatgaact	ccatcctgat	aatggacag	tacagcctat	agtgtgcca	gaaaaggaca	3300
20	gctggactgt	caatgacata	cagaaattag	tgggaaaatt	gaattgggca	agtcagattt	3360
	atgcagggat	taaagtaagg	caattatgta	aacttcttag	gggaaccaa	gcactaacag	3420
25	aagtagtacc	actaacagaa	gaagcagagc	tagaactggc	agaaaacagg	gagattctaa	3480
	aagaaccggt	acatggagt	tattatgacc	catcaaaaga	cttaatagca	gaaatacaga	3540
	agcaggggca	aggccaatgg	acatatcaaa	tttatcaaga	gccatttaaa	aatctgaaaa	3600
30	caggaaaata	tgcaagaatg	aagggtgccc	acactaatga	tgtgaaacaa	ttaacagagg	3660
	cagtacaaaa	aatagccaca	gaaagcatag	taatatgggg	aaagactcct	aaatttaaat	3720
35	taccataca	aaaggaaaca	tgggaagcat	ggtggacaga	gtattggcaa	gccacctgga	3780
	ttcctgagt	ggagtttgtc	aatacccctc	ccttagtgaa	gttatggtac	cagttagaga	3840
	aagaacccat	aataggagca	gaaactttct	atgtagatgg	ggcagccaat	agggaaacta	3900
40	aattagggaa	agcaggatat	gtaactgaca	gaggaagaca	aaaagttgtc	cccctaacgg	3960
	acacaacaaa	tcagaagact	gagttacaag	caattcatct	agctttgcag	gattcgggat	4020
	tagaagtaaa	catagtga	gactcacaat	atgcattggg	aatcattcaa	gcacaaccag	4080
45	ataagagtga	atcagagtta	gtcagtcaaa	taatagagca	gttaataaaa	aaggaaaaag	4140
	tctacctggc	atgggtacca	gcacacaaag	gaattggagg	aatgaacaa	gtagataaat	4200
	tggtcagtgc	tggaatcagg	aaagtactat	ttttagatgg	aatagataag	gcccagaag	4260
50	aacatgagaa	atatcacagt	aattggagag	caatggctag	tgattttaac	ctaccacctg	4320
	tagtagcaaa	agaaatagta	gccagctgtg	ataaatgtca	gctaaaaggg	gaagccatgc	4380
55	atggacaagt	agactgtagc	ccgggaatat	ggcagctaga	ttgtacacat	ttagaaggaa	4440
	aagttatctt	ggtagcagtt	catgtagcca	gtggatatat	agaagcagaa	gtaattccag	4500
	cagagacagg	gcaagaaaca	gcatacttcc	tcttaaaatt	agcaggaaga	tggccagtaa	4560
60	aaacagtaca	tacagacaat	ggcagcaatt	tcaccagtac	tacagttaag	gccgcctgtt	4620
	ggtgggcggg	gatcaagcag	gaatttggca	ttccctacaa	tcccaaagt	caaggagtaa	4680
	tagaatctat	gaataaagaa	ttaaagaaaa	ttataggaca	ggtaagagat	caggctgaac	4740
65	atcttaagac	agcagtacaa	atggcagtat	tcatccacaa	ttttaaaaga	aaagggggga	4800

ES 2 355 027 A1

	ttggggggta	cagtgcaggg	gaaagaatag	tagacataat	agcaacagac	atacaaaacta	4860
	aagaattaca	aaaacaaatt	acaaaaattc	aaaattttcg	ggtttattac	agggacagca	4920
5	gagatccagt	ttggaaagga	ccagcaaagc	tcctctggaa	aggtgaaggg	gcagtagtaa	4980
	tacaagataa	tagtgacata	aaagtagtgc	caagaagaaa	agcaaagatc	atcagggatt	5040
	atggaaaaca	gatggcaggt	gatgattgtg	tggcaagtag	acaggatgag	gattaacaca	5100
10	tggaaaagat	tagtaaaaca	ccatatgtat	atttcaagga	aagctaagga	ctggttttat	5160
	agacatcact	atgaaagtac	taatccaaaa	ataagttcag	aagtacacat	cccactaggg	5220
15	gatgctaaat	tagtaataac	aacatattgg	ggtctgcata	caggagaaaag	agactggcat	5280
	ttgggtcagg	gagtctccat	agaatggagg	aaaaagagat	atagcacaca	agtagaccct	5340
	gacctagcag	accaactaat	tcctctgcac	tattttgatt	gtttttcaga	atctgctata	5400
20	agaaatacca	tattaggacg	tatagttagt	cctaggtgtg	aatatcaagc	aggacataac	5460
	aaggtaggat	ctctacagta	cttggcacta	gcagcattaa	taaaaccaa	acagataaag	5520
25	ccacctttgc	ctagtgttag	gaaactgaca	gaggacagat	ggaacaagcc	ccagaagacc	5580
	aagggccaca	gagggagcca	tacaatgaat	ggacactaga	gcttttagag	gaacttaaga	5640
	gtgaagctgt	tagacatttt	cctaggatat	ggctccataa	cttaggacaa	catatctatg	5700
30	aaacttacgg	ggatacttgg	gcaggagtgg	aagccataat	aagaattctg	caacaactgc	5760
	tgtttatcca	tttcagaatt	gggtgtcgac	atagcagaat	aggcgttact	cgacagagga	5820
	gagcaagaaa	tggagccagt	agatcctaga	ctagagccct	ggaagcatcc	aggaagtcag	5880
35	cctaaaactg	cttgtaccaa	ttgctattgt	aaaaagtgtt	gctttcattg	ccaagtttgt	5940
	ttcatgacaa	aagccttagg	catctcctat	ggcaggaaga	agcggagaca	gcgacgaaga	6000
40	gctcatcaga	acagtcagac	tcataagct	tctctatcaa	agcagtaagt	agtacatgta	6060
	atgcaaccta	taatagtagc	aatagtagca	ttagtagtag	caataataat	agcaatagtt	6120
	gtgtggtcca	tagtaatcat	agaatatagg	aaaatattaa	gacaaagaaa	aatagacagg	6180
45	ttaattgata	gactaataga	aagagcagaa	gacagtggca	atgagagtga	aggagaagta	6240
	tcagcacttg	tggagatggg	ggtggaaatg	gggcaccatg	ctccttggga	tattgatgat	6300
	ctgtagtgtc	acagaaaaat	tgtgggtcac	agtctattat	ggggtacctg	tgtggaagga	6360
50	agcaaccacc	actctatfff	gtgcatcaga	tgctaaagca	tatgatacag	aggtacataa	6420
	tgtttgggcc	acacatgcct	gtgtaccac	agaccccaac	ccacaagaag	tagtattggt	6480
55	aaatgtgaca	gaaaatttta	acatgtggaa	aaatgacatg	gtagaacaga	tgcatgagga	6540
	tataatcagt	ttatgggatc	aaagcctaaa	gccatgtgta	aaattaaccc	cactctgtgt	6600
	tagtttaag	tgcactgatt	tgaagaatga	tactaatacc	aatagtagta	gcgggagaat	6660
60	gataatggag	aaaggagaga	taaaaaactg	ctctttcaat	atcagcacia	gcataagaga	6720
	taagggtcag	aaagaatatg	cattctttta	taaacttgat	atagtaccaa	tagataatac	6780
65	cagctatagg	ttgataagtt	gtaacacctc	agtcattaca	caggcctgtc	caaaggtatc	6840

ES 2 355 027 A1

	ctttgagcca attcccatac attattgtgc cccggctggt tttgcgattc taaaatgtaa	6900
	taataagacg ttcaatggaa caggaccatg tacaaatgtc agcacagtac aatgtacaca	6960
5	tggaatcagg ccagtagtat caactcaact gctgttaa at ggagctctag cagaagaaga	7020
	tgtagtaatt agatctgcca atttcacaga caatgctaaa accataatag tacagctgaa	7080
10	cacatctgta gaaattaatt gtacaagacc caacaacaat acaagaaaa gtatccgtat	7140
	ccagagggga ccagggagag catttggttac aataggaaaa ataggaaata tgagacaagc	7200
	acattgtaac attagtagag caaaatggaa tgccacttta aaacagatag ctagcaaatt	7260
15	aagagaacaa tttggaaata ataaaacaat aatctttaag caatcctcag gaggggaccc	7320
	agaaattgta acgcacagtt ttaattgtgg aggggaattt ttctactgta attcaacaca	7380
	actgtttaat agtacttggt ttaatagtag ttggagtact gaagggtcaa ataactga	7440
20	aggaagtga acaatcacac tcccatgcag aataaaacaa ttataaaca tgtggcagga	7500
	agtaggaaaa gcaatgtatg cccctcccat cagtggacaa attagatgtt catcaaatat	7560
25	tactgggctg ctattaacaa gagatggtgg taataacaac aatgggtccg agatcttcag	7620
	acctggagga ggcgatatga gggacaattg gagaagtga ttatataaat ataaagtagt	7680
	aaaaattgaa ccattaggag tagcaccac caaggcaaag agaagagtgg tgcagagaga	7740
30	aaaaagagca gtgggaatag gagctttgtt ccttgggttc ttgggagcag caggaagcac	7800
	tatgggcgca gcgtcaatga cgctgacggt acaggccaga caattattgt ctgatatagt	7860
	gcagcagcag aacaatttgc tgagggtctat tgaggcgcaa cagcatctgt tgcaactcac	7920
35	agtctggggc atcaaacagc tccaggcaag aatcctggct gtggaaagat acctaaagga	7980
	tcaacagctc ctggggattt ggggttgctc tggaaaactc atttgcacca ctgctgtgcc	8040
40	ttggaatgct agttggagta ataaatctct ggaacagatt tggaataaca tgacctggat	8100
	ggagtgggac agagaaatta acaattacac aagcttaata cactccttaa ttgaagaatc	8160
	gcaaaaccag caagaaaaga atgaacaaga attattggaa ttagataaat gggcaagttt	8220
45	gtggaattgg tttaacataa caaattggct gtggtatata aaattattca taatgatagt	8280
	aggaggcttg gtaggtttta gaatagtttt tgctgtactt tctatagtga atagagttag	8340
	gcagggatat tcaccattat cgtttcagac ccacctcca atcccaggg gacccgacag	8400
50	gcccgaagga atagaagaag aaggtggaga gagagacaga gacagatcca ttcgattagt	8460
	gaacggatcc ttagcactta tctgggacga tctgcggagc ctgtgcctct tcagctacca	8520
55	ccgcttgaga gacttactct tgattgtaac gaggattgtg gaacttctgg gacgcagggg	8580
	gtgggaagcc ctcaaattt ggtggaatct cctacagtat tggagtcagg aactaaagaa	8640
	tagtgctgtt aacttgctca atgccacagc catagcagta gctgagggga cagataggg	8700
60	tatagaagta ttacaagcag cttatagagc tattcgccac atacctagaa gaataagaca	8760
	gggcttggaaggattttgc tataagatgg gtggcaagtgtgtcaaaaagt agtgtgattg	8820
65	gatggcctgc tgtaagggaa agaattgagac gagctgagcc agcagcagat ggggtgggag	8880
	cagtatctcg agacctagaa aaacatggag caatcacaag tagcaataca gcagctaaca	8940

ES 2 355 027 A1

	atgctgcttg	tgccctggcta	gaagcacaag	aggaggaaga	ggtgggtttt	ccagtcacac	9000
	ctcaggtacc	tttaagacca	atgacttaca	aggcagctgt	agatccttagc	cacttttttaa	9060
5	aagaaaaggg	gggactggaa	gggctaattc	actcccaaag	aagacaagat	atccttgatc	9120
	tgtggatcta	ccacacacaa	ggctacttcc	ctgattggca	gaactacaca	ccagggccag	9180
	gggtcagata	tccactgacc	tttggatggg	gctacaagct	agtaccagtt	gagccagata	9240
10	aggtagaaga	ggccaataaa	ggagagaaca	ccagcttggt	acaccctgtg	agcctgcatg	9300
	gaatggatga	ccctgagaga	gaagtgttag	agtggaggtt	tgacagccgc	ctagcatttc	9360
15	atcacgtggc	ccgagagctg	catccggagt	acttcaagaa	ctgctgacat	cgagcttgct	9420
	acaagggact	ttccgctggg	gactttccag	ggaggcgtgg	cctgggcggg	actggggagt	9480
	ggcgagccct	cagatgctgc	atataagcag	ctgctttttg	cctgtactgg	gtctctctgg	9540
20	ttagaccaga	tctgagcctg	ggagctctct	ggctaactag	ggaaccctact	gcttaagcct	9600
	caataaagct	tgcccttgagt	gcttcaagta	gtgtgtgccc	gtctgtttgtg	tgactctggt	9660
	aactagagat	ccctcagacc	cttttagtca	gtgtggaaaa	tctctagcac	ccccaggag	9720
25	gtagaggttg	cagtgaacca	agatcgcgcc	actgcattcc	agcctgggca	agaaaacaag	9780
	actgtctaaa	ataataataa	taagttaagg	gtattaaata	tattttataca	tggaggtcat	9840
30	aaaaatatat	atatttgggc	tgggcgcagt	ggctcacacc	tgcgcccggc	cctttgggag	9900
	gccgaggcag	gtggatcacc	tgagtttggg	agttccagac	cagcctgacc	aacatggaga	9960
	aacccttct	ctgtgtattt	ttagtagatt	ttattttatg	tgtattttat	tcacaggtat	10020
35	ttctggaaaa	ctgaaactgt	ttttcctcta	ctctgatacc	acaagaatca	tcagcacaga	10080
	ggaagacttc	tgtgatcaaa	tgtggtggga	gagggaggtt	ttcaccagca	catgagcagt	10140
	cagttctgcc	gcagactcgg	cgggtgtcct	tcggttcagt	tccaacaccg	cctgcctgga	10200
40	gagaggtcag	accacagggg	gagggctcag	tcccaagac	ataaacaccc	aagacataaa	10260
	cacccaacag	gtccaccccc	cctgctgccc	aggcagagcc	gattcaccaa	gacgggaatt	10320
45	aggatagaga	aagagtaagt	cacacagagc	cggctgtgcg	ggagaacgga	gttctattat	10380
	gactcaaadc	agtctcccca	agcattcggg	gatcagagtt	tttaaggata	acttagtggt	10440
	tagggggcca	gtgagttgga	gatgaaagcg	tagggagtcg	aagggtgtcct	tttgcgccga	10500
50	gtcagttcct	gggtgggggg	cacaagatcg	gatgagccag	tttatcaatc	cgggggtgcc	10560
	agctgatcca	tggagtgcag	ggtctgcaaa	atatctcaag	cactgattga	tcttaggttt	10620
55	tacaatagtg	atgttaccac	aggaacaatt	tggggaaggt	cagaatcttg	tagcctgtag	10680
	ctgcatgact	cctaaacat	aatttctttt	ttgttttttt	ttttttat	ttgagacagg	10740
	gtctcactct	gtcacctagg	ctggagtgc	gtggtgcaat	cacagctcac	tgcagcctca	10800
60	acgtcgtaag	ctcaagcgat	cctccacct	cagcctgcct	ggtagctgag	actacaagcg	10860
	acgccccagt	taatttttgt	atttttggta	gaggcagcgt	tttgccgtgt	ggccctggct	10920
65	ggtctcgaac	tcctgggctc	aagtgatcca	gcctcagcct	cccaaagtgc	tgggacaacc	10980

ES 2 355 027 A1

	ggggccagtc	actgcacctg	gccctaaacc	ataatttcta	atcttttggc	taatttgtta	11040
	gtcctacaaa	ggcagttctag	tccccaggca	aaaagggggt	ttgtttcggg	aaagggctgt	11100
5	tactgtcttt	gtttcaaact	ataaactaag	ttcctcctaa	acttagttcg	gcctacaccc	11160
	aggaatgaac	aaggagagct	tggaggttag	aagcacgatg	gaattggtta	ggtcagatct	11220
	ctttcactgt	ctgagttata	attttgcaat	ggagggttcaa	agactgcccg	cttctgacac	11280
10	cagtcgctgc	attaatgaat	cggccaacgc	gcggggagag	gcggtttgcg	tattggcgct	11340
	cttccgcttc	ctcgtcact	gactcgctgc	gctcggtcgt	tcggctgcgg	cgagcggat	11400
15	cagctcactc	aaaggcggt	atacggttat	ccacagaatc	aggggataac	gcaggaaaga	11460
	acatgtgagc	aaaaggccag	caaaaggcca	ggaaccgtaa	aaaggccgcg	ttgctggcgt	11520
	ttttccatag	gctccgcccc	cctgacgagc	atcacaaaaa	tcgacgctca	agtcagaggt	11580
20	ggcgaaaccc	gacaggacta	taaagatacc	aggcgtttcc	ccctggaagc	tccctcgtgc	11640
	gctctcctgt	tccgaccctg	ccgcttaccg	gatacctgtc	cgcctttctc	ccttcgggaa	11700
	gcgtggcgct	ttctcaatgc	tcacgctgta	ggatatctcag	ttcgggtgtag	gtcgttcgct	11760
25	ccaagctggg	ctgtgtgcac	gaaccccccg	ttcagcccga	ccgctgcgcc	ttatccggt	11820
	actatcgtct	tgagtccaac	ccggtaagac	acgacttatc	gccactggca	gcagccactg	11880
30	gtaacaggat	tagcagagcg	aggtatgtag	gcggtgctac	agagttcttg	aagtgggtggc	11940
	ctaactacgg	ctacactaga	aggacagtat	ttggtatctg	cgctctgctg	aagccagtta	12000
	ccttcggaaa	aagagttggt	agctcttgat	ccggcaaaaa	aaccaccgct	ggtagcgggtg	12060
35	gtttttttgt	ttgcaagcag	cagattacgc	gcagaaaaaa	aggatctcaa	gaagatcctt	12120
	tgatcttttc	tacggggtct	gacgctcagt	ggaacgaaaa	ctcacgttaa	gggatttttg	12180
40	tcatgagatt	atcaaaaagg	atcttcacct	agatcctttt	aaattaaaaa	tgaagtttta	12240
	aatcaatcta	aagtatatat	gagtaaactt	ggtctgacag	ttaccaatgc	ttaatcagt	12300
	aggcacctat	ctcagcgatc	tgtctatttc	gttcatccat	agttgcctga	ctccccgtcg	12360
45	tgtagataac	tacgatacgg	gagggcttac	catctggccc	cagtgcctga	atgataccgc	12420
	gagaccacag	ctcaccggct	ccagatttat	cagcaataaa	ccagccagcc	ggaagggccg	12480
	agcgagaag	tggtcctgca	actttatccg	cctccatcca	gtctattaat	tgttgccggg	12540
50	aagctagagt	aagtagttcg	ccagttaata	gtttgcgcaa	cgttgttgcc	attgctacag	12600
	gcatcggtgt	gtcacgctcg	tcgtttggta	tggcttcatt	cagctccggt	tcccaacgat	12660
55	caaggcgagt	tacatgatcc	cccatgttgt	gcaaaaaagc	ggttagctcc	ttcggtcctc	12720
	cgatcgttgt	cagaagtaag	ttggccgag	tgttatcact	catggttatg	gcagcactgc	12780
	ataattctct	tactgtcatg	ccatccgtaa	gatgcttttc	tgtgactggt	gagtactcaa	12840
60	ccaagtcatt	ctgagaatag	tgtatgcggc	gaccgagttg	ctcttgcccg	gcgtcaatac	12900
	gggataatac	cgcgccacat	agcagaactt	taaaagtgct	catcattgga	aaacgttctt	12960
	cggggcgaaa	actctcaagg	atcttaccgc	tgttgagatc	cagttcgatg	taaccactc	13020
65	gtgcacccaa	ctgatcttca	gcatctttta	ctttcaccag	cgtttctggg	tgagcaaaaa	13080

ES 2 355 027 A1

	caggaaggca aaatgccgca aaaaagggaa taagggcgac acggaaatgt tgaatactca	13140
	tactcttcct ttttcaatat tattgaagca tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat	13200
5	acatatttga atgtatttag aaaaataaac aaataggggt tccgcgcaca tttccccgaa	13260
	aagtgccacc tgacgtctaa gaaaccatta ttatcatgac attaacctat aaaaataggc	13320
10	gtatcacgag gccctttcgt cttcaagaac tgcctcgcgc gtttcggtga tgacggtgaa	13380
	aacctctgac acatgcagct cccggagacg gtcacagctt gtctgtaagc ggatgccggg	13440
	agcagacaag cccgtcaggg cgcgtcagcg ggtgttggcg ggtgtcgggg cgcagccatg	13500
15	accagtcac gtacgcatag cggagtgtac tggcttaact atgcggcatc agagcagatt	13560
	gtactgagag tgcaccatat gcggtgtgaa ataccgcaca gatgcgtaag gagaaaatac	13620
	cgcacagggc gccattcgcc attcaggctg cgcaactgtt gggaaagggcg atcgggtgcg	13680
20	gcctcttcgc tattacgcca gcgcggggag gcagagattg cagtaagctg agatcgagc	13740
	actgcactcc agcctgggcg acagagtaag actctgtctc aaaaataaaa taaataaatc	13800
25	aatcagatat tccaatcttt tcctttatctt atttatctt tttctatctt ggaaacacag	13860
	tccttcctta ttccagaatt acacatatat tctatttttc tttatatgct ccagtttttt	13920
	ttagaccttc acctgaaatg tgtgtataca aaatctaggc cagtccagca gagcctaaag	13980
30	gtaaaaaata aaataataaa aaataaataa aatctagctc actccttcac atcaaaatgg	14040
	agatacagct gttagcatta aataccaaat aacctatctt gtcctcaata attttaagcg	14100
	cctctctcca ccacatctaa ctctgtcaa aggcattgtgc cccttccggg cgctctgctg	14160
35	tgctgccaac caactggcat gtggactctg caggggtccct aactgccaag cccacagtg	14220
	tgccctgagg ctgccccctt cttctagcgg ctgccccac tcggctttgc tttccctagt	14280
40	ttcagttact tgcgttcagc caaggtctga aactagggtg gcacagagcg gtaagactgc	14340
	gagagaaaga gaccagcttt acaggggggt tatcacagtg caccctgaca gtcgtcagcc	14400
	tcacaggggg tttatcacat tgcaccctga cagtcgtcag cctcacaggg ggtttatcac	14460
45	agtgcaccct tacaatcatt ccatttgatt cacaattttt ttagtctcta ctgtgcctaa	14520
	cttgtaagtt aaatttgatc agaggtgtgt tcccagaggg gaaaacagta tatacaggg	14580
	tcagtactat cgcatttcag gcctccacct gggctcttga atgtgtcccc cgaggggtga	14640
50	tgactacctc agttggatct ccacaggtca cagtgcacac agataaccaa gacacctccc	14700
	aaggctacca caatgggccc ccctccacgt gcacatggcc ggaggaactg ccatgtcggg	14760
55	gggtgcaagca cacctgcgca tcagagtcct tgggtgtggag ggagggacca gcgcagcttc	14820
	cagccatcca cctgatgaac agaacctagg gaaagcccca gttctactta caccaggaaa	14880
	ggc	14883

60

<210> 3

<211> 14883

<212> DNA

65

<213> Secuencia artificial

<220> misc_recomb

ES 2 355 027 A1

<223> p4634

<400> 3

5	tggaaagggct aatttgggtcc caaaaaagac aagagatcct tgatctgtgg atctaccaca	60
	cacaaggcta cttccctgat tggcagaact acacaccagg gccagggatc agatatccac	120
	tgaccttttg atggtgcttc aagtttagtac cagttgaacc agagcaagta gaagaggcca	180
10	aataaggaga gaagaacagc ttgttacacc ctatgagcca gcatgggatg gaggacccgg	240
	agggagaagt attagtgtgg aagtttgaca gcctcctagc atttcgtcac atggcccag	300
15	agctgcatcc ggagtactac aaagactgct gacatcgagc tttctacaag ggactttccg	360
	ctggggactt tccagggagg tgtggcctgg gcgggactgg ggagtggcga gccctcagat	420
	gctacatata agcagctgct ttttgccctgt actgggtctc tctggttaga ccagatctga	480
20	gcctgggagc tctctggcta actaggaac ccactgctta agcctcaata aagcttgccct	540
	tgagtgtctca aagtagtgtg tgcccgtctg ttgtgtgact ctggtaacta gagatccctc	600
	agaccctttt agtcagtgtg gaaaaatctct agcagtggcg cccgaacagg gacttgaaag	660
25	cgaaagtaaa gccagaggag atctctcgac gcaggactcg gcttgctgaa gcgcgcacgg	720
	caagaggcga ggggcggcga ctggtgagta cgccaaaaat tttgactagc ggaggctaga	780
30	aggagagaga tgggtgagc agcgtcggt ttaagcggg gagaattaga taaatgggaa	840
	aaaattcggg taaggccagg gggaaagaaa caatataaac taaaacatat agtatgggca	900
	agcagggagc tagaacgatt cgcagttaat cctggccttt tagagacatc agaaggctgt	960
35	agacaaatac tgggacagct acaaccatcc cttcagacag gatcagaaga acttagatca	1020
	ttatataata caatagcagt cctctattgt gtgcatcaaa ggatagatgt aaaagacacc	1080
40	aaggaagcct tagataagat agaggaagag caaaacaaaa gtaagaaaaa ggcacagcaa	1140
	gcagcagctg acacaggaaa caacagccag gtcagccaaa attaccctat agtgcagaac	1200
	ctccaggggc aaatggtaca tcaggccata tcacctagaa ctttaaatgc atgggtaaaa	1260
45	gtagtagaag agaaggcttt cagcccagaa gtaataacca tgttttcagc attatcagaa	1320
	ggagccaccc cacaagattt aaataccatg ctaaacacag tggggggaca tcaagcagcc	1380
	atgcaaatgt taaaagagac catcaatgag gaagctgcag aatgggatag attgcatcca	1440
50	gtgcatgcag ggcctattgc accaggccag atgagagaac caaggggaag tgacatagca	1500
	ggaactacta gtacccttca ggaacaaata ggatggatga cacataatcc acctatccca	1560
55	gtaggagaaa tctataaaaag atggataatc ctgggattaa ataaaaatag aagaatgtat	1620
	agccctacca gcattctgga cataagacaa ggaccaaagg aaccctttag agactatgta	1680
	gaccgattct ataaaactct aagagccgag caagcttcac aagaggtaaa aaattggatg	1740
60	acagaaacct tgttgggtcca aaatgcgaac ccagattgta agactatttt aaaagcattg	1800
	ggaccaggag cgacactaga agaaatgatg acagcatgtc agggagtggg gggacccggc	1860
	cataaagcaa gagttttggc tgaagcaatg agccaagtaa caaatccagc taccataatg	1920
65	atacagaaag gcaatttttag gaaccaaaga aagactgtta agtgtttcaa ttgtggcaaa	1980

ES 2 355 027 A1

	gaagggcaca tagccaaaaa ttgcagggcc cctaggaaaa agggctgttg gaaatgtgga	2040
	aaggaaggac accaaatgaa agattgtact gagagacagg ctaatttttt agggaagatc	2100
5	tggccttccc acaaggggaag gccaggggaat tttcttcaga gcagaccaga gccaacagcc	2160
	ccaccagaag agagcttcag gtttggggaa gagacaacaa ctccctctca gaagcaggag	2220
10	ccgatagaca aggaactgta tccttttagct tccctcagat cactctttgg cagcgacccc	2280
	tcgtcacaat aaagataggg gggcaattaa aggaagctct attagataca ggagcagatg	2340
	atacagtatt agaagaaatg aatttgccag gaagatggaa accaaaaatg atagggggaa	2400
15	ttggagggttt tatcaaagta agacagtatg atcagatact catagaaatc tgcggacata	2460
	aagctatagg tacagtatta gtaggacctt cacctgtcaa cataattgga agaaatctgt	2520
	tgactcagat tggctgcact ttaaattttt ccattagtcc tattgagact gtaccagtaa	2580
20	aattaaagcc aggaatggat ggcccaaaag ttaaacaatg gccattgaca gaagaaaaaa	2640
	taaaagcatt agtagaaatt tgtacagaaa tggaaaagga aggaaaaatt tcaaaaattg	2700
25	ggcctgaaaa tccatacaat actccagtat ttgccataaa gaaaaaagac agtactaaat	2760
	ggagaaaatt agtagatttc agagaactta ataagagaac tcaagatttc tgggaagttc	2820
	aattaggaat accacatcct gcaggggttaa aacagaaaaa atcagtaaca gtactggatg	2880
30	tgggcgatgc atatttttca gttcccttag ataaagactt caggaagtat actgcattta	2940
	ccatacctag tataaacaat gagacaccag ggattagata tcagtacaat gtgcttcac	3000
	agggatggaa aggatcacca gcaatatttc agtgtagcat gacaaaaatc ttagagcctt	3060
35	ttagaaaaca aaatccagac atagtcattt atcaatacat ggatgatttg tatgtaggat	3120
	ctgacttaga aatagggcag catagaacaa aaatagagga actgagacaa catctgttga	3180
40	ggtggggatt taccacacca gacaaaaaac atcagaaaga acctccattc ctttggatgg	3240
	gttatgaact ccatcctgat aaatggacag tacagcctat agtgctgcca gaaaaggaca	3300
	gctggactgt caatgacata cagaaattag tgggaaaatt gaattgggca agtcagattt	3360
45	atgcagggat taaagtaagg caattatgta aacttcttag gggaaccaa gcactaacag	3420
	aagtagtacc actaacagaa gaagcagagc tagaactggc agaaaacagg gagattctaa	3480
	aagaaccggt acatggagtg tattatgacc catcaaaaga ctaatagca gaaatacaga	3540
50	agcaggggca aggccaatgg acatatcaaa tttatcaaga gccatttaaa aatctgaaaa	3600
	caggaaaata tgcaagaatg aagggtgccc acactaatga tgtgaaacaa ttaacagagg	3660
55	cagtacaaaa aatagccaca gaaagcatag taatatgggg aaagactcct aaatttaa	3720
	taccataca aaaggaaaca tgggaagcat ggtggacaga gtattggcaa gccacctgga	3780
	ttcctgagtg ggagtttgtc aatacccctc ccttagtgaa gttatggtac cagttagaga	3840
60	aagaacccat aataggagca gaaactttct atgtagatgg ggcagccaat agggaaacta	3900
	aattaggaaa agcaggatat gtaactgaca gaggaagaca aaaagtgtgc cccctaacgg	3960
65	acacaacaaa tcagaagact gagttacaag caattcatct agctttgcag gattcgggat	4020

ES 2 355 027 A1

	tagaagtaaa	catagtgaca	gactcacaat	atgcattggg	aatcattcaa	gcacaaccag	4080
	ataagagtga	atcagagtta	gtcagtcaaa	taatagagca	gttaataaaa	aaggaaaaag	4140
5	tctacctggc	atgggtacca	gcacacaaaag	gaattggagg	aatgaacaa	gtagataaat	4200
	tggtcagtgc	tggaatcagg	aaagtactat	ttttagatgg	aatagataag	gccaagaag	4260
	aacatgagaa	atatcacagt	aattggagag	caatggctag	tgattttaac	ctaccacctg	4320
10	tagtagcaaa	agaaatagta	gccagctgtg	ataaatgtca	gctaaaaggg	gaagccatgc	4380
	atggacaagt	agactgtagc	ccaggaatat	ggcagctaga	ttgtacacat	ttagaaggaa	4440
15	aagttatctt	ggtagcagtt	catgtagcca	gtggatatat	agaagcagaa	gtaattccag	4500
	cagagacagg	gcaagaaaca	gcatacttcc	tcttaaaatt	agcaggaaga	tggccagtaa	4560
	aaacagtaca	tacagacaat	ggcagcaatt	tcaccagtac	tacagttaag	gccgcctggt	4620
20	ggtgcccggg	gatcaagcag	gaatttggca	ttccctacaa	tcccaaagt	caaggagtaa	4680
	tagaatctat	gaataaagaa	ttaaagaaaa	ttataggaca	ggtaagagat	caggctgaac	4740
	atcttaagac	agcagtacaa	atggcagtat	tcatccacaa	ttttaaaga	aaagggggga	4800
25	ttggggggta	cagtgcaggg	gaaagaatag	tagacataat	agcaacagac	atacaacta	4860
	aagaattaca	aaaacaaatt	acaaaaattc	aaaattttcg	ggtttattac	agggacagca	4920
30	gagatccagt	ttggaaagga	ccagcaaagc	tcctctggaa	aggtgaaggg	gcagtagtaa	4980
	tacaagataa	tagtgacata	aaagtagtgc	caagaagaaa	agcaaagatc	atcagggatt	5040
	atggaaaaca	gatggcaggt	gatgattgtg	tggcaagtag	acaggatgag	gattaacaca	5100
35	tggaaaagat	tagtaaaaca	ccatatgtat	atttcaagga	aagctaagga	ctggttttat	5160
	agacatcact	atgaaagtac	taatccaaaa	ataagttcag	aagtacacat	cccactaggg	5220
	gatgctaaat	tagtaataac	aacatattgg	ggtctgcata	caggagaaaag	agactggcat	5280
40	ttgggtcagg	gagtctccat	agaatggagg	aaaaagagat	atagcacaca	agtagaccct	5340
	gacctagcag	accaactaat	tcattctgcac	tattttgatt	gtttttcaga	atctgctata	5400
45	agaaatacca	tattaggacg	tatagttagt	cctaggtgtg	aatatcaagc	aggacataac	5460
	aaggtaggat	ctctacagta	cttggcacta	gcagcattaa	taaaaccaa	acagataaag	5520
	ccacctttgc	ctagtgttag	gaaactgaca	gaggacagat	ggaacaagcc	ccagaagacc	5580
50	aagggccaca	gagggagcca	tacaatgaat	ggacactaga	gcttttagag	gaacttaaga	5640
	gtgaagctgt	tagacatttt	cctaggatat	ggctccataa	cttaggacaa	catatctatg	5700
55	aaacttacgg	ggatacttgg	gcaggagtgg	aagccataat	aagaattctg	caacaactgc	5760
	tgtttatcca	tttcagaatt	gggtgtcgac	atagcagaat	aggcgttact	cgacagagga	5820
	gagcaagaaa	tggagccagt	agatcctaga	ctagagccct	ggaagcatcc	aggaagtcag	5880
60	cctaaaactg	cttgtagcaa	ttgctattgt	aaaaagtgtt	gctttcattg	ccaagtttgt	5940
	ttcatgacaa	aagccttagg	catctcctat	ggcaggaaga	agcggagaca	gcgacgaaga	6000
	gctcatcaga	acagtcagac	tcattcaagct	tctctatcaa	agcagtaagt	agtacatgta	6060
65	atgcaaccta	taatagtagc	aatagtagca	ttagtagtag	caataataat	agcaatagtt	6120

ES 2 355 027 A1

	gtgtggtcca tagtaatcat agaatatagg aaaatattaa gacaaagaaa aatagacagg	6180
	ttaattgata gactaataga aagagcagaa gacagtggca atgagagtga aggagaagta	6240
5	tcagcacttg tggagatggg ggtggaaatg gggcaccatg ctccttggga tattgatgat	6300
	ctgtagtgct acagaaaaat tgtgggtcac agtctattat ggggtacctg tgtggaagga	6360
10	agcaaccacc actctatitt gtgcatcaga tgctaaagca tatgatacag aggtacataa	6420
	tgtttgggcc acacatgcct gtgtaccac agaccccaac ccacaagaag tagtattggt	6480
	aaatgtgaca gaaaatttta acatgtggaa aaatgacatg gtagaacaga tgcattgagga	6540
15	tataatcagt ttatgggatc aaagcctaaa gccatgtgta aaattaaccc cactctgtgt	6600
	tagtttaaag tgcactgatt tgaagaatga tactaatacc aatagtagta gcgggagaat	6660
	gataatggag aaaggagaga taaaaaactg ctctttcaat atcagcacia gcataagaga	6720
20	taagggtgcag aaagaatatg cattctttta taaacttgat atagtaccaa tagataatac	6780
	cagctatagg ttgataagtt gtaacacctc agtcattaca caggcctgtc caaaggatc	6840
25	ctttgagcca attcccatac attattgtgc cccggctggg tttgcgattc taaaatgtaa	6900
	taataagacg ttcaatggaa caggaccatg tacaatgtc agcacagtac aatgtacaca	6960
	tggaatcagg ccagtagtat caactcaact gctgttaaat ggcagtctag cagaagaaga	7020
30	tgtagtaatt agatctgcc aattcacaga caatgctaaa accataatag tacagctgaa	7080
	cacatctgta gaaattaatt gtacaagacc caacaacaat acaagaaaaa gtatccgtat	7140
	ccagagggga ccagggagag catttgttac aataggaaaa ataggaaata tgagacaagc	7200
35	acattgtaac attagtagag caaatggaa tgccacttta aaacagatag ctagcaaatt	7260
	aagagaacia tttggaaata ataaaacaat aatctttaag caatcctcag gaggggaccc	7320
40	agaaattgta acgcacagtt ttaattgtgg aggggaattt ttctactgta attcaacaca	7380
	actgtttaat agtacttggt ttaatagtag ttggagtact gaagggtcaa ataactga	7440
	aggaagtgc acaatcacac tcccatgcag aataaaacia tttataaaca tgtggcagga	7500
45	agtaggaaaa gcaatgtatg cccctcccat cagtggacia attagatgtt catcaaatat	7560
	tactgggctg ctattaacia gagatggtgg taataacia aatgggtccg agatcttcag	7620
	acctggagga ggcgatatga gggacaattg gagaagtga ttatataaat ataaagtagt	7680
50	aaaaattgaa ccattaggag tagcaccac caaggcaaag agaagagtgg tgcagagaga	7740
	aaaaagagca gtgggaatag gagctttgtt ccttgggttc ttgggagcag caggaagcac	7800
55	tatgggcgca gcgtcaatga cgctgacggg acaggccaga caattattgt ctgatatagt	7860
	gcagcagcag aacaatttgc tgagggttat tgaggcgcaa cagcatctgt tgcaactcac	7920
	agtctggggc atcaaacagc tccaggcaag aatcctggct gtggaaagat acctaaagga	7980
60	tcaacagctc ctggggattt ggggttgctc tggaaaactc atttgacca ctgctgtgcc	8040
	ttggaatgct agttggagta ataaatctct ggaacagatt tggataaaca tgacctggat	8100
65	ggagtgggac agagaaatta acaattacac aagcttaata cactccttaa ttgaagaatc	8160

ES 2 355 027 A1

	gcaaaaccag caagaaaaga atgaacaaga attattggaa ttagataaat gggcaagttt	8220
	gtggaattgg tttacataa caaattggct gtggtatata aaattattca taatgatagt	8280
5	aggaggcttg gtaggtttta gaatagtttt tgctgtactt tctatagtga atagagttag	8340
	gcagggatat tcaccattat cgtttcagac ccacctccca atcccagagg gacccgacag	8400
10	gcccgaagga atagaagaag aaggtggaga gagagacaga gacagatcca ttcgattagt	8460
	gaacggatcc ttagcactta tctgggacga tctgcggagc ctgtgcctct tcagctacca	8520
	ccgcttgaga gacttactct tgattgtaac gaggattgtg gaacttctgg gacgcagggg	8580
15	gtgggaagcc ctcaaattatt ggtggaatct cctacagtat tggagtcagg aactaaagaa	8640
	tagtgctgtt aacttgctca atgccacagc catagcagta gctgagggga cagatagggt	8700
20	tatagaagta ttacaagcag cttatagagc tattcgccac atacctagaa gaataagaca	8760
	gggcttggaaggatttttgc tataagatgg gtggcaagtg gtcaaaaagt agtgtgattg	8820
	gatggcctgc tgtaagggaagaagaatgagac gagctgagcc agcagcagat ggggtgggag	8880
25	cagtatctcg agacctagaa aaacatggag caatcacaaag tagcaataca gcagctaaca	8940
	atgtgcttg tgcttggtca gaagcacaaaggagggaaga ggtgggtttt ccagtcacac	9000
	ctcaggtacc ttttaagacca atgacttaca aggcagctgt agatcttagc cactttttaa	9060
30	aagaaaaggg gggactggaa gggctaattc actcccaaag aagacaagat atccttgatc	9120
	tgtggatcta ccacacacaa ggctacttcc ctgattggca gaactacaca ccagggccag	9180
35	gggtcagata tccactgacc tttggatggg gctacaagct agtaccagtt gagccagata	9240
	aggtagaaga ggccaataaa ggagagaaca ccagcttggt acaccctgtg agcctgcatg	9300
	gaatggatga ccctgagaga gaagtgttag agtggagggt tgacagccgc ctagcatttc	9360
40	atcacgtggc ccgagagctg catccggagt acttcaagaa ctgctgacat cgagcttgct	9420
	acaagggact ttccgctggg gactttccag ggaggcgtgg cctgggcggg actggggagt	9480
45	ggcgagccct cagatgctgc atataagcag ctgctttttg cctgtactgg gtctctctgg	9540
	ttagaccaga tctgagcctg ggagctctct ggctaactag ggaaccact gcttaagcct	9600
	caataaagct tgccttgagt gcttcaagta gtgtgtgccc gtctgttgtg tgactctggt	9660
50	aactagagat ccctcagacc cttttagtca gtgtggaaaa tctctagcac ccccaggag	9720
	gtagagggtg cagttagcca agatcgcgcc actgcattcc agcctgggca agaaaacaag	9780
	actgtctaaa ataataataa taagttaagg gtattaaata tatttataca tggagggtcat	9840
55	aaaaatatat atatttgggc tgggcgcagt ggctcacacc tgcgcccggc cctttgggag	9900
	gccgaggcag gtggatcacc tgagtttggg agttccagac cagcctgacc aacatggaga	9960
60	aaccccttct ctgtgtattt ttagtagatt ttattttatg tgtattttat tcacaggtat	10020
	ttctggaaaa ctgaaactgt tttcctcta ctctgatacc acaagaatca tcagcacaga	10080
	ggaagacttc tgtgatcaaa tgtggtggga gaggagggtt ttcaccagca catgagcagt	10140
65	cagttctgcc gcagactcgg cgggtgtcct tcggttcagt tccaacaccg cctgcctgga	10200
	gagagggtcag accacagggg gaggggtcag tcccaagac ataaacacc aagacataaa	10260

ES 2 355 027 A1

	cacccaacag	gtccacccccg	cctgctgccc	aggcagagcc	gattcaccaa	gacgggaatt	10320
	aggatagaga	aagagtaagt	cacacagagc	cggctgtgcg	ggagaacgga	gttctattat	10380
5	gactcaaadc	agtctcccca	agcattcggg	gatcagagtt	tttaaggata	acttagtgtg	10440
	tagggggcca	gtgagttgga	gatgaaagcg	tagggagtcg	aagggtgcct	tttgcgccga	10500
	gtcagttcct	gggtgggggc	cacaagatcg	gatgagccag	tttatcaatc	cgggggtgcc	10560
10	agctgatcca	tggagtgca	ggcttgcaaa	atatctcaag	cactgattga	tcttaggttt	10620
	tacaatagt	atgttaccac	aggaacaatt	tggggaaggt	cagaatcttg	tagcctgtag	10680
15	ctgcatgact	cctaaacat	aatttctttt	ttgttttttt	ttttttattt	ttgagacagg	10740
	gtctcactct	gtcacctagg	ctggagtgca	gtggtgcaat	cacagctcac	tgagcctca	10800
	acgtcgtgag	ctcaagcgat	cctccacact	cagcctgcct	ggtagctgag	actacaagcg	10860
20	acgccccagt	taatttttgt	atttttggta	gaggcagcgt	tttgccgtgt	ggccctggct	10920
	ggctctgaac	tcctgggctc	aagtgatcca	gcctcagcct	cccaaagtgc	tgggacaacc	10980
	ggggccagtc	actgcacctg	gccctaaacc	ataatttcta	atcttttggc	taatttggtta	11040
25	gtcctacaaa	ggcagtcctag	tccccaggca	aaaagggggg	ttgtttcggg	aaagggctgt	11100
	tactgtcttt	gtttcaaact	ataaactaag	ttctctctaa	acttagttcg	gcctacaccc	11160
30	aggaatgaac	aaggagagct	tggaggttag	aagcacgatg	gaattgggtta	ggcagatct	11220
	ctttcactgt	ctgagttata	attttgcaat	gggtgttcaa	agactgcccg	cttctgacac	11280
	cagtcgctgc	attaatgaat	cggccaacgc	gcggggagag	gcgggttgcg	tattggcgct	11340
35	cttccgcttc	ctcgtcact	gactcgctgc	gctcggtcgt	tcggctgcgg	cgagcgggat	11400
	cagctcactc	aaaggcggta	atacgggtat	ccacagaatc	aggggataac	gcaggaaaga	11460
40	acatgtgagc	aaaaggccag	caaaaggcca	ggaaccgtaa	aaaggccgcg	ttgctggcgt	11520
	ttttccatag	gtcccgcccc	cctgacgagc	atcacaaaaa	tcgacgctca	agtcagaggt	11580
	ggcgaaaccc	gacaggacta	taaagatacc	aggcggttcc	ccctggaagc	tccctcgctg	11640
45	gctctcctgt	tccgaccctg	ccgcttaccg	gatacctgtc	cgcctttctc	ccttcgggaa	11700
	gcgtggcgct	ttctcaatgc	tcacgctgta	ggatatctcag	ttcgggtgtag	gtcgttcgct	11760
	ccaagctggg	ctgtgtgcac	gaaccccccg	ttcagcccga	ccgctgcgcc	ttatccggta	11820
50	actatcgtct	tgagtccaac	ccggtgaagc	acgacttatc	gccactggca	gcagccactg	11880
	gtaacaggat	tagcagagcg	aggtatgtag	gcgggtgctac	agagttcttg	aagtgggtggc	11940
55	ctaactacgg	ctacactaga	aggacagtat	ttggatatctg	cgctctgctg	aagccagtta	12000
	ccttcggaaa	aagagttggg	agctcttgat	ccggcaaaaca	aaccaccgct	ggtagcgggtg	12060
	gtttttttgt	ttgcaagcag	cagattacgc	gcagaaaaaa	aggatctcaa	gaagatcctt	12120
60	tgatcttttc	tacggggtct	gacgctcagt	ggaacgaaaa	ctcacgttaa	gggattttgg	12180
	tcagagagatt	atcaaaaagg	atcttcacct	agatcctttt	aaattaaaaa	tgaagtttta	12240
65	aatcaatcta	aagtatatat	gagtaaaactt	ggctctgacag	ttaccaatgc	ttaatcagtg	12300

ES 2 355 027 A1

	aggcacctat	ctcagcgatc	tgtctatttc	gttcatccat	agttgcctga	ctccccgtcg	12360
	tgtagataac	tacgatacgg	gagggcttac	catctggccc	cagtgtctga	atgataccgc	12420
5	gagacccacg	ctcaccggct	ccagatttat	cagcaataaa	ccagccagcc	ggaagggccg	12480
	agcgcagaag	tggtcctgca	actttatccg	cctccatcca	gtctattaat	tgttgccggg	12540
	aagctagagt	aagtagttcg	ccagttaata	gtttgcgcaa	cgttgttgcc	attgctacag	12600
10	gcatcgtggt	gtcacgctcg	tcgtttggta	tggcttcatt	cagctccggg	tcccaacgat	12660
	caaggcgagt	tacatgatcc	cccatgttgt	gcaaaaaagc	ggttagctcc	ttcggtcctc	12720
	cgatcgttgt	cagaagtaag	ttggccgcag	tgttatcact	catggttatg	gcagcactgc	12780
15	ataattctct	tactgtcatg	ccatccgtaa	gatgcttttc	tgtgactggg	gagtactcaa	12840
	ccaagtcatt	ctgagaatag	tgtatgcggc	gaccgagttg	ctcttgcccg	gcgtcaatac	12900
20	gggataatac	cgcgccacat	agcagaactt	taaaagtgct	catcattgga	aaacgttctt	12960
	cggggcgaaa	actctcaagg	atcttaccgc	tgttgagatc	cagttcgatg	taaccactc	13020
	gtgcacccaa	ctgatcttca	gcatctttta	ctttcaccag	cgtttctggg	tgagcaaaaa	13080
25	caggaaggca	aaatgccgca	aaaaagggaa	taagggcgac	acggaaatgt	tgaatactca	13140
	tactcttcct	ttttcaatat	tattgaagca	tttatcaggg	ttattgtctc	atgagcggat	13200
30	acatatttga	atgtattttag	aaaaataaac	aaataggggt	tccgcgcaca	tttccccgaa	13260
	aagtgccacc	tgacgtctaa	gaaaccatta	ttatcatgac	attaacctat	aaaaataggc	13320
	gtatcacgag	gccctttcgt	cttcaagaac	tgccctcgcg	gtttcgggtga	tgacggtgaa	13380
35	aacctctgac	acatgcagct	cccggagacg	gtcacagctt	gtctgtaagc	ggatgccggg	13440
	agcagacaag	cccgtcaggg	cgcgtcagcg	ggtgttgggc	ggtgtcgggg	cgcagccatg	13500
	accagtcac	gtagcgatag	cggagtgtac	tggcttaact	atgcggcatc	agagcagatt	13560
40	gtactgagag	tgacccatat	gcggtgtgaa	ataccgcaca	gatgcgtaag	gagaaaatac	13620
	cgcatcaggc	gccattcgcc	attcaggctg	cgcaactgtt	gggaagggcg	atcgggtcgg	13680
45	gcctcttcgc	tattacgcca	gcgcggggag	gcagagattg	cagtaagctg	agatcgcagc	13740
	actgcactcc	agcctggggc	acagagtaag	actctgtctc	aaaaataaaa	taaataaatc	13800
	aatcagatat	tccaatcttt	tcctttattt	atttatttat	tttctatttt	ggaaacacag	13860
50	tccttcctta	ttccagaatt	acacatatat	tctatttttc	tttatatgct	ccagtttttt	13920
	ttagaccttc	acctgaaatg	tgtgtataca	aaatctaggc	cagtccagca	gagcctaaag	13980
55	gtaaaaaata	aaataataaa	aaataaataa	aatctagctc	actccttcac	atcaaaatgg	14040
	agatacagct	gttagcatta	aataccaaat	aacctatctt	gtcctcaata	attttaagcg	14100
	cctctctcca	ccacatctaa	ctcctgtcaa	aggcatgtgc	cccttccggg	cgctctgctg	14160
60	tgctgccaac	caactggcat	gtggactctg	cagggtcctt	aactgccaag	ccccacagtg	14220
	tgccctgagg	ctgccccttc	cttctagcgg	ctgccccac	tcggctttgc	tttccctagt	14280
	ttcagttact	tgcgttcagc	caaggctctga	aactaggtgc	gcacagagcg	gtaagactgc	14340
65	gagagaaaga	gaccagcttt	acaggggggt	tatcacagtg	caccctgaca	gtcgtcagcc	14400

ES 2 355 027 A1

	tcacaggggg	tttatcacat	tgcaccctga	cagtcgtcag	cctcacaggg	ggtttatcac	14460
	agtgcaccct	tacaatcatt	ccatttgatt	cacaattttt	ttagtctcta	ctgtgcctaa	14520
5	cttgtaagtt	aaatttgatc	agaggtgtgt	tcccagaggg	gaaaacagta	tatacaggg	14580
	tcagtactat	cgcatttcag	gcctccacct	gggtcttgga	atgtgtcccc	cgaggggtga	14640
	tgactacctc	agttggatct	ccacaggtca	cagtgcacaca	agataaccaa	gacacctccc	14700
10	aaggctacca	caatgggccg	ccctccacgt	gcacatggcc	ggaggaactg	ccatgtcgga	14760
	ggtgcaagca	cacctgcgca	tcagagtcct	tggtgtggag	ggagggacca	gcgcagcttc	14820
15	cagccatcca	cctgatgaac	agaacctagg	gaaagcccca	gttctactta	caccaggaaa	14880
	ggc						14883
	<210> 4						
20	<211> 14883						
	<212> DNA						
	<213> Secuencia artificial						
25	<220> misc_recomb						
	<223> p4696						
	<400> 4						
30	tggaagggct	aatttggtcc	caaaaaagac	aagagatcct	tgatctgtgg	atctaccaca	60
	cacaaggcta	cttccctgat	tggcagaact	acacaccagg	gccagggatc	agatatccac	120
35	tgacctttgg	atgggtgcttc	aagtttagtac	cagttgaacc	agagcaagta	gaagaggcca	180
	aataaggaga	gaagaacagc	ttgttacacc	ctatgagcca	gcatgggatg	gaggaccg	240
	agggagaagt	attagtgtgg	aagtttgaca	gcctcctagc	atttcgtcac	atggcccgag	300
40	agctgcatcc	ggagtactac	aaagactgct	gacatcgagc	tttctacaag	ggactttccg	360
	ctggggactt	tccagggagg	tgtggcctgg	gcgggactgg	ggagtggcga	gccctcagat	420
	gctacatata	agcagctgct	ttttgcctgt	actgggtctc	tctgggttaga	ccagatctga	480
45	gcctgggagc	tctctggcta	actaggggaa	ccactgctta	agcctcaata	aagcttgctc	540
	tgagtgtctca	aagtagtgtg	tgcccgctctg	ttgtgtgact	ctggtaacta	gagatccctc	600
50	agaccctttt	agtcagtgtg	gaaaatctct	agcagtggcg	cccgaacagg	gacttgaaag	660
	cgaaagtaaa	gccagaggag	atctctcgac	gcaggactcg	gcttgctgaa	gcgcgcacgg	720
	caagaggcga	ggggcggcga	ctggtgagta	cgccaaaaat	tttgactagc	ggaggctaga	780
55	aggagagaga	tgggtgctgag	agcgtcggta	ttaagcgggg	gagaattaga	taaatgggaa	840
	aaaattcggt	taaggccagg	gggaaagaaa	caatataaac	taaaacatat	agtatgggca	900
60	agcagggagc	tagaacgatt	cgcagttaat	cctggccttt	tagagacatc	agaaggctgt	960
	agacaaatac	tgggacagct	acaacctatc	cttcagacag	gatcagaaga	acttagatca	1020
	ttatataata	caatagcagt	cctctattgt	gtgcatcaaa	ggatagatgt	aaaagacacc	1080
65	aaggaagcct	tagataagat	agaggaagag	caaaacaaaa	gtaagaaaaa	ggcacagcaa	1140
	gcagcagctg	acacaggaaa	caacagccag	gtcagccaaa	attaccctat	agtgcagaac	1200

ES 2 355 027 A1

	ctccaggggc	aaatggtaca	tcaggccata	tcacctagaa	ctttaaatgc	atgggtaaaa	1260
	gtagtagaag	agaaggcttt	cagcccagaa	gtaataccca	tgttttcagc	attatcagaa	1320
5	ggagccaccc	cacaagattt	aaataccatg	ctaaacacag	tggggggaca	tcaagcagcc	1380
	atgcaaattgt	taaaagagac	catcaatgag	gaagctgcag	aatgggatag	attgcatcca	1440
	gtgcatgcag	ggcctattgc	accaggccag	atgagagaac	caaggggaag	tgacatagca	1500
10	ggaactacta	gtacccttca	ggaacaaata	ggatggatga	cacataatcc	acctatccca	1560
	gtaggagaaa	tctataaaaag	atggataatc	ctgggattaa	ataaaaatag	aagaatgtat	1620
	agccctacca	gcatttctgga	cataagacaa	ggaccaaaag	aacccttttag	agactatgta	1680
15	gaccgattct	ataaaactct	aagagccgag	caagcttcac	aagaggtaaa	aaattggatg	1740
	acagaaacct	tgttggtcca	aaatgcgaac	ccagattgta	agactatttt	aaaagcattg	1800
20	ggaccaggag	cgacactaga	agaaatgatg	acagcatgtc	agggagtggg	gggacccggc	1860
	cataaagcaa	gagttttggc	tgaagcaatg	agccaagtaa	caaattccagc	taccataatg	1920
	atacagaaaag	gcaatttttag	gaaccaaaga	aagactgtta	agtgtttcaa	ttgtggcaaa	1980
25	gaagggcaca	tagccaaaaa	ttgcagggcc	cctaggaaaa	agggtgttg	gaaatgtgga	2040
	aaggaaggac	accaaataga	agattgtact	gagagacagg	ctaatttttt	aggggaagatc	2100
30	tggccttccc	acaaggggaag	gccaggggaat	tttcttcaga	gcagaccaga	gccaacagcc	2160
	ccaccagaag	agagcttcag	gtttggggaa	gagacaacaa	ctccctctca	gaagcaggag	2220
	ccgatagaca	aggaactgta	tccttttagct	tccctcagat	cactcttttg	cagcgacccc	2280
35	tcgtcacaat	aaagataggg	gggcaattaa	aggaagctct	attagataca	ggagcagatg	2340
	atacagtatt	agaagaaatg	aatttgccag	gaagatggaa	acaaaaaatg	atagggggaa	2400
	ttggagggtt	tatcaaagta	agacagtatg	atcagatact	catagaaatc	tgcgacata	2460
40	aagctatagg	tacagtatta	gtaggacct	cacctgtcaa	cataattgga	agaaatctgt	2520
	tgactcagat	tggctgcact	ttaaattttc	ccattagtcc	tattgagact	gtaccagtaa	2580
45	aattaaagcc	aggaatggat	ggcccaaaaag	ttaaacaatg	gccattgaca	gaagaaaaaa	2640
	taaaagcatt	agtagaaatt	tgtacagaaa	tggaaaagga	aggaaaaatt	tcaaaaattg	2700
	ggcctgaaaa	tccatacaat	actccagtat	ttgccataaa	gaaaaaagac	agtactaaat	2760
50	ggagaaaatt	agtagatttc	agagaactta	ataagagaac	tcaagatttc	tggaagttc	2820
	aattaggaat	accacatcct	gcagggttaa	aacagaaaaa	atcagtaaca	gtactggatg	2880
55	tgggcgatgc	atatttttca	gttcccttag	ataaagactt	caggaagtat	actgcattta	2940
	ccatacctag	tataaacaat	gagacaccag	ggattagata	tcagtacaat	gtgcttcac	3000
	agggatggaa	aggatcacca	gcaatattcc	agtgtagcat	gacaaaaatc	ttagagcctt	3060
60	ttagaaaaca	aaatccagac	atagtcatct	atcaatacat	ggatgatttg	tatgtaggat	3120
	ctgacttaga	aatagggcag	catagaacaa	aaatagagga	actgagacaa	catctgttga	3180
	ggtggggatt	taccacacca	gacaaaaaac	atcagaaaga	acctccattc	ctttggatgg	3240
65	gttatgaact	ccatcctgat	aaatggacag	tacagcctat	agtgctgcca	gaaaaggaca	3300

ES 2 355 027 A1

	gctggactgt	caatgacata	cagaaattag	tgggaaaatt	gaattgggca	agtcagattt	3360
	atgcagggat	taaagtaagg	caattatgta	aacttcttag	gggaaccaa	gcactaacag	3420
5	aagtagtacc	actaacagaa	gaagcagagc	tagaactggc	agaaaacagg	gagattctaa	3480
	aagaaccggt	acatggagtg	tattatgacc	catcaaaaga	cttaatagca	gaaatacaga	3540
	agcaggggca	aggccaatgg	acatatcaaa	tttatcaaga	gccatttaaa	aatctgaaaa	3600
10	caggaaaata	tgcaagaatg	aaggggtgcc	acactaatga	tgtgaaacaa	ttaacagagg	3660
	cagtacaaaa	aatagccaca	gaaagcatag	taatattggg	aaagactcct	aaatttaaat	3720
15	taccataca	aaaggaaaca	tgggaagcat	ggtggacaga	gtattggcaa	gccacctgga	3780
	ttcctgagtg	ggagtttgtc	aatacccctc	ccttagtgaa	gttatggtac	cagttagaga	3840
	aagaacccat	aataggagca	gaaactttct	atgtagatgg	ggcagccaat	agggaaacta	3900
20	aattaggaaa	agcaggatat	gtaactgaca	gaggaagaca	aaaagttgtc	cccctaacgg	3960
	acacaacaaa	tcagaagact	gagttacaag	caattcatct	agctttgcag	gattcgggat	4020
25	tagaagtaaa	catagtgaca	gactcacaat	atgcattggg	aatcattcaa	gcacaaccag	4080
	ataagagtga	atcagagtta	gtcagtcaaa	taatagagca	gttaataaaa	aaggaaaaag	4140
	tctacctggc	atgggtacca	gcacacaaag	gaattggagg	aaatgaacaa	gtagataaat	4200
30	tgggtcagtg	tggaatcagg	aaagtactat	ttttagatgg	aatagataag	gccaagaag	4260
	aacatgagaa	atatcacagt	aattggagag	caatggctag	tgattttaac	ctaccacctg	4320
	tagtagcaaa	agaaatagta	gccagctgtg	ataaatgtca	gctaaaaggg	gaagccatgc	4380
35	atggacaagt	agactgtagc	ccaggaatat	ggcagctaga	ttgtacacat	ttagaaggaa	4440
	aagttatctt	ggtagcagtt	catgtagcca	gtggatatat	agaagcagaa	gtaattccag	4500
40	cagagacagg	gcaagaaaca	gcatacttcc	tcttaaaatt	agcaggaaga	tggccagtaa	4560
	aaacagtaca	tacagacaat	ggcagcaatt	tcaccagtac	tacagttaag	gccgcctggt	4620
	ggtgggcggg	gatcaagcag	gaatttgcca	ttccctacaa	tcccaaag	caaggagtaa	4680
45	tagaatcgat	gaataaagaa	ttaaagaaaa	ttataggaca	ggtaagagat	caggctgaac	4740
	atcttaagac	agcagtacaa	atggcagtat	tcatccacaa	ttttaaaga	aaagggggga	4800
	ttggggggta	cagtgcaggg	gaaac .atag	tagacataat	agcaacagac	atacaacta	4860
50	aagaattaca	aaaacaaatt	acaaaaattc	aaaattttcg	ggtttattac	agggacagca	4920
	gagatccagt	ttggaaagga	ccagcaaagc	tcctctggaa	aggtgaaggg	gcagtagtaa	4980
55	tacaagataa	tagtgacata	aaagtagtgc	caagaagaaa	agcaaagatc	atcagggatt	5040
	atggaaaaca	gatggcaggt	gatgattgtg	tggcaagtag	acaggatgag	gattaacaca	5100
	tggaaaagat	tagtaaaaca	ccatatgtat	atttcaagga	aagctaagga	ctggttttat	5160
60	agacatcact	atgaaagtac	taatccaaaa	ataagttcag	aagtacacat	cccactaggg	5220
	gatgctaaat	tagtaataac	aacatattgg	ggtctgcata	caggagaaag	agactggcat	5280
65	ttgggtcagg	gagtctccat	agaatggagg	aaaaagagat	atagcacaca	agtagaccct	5340

ES 2 355 027 A1

	gacctagcag	accaactaat	tcattctgcac	tatttttgatt	gtttttcaga	atctgctata	5400
	agaaatacca	tattaggacg	tatagttagt	cctagggtgtg	aatatcaagc	aggacataac	5460
5	aaggtaggat	ctctacagta	cttggcacta	gcagcattaa	taaaaccaa	acagataaag	5520
	ccacctttgc	ctagtgttag	gaaactgaca	gaggacagat	ggaacaagcc	ccagaagacc	5580
	aagggccaca	gagggagcca	tacaatgaat	ggacactaga	gcttttagag	gaacttaaga	5640
10	gtgaagctgt	tagacatttt	cctaggatat	ggctccataa	cttaggacaa	catatctatg	5700
	aaacttacgg	ggatacttgg	gcaggagtgg	aagccataat	aagaattctg	caacaactgc	5760
15	tgtttatcca	tttcagaatt	gggtgtcgac	atagcagaat	aggcgttact	cgacagagga	5820
	gagcaagaaa	tggagccagt	agatcctaga	ctagagccct	ggaagcatcc	aggaagtcag	5880
	cctaaaactg	cttgtacca	ttgctattgt	aaaaagtgtt	gctttcattg	ccaagtttgt	5940
20	ttcatgacaa	aagccttagg	catctcctat	ggcaggaaga	agcggagaca	gcgacgaaga	6000
	gctcatcaga	acagtcagac	tcattcaagct	tctctatcaa	agcagtaagt	agtacatgta	6060
25	atgcaacctt	taatatagtc	aatagtagca	ttagtagtag	caataataat	agcaatagtt	6120
	gtgtggtcca	tagtaatcat	agaatatagg	aaaatattaa	gacaaagaaa	aatagacagg	6180
	ttaattgata	gactaataga	aagagcagaa	gacagtggca	atgagagtga	aggagaagta	6240
30	tcagcacttg	tggagatggg	ggtggaaatg	gggcaccatg	ctccttgga	tattgatgat	6300
	ctgtagtgct	acagaaaaat	tgtgggtcac	agtctattat	ggggtacctg	tgtggaagga	6360
	agcaaccacc	actctatttt	gtgcatcaga	tgctaaagca	tatgatacag	aggtagataa	6420
35	tgtttgggcc	acacatgcct	gtgtaccac	agacccaac	ccacaagaag	tagtattggt	6480
	aaatgtgaca	gaaaatttta	acatgtggaa	aaatgacatg	gtagaacaga	tgcattgagga	6540
40	tataatcagt	ttatgggatc	aaagcctaaa	gccatgtgta	aaattaacc	cactctgtgt	6600
	tagtttaaag	tgcactgatt	tgaagaatga	tactaatacc	aatagtagta	gcgggagaat	6660
	gataatggag	aaaggagaga	taaaaaactg	ctctttcaat	atcagacaa	gcataagaga	6720
45	taagggtgcag	aaagaatatg	cattctttta	taaacttgat	atagtacaa	tagataatac	6780
	cagctatagg	ttgataagtt	gtaacacctc	agtcattaca	caggcctgtc	caaaggatc	6840
	ctttgagcca	attcccatc	attattgtgc	cccggctggt	tttgcgattc	taaaatgtaa	6900
50	taataagacg	ttcaatggaa	caggaccatg	tacaaatgtc	agcacagtac	aatgtacaca	6960
	tggaaatcagg	ccagtagtat	caactcaact	gctgttaa	ggcagtctag	cagaagaaga	7020
55	tgtagtaatt	agatctgcc	atttcacaga	caatgctaaa	accataatag	tacagctgaa	7080
	cacatctgta	gaaattaatt	gtacaagacc	caacaacaat	acaagaaaa	gtatccgtat	7140
	ccagagggga	ccaggagag	catttggttac	aataggaaaa	ataggaaata	tgagacaagc	7200
60	acattgtaac	attagtagag	caaatggaa	tgccacttta	aaacagatag	ctagcaaatt	7260
	aagagaacaa	tttggaaata	ataaaacaat	aatctttaag	caatcctcag	gaggggaccc	7320
	agaaattgta	acgcacagtt	ttaattgtgg	aggggaattt	ttctactgta	attcaacaca	7380
65	actgtttaat	agtacttggt	ttaatagtac	ttggagtact	gaagggtcaa	ataaactga	7440

ES 2 355 027 A1

	aggaagtgac	acaatcacac	tcccatgcag	aataaaacaa	tttataaaca	tgtggcagga	7500
	agtaggaaaa	gcaatgtatg	cccctcccat	cagtggacaa	attagatgtt	catcaaatat	7560
5	tactgggctg	ctattaacaa	gagatggttg	taataacaac	aatgggtccg	agatcttcag	7620
	acctggagga	ggcgatatga	gggacaattg	gagaagtga	ttatataaat	ataaagtagt	7680
10	aaaaattgaa	ccattaggag	tagcaccac	caaggcaaag	agaagagtgg	tgagagaga	7740
	aaaaagagca	gtgggaatag	gagctttgtt	ccttgggttc	ttgggagcag	caggaagcac	7800
	tatgggcgca	gcgtaaatga	cgctgacggt	acaggccaga	caattattgt	ctgatatagt	7860
15	gcagcagcag	aacaatttgc	tgagggctat	tgaggcgcaa	cagcatctgt	tgcaactcac	7920
	agtctggggc	atcaaacagc	tccaggcaag	aatcctggct	gtggaaagat	acctaaagga	7980
	tcaacagctc	ctggggattt	ggggttgctc	tggaaaactc	atttgcacca	ctgctgtgcc	8040
20	ttggaatgct	agttggagta	ataaatctct	ggaacagatt	tggaataaca	tgacctggat	8100
	ggagtgggac	agagaaatta	acaattacac	aagcttaata	cactccttaa	ttgaagaatc	8160
25	gcaaaaccag	caagaaaaga	atgaacaaga	attattggaa	ttagataaat	gggcaagttt	8220
	gtggaattgg	tttaacataa	caaattggct	gtggtatata	aaattattca	taatgatagt	8280
	aggaggcttg	gtaggtttaa	gaatagtttt	tgctgtactt	tctatagtga	atagagttag	8340
30	gcagggatat	tcaccattat	cgtttcagac	ccacctccca	atcccaggagg	gacccgacag	8400
	gcccgaagga	atagaagaag	aagggtggaga	gagagacaga	gacagatcca	ttcgattagt	8460
	gaacggatcc	ttagcactta	tctgggacga	tctgcggagc	ctgtgcctct	tcagctacca	8520
35	ccgcttgaga	gacttactct	tgattgtaac	gaggattgtg	gaacttctgg	gacgcagggg	8580
	gtgggaagcc	ctcaaataat	ggtggaatct	cctacagtat	tggagtcagg	aactaaagaa	8640
40	tagtgctgtt	aacttgctca	atgccacagc	catagcagta	gctgagggga	cagatagggt	8700
	tatagaagta	ttacaagcag	cttatagagc	tattcgccac	atacctagaa	gaataagaca	8760
	gggcttgga	aggattttgc	tataagatgg	gtggcaagtg	gtcaaaaagt	agtgtgattg	8820
45	gatggcctgc	tgtaagggaa	agaatgagac	gagctgagcc	agcagcagat	ggggtgggag	8880
	cagtatctcg	agacctagaa	aaacatggag	caatcacaag	tagcaataca	gcagctaaca	8940
50	atgctgcttg	tgcttggtta	gaagcacaag	aggaggaaga	ggtgggtttt	ccagtcacac	9000
	ctcaggtacc	tttaagacca	atgacttaca	aggcagctgt	agatcttagc	cactttttaa	9060
	aagaaaaggg	gggactggaa	gggctaattc	actcccaaag	aagacaagat	atccttgatc	9120
55	tgtggatcta	ccacacacaa	ggctacttcc	ctgattggca	gaactacaca	ccagggccag	9180
	gggtcagata	tccactgacc	tttgatggt	gctacaagct	agtaccagtt	gagccagata	9240
	aggtagaaga	ggccaataaa	ggagagaaca	ccagcttggt	acaccctgtg	agcctgcatg	9300
60	gaatggatga	ccctgagaga	gaagtgttag	agtggagggt	tgacagccgc	ctagcatttc	9360
	atcacgtggc	ccgagagctg	catccggagt	acttcaagaa	ctgctgacat	cgagcttgct	9420
65	acaagggact	ttccgctggg	gactttccag	ggaggcggtg	cctgggcggg	actggggagt	9480

ES 2 355 027 A1

	ggcgagccct	cagatgctgc	atataagcag	ctgctttttg	cctgtactgg	gtctctctgg	9540
	ttagaccaga	tctgagcctg	ggagctctct	ggctaactag	ggaaccact	gcttaagcct	9600
5	caataaagct	tgcttgagt	gcttcaagta	gtgtgtgccc	gtctgttggt	tgactctggt	9660
	aactagagat	ccctcagacc	cttttagtca	gtgtggaaaa	tctctagcac	ccccaggag	9720
10	gtagagggtt	cagttagcca	agatcgcgcc	actgcattcc	agcctgggca	agaaaacaag	9780
	actgtctaaa	ataataataa	taagttaagg	gtattaaata	tatttataca	tggagggtcat	9840
	aaaaatatat	atatttgggc	tgggcgcagt	ggctcacacc	tgcgcccgcc	cctttgggag	9900
15	gccgaggcag	gtggatcacc	tgagtttggg	agttccagac	cagcctgacc	aacatggaga	9960
	aaccccttct	ctgtgtattt	ttagtagatt	ttattttatg	tgtattttat	tcacagggtat	10020
20	ttctggaaaa	ctgaaactgt	ttttcctcta	ctctgatacc	acaagaatca	tcagcacaga	10080
	ggaagacttc	tgtgatcaaa	tgtggtggga	gagggagggt	ttcaccagca	catgagcagt	10140
	cagttctgcc	gcagactcgg	cgggtgtcct	tcggttcagt	tccaacaccg	cctgcctgga	10200
25	gagaggtcag	accacagggt	gagggctcag	tccccaagac	ataaacaccc	aagacataaa	10260
	caccaaacag	gtccaccccc	cctgctgccc	aggcagagcc	gattcaccaa	gacgggaatt	10320
	aggatagaga	aagagtaagt	cacacagagc	cggctgtgcg	ggagaacgga	gttctattat	10380
30	gactcaaadc	agtctcccca	agcattcggg	gatcagagtt	tttaaggata	acttagtggt	10440
	tagggggcca	gtgagttgga	gatgaaagcg	tagggagtcg	aagggtgcct	tttgcccgga	10500
35	gtcagttcct	gggtgggggc	cacaagatcg	gatgagccag	tttatcaatc	cgggggtgcc	10560
	agctgatcca	tggagtgcag	ggtctgcaaa	atatctcaag	cactgattga	tcttaggttt	10620
	tacaatagtg	atgttacccc	aggaacaatt	tggggaaggt	cagaatcttg	tagcctgtag	10680
40	ctgcatgact	cctaaacccat	aatttctttt	ttgttttttt	ttttttat	ttgagacagg	10740
	gtctcactct	gtcacctagg	ctggagtgc	gtggtgcaat	cacagctcac	tgcagcctca	10800
	acgtcgtaag	ctcaagcgat	cctccaccc	cagcctgcct	ggtagctgag	actacaagcg	10860
45	acgccccagt	taatttttgt	atttttggta	gagggcagcg	tttgccgtgt	ggccctggct	10920
	ggtctcgaac	tcctgggctc	aagtgatcca	gcctcagcct	cccaaagtgc	tgggacaacc	10980
50	ggggccagtc	actgcacctg	gccctaaacc	ataatttcta	atcttttggc	taatttggtta	11040
	gtcctacaaa	ggcagtctag	tccccaggca	aaaagggggg	ttgtttcggg	aaagggctgt	11100
	tactgtcttt	gtttcaaaact	ataaactaag	ttcctcctaa	acttagttcg	gcctacaccc	11160
55	aggaatgaac	aaggagagct	tggagggttag	aagcacgatg	gaattgggtta	ggtcagatct	11220
	ctttcactgt	ctgagttata	attttgcaat	ggtggttcaa	agactgccc	cttctgacac	11280
	cagtcgctgc	attaatgaat	cggccaacgc	gcggggagag	gcggtttgcg	tattggcgct	11340
60	cttccgcttc	ctcgctcact	gactcgctgc	gctcggtcgt	tcggctgcgg	cgagcggtat	11400
	cagctcactc	aaaggcggtta	atacgggttat	ccacagaatc	aggggataac	gcaggaaaga	11460
65	acatgtgagc	aaaaggccag	caaaaggcca	ggaaccgtaa	aaaggccgcg	ttgctggcgt	11520
	ttttccatag	gctccgcccc	cctgacgagc	atcacaaaaa	tcgacgctca	agtcagaggt	11580

ES 2 355 027 A1

	ggcgaaaccc	gacaggacta	taaagatacc	aggcgtttcc	ccctggaagc	tccctcgtgc	11640
	gctctcctgt	tccgaccctg	ccgcttaccg	gatacctgtc	cgcccttctc	ccttcgggaa	11700
5	gcgtggcgct	ttctcaatgc	tcacgctgta	ggatatctcag	ttcggtgtag	gtcgttcgct	11760
	ccaagctggg	ctgtgtgcac	gaaccccccg	ttcagcccga	ccgctgcgcc	ttatccggta	11820
	actatcgtct	tgagtccaac	ccggtaagac	acgacttatc	gccactggca	gcagccactg	11880
10	gtaacaggat	tagcagagcg	aggtatgtag	gcggtgctac	agagtcttg	aagtgggtggc	11940
	ctaactacgg	ctacactaga	aggacagtat	ttggatatctg	cgctctgctg	aagccagtta	12000
15	ccttcggaaa	aagagttggt	agctcttgat	ccggcaaaca	aaccaccgct	ggtagcgggtg	12060
	gtttttttgt	ttgcaagcag	cagattacgc	gcagaaaaaa	aggatctcaa	gaagatcctt	12120
	tgatcttttc	tacggggtct	gacgctcagt	ggaacgaaaa	ctcacgttaa	gggatttttg	12180
20	tcatgagatt	atcaaaaagg	atcttcacct	agatccctttt	aaattaaaaa	tgaagtttta	12240
	aatcaatcta	aagtatatat	gagtaaaactt	ggcttgacag	ttaccaatgc	ttaatcagtg	12300
25	aggcacctat	ctcagcgatc	tgtctatttc	gttcatccat	agttgcctga	ctccccgtcg	12360
	tgtagataac	tacgatacgg	gagggcttac	catctggccc	cagtgcctgca	atgataccgc	12420
	gagaccacag	ctcaccggct	ccagatttat	cagcaataaa	ccagccagcc	ggaagggccg	12480
30	agcgcagaag	tggtcctgca	actttatccg	cctccatcca	gtctattaat	tggtgccggg	12540
	aagctagagt	aagtagttcg	ccagttaata	gtttgcgcaa	cgttgttgcc	attgctacag	12600
	gcatcggtgt	gtcacgctcg	tcgtttggta	tggcttcatt	cagctccggt	tcccaacgat	12660
35	caaggcgagt	tacatgatcc	cccatgttgt	gcaaaaaagc	ggttagctcc	ttcggtcctc	12720
	cgatcgttgt	cagaagtaag	ttggccgcag	tggtatcact	catggttatg	gcagcactgc	12780
40	ataattctct	tactgtcatg	ccatccgtaa	gatgcttttc	tgtgactggt	gagtactcaa	12840
	ccaagtcatt	ctgagaatag	tgtatgcggc	gaccgagttg	ctcttgcccg	gcgtcaatac	12900
	gggataatac	cgcgccacat	agcagaactt	taaaagtgtc	catcattgga	aaacgttctt	12960
45	cggggcgaaa	actctcaagg	atcttaccgc	tggttgagatc	cagttcgatg	taaccctactc	13020
	gtgcacccaa	ctgatcttca	gcatctttta	ctttcaccag	cgtttctggg	tgagcaaaaa	13080
	caggaaggca	aaatgccgca	aaaaagggaa	taagggcgac	acggaaatgt	tgaataactca	13140
50	tactcttcct	ttttcaatat	tattgaagca	tttatcaggg	ttattgtctc	atgagcggat	13200
	acatatattga	atgtattttg	aaaaataaac	aaataggggt	tccgcgacac	tttccccgaa	13260
55	aagtgccacc	tgacgtctaa	gaaaccatta	ttatcatgac	attaacctat	aaaaataggc	13320
	gtatcacgag	gccctttcgt	cttcaagaac	tgctcgcgc	gtttcgggtga	tgacgggtgaa	13380
	aacctctgac	acatgcagct	cccggagacg	gtcacagctt	gtctgtaagc	ggatgccggg	13440
60	agcagacaag	cccgtcaggg	cgcgtcagcg	gggtgttgccg	gggtgcgggg	cgagcccatg	13500
	accagtcac	gtagcgatag	cggagtgtac	tggcttaact	atgcggcatc	agagcagatt	13560
65	gtactgagag	tgcaccatat	gcggtgtgaa	ataccgcaca	gatgcgtaag	gagaaaatac	13620

ES 2 355 027 A1

cgcatcaggc gccattcgcc attcaggctg cgcaactgtt gggaagggcg atcgggtgcgg 13680
 gcctcttcgc tattacgcca gcgcggggag gcagagattg cagtaagctg agatcgcagc 13740
 5 actgcactcc agcctgggag acagagtaag actctgtctc aaaaataaaa taaataaatc 13800
 aatcagatat tccaatcttt tcctttatatt atttatattt tttctatttt ggaaacacag 13860
 tccttcctta ttccagaatt acacatatat tctatttttc tttatatgct ccagtttttt 13920
 10 ttagaccttc acctgaaatg tgtgtataca aaatctaggc cagtccagca gagcctaaag 13980
 gtaaaaaata aaataataaa aaataaataa aatctagctc actccttcac atcaaaatgg 14040
 15 agatacagct gttagcatta aataccaaat aaccatctt gtcctcaata attttaagcg 14100
 cctctctcca ccacatctaa ctctgtcaa aggcattgtc cccttccggg cgctctgctg 14160
 tgctgccaac caactggcat gtggactctg cagggtccct aactgccaag cccacagtg 14220
 20 tgccctgagg ctgccccttc cttctagcgg ctgccccac tcggctttgc tttccctagt 14280
 tttagttact tgcgttcagc caaggtctga aactaggtgc gcacagagcg gtaagactgc 14340
 gagagaaaga gaccagcttt acaggggggt tatcacagtg caccctgaca gtcgtcagcc 14400
 25 tcacaggggg tttatcacat tgcaccctga cagtcgtcag cctcacaggg ggtttatcac 14460
 agtgcaccct tacaatcatt ccatttgatt cacaattttt ttagtctcta ctgtgcctaa 14520
 30 cttgtaagtt aaatttgatc agaggtgtgt tcccagaggg gaaaacagta tatacagggt 14580
 tcagtactat cgcatctcag gcctccacct gggctcttga atgtgtcccc cgaggggtga 14640
 tgactacctc agttggatct ccacaggtca cagtgcacac agataaccaa gacacctccc 14700
 35 aaggctacca caatgggccc ccctccacgt gcacatggcc ggaggaactg ccatgtcgga 14760
 ggtgcaagca cacctgcgca tcagagtcct tgggtgtggag ggagggacca gcgcagcttc 14820
 40 cagccatcca cctgatgaac agaacctagg gaaagcccca gttctactta caccaggaaa 14880
 ggc 14883

45 <210> 5
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> virus de la inmunodeficiencia humana
 50 <400> 5

55 tccacctatc ccagtaagga gaa 23

<210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 60 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana
 <400> 6

65 cttcctgcca taggagatgc 20

ES 2 355 027 A1

	<210> 7		
	<211> 22		
	<212> DNA		
5	<213> Secuencia artificial		
	<220> primer_bind		
	<223> Usado en la mutagénesis directa		
10	<400> 7		
15	gggccttatc gattccatct aa	22	
	<210> 8		
	<211> 20		
20	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
	<220> primer_bind		
25	<223> Usado en la mutagénesis directa		
	<400> 8		
30	catattcccg ggctacagtc	20	
	<210> 9		
35	<211> 24		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
40	<220> primer_bind		
	<223> Usado en la mutagénesis directa		
	<400> 9		
45	tgcttgatcc ccgggcacca acag	24	
50	<210> 10		
	<211> 28		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
55	<220> primer_bind		
	<223> Usado en la mutagénesis directa		
60	<400> 10		
	ttattcatcg attctattac tccttgac	28	
65	<210> 11		
	<211> 24		

ES 2 355 027 A1

	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220> primer_bind	
	<223> usado en la mutagénesis directa	
	<400> 11	
10	aggcatcgcc atatggatca cgac	24
	<210> 12	
15	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220> primer_bind	
	<223> Sitio de restricción ApaI	
25	<400> 12	
	gctgaagcaa tgagccaagt	20
30	<210> 13	
	<211> 24	
	<212> DNA	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220> primer_bind	
	<223> Cebador para SEQ ID NO: 1	
40	<400> 13	
	aaaaggaat tggaggaaat gaac	24
45	<210> 14	
	<211> 23	
	<212> DNA	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220> primer_bind	
55	<223> Cebador para SEQ ID NO: 1	
	<400> 14	
60	ctcatgttct tcttgggcct tat	23
	<210> 15	
	<211> 16	
65	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	

ES 2 355 027 A1

	<220> primer_bind	
	<223> Cebador para SEQ ID NO: 1	
5	<400> 15	
	ttcttcttgg gcctta	16
10	<210> 16	
	<211> 23	
	<212> DNA	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220> primer_bind	
	<223> Cebador para SEQ ID NO: 2	
20	<400> 16	
	atgtcaagct aaaaggggaa gcc	23
25	<210> 17	
	<211> 21	
	<212> DNA	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220> primer_bind	
35	<223> Cebador para SEQ ID NO: 2	
	<400> 17	
40	gctgtttctt gccctgtctc t	21
	<210> 18	
	<211> 17	
45	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220> primer_bind	
50	<223> Cebador para SEQ ID NO: 2	
	<400> 18	
55	tctagctgcc atattcc	17
	<210> 19	
60	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220> primer_bind	
	<223> Cebador para SEQ ID NO: 3	

ES 2 355 027 A1

	<400> 19	
	tacagacaat ggcagcaatt tcac	24
5		
	<210> 20	
	<211> 21	
	<212> DNA	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220> primer_bind	
15	<223> Cebador para SEQ ID NO: 3	
	<400> 20	
20	atgccaaatt cctgcttgat t	21
	<210> 21	
	<211> 15	
25	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220> primer_bind	
30	<223> Cebador para SEQ ID NO: 3	
	<400> 21	
35	ttaaggccgc ctggt	15
	<210> 22	
40	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220> primer_bind	
	<223> Cebador para SEQ ID NO: 4	
	<400> 22	
50	agcagagaca gggcaagaaa ca	22
	<210> 23	
55	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220> primer_bind	
	<223> Cebador para SEQ ID NO: 4	
	<400> 23	
65	ctgccatttg tactgctgtc ttaa	24

ES 2 355 027 A1

<210> 24

<211> 19

<212> DNA

5 <213> Secuencia artificial

<220> primer_bind

<223> Cebador para SEQ ID NO: 4

10

<400> 24

agtcaaggag taatagaat

15

19

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200802766

②② Fecha de presentación de la solicitud: 30.09.2008

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	TANG Y. et al. "Comparative evaluation of three commercial systems for nucleic acid extraction from urine specimens." Journal of Clinical Microbiology (2005) Vol. 43, páginas 4830-4833.	12
A	EDELSTEIN R. et al. "Oligonucleotide ligation assay for detecting mutations in the human immunodeficiency virus type 1 pol gene that are associated with resistance to zidovudine, didanosine and lamivudine" Journal of Clinical Microbiology (1998) Vol. 36, páginas 569-572.	1-14
A	ES 2244332 B1 (FUNCACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN Y LA PREVENCIÓN DEL SIDA EN ESPAÑA E INSTITUTO DE SALUD CARLOS III) 01.12.2007	1-14
A	SACHDEVA N., et al. "Frequency of drug-resistant variants of HIV-I coexistent with wild-type in treatment-naïve patients of India." Journal of the International AIDS Society (2005) Vol. 7 páginas 1-7.	1-14
A	ABAD et al. "Construction and characterization of a minimized version of the HIV-1 pNL4-3 plasmid and its application for pseudotyping HIV-1 vectors." Molecular Biotechnology (2004) Vol. 28, páginas 87-95.	1-14
A	ES 2246859 T3 (VIRCO BVBA) 13.03.2002	1-14
A	WO 0181624 A1 (VIRCO N.V.) 01.11.2001	1-14

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
03.03.2011

Examinador
M. García Bueno

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12Q1/70 (01.01.2006)

C12Q1/68 (01.01.2006)

C12N15/00 (01.01.2006)

C12N7/00 (01.01.2006)

C12R1/92 (01.01.2006)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q, C12N, C12R

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTE, TXTF, MEDLINE, BIOSIS, NPL, XPESP, EMBASE, EMBL ALL.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 03.03.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-11, 13-14	SI
	Reivindicaciones 12	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-11, 13-14	SI
	Reivindicaciones 12	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	TANG Y. et al. "Comparative evaluation of three commercial systems for nucleic acid extraction from urine specimens." Journal of Clinical Microbiology (2005) Vol. 43, páginas 4830-4833.	2005
D02	EDELSTEIN R. et al. "Oligonucleotide ligation assay for detecting mutations in the human immunodeficiency virus type 1 pol gene that are associated with resistance to zidovudine, didanosine and lamivudine" Journal of Clinical Microbiology (1998) Vol.36, páginas 569-572.	1998
D03	ES 2244332 B1 (FUNCACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN Y LA PREVENCIÓN DEL SIDA EN ESPAÑA E INSTITUTO DE SALUD CARLOS III)	01.12.2007
D04	SACHDEVA N., et al. "Frequency of drug-resistant variants of HIV-I coexistent with wild-type in treatment-naïve patients of India." Journal of the International AIDS Society (2005) Vol. 7 páginas 1-7.	2005
D05	ABAD et al. "Construction and characterization of a minimized version of the HIV-1 pNL4-3 plasmid and its application for pseudotyping HIV-1 vectors." Molecular Biotechnology (2004) Vol. 28, páginas 87-95.	2004
D06	ES 2246859 T3 (VIRCO BVBA)	13.03.2002
D07	WO 01/81624 A1 (VIRCO N.V.)	01.11.2001

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud de invención consiste en un plásmido que comprende SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, una célula empaquetadora transfectada con el plásmido, un virión que contiene el ARN codificado por el plásmido y la célula reporter transfectada con el virión (reivindicaciones 1-4), y sus usos para evaluar la calidad de los sistemas de extracción de ADN o ARN, para clonar fragmentos del gen pol y de la proteasa del ADN del virus VIH-1 y para evaluar la resistencia de fenotipos del virus VIH-1 a antirretrovirales (reivindicaciones 5-10).

La presente solicitud de invención también consiste en el método de construcción del plásmido (reivindicación 11), y el método de evaluación de la calidad de los sistemas de extracción de ácidos nucleicos (reivindicaciones 12-13) y kit (reivindicación 14).

El documento D01 divulga una evaluación comparativa de tres sistemas comerciales de extracción de ácidos nucleicos (ver todo el documento).

El documento D02 divulga la detección de mutaciones en el gen pol de VIH-1 relacionadas con la resistencia a antirretrovirales mediante genotipado por ensayo de ligación de oligonucleótidos en codones específicos en el gen pol amplificado por PCR (ver resumen y páginas 569 y 571).

El documento D03 divulga una generación de nuevos clones virales recombinantes basados en VIH y su utilización en métodos analíticos. Dichos clones resultan de una serie de manipulaciones genéticas realizadas sobre un fragmento de ADN, entre ellas la introducción por mutagénesis dirigida de sitios de restricción que permitan extraer fácilmente determinados fragmentos de ADN del provirus matriz, para sustituirlos por genes de aislados procedentes de pacientes a valorar (ver página 8). Para la obtención de los clones se parte del vector proviral NL4.3 (ver página 9, líneas 29-30).

El documento D03 también divulga un sistema de determinación de resistencias fenotípicas a fármacos antirretrovirales (ver página 16 y reivindicación 9).

El documento D04 divulga mutaciones en el gen pol asociadas a resistencia a antirretrovirales y la dependencia de esta resistencia según la frecuencia de mutación del gen pol, la carga viral, y el número de mutaciones necesarias para conferir el fenotipo de resistencia (ver páginas 2-3).

El documento D05 la construcción de un nuevo vector retroviral basado en el plásmido pNL4-3, que puede ser útil para facilitar el diseño de vectores un vitro del VIH-1 para realizar pruebas fenotípicas de resistencia a antirretrovirales, permitiendo la introducción de sitios de restricción apropiados y específicas por mutagénesis dirigida al sitio del genoma proviral (ver páginas 87 y 91).

El documento D06 divulga ensayos para la detección de mutaciones en el VIH-1 que se basan en la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de secuencias genómicas víricas y ensayos para la determinación de la susceptibilidad de las fenotípica (ver página3, líneas 47-53, página 5, línea 63- página 6, línea 19, página 10, líneas 54-60, página 15, línea 66- página 16, línea 29 y página 17, líneas 13-26).

El documento D07 divulga un método para el análisis de la mutación del gen pol de viriones de VIH, que incluye la amplificación del virión RNA o DNA mediante PCR anidada (ver resumen y reivindicaciones).

1. NOVEDAD (Art 6 Ley 11/1986) Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8 Ley 11/1986).

1.1. REIVINDICACIÓN 12.

El documento D01 divulga un método de evaluación de la calidad de los sistemas de extracción de ácidos nucleicos que comprende obtener la mezcla estándar de ADN, aplicar la mezcla a un sistema de extracción de ADN, cuantificar la concentración de ADN extraído y comparar los resultados obtenidos con los valores de concentración nucleotídica de la mezcla estándar (ver todo el documento).

Las características de la reivindicación 12 ya son conocidas del documento IX. Por lo tanto la reivindicación 12 no es nueva y no implica actividad inventiva la vista del estado de la técnica conocido según los artículos 6 y 8 de la Ley 11/1986.

1.2. REIVINDICACIONES 1-11, 13-14.

La invención reivindicada difiere principalmente de los documentos citados en que ninguno de los documentos citados muestra los plásmidos que comprenden SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.

Así, la invención reivindicada implica la creación de nuevos sitios de restricción en el gen pol que no se divulga en el estado de la técnica.

Por lo tanto, los documentos citados son solo documentos que reflejan el estado de la técnica. En consecuencia, las reivindicaciones 1-11, 13-14 son nuevas y se considera que implican actividad inventiva según los artículos 6 y 8 de la Ley 11/1986.