(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 354 785**

(21) Número de solicitud: 201001193

(51) 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) PATENTE DE INVENCIÓN CON EXAMEN PREVIO B2

(22) Fecha de presentación: **30.09.2010**

(30) Prioridad: **30.09.2008 ES 200802766**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **18.03.2011**

Fecha de la concesión: **30.09.2011**

(45) Fecha de anuncio de la concesión: **13.10.2011**

(45) Fecha de publicación del folleto de la patente: **13.10.2011**

(62) Número de la solicitud inicial: **P 200802766**

(73) Titular/es:
Universidade de Santiago de Compostela
Edificio EMPRENDIA - Campus Vida
15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES
NANOGAP

(72) Inventor/es: **Regueiro García, Benito José**

(74) Agente: **No consta**

(54) Título: **Método de evaluación de resistencia de fenotipos de VIH-1 a antirretrovirales.**

(57) Resumen:
Método de evaluación de resistencia de fenotipos de VIH-1 a antirretrovirales.
En la presente invención se provee un método de análisis de la resistencia fenotípica de VIH-1 de muestras clínicas a antirretrovirales. El método hace uso de plásmidos en los que se han creado mutaciones que generan sitios únicos de secuencia original, de modo que permite la clonación de fragmentos progresivamente mayores del gen *pol* y/o del gen que codifica para la proteasa del virus VIH procedentes de pacientes en estos plásmidos, y por tanto proporciona un modelo capaz de caracterizar los genes y las subregiones genómicas de VIH-1 implicadas en la resistencia a antirretrovirales.

ES 2 354 785 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 40.2.8 LP.

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Método de evaluación de resistencia de fenotipos de VIH-1 a antirretrovirales.

En la presente invención se provee un método de análisis de la resistencia fenotípica de VIH-1 de muestras clínicas a antirretrovirales. El método hace uso de plásmidos en los que se han creado mutaciones que generan sitios únicos de restricción en posiciones sucesivas del gen *pol* del virus VIH-1, siendo la expresión de aminoácidos idéntica a la de la secuencia original, de modo que permite la clonación de fragmentos progresivamente mayores del gen *pol* y/o del gen que codifica para la proteasa del virus VIH procedentes de pacientes en estos plásmidos, y por tanto proporciona un modelo capaz de caracterizar los genes y las subregiones genómicas de VIH-1 implicadas en la resistencia a antirretrovirales.

Estado de la técnica anterior

El método objeto de la presente invención constituye un sistema alternativo para analizar la resistencia fenotípica de VIH-1 de muestras clínicas a antirretrovirales, cuya eficacia se muestra en el correspondiente ejemplo.

Aunque el virus VIH tipo 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 que 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 construidos usando secuencias de los genes de los virus aislados en los pacientes en las construcciones descritas en 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 antirretrovirales.

Explicación de la invención

El método de la presente invención hace uso de cuatro plásmidos en los que se han creado mutaciones dirigidas al tercer nucleótido del codón sin cambio en la traducción de una secuencia original, para la 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 *Apa*I-*Pin*A1.

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 generan sitios únicos de restricción en posiciones sucesivas del gen *pol* del virus VIH-1. Mediante este sistema es posible obtener ácidos nucleicos con cuatro polimorfismos de un solo nucleótido (de las siglas en inglés SNP, *Single nucleotide polimorphism*) y además, al tener secuencias conocidas, podemos obtener la construcción como ADNs lineales (por corte en lugares únicos comunes como *Apa*I) o circulares. Alternativamente puede obtenerse por transfección con Calphos™ (Invitrogen) en células empaquetadoras (por ejemplo, células 293T/17), viriones VIH infecciosos que puedan usarse como origen de ARNs o como herramienta para la infección experimental "*in vivo*" y la posible valoración de la capacidad inhibitoria de los antirretrovirales. Por tanto, una aplicación clínica o de desarrollo con las construcciones mencionadas es la evaluación de la resistencia de los diferentes fenotipos de VIH-1 a antirretrovirales comerciales o en vías de ensayo.

El método de construcción de los plásmidos consistió en amplificar la región de ADN del VIH-1 correspondiente al gen *pol* contenida en el plásmido pNL4.3 mediante los cebadores SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, clonar la región amplificada en un vector de expresión, realizar mutagénesis dirigidas independientes en el vector 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 (de modo que se generaron sitios únicos de restricción en posiciones sucesivas del gen *pol* del virus VIH-1), y reclonar de forma independiente cada uno de los 4 fragmentos obtenidos en el vector original pNL4.3, obteniendo los plásmidos de secuencias SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4. (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 *Apa*I/*Pflm*I y reclonarlo en el vector original pNL4.3 tras ser digerido previamente con los mismos enzimas de restricción *Apa*I y *Pflm*I, en este caso). Por

tanto, el plásmido de que hace uso el método 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.

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 *Cla*I.

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 *Xma*I.

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 TG**GG**CG por TG**CC**CG. 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 *Xma*I.

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 *Cla*I.

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 aspecto necesario para aplicar el método de la presente invención es 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.

Para aplicar el método de la presente invención también es necesario un virión que contiene el ARN codificado por cualquiera de los plásmidos de secuencia SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4. 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.

Otro aspecto necesario para aplicar el método de la presente invención es 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.

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.

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.

En el método de la presente invención, los plásmidos seleccionados de la lista que comprende SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4, o cualquiera de sus combinaciones, pueden emplearse para clonar fragmentos del gen *pol* y de la proteasa del virus VIH-1.

En el método de la presente Invención, los fragmentos del gen *pol* y de la proteasa que se clonan en los plásmidos SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4 proceden de muestras aisladas de personas infectadas por el virus VIH. Una vez amplificados los fragmentos procedentes de pacientes infectados, 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 *Apa*I/*Cla*I y *Apa*I/*Xma*I 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 *Apa*I, *Cla*I y *Xma*I. Estos fragmentos solo pueden clonarse en los plásmidos descritos en la invención. *Apa*I es un sitio único común en todas las construcciones de pNL4.3 ya que aparece en la secuencia original.

Por tanto, el 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*, o cualquiera de sus combinaciones, pueden emplearse 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 mediante el método de la presente invención, es necesaria la clonación, en los plásmidos de secuencia SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4., 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 trasnfectarían 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.

Una realización preferida de la invención es un método de evaluación fenotípico de la resistencia de VIH a antirretrovirales que comprende:

a. recoger muestras biológicas de pacientes infectados por el virus VIH,

b. extraer el ARN de las muestras del paso (a),

c. amplificar, mediante RT-PCR, fragmentos del gen que codifica para la polimerasa y/o del gen que codifica para la proteasa del virus VIH del ARN del paso (b) mediante el empleo del cebador directo SEQ ID NO: 12 y el cebador reverso seleccionado de la lista que comprende SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10,

d. clonar de forma independiente los fragmentos obtenidos en (c), en los plásmidos SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 4,

e. transfectar los plásmidos obtenidos en (d) en una línea celular empaquetadora y recoger los viriones liberados,

f. infectar células *reporter* con los viriones obtenidos en (e),

g. añadir un antirretroviral a las células del paso (f) y

h. medir la fluorescencia, calculando la IC_{50}.

Por el término "muestra biológica" se entiende aquella muestra que procede de un fluido fisiológico como sangre, plasma, suero u orina y/o cualquier tejido celular procedente de un organismo vivo. Queda claro por tanto que se trata de una muestra biológica aislada del organismo vivo.

La técnica de la RT-PCR consigue amplificar el ADN codificante de los genes deseados mediante el empleo de cualquier enzima (retrotranscriptasa; RT o transcriptasa reversa) que utiliza el ARNm aislado de las muestras descritas y un cebador reverso seleccionado de la lista que comprende SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10. El cebador conocido como reverso de cada uno de los pares descritos anteriormente hará de iniciador para obtener el ADN de cadena simple o monocatenario complementario a la secuencia de ARNm transcrita.

El siguiente paso es la obtención de fragmentos de ADN de doble cadena amplificados mediante PCR (de las siglas en inglés *Polimerase Chain Reaction*) utilizando como molde el ADN codificante obtenido mediante la reacción de retrotranscripción y los pares de cebadores directo/reverso siguientes: el cebador directo es SEQ ID NO: 12 y el cebador reverso se selecciona de la lista que comprende SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10. Además, para la síntesis del ADN es necesaria la presencia de nucleótidos dNTPs, es decir, dATP, dTTP, dCTP y dGTP, ADN polimerasa termoresistente, cloruro de magnesio en una concentración determinada así como tampones que creen las condiciones físico-químicas adecuadas para el funcionamiento de todos los componentes y se consiga con ello la amplificación.

La clonación de los fragmentos obtenidos en el paso (c) en los plásmidos de la invención se puede llevar a cabo mediante los enzimas de restricción A*pa*I y C*la*I o X*ma*I.

Tras la selección de los viriones liberados al medio por las células empaquetadoras puede emplearse un paso intermedio; la titulación de los viriones del paso (d) por medio de la infección de una línea celular capaz de formar sincitios. Las células formadoras de sincitios que pueden ser empleadas para llevar a cabo la titulación son células MT-2 o cualquier otra línea celular capaz de formar sincitios. La formación de sincitios es el efecto citopático de VIH en algunas líneas celulares y consiste en la formación de acúmulos celulares que pierden el papel de separación que tiene la membrana externa de forma que aparecen grandes células llenas de núcleos. La titulación tal como se entiende en la presente invención es la determinación de la dilución del sobrenadante con viriones y su capacidad infectiva relativa. La titulación puede llevarse a cabo de forma alternativa valorando la presencia de la proteína p24 (que es sintetizada si el virión es infectivo).

El antirretroviral añadido a las células del paso (f) se selecciona de la lista disponible que en la actualidad comprendería zidovudina, didanosina, zalcitabina, estavudina, lamivudina, abacavir, emtricitabina, nevirapina, delavirdina, efavirenz, tenofovir, disoproxil fumarato, saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir, amprenavir, lopinavir, atazanavir, fosamprenavir, tipranavir, darunavir, enfuvirtida, maraviroc, raltegravir, elvitegravir o cualquier otro inhibidor de transcriptasa inversa (inhibidor de transcriptasa análogo de nucleósidos, inhibidor de transcriptasa no análogo de nucleósidos e inhibidor de transcriptasa análogo de nucleótidos), Inhibidor de proteasa, inhibidor de la integrasa, inhibidor de fusión, anticuerpos monoclonales dirigidos contra co-receptores o potenciadores de su efecto además de mezclas de los anteriores.

La medida de fluorescencia emitida es debida a la activación de la expresión del gen *reporter* GFP dirigido por el promotor LTR que reconoce el virus VIH-1, al ser activado por la presencia del transactivador Tat, producido durante la infección de la célula con el virión infeccioso. La medida de la fluorescencia puede servir para calcular la IC_{50}. La IC_{50} es la medida de la efectividad de un compuesto (en este caso antirretroviral) en su proceso de inhibición biológica o de una función bioquímica. Por tanto, el IC_{50} representa la concentración de un compuesto que es necesaria para la inhibición de la replicación viral *in vitro* en un 50%.

En una realización más preferida del método anterior, la célula empaquetadora es 293-T y las células *reporter* son CEM-GFP.

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 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.

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.

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.

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 *Apa*I y *Pin*AI (fragmento 1480 bp), (C) pNL4.3 C4254 (SEQ ID NO: 1) cortado con *Apa*I y *Cla*I (fragmento2248 bp), (D) pNL4.3 X4411 (SEQ ID NO: 2) cortado con *Apa*I y *Xma*I (fragmento2405 bp), (E) pNL4.3 X4634 (SEQ ID NO: 3) cortado con *Apa*I y *Xma*I (fragmento 2628 bp) y (F) pNL4.3 X4696 (SEQ ID NO: 4) cortado con *Apa*I y *Cla*I (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 Mutagénesis 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 *Nco*I definida por la secuencia SEQ ID NO: 11. Tras obtener las mutaciones se cortó el fragmento, *Apa*I/*Pflm*I 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 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 *Cla*I. El fragmento generado va desde la posición que ocupa el sitio de restricción *Apa*I a *Cla*I con un tamaño de 2248 pb.

- SEQ ID NO: 2 (pNL4.3 XMA 4411) (Fig 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 *Xma*I. El fragmento generado va desde la posición que ocupa el sitio de restricción *Apa*I a *Xma*I con un tamaño de 2405 pb.

- SEQ ID NO: 3 (pNL4.3 XMA 4634) (Fig 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 TG**GG**CG por TG**CC**CG. 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 *Xma*I. El fragmento generado va desde la posición que ocupa el sitio de restricción *Apa*I a *Xma*I 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 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 *Cla*I. El fragmento generado va desde la posición que ocupa el sitio de restricción *Apa*I a *Cla*I 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 *Apa*I/*Pim* AI, *Apa*I/*Cla*I, *Apa*I/*Xma*I, *Apa*I/*Xma*I y *Apa*I/*Cla*I 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

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 *Apa*I) y SEQ ID NO: 7 (cebador reverso con el sitio de restricción *Cla*I), SEQ ID NO: 8 (cebador reverso con el sitio de restricción *Xma*I), SEQ ID NO: 9 (cebador reverso con el sitio de restricción *Xma*I) o SEQ ID NO: 10 (cebador reverso con el sitio de restricción *Cla*I).

Los cebadores fueron diseñados con la ayuda del programa *Primer3 Output* (http://www-genome.wi.mit.edu) incluyendo el sitio de restricción de *Apa*I en el cebador directo y el *Xma*I/*Cla*I en cada cebador reverso, necesarios para el posterior ligamiento de los fragmentos de *Apa*I-*Xma*I/*Cla*I 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 *Apa* I-*Pin*AI.

Ejemplo 3

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 (*Apa*I2010-*Pin*AI3486 = 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 *Cla*I y dos para *Xma*I). 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 sinticios, por tanto, puede ser considerado como control negativo. Se utilizaron inóculos virales de $5x10^5$ 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 Repeaf*) 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 1.

TABLA 1

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	0,73± 0,35	0,92± 0,28	0,73± 0,05	1,03± 0,49

Apa/PinAI				
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

	Nevirapina (NNRTI)	**Atazanavir (IP)**	**Indinavir (IP)**	**Saquinavir (IP)**
	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

	Nelfinavir (IP)	Amprenavir (IP)	Lopinavir (IP)
	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 *Apa*I-*Pin*AI.

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 pasa a página siguiente)

TABLA 2

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

	VIRCO	VIRCO	CHUS	CHUS
	AZT	Indinavir	AZT	Indinavir
	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.

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 3 y 4

TABLA 3

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 4

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

IC_{50}: 1,17

Datos numéricos de las curvas de respuesta de la figura 8; tablas 5 y 6

TABLA 5

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 6

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

IC_{50}: 1,23

Datos numéricos de las curvas de respuesta de la figura 9; tablas 7 y 8

TABLA 7

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	O,5191
IC_{50}	0,0603	0,0004
Factor de la pendiente	-11,6884	0,3656
Fondo	4,7227	0,4361

TABLA 8

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

IC_{50}: 1,04

REIVINDICACIONES

1. Método de evaluación de la resistencia de fenotipos de VIH a antirretrovirales que comprende:

   a. recoger muestras biológicas de pacientes infectados por el virus VIH,

   b. extraer el ARN de las muestras del paso (a),

   c. amplificar, mediante RT-PCR, fragmentos del gen que codifica para la polimerasa y/o del gen que codifica para la proteasa del virus VIH del ARN del paso (b) mediante el empleo del cebador directo SEQ ID NO: 12 y el cebador reverso seleccionado de la lista que comprende SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10,

   d. clonar de forma independiente los fragmentos obtenidos en (c), en los plásmidos seleccionados de la lista que comprende SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4,

   e. transfectar los plásmidos obtenidos en (d) en una línea celular empaquetadora y recoger los viriones liberados,

   f. infectar células *reporter* con los viriones obtenidos en (e),

   g. añadir un antirretroviral a las células del paso (f) y

   h. medir la fluorescencia.

2. Método según la reivindicación 1 donde la célula empaquetadora es 293-T y las células *reporter* son CEM-GFP.

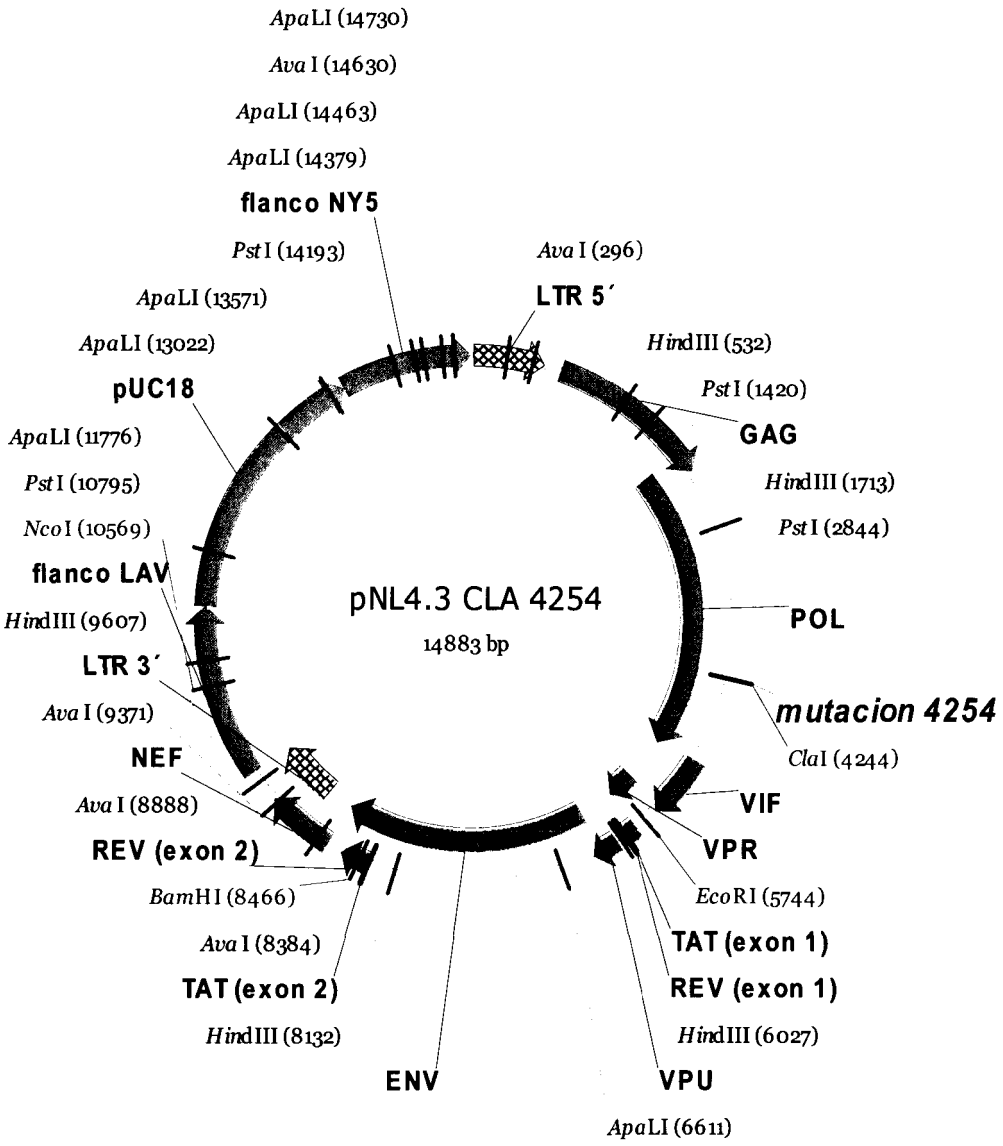
ApaLI (14730)
Ava I (14630)
ApaLI (14463)
ApaLI (14379)
flanco NY5
Pst I (14193)
ApaLI (13571)
ApaLI (13022)
pUC18
ApaLI (11776)
Pst I (10795)
Nco I (10569)
flanco LAV
HindIII (9607)
LTR 3´
Ava I (9371)
NEF
Ava I (8888)
REV (exon 2)
BamHI (8466)
Ava I (8384)
TAT (exon 2)
HindIII (8132)
ENV
Ava I (296)
LTR 5´
HindIII (532)
Pst I (1420)
GAG
HindIII (1713)
Pst I (2844)
POL
mutacion 4254
ClaI (4244)
VIF
VPR
EcoRI (5744)
TAT (exon 1)
REV (exon 1)
HindIII (6027)
VPU
ApaLI (6611)
pNL4.3 CLA 4254
14883 bp

FIG. 1

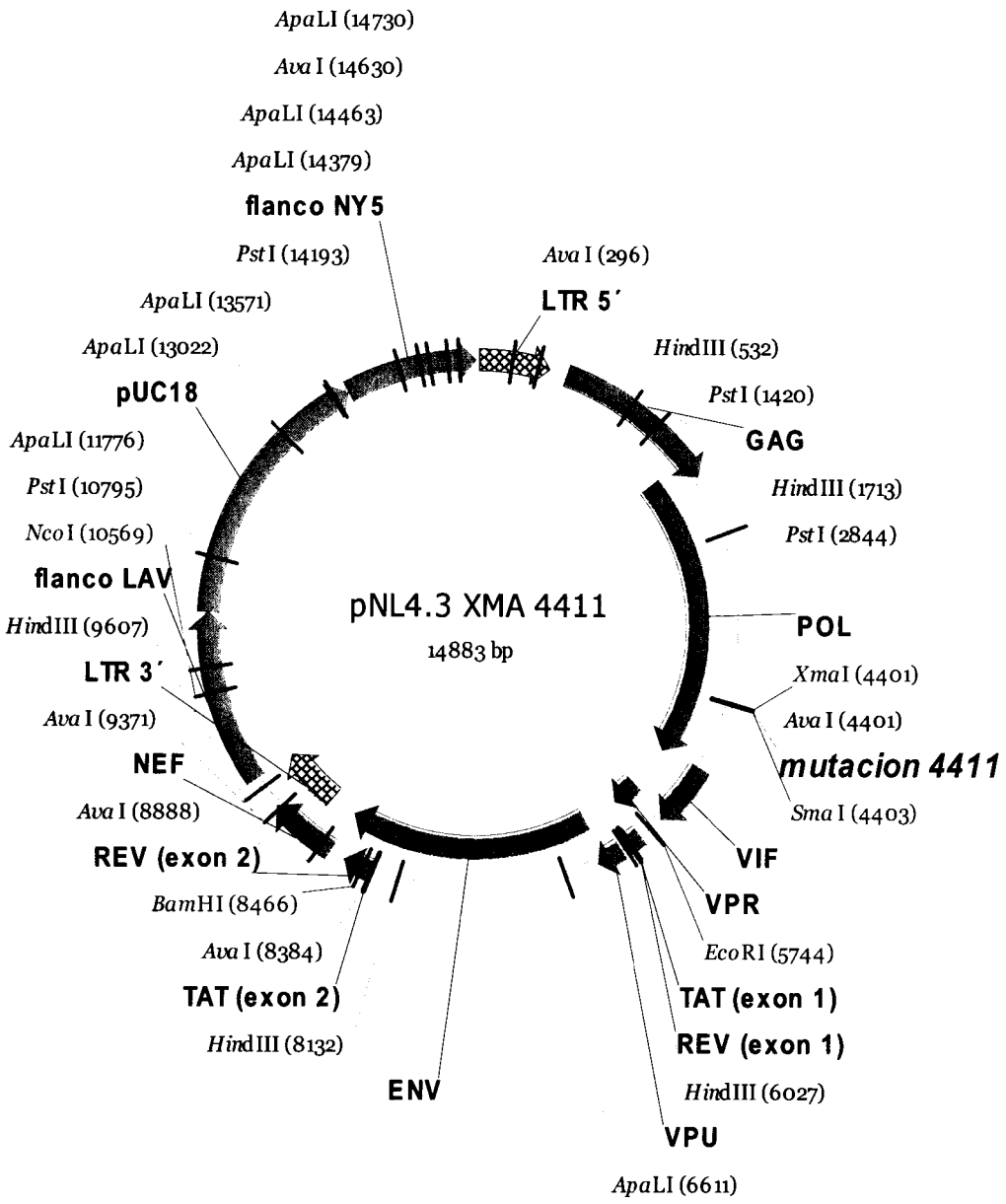
ApaLI (14730)
Ava I (14630)
ApaLI (14463)
ApaLI (14379)
flanco NY5
Pst I (14193)
ApaLI (13571)
ApaLI (13022)
pUC18
ApaLI (11776)
Pst I (10795)
Nco I (10569)
flanco LAV
HindIII (9607)
LTR 3´
Ava I (9371)
NEF
Ava I (8888)
REV (exon 2)
BamHI (8466)
Ava I (8384)
TAT (exon 2)
HindIII (8132)
ENV
Ava I (296)
LTR 5´
HindIII (532)
Pst I (1420)
GAG
HindIII (1713)
Pst I (2844)
POL
XmaI (4401)
Ava I (4401)
mutacion 4411
Sma I (4403)
VIF
VPR
EcoRI (5744)
TAT (exon 1)
REV (exon 1)
HindIII (6027)
VPU
ApaLI (6611)
pNL4.3 XMA 4411
14883 bp

FIG. 2.

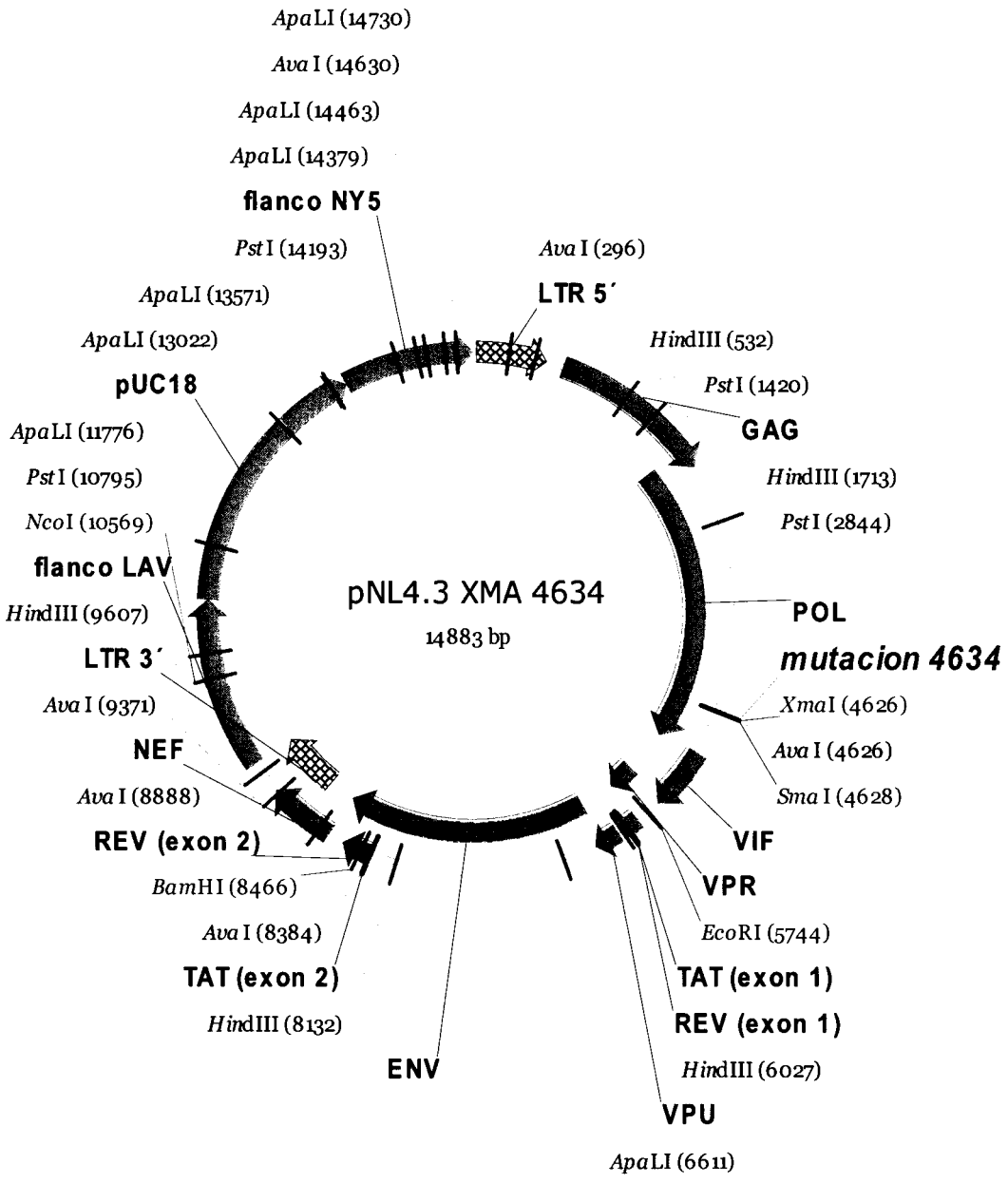
ApaLI (14730)
Ava I (14630)
ApaLI (14463)
ApaLI (14379)
flanco NY5
Pst I (14193)
ApaLI (13571)
ApaLI (13022)
pUC18
ApaLI (11776)
Pst I (10795)
NcoI (10569)
flanco LAV
HindIII (9607)
LTR 3´
Ava I (9371)
NEF
Ava I (8888)
REV (exon 2)
BamHI (8466)
Ava I (8384)
TAT (exon 2)
HindIII (8132)
ENV
Ava I (296)
LTR 5´
HindIII (532)
Pst I (1420)
GAG
HindIII (1713)
Pst I (2844)
POL
mutacion 4634
XmaI (4626)
Ava I (4626)
Sma I (4628)
VIF
VPR
EcoRI (5744)
TAT (exon 1)
REV (exon 1)
HindIII (6027)
VPU
ApaLI (6611)
pNL4.3 XMA 4634
14883 bp

FIG. 3

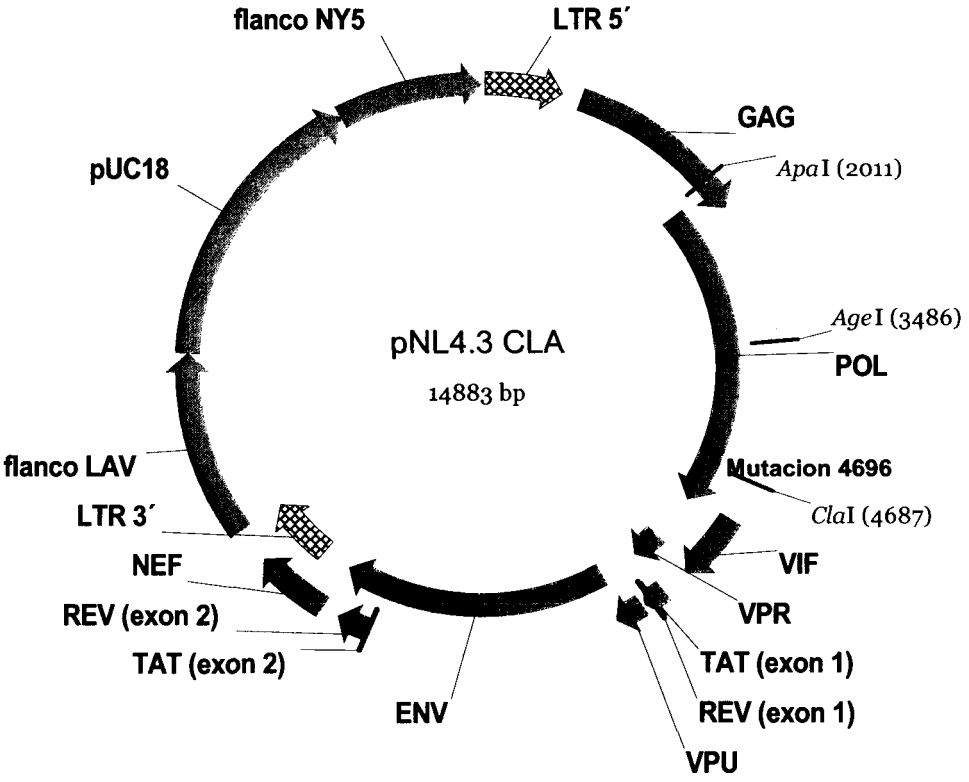
flanco NY5
LTR 5´
GAG
ApaI (2011)
pUC18
AgeI (3486)
pNL4.3 CLA
14883 bp
POL
flanco LAV
Mutacion 4696
ClaI (4687)
LTR 3´
VIF
NEF
VPR
REV (exon 2)
TAT (exon 1)
TAT (exon 2)
ENV
REV (exon 1)
VPU

FIG. 4

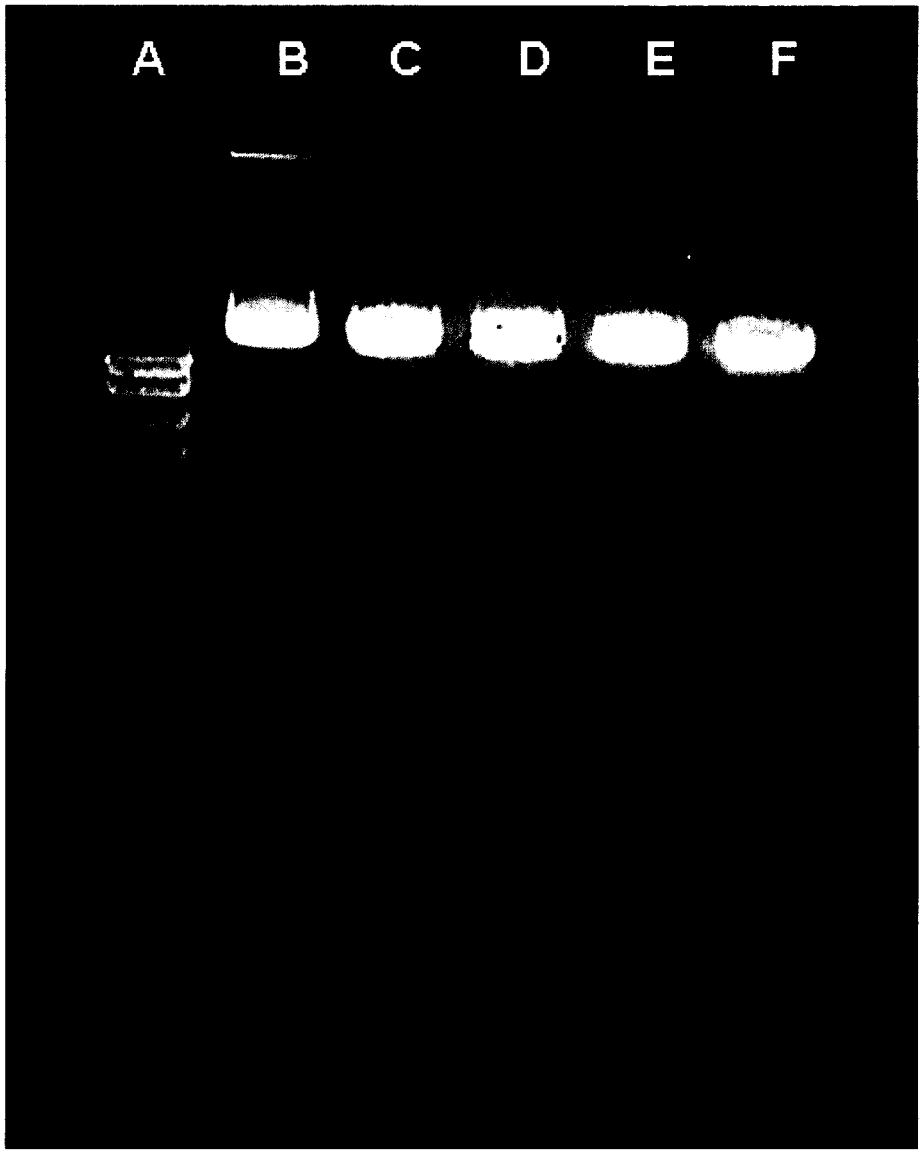

FIG. 5

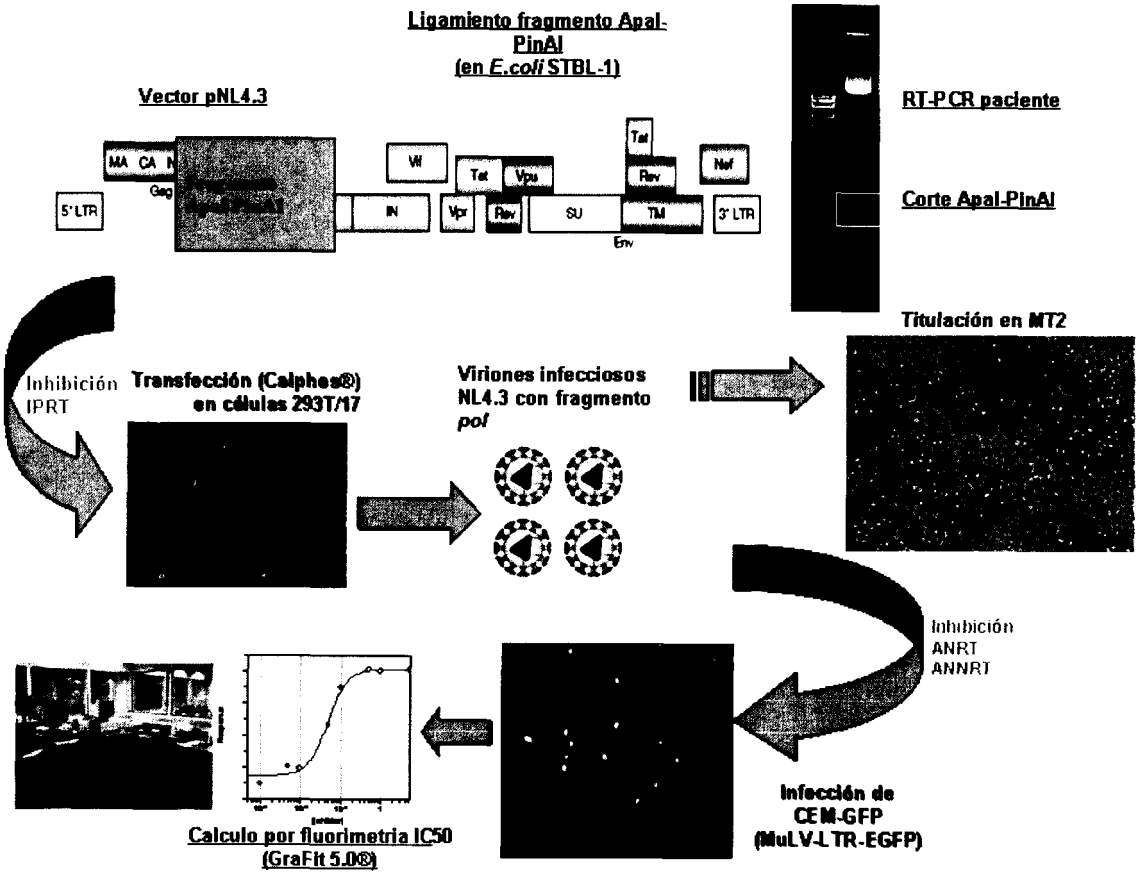
Ligamiento fragmento ApaI-PinAI
(en E.coli STBL-1)
Vector pNL4.3
RT-PCR paciente
Corte ApaI-PinAI
Titulación en MT2
Inhibición IPRT
Transfección (Calphos®) en células 293T/17
Viriones infecciosos NL4.3 con fragmento pol
Inhibición ANRT ANNRT
Infección de CEM-GFP (MuLV-LTR-EGFP)
Calculo por fluorimetria IC50 (GraFit 5.0®)

FIG. 6

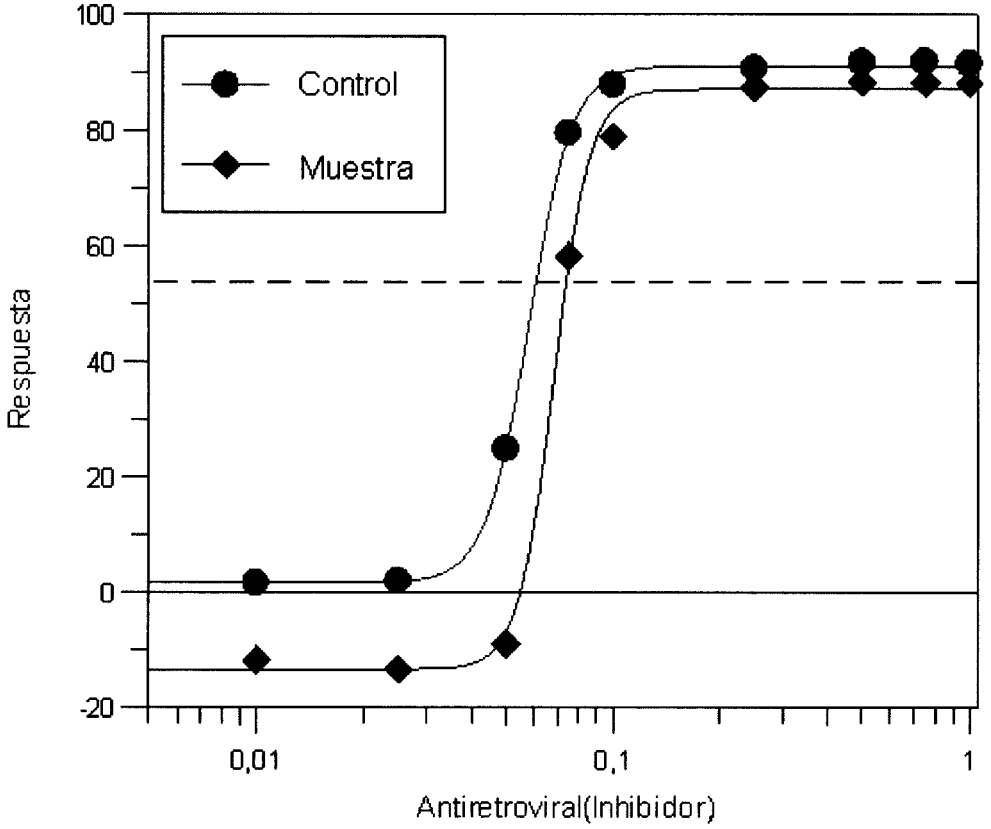
100
80
60
40
20
0
-20
Respuesta
Control
Muestra
0,01
0,1
1
Antiretroviral(Inhibidor)

FIG. 7

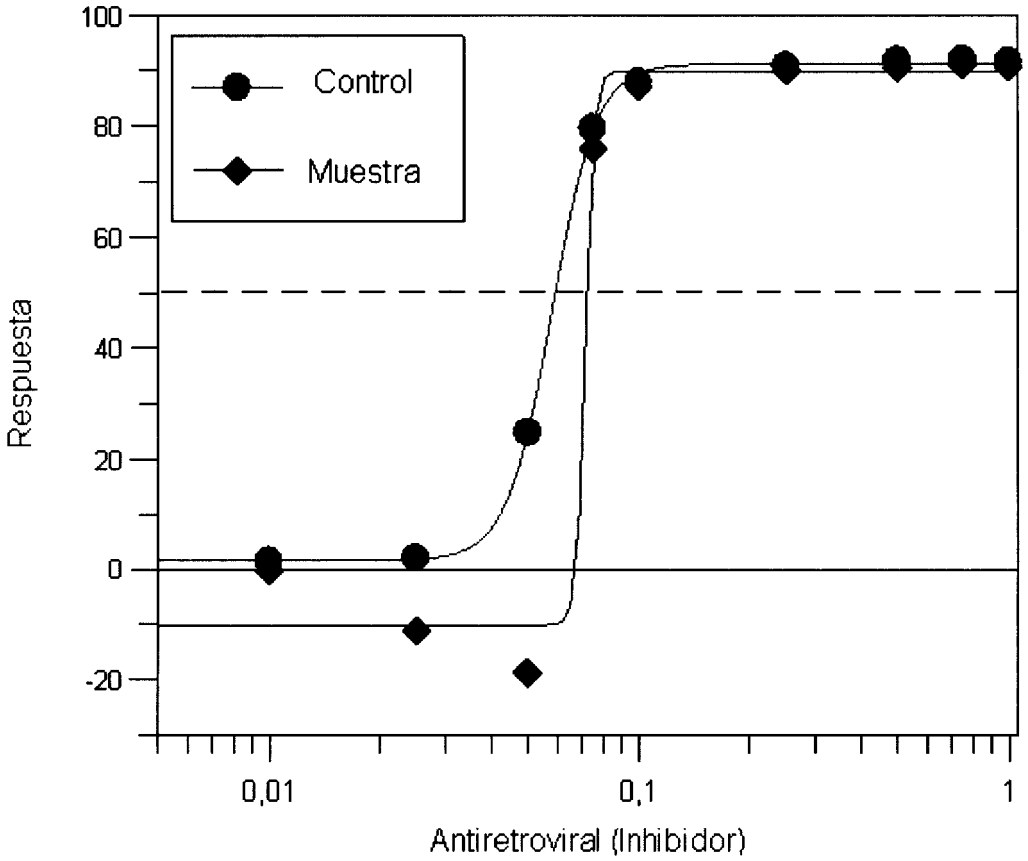
100
80
60
40
20
0
-20
Respuesta
Control
Muestra
0,01
0,1
1
Antiretroviral (Inhibidor)

FIG. 8

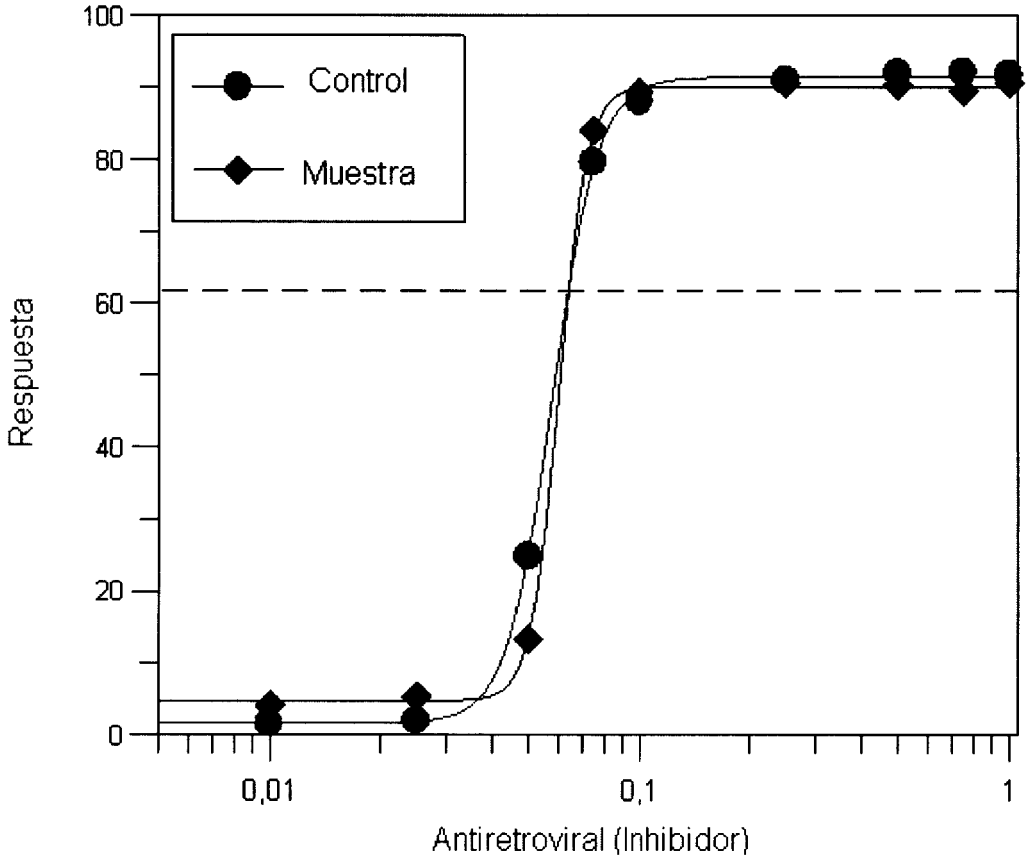
100
80
60
40
20
0
Respuesta
Control
Muestra
0,01
0,1
1
Antiretroviral (Inhibidor)

FIG. 9

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidade de Santiago de Compostela
Nanogap

<120> Método de evaluación de resistencia de fenotipos de VIH-1 a antirretrovirales

<130> 1596.15-2

<160> 24

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 14883
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220> misc_recomb
<223> Plásmido p4254

<400> 1

```
tggaagggct aatttggtcc caaaaaagac aagagatcct tgatctgtgg atctaccaca      60
cacaaggcta cttccctgat tggcagaact acacaccagg gccagggatc agatatccac     120
tgacctttgg atggtgcttc aagttagtac cagttgaacc agagcaagta gaagaggcca     180
aataaggaga gaagaacagc ttgttacacc ctatgagcca gcatgggatg gaggacccgg     240
agggagaagt attagtgtgg aagtttgaca gcctcctagc atttcgtcac atggcccgag     300
agctgcatcc ggagtactac aaagactgct gacatcgagc tttctacaag ggactttccg     360
ctggggactt tccagggagg tgtggcctgg gcgggactgg ggagtggcga gccctcagat     420
gctacatata agcagctgct ttttgcctgt actgggtctc tctggttaga ccagatctga     480
gcctgggagc tctctggcta actagggaac ccactgctta agcctcaata aagcttgcct     540
tgagtgctca 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
aggagagaga tgggtgcgag agcgtcggta ttaagcgggg gagaattaga taaatgggaa     840
aaaattcggt taaggccagg gggaaagaaa caatataaac taaaacatat agtatgggca     900
agcagggagc tagaacgatt cgcagttaat cctggccttt tagagacatc agaaggctgt     960
agacaaatac tgggacagct acaaccatcc cttcagacag gatcagaaga acttagatca    1020
ttatataata caatagcagt cctctattgt gtgcatcaaa ggatagatgt aaaagacacc    1080
aaggaagcct tagataagat agaggaagag caaaacaaaa gtaagaaaaa ggcacagcaa    1140
gcagcagctg acacaggaaa caacagccag gtcagccaaa attaccctat agtgcagaac    1200
ctccaggggc aaatggtaca tcaggccata tcacctagaa ctttaaatgc atgggtaaaa    1260
gtagtagaag agaaggcttt cagcccagaa gtaataccca tgttttcagc attatcagaa    1320
ggagccaccc cacaagattt aaataccatg ctaaacacag tgggggggaca tcaagcagcc    1380
```

atgcaaatgt taaaagagac catcaatgag gaagctgcag aatgggatag attgcatcca 1440
gtgcatgcag ggcctattgc accaggccag atgagagaac caaggggaag tgacatagca 1500
ggaactacta gtacccttca ggaacaaata ggatggatga cacataatcc acctatccca 1560
gtaggagaaa tctataaaag atggataatc ctgggattaa ataaaatagt aagaatgtat 1620
agccctacca gcattctgga cataagacaa ggaccaaagg aaccctttag agactatgta 1680
gaccgattct ataaaactct aagagccgag caagcttcac aagaggtaaa aaattggatg 1740
acagaaacct tgttggtcca aaatgcgaac ccagattgta agactatttt aaaagcattg 1800
ggaccaggag cgacactaga agaaatgatg acagcatgtc agggagtggg gggacccggc 1860
cataaagcaa gagttttggc tgaagcaatg agccaagtaa caaatccagc taccataatg 1920
atacagaaag gcaattttag gaaccaaaga aagactgtta agtgtttcaa ttgtggcaaa 1980
gaagggcaca tagccaaaaa ttgcagggcc cctaggaaaa agggctgttg gaaatgtgga 2040
aaggaaggac accaaatgaa agattgtact gagagacagg ctaatttttt agggaagatc 2100
tggccttccc acaagggaag gccagggaat tttcttcaga gcagaccaga gccaacagcc 2160
ccaccagaag agagcttcag gtttggggaa gagacaacaa ctccctctca gaagcaggag 2220
ccgatagaca aggaactgta tcctttagct tccctcagat cactctttgg cagcgacccc 2280
tcgtcacaat aaagataggg gggcaattaa aggaagctct attagataca ggagcagatg 2340
atacagtatt agaagaaatg aatttgccag gaagatggaa accaaaaatg ataggggggaa 2400
ttggaggttt tatcaaagta agacagtatg atcagatact catagaaatc tgcggacata 2460
aagctatagg tacagtatta gtaggaccta cacctgtcaa cataattgga agaaatctgt 2520
tgactcagat tggctgcact ttaaattttc ccattagtcc tattgagact gtaccagtaa 2580
aattaaagcc aggaatggat ggcccaaaag ttaaacaatg gccattgaca gaagaaaaaa 2640
taaaagcatt agtagaaatt tgtacagaaa tggaaaagga aggaaaaatt tcaaaaattg 2700
ggcctgaaaa tccatacaat actccagtat ttgccataaa gaaaaaagac agtactaaat 2760
ggagaaaatt agtagatttc agagaactta ataagagaac tcaagatttc tgggaagttc 2820
aattaggaat accacatcct gcagggttaa aacagaaaaa atcagtaaca gtactggatg 2880
tgggcgatgc atatttttca gttcccttag ataaagactt caggaagtat actgcattta 2940
ccatacctag tataaacaat gagacaccag ggattagata tcagtacaat gtgcttccac 3000
agggatggaa aggatcacca gcaatattcc agtgtagcat gacaaaaatc ttagagcctt 3060
ttagaaaaca aaatccagac atagtcatct atcaatacat ggatgatttg tatgtaggat 3120
ctgacttaga aatagggcag catagaacaa aaatagagga actgagacaa catctgttga 3180
ggtggggatt taccacacca gacaaaaaac atcagaaaga acctccattc ctttggatgg 3240
gttatgaact ccatcctgat aaatggacag tacagcctat agtgctgcca gaaaaggaca 3300
gctggactgt caatgacata cagaaattag tgggaaaatt gaattgggca agtcagattt 3360
atgcagggat taaagtaagg caattatgta aacttcttag gggaaccaaa gcactaacag 3420

aagtagtacc actaacagaa gaagcagagc tagaactggc agaaaacagg gagattctaa 3480
aagaaccggt acatggagtg tattatgacc catcaaaaga cttaatagca gaaatacaga 3540
agcaggggca aggccaatgg acatatcaaa tttatcaaga gccatttaaa aatctgaaaa 3600
caggaaaata tgcaagaatg aagggtgccc acactaatga tgtgaaacaa ttaacagagg 3660
cagtacaaaa aatagccaca gaaagcatag taatatgggg aaagactcct aaatttaaat 3720
tacccataca aaaggaaaca tgggaagcat ggtggacaga gtattggcaa gccacctgga 3780
ttcctgagtg ggagtttgtc aatacccctc ccttagtgaa gttatggtac cagttagaga 3840
aagaacccat aataggagca gaaactttct atgtagatgg ggcagccaat agggaaacta 3900
aattaggaaa agcaggatat gtaactgaca gaggaagaca aaaagttgtc cccctaacgg 3960
acacaacaaa tcagaagact gagttacaag caattcatct agctttgcag gattcgggat 4020
tagaagtaaa catagtgaca gactcacaat atgcattggg aatcattcaa gcacaaccag 4080
ataagagtga atcagagtta gtcagtcaaa taatagagca gttaataaaa aaggaaaaag 4140
tctacctggc atgggtacca gcacacaaag gaattggagg aaatgaacaa gtagataaat 4200
tggtcagtgc tggaatcagg aaagtactat ttttagatgg aatcgataag gcccaagaag 4260
aacatgagaa atatcacagt aattggagag caatggctag tgattttaac ctaccacctg 4320
tagtagcaaa agaaatagta gccagctgtg ataaatgtca gctaaaaggg gaagccatgc 4380
atggacaagt agactgtagc ccaggaatat ggcagctaga ttgtacacat ttagaaggaa 4440
aagttatctt ggtagcagtt catgtagcca gtggatatat agaagcagaa gtaattccag 4500
cagagacagg gcaagaaaca gcatacttcc tcttaaaatt agcaggaaga tggccagtaa 4560
aaacagtaca tacagacaat ggcagcaatt tcaccagtac tacagttaag gccgcctgtt 4620
ggtgggcggg gatcaagcag gaatttggca ttccctacaa tccccaaagt caaggagtaa 4680
tagaatctat gaataaagaa ttaaagaaaa ttataggaca ggtaagagat caggctgaac 4740
atcttaagac agcagtacaa atggcagtat tcatccacaa ttttaaaaga aaagggggga 4800
ttgggggta cagtgcaggg gaaagaatag tagacataat agcaacagac atacaaacta 4860
aagaattaca aaaacaaatt acaaaaattc aaaattttcg ggtttattac agggacagca 4920
gagatccagt ttggaaagga ccagcaaagc tcctctggaa aggtgaaggg gcagtagtaa 4980
tacaagataa tagtgacata aaagtagtgc caagaagaaa agcaaagatc atcagggatt 5040
atggaaaaca gatggcaggt gatgattgtg tggcaagtag acaggatgag gattaacaca 5100
tggaaaagat tagtaaaaca ccatatgtat atttcaagga aagctaagga ctggttttat 5160
agacatcact atgaaagtac taatccaaaa ataagttcag aagtacacat cccactaggg 5220
gatgctaaat tagtaataac aacatattgg ggtctgcata caggagaaag agactggcat 5280
ttgggtcagg gagtctccat agaatggagg aaaaagagat atagcacaca agtagaccct 5340
gacctagcag accaactaat tcatctgcac tattttgatt gtttttcaga atctgctata 5400
agaaatacca tattaggacg tatagttagt cctaggtgtg aatatcaagc aggacataac 5460
aaggtaggat ctctacagta cttggcacta gcagcattaa taaaaccaaa acagataaag 5520

ccacctttgc ctagtgttag gaaactgaca gaggacagat ggaacaagcc ccagaagacc 5580
aagggccaca gagggagcca tacaatgaat ggacactaga gcttttagag gaacttaaga 5640
gtgaagctgt tagacatttt cctaggatat ggctccataa cttaggacaa catatctatg 5700
aaacttacgg ggatacttgg gcaggagtgg aagccataat aagaattctg caacaactgc 5760
tgtttatcca tttcagaatt gggtgtcgac atagcagaat aggcgttact cgacagagga 5820
gagcaagaaa tggagccagt agatcctaga ctagagccct ggaagcatcc aggaagtcag 5880
cctaaaactg cttgtaccaa ttgctattgt aaaaagtgtt gctttcattg ccaagtttgt 5940
ttcatgacaa aagccttagg catctcctat ggcaggaaga agcggagaca gcgacgaaga 6000
gctcatcaga acagtcagac tcatcaagct tctctatcaa agcagtaagt agtacatgta 6060
atgcaaccta taatagtagc aatagtagca ttagtagtag caataataat agcaatagtt 6120
gtgtggtcca tagtaatcat agaatatagg aaaatattaa gacaaagaaa aatagacagg 6180
ttaattgata gactaataga aagagcagaa gacagtggca atgagagtga aggagaagta 6240
tcagcacttg tggagatggg ggtggaaatg gggcaccatg ctccttggga tattgatgat 6300
ctgtagtgct acagaaaaat tgtgggtcac agtctattat ggggtacctg tgtggaagga 6360
agcaaccacc actctatttt gtgcatcaga tgctaaagca tatgatacag aggtacataa 6420
tgtttgggcc acacatgcct gtgtacccac agaccccaac ccacaagaag tagtattggt 6480
aaatgtgaca gaaaatttta acatgtggaa aaatgacatg gtagaacaga tgcatgagga 6540
tataatcagt ttatgggatc aaagcctaaa gccatgtgta aaattaaccc cactctgtgt 6600
tagtttaaag tgcactgatt tgaagaatga tactaatacc aatagtagta gcgggagaat 6660
gataatggag aaaggagaga taaaaaactg ctctttcaat atcagcacaa gcataagaga 6720
taaggtgcag aaagaatatg cattctttta taaacttgat atagtaccaa tagataatac 6780
cagctatagg ttgataagtt gtaacacctc agtcattaca caggcctgtc caaaggtatc 6840
ctttgagcca attcccatac attattgtgc cccggctggt tttgcgattc taaaatgtaa 6900
taataagacg ttcaatggaa caggaccatg tacaaatgtc agcacagtac aatgtacaca 6960
tggaatcagg ccagtagtat caactcaact gctgttaaat ggcagtctag cagaagaaga 7020
tgtagtaatt agatctgcca atttcacaga caatgctaaa accataatag tacagctgaa 7080
cacatctgta gaaattaatt gtacaagacc caacaacaat acaagaaaaa gtatccgtat 7140
ccagagggga ccagggagag catttgttac aataggaaaa ataggaaata tgagacaagc 7200
acattgtaac attagtagag caaaatggaa tgccacttta aaacagatag ctagcaaatt 7260
aagagaacaa tttggaaata ataaaacaat aatctttaag caatcctcag gaggggaccc 7320
agaaattgta acgcacagtt ttaattgtgg aggggaattt ttctactgta attcaacaca 7380
actgtttaat agtacttggt ttaatagtac ttggagtact gaagggtcaa ataacactga 7440
aggaagtgac acaatcacac tcccatgcag aataaaacaa tttataaaca tgtggcagga 7500
agtaggaaaa gcaatgtatg cccctcccat cagtggacaa attagatgtt catcaaatat 7560

tactgggctg ctattaacaa gagatggtgg taataacaac aatgggtccg agatcttcag 7620
acctggagga ggcgatatga gggacaattg gagaagtgaa ttatataaat ataaagtagt 7680
aaaaattgaa ccattaggag tagcacccac caaggcaaag agaagagtgg tgcagagaga 7740
aaaaagagca gtgggaatag gagctttgtt ccttgggttc ttgggagcag caggaagcac 7800
tatgggcgca gcgtcaatga cgctgacggt acaggccaga caattattgt ctgatatagt 7860
gcagcagcag aacaatttgc tgagggctat tgaggcgcaa cagcatctgt tgcaactcac 7920
agtctggggc atcaaacagc tccaggcaag aatcctggct gtggaaagat acctaaagga 7980
tcaacagctc ctggggattt ggggttgctc tggaaaactc atttgcacca ctgctgtgcc 8040
ttggaatgct agttggagta ataaatctct ggaacagatt tggaataaca tgacctggat 8100
ggagtgggac agagaaatta acaattacac aagcttaata cactccttaa ttgaagaatc 8160
gcaaaaccag caagaaaaga atgaacaaga attattggaa ttagataaat gggcaagttt 8220
gtggaattgg tttaacataa caaattggct gtggtatata aaattattca taatgatagt 8280
aggaggcttg gtaggtttaa gaatagtttt tgctgtactt tctatagtga atagagttag 8340
gcagggatat tcaccattat cgtttcagac ccacctccca atcccgaggg gacccgacag 8400
gcccgaagga atagaagaag aaggtggaga gagagacaga gacagatcca ttcgattagt 8460
gaacggatcc ttagcactta tctgggacga tctgcggagc ctgtgcctct tcagctacca 8520
ccgcttgaga gacttactct tgattgtaac gaggattgtg gaacttctgg gacgcagggg 8580
gtgggaagcc ctcaaatatt ggtggaatct cctacagtat tggagtcagg aactaaagaa 8640
tagtgctgtt aacttgctca atgccacagc catagcagta gctgagggga cagatagggt 8700
tatagaagta ttacaagcag cttatagagc tattcgccac atacctagaa gaataagaca 8760
gggcttggaa aggattttgc tataagatgg gtggcaagtg gtcaaaaagt agtgtgattg 8820
gatggcctgc tgtaagggaa agaatgagac gagctgagcc agcagcagat ggggtgggag 8880
cagtatctcg agacctagaa aaacatggag caatcacaag tagcaataca gcagctaaca 8940
atgctgcttg tgcctggcta gaagcacaag aggaggaaga ggtgggtttt ccagtcacac 9000
ctcaggtacc tttaagacca atgacttaca aggcagctgt agatcttagc cactttttaa 9060
aagaaaaggg gggactggaa gggctaattc actcccaaag aagacaagat atccttgatc 9120
tgtggatcta ccacacacaa ggctacttcc ctgattggca gaactacaca ccagggccag 9180
gggtcagata tccactgacc tttggatggt gctacaagct agtaccagtt gagccagata 9240
aggtagaaga ggccaataaa ggagagaaca ccagcttgtt acaccctgtg agcctgcatg 9300
gaatggatga ccctgagaga gaagtgttag agtggaggtt tgacagccgc ctagcatttc 9360
atcacgtggc ccgagagctg catccggagt acttcaagaa ctgctgacat cgagcttgct 9420
acaagggact ttccgctggg gactttccag ggaggcgtgg cctgggcggg actggggagt 9480
ggcgagccct cagatgctgc atataagcag ctgctttttg cctgtactgg gtctctctgg 9540
ttagaccaga tctgagcctg ggagctctct ggctaactag ggaacccact gcttaagcct 9600
caataaagct tgccttgagt gcttcaagta gtgtgtgccc gtctgttgtg tgactctggt 9660

aactagagat ccctcagacc cttttagtca gtgtggaaaa tctctagcac cccccaggag 9720
gtagaggttg cagtgagcca agatcgcgcc actgcattcc agcctgggca agaaaacaag 9780
actgtctaaa ataataataa taagttaagg gtattaaata tatttataca tggaggtcat 9840
aaaaatatat atatttgggc tgggcgcagt ggctcacacc tgcgcccggc cctttgggag 9900
gccgaggcag gtggatcacc tgagtttggg agttccagac cagcctgacc aacatggaga 9960
aaccccttct ctgtgtattt ttagtagatt ttattttatg tgtattttat tcacaggtat 10020
ttctggaaaa ctgaaactgt ttttcctcta ctctgatacc acaagaatca tcagcacaga 10080
ggaagacttc tgtgatcaaa tgtggtggga gagggaggtt ttcaccagca catgagcagt 10140
cagttctgcc gcagactcgg cgggtgtcct tcggttcagt tccaacaccg cctgcctgga 10200
gagaggtcag accacagggt gagggctcag tccccaagac ataaacaccc aagacataaa 10260
cacccaacag gtccaccccg cctgctgccc aggcagagcc gattcaccaa gacgggaatt 10320
aggatagaga aagagtaagt cacacagagc cggctgtgcg ggagaacgga gttctattat 10380
gactcaaatc agtctcccca agcattcggg gatcagagtt tttaaggata acttagtgtg 10440
taggggggca gtgagttgga gatgaaagcg tagggagtcg aaggtgtcct tttgcgccga 10500
gtcagttcct gggtgggggc cacaagatcg gatgagccag tttatcaatc cgggggtgcc 10560
agctgatcca tggagtgcag ggtctgcaaa atatctcaag cactgattga tcttaggttt 10620
tacaatagtg atgttacccc aggaacaatt tggggaaggt cagaatcttg tagcctgtag 10680
ctgcatgact cctaaaccat aatttctttt ttgtttttt tttttattt ttgagacagg 10740
gtctcactct gtcacctagg ctggagtgca gtggtgcaat cacagctcac tgcagcctca 10800
acgtcgtaag ctcaagcgat cctcccacct cagcctgcct ggtagctgag actacaagcg 10860
acgccccagt taatttttgt atttttggta gaggcagcgt tttgccgtgt ggccctggct 10920
ggtctcgaac tcctgggctc aagtgatcca gcctcagcct cccaaagtgc tgggacaacc 10980
ggggccagtc actgcacctg gccctaaacc ataatttcta atcttttggc taatttgtta 11040
gtcctacaaa ggcagtctag tccccaggca aaaagggggt ttgtttcggg aaagggctgt 11100
tactgtcttt gtttcaaact ataaactaag ttcctcctaa acttagttcg gcctacaccc 11160
aggaatgaac aaggagagct tggaggtt.g aagcacgatg gaattggtta ggtcagatct 11220
ctttcactgt ctgagttata attttgcaat ggtggttcaa agactgcccg cttctgacac 11280
cagtcgctgc attaatgaat cggccaacgc gcggggagag gcggtttgcg tattggcgct 11340
cttccgcttc ctcgctcact gactcgctgc gctcggtcgt tcggctgcgg cgagcggtat 11400
cagctcactc aaaggcggta atacggttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga 11460
acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt 11520
ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt 11580
ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc 11640
gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa 11700

gcgtggcgct ttctcaatgc tcacgctgta ggtatctcag ttcggtgtag gtcgttcgct 11760
ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg ttcagcccga ccgctgcgcc ttatccggta 11820
actatcgtct tgagtccaac ccggtaagac acgacttatc gccactggca gcagccactg 11880
gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac agagttcttg aagtggtggc 11940
ctaactacgg ctacactaga aggacagtat ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta 12000
ccttcggaaa aagagttggt agctcttgat ccggcaaaca aaccaccgct ggtagcggtg 12060
gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt 12120
tgatcttttc tacggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa ctcacgttaa gggattttgg 12180
tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta 12240
aatcaatcta aagtatatat gagtaaactt ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg 12300
aggcacctat ctcagcgatc tgtctatttc gttcatccat agttgcctga ctccccgtcg 12360
tgtagataac tacgatacgg gagggcttac catctggccc cagtgctgca atgataccgc 12420
gagacccacg ctcaccggct ccagatttat cagcaataaa ccagccagcc ggaagggccg 12480
agcgcagaag tggtcctgca actttatccg cctccatcca gtctattaat tgttgccggg 12540
aagctagagt aagtagttcg ccagttaata gtttgcgcaa cgttgttgcc attgctacag 12600
gcatcgtggt gtcacgctcg tcgtttggta tggcttcatt cagctccggt tcccaacgat 12660
caaggcgagt tacatgatcc cccatgttgt gcaaaaaagc ggttagctcc ttcggtcctc 12720
cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgcag tgttatcact catggttatg gcagcactgc 12780
ataattctct tactgtcatg ccatccgtaa gatgcttttc tgtgactggt gagtactcaa 12840
ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgcggc gaccgagttg ctcttgcccg gcgtcaatac 12900
gggataatac cgcgccacat agcagaactt taaaagtgct catcattgga aaacgttctt 12960
cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc tgttgagatc cagttcgatg taacccactc 13020
gtgcacccaa ctgatcttca gcatctttta ctttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa 13080
caggaaggca aaatgccgca aaaaagggaa taagggcgac acggaaatgt tgaatactca 13140
tactcttcct ttttcaatat tattgaagca tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat 13200
acatatttga atgtatttag aaaaataaac aaataggggt tccgcgcaca tttccccgaa 13260
aagtgccacc tgacgtctaa gaaaccatta ttatcatgac attaacctat aaaaataggc 13320
gtatcacgag gccctttcgt cttcaagaac tgcctcgcgc gtttcggtga tgacggtgaa 13380
aacctctgac acatgcagct cccggagacg gtcacagctt gtctgtaagc ggatgccggg 13440
agcagacaag cccgtcaggg cgcgtcagcg ggtgttggcg ggtgtcgggg cgcagccatg 13500
acccagtcac gtagcgatag cggagtgtac tggcttaact atgcggcatc agagcagatt 13560
gtactgagag tgcaccatat gcggtgtgaa ataccgcaca gatgcgtaag gagaaaatac 13620
cgcatcaggc gccattcgcc attcaggctg cgcaactgtt gggaagggcg atcggtgcgg 13680
gcctcttcgc tattacgcca gcgcggggag gcagagattg cagtaagctg agatcgcagc 13740
actgcactcc agcctgggcg acagagtaag actctgtctc aaaaataaaa taaataaatc 13800

aatcagatat tccaatcttt tcctttattt atttatttat tttctatttt ggaaacacag 13860
tccttcctta ttccagaatt acacatatat tctatttttc tttatatgct ccagtttttt 13920
ttagaccttc acctgaaatg tgtgtataca aaatctaggc cagtccagca gagcctaaag 13980
gtaaaaaata aaataataaa aaataaataa aatctagctc actccttcac atcaaaatgg 14040
agatacagct gttagcatta aataccaaat aacccatctt gtcctcaata attttaagcg 14100
cctctctcca ccacatctaa ctcctgtcaa aggcatgtgc cccttccggg cgctctgctg 14160
tgctgccaac caactggcat gtggactctg cagggtccct aactgccaag ccccacagtg 14220
tgccctgagg ctgccccttc cttctagcgg ctgcccccac tcggctttgc tttccctagt 14280
ttcagttact tgcgttcagc caaggtctga aactaggtgc gcacagagcg gtaagactgc 14340
gagagaaaga gaccagcttt acagggggtt tatcacagtg caccctgaca gtcgtcagcc 14400
tcacaggggg tttatcacat tgcaccctga cagtcgtcag cctcacaggg ggtttatcac 14460
agtgcaccct tacaatcatt ccatttgatt cacaattttt ttagtctcta ctgtgcctaa 14520
cttgtaagtt aaatttgatc agaggtgtgt tcccagaggg gaaaacagta tatacagggt 14580
tcagtactat cgcatttcag gcctccacct gggtcttgga atgtgtcccc cgaggggtga 14640
tgactacctc agttggatct ccacaggtca cagtgacaca agataaccaa gacacctccc 14700
aaggctacca caatgggccg ccctccacgt gcacatggcc ggaggaactg ccatgtcgga 14760
ggtgcaagca cacctgcgca tcagagtcct tggtgtggag ggagggacca gcgcagcttc 14820
cagccatcca cctgatgaac agaacctagg gaaagcccca gttctactta caccaggaaa 14880
ggc 14883

<210> 2
<211> 14883
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220> misc_recomb
<223> p4411

<400> 2

tggaagggct aatttggtcc caaaaaagac aagagatcct tgatctgtgg atctaccaca 60
cacaaggcta cttccctgat tggcagaact acacaccagg gccagggatc agatatccac 120
tgacctttgg atggtgcttc aagttagtac cagttgaacc agagcaagta gaagaggcca 180
aataaggaga gaagaacagc ttgttacacc ctatgagcca gcatgggatg gaggacccgg 240
agggagaagt attagtgtgg aagtttgaca gcctcctagc atttcgtcac atggcccgag 300
agctgcatcc ggagtactac aaagactgct gacatcgagc tttctacaag ggactttccg 360
ctggggactt tccagggagg tgtggcctgg gcgggactgg ggagtggcga gccctcagat 420
gctacatata agcagctgct ttttgcctgt actgggtctc tctggttaga ccagatctga 480
gcctgggagc tctctggcta actagggaac ccactgctta agcctcaata aagcttgcct 540
tgagtgctca aagtagtgtg tgcccgtctg ttgtgtgact ctggtaacta gagatccctc 600

agacccttt agtcagtgtg gaaaatctct agcagtggcg cccgaacagg gacttgaaag 660
cgaaagtaaa gccagaggag atctctcgac gcaggactcg gcttgctgaa gcgcgcacgg 720
caagaggcga ggggcggcga ctggtgagta cgccaaaaat tttgactagc ggaggctaga 780
aggagagaga tgggtgcgag agcgtcggta ttaagcgggg gagaattaga taaatgggaa 840
aaaattcggt taaggccagg gggaaagaaa caatataaac taaaacatat agtatgggca 900
agcagggagc tagaacgatt cgcagttaat cctggccttt tagagacatc agaaggctgt 960
agacaaatac tgggacagct acaaccatcc cttcagacag gatcagaaga acttagatca 1020
ttatataata caatagcagt cctctattgt gtgcatcaaa ggatagatgt aaaagacacc 1080
aaggaagcct tagataagat agaggaagag caaaacaaaa gtaagaaaaa ggcacagcaa 1140
gcagcagctg acacaggaaa caacagccag gtcagccaaa attaccctat agtgcagaac 1200
ctccaggggc aaatggtaca tcaggccata tcacctagaa ctttaaatgc atgggtaaaa 1260
gtagtagaag agaaggcttt cagcccagaa gtaataccca tgttttcagc attatcagaa 1320
ggagccaccc cacaagattt aaataccatg ctaaacacag tgggggggaca tcaagcagcc 1380
atgcaaatgt taaaagagac catcaatgag gaagctgcag aatgggatag attgcatcca 1440
gtgcatgcag ggcctattgc accaggccag atgagagaac caaggggaag tgacatagca 1500
ggaactacta gtacccttca ggaacaaata ggatggatga cacataatcc acctatccca 1560
gtaggagaaa tctataaaag atggataatc ctgggattaa ataaaatagt aagaatgtat 1620
agccctacca gcattctgga cataagacaa ggaccaaagg aaccctttag agactatgta 1680
gaccgattct ataaaactct aagagccgag caagcttcac aagaggtaaa aaattggatg 1740
acagaaacct tgttggtcca aaatgcgaac ccagattgta agactatttt aaaagcattg 1800
ggaccaggag cgacactaga agaaatgatg acagcatgtc agggagtggg gggacccggc 1860
cataaagcaa gagttttggc tgaagcaatg agccaagtaa caaatccagc taccataatg 1920
atacagaaag gcaattttag gaaccaaaga aagactgtta agtgtttcaa ttgtggcaaa 1980
gaagggcaca tagccaaaaa ttgcagggcc cctaggaaaa agggctgttg gaaatgtgga 2040
aaggaaggac accaaatgaa agattgtact gagagacagg ctaatttttt agggaagatc 2100
tggccttccc acaagggaag gccagggaat tttcttcaga gcagaccaga gccaacagcc 2160
ccaccagaag agagcttcag gtttggggaa gagacaacaa ctccctctca gaagcaggag 2220
ccgatagaca aggaactgta tcctttagct tccctcagat cactctttgg cagcgacccc 2280
tcgtcacaat aaagataggg gggcaattaa aggaagctct attagataca ggagcagatg 2340
atacagtatt agaagaaatg aatttgccag gaagatggaa accaaaaatg ataggggggaa 2400
ttggaggttt tatcaaagta agacagtatg atcagatact catagaaatc tgcggacata 2460
aagctatagg tacagtatta gtaggaccta cacctgtcaa cataattgga agaaatctgt 2520
tgactcagat tggctgcact ttaaattttc ccattagtcc tattgagact gtaccagtaa 2580
aattaaagcc aggaatggat ggcccaaaag ttaaacaatg gccattgaca gaagaaaaaa 2640
taaaagcatt agtagaaatt tgtacagaaa tggaaaagga aggaaaaatt tcaaaaattg 2700

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

atcttaagac agcagtacaa atggcagtat tcatccacaa ttttaaaaga aaagggggga 4800
ttgggggta cagtgcaggg gaaagaatag tagacataat agcaacagac atacaaacta 4860
aagaattaca aaaacaaatt acaaaaattc aaaattttcg ggtttattac agggacagca 4920
gagatccagt ttggaaagga ccagcaaagc tcctctggaa aggtgaaggg gcagtagtaa 4980
tacaagataa tagtgacata aaagtagtgc caagaagaaa agcaaagatc atcagggatt 5040
atggaaaaca gatggcaggt gatgattgtg tggcaagtag acaggatgag gattaacaca 5100
tggaaaagat tagtaaaaca ccatatgtat atttcaagga aagctaagga ctggttttat 5160
agacatcact atgaaagtac taatccaaaa ataagttcag aagtacacat cccactaggg 5220
gatgctaaat tagtaataac aacatattgg ggtctgcata caggagaaag agactggcat 5280
ttgggtcagg gagtctccat agaatggagg aaaaagagat atagcacaca agtagaccct 5340
gacctagcag accaactaat tcatctgcac tattttgatt gtttttcaga atctgctata 5400
agaaatacca tattaggacg tatagttagt cctaggtgtg aatatcaagc aggacataac 5460
aaggtaggat ctctacagta cttggcacta gcagcattaa taaaaccaaa acagataaag 5520
ccacctttgc ctagtgttag gaaactgaca gaggacagat ggaacaagcc ccagaagacc 5580
aagggccaca gagggagcca tacaatgaat ggacactaga gcttttagag gaacttaaga 5640
gtgaagctgt tagacatttt cctaggatat ggctccataa cttaggacaa catatctatg 5700
aaacttacgg ggatacttgg gcaggagtgg aagccataat aagaattctg caacaactgc 5760
tgtttatcca tttcagaatt gggtgtcgac atagcagaat aggcgttact cgacagagga 5820
gagcaagaaa tggagccagt agatcctaga ctagagccct ggaagcatcc aggaagtcag 5880
cctaaaactg cttgtaccaa ttgctattgt aaaaagtgtt gctttcattg ccaagtttgt 5940
ttcatgacaa aagccttagg catctcctat ggcaggaaga agcggagaca gcgacgaaga 6000
gctcatcaga acagtcagac tcatcaagct tctctatcaa agcagtaagt agtacatgta 6060
atgcaaccta taatagtagc aatagtagca ttagtagtag caataataat agcaatagtt 6120
gtgtggtcca tagtaatcat agaatatagg aaaatattaa gacaaagaaa aatagacagg 6180
ttaattgata gactaataga aagagcagaa gacagtggca atgagagtga aggagaagta 6240
tcagcacttg tggagatggg ggtggaaatg gggcaccatg ctccttggga tattgatgat 6300
ctgtagtgct acagaaaaat tgtgggtcac agtctattat ggggtacctg tgtggaagga 6360
agcaaccacc actctatttt gtgcatcaga tgctaaagca tatgatacag aggtacataa 6420
tgtttgggcc acacatgcct gtgtacccac agaccccaac ccacaagaag tagtattggt 6480
aaatgtgaca gaaaatttta acatgtggaa aaatgacatg gtagaacaga tgcatgagga 6540
tataatcagt ttatgggatc aaagcctaaa gccatgtgta aaattaaccc cactctgtgt 6600
tagtttaaag tgcactgatt tgaagaatga tactaatacc aatagtagta gcgggagaat 6660
gataatggag aaaggagaga taaaaaactg ctctttcaat atcagcacaa gcataagaga 6720
taaggtgcag aaagaatatg cattctttta taaacttgat atagtaccaa tagataatac 6780
cagctatagg ttgataagtt gtaacacctc agtcattaca caggcctgtc caaaggtatc 6840

ctttgagcca attcccatac attattgtgc cccggctggt tttgcgattc taaaatgtaa 6900
taataagacg ttcaatggaa caggaccatg tacaaatgtc agcacagtac aatgtacaca 6960
tggaatcagg ccagtagtat caactcaact gctgttaaat ggcagtctag cagaagaaga 7020
tgtagtaatt agatctgcca atttcacaga caatgctaaa accataatag tacagctgaa 7080
cacatctgta gaaattaatt gtacaagacc caacaacaat acaagaaaaa gtatccgtat 7140
ccagagggga ccagggagag catttgttac aataggaaaa ataggaaata tgagacaagc 7200
acattgtaac attagtagag caaaatggaa tgccacttta aaacagatag ctagcaaatt 7260
aagagaacaa tttggaaata ataaaacaat aatctttaag caatcctcag gaggggaccc 7320
agaaattgta acgcacagtt ttaattgtgg aggggaattt ttctactgta attcaacaca 7380
actgtttaat agtacttggt ttaatagtac ttggagtact gaagggtcaa ataacactga 7440
aggaagtgac acaatcacac tcccatgcag aataaaacaa tttataaaca tgtggcagga 7500
agtaggaaaa gcaatgtatg cccctcccat cagtggacaa attagatgtt catcaaatat 7560
tactgggctg ctattaacaa gagatggtgg taataacaac aatgggtccg agatcttcag 7620
acctggagga ggcgatatga gggacaattg gagaagtgaa ttatataaat ataaagtagt 7680
aaaaattgaa ccattaggag tagcacccac caaggcaaag agaagagtgg tgcagagaga 7740
aaaaagagca gtgggaatag gagctttgtt ccttgggttc ttgggagcag caggaagcac 7800
tatgggcgca gcgtcaatga cgctgacggt acaggccaga caattattgt ctgatatagt 7860
gcagcagcag aacaatttgc tgagggctat tgaggcgcaa cagcatctgt tgcaactcac 7920
agtctggggc atcaaacagc tccaggcaag aatcctggct gtggaaagat acctaaagga 7980
tcaacagctc ctggggattt ggggttgctc tggaaaactc atttgcacca ctgctgtgcc 8040
ttggaatgct agttggagta ataaatctct ggaacagatt tggaataaca tgacctggat 8100
ggagtgggac agagaaatta acaattacac aagcttaata cactccttaa ttgaagaatc 8160
gcaaaaccag caagaaaaga atgaacaaga attattggaa ttagataaat gggcaagttt 8220
gtggaattgg tttaacataa caaattggct gtggtatata aaattattca taatgatagt 8280
aggaggcttg gtaggtttaa gaatagtttt tgctgtactt tctatagtga atagagttag 8340
gcagggatat tcaccattat cgtttcagac ccacctccca atcccgaggg gacccgacag 8400
gcccgaagga atagaagaag aaggtggaga gagagacaga gacagatcca ttcgattagt 8460
gaacggatcc ttagcactta tctgggacga tctgcggagc ctgtgcctct tcagctacca 8520
ccgcttgaga gacttactct tgattgtaac gaggattgtg gaacttctgg gacgcagggg 8580
gtgggaagcc ctcaaatatt ggtggaatct cctacagtat tggagtcagg aactaaagaa 8640
tagtgctgtt aacttgctca atgccacagc catagcagta gctgagggga cagatagggt 8700
tatagaagta ttacaagcag cttatagagc tattcgccac atacctagaa gaataagaca 8760
gggcttggaa aggattttgc tataagatgg gtggcaagtg gtcaaaaagt agtgtgattg 8820
gatggcctgc tgtaagggaa agaatgagac gagctgagcc agcagcagat ggggtgggag 8880

cagtatctcg agacctagaa aaacatggag caatcacaag tagcaataca gcagctaaca 8940
atgctgcttg tgcctggcta gaagcacaag aggaggaaga ggtgggtttt ccagtcacac 9000
ctcaggtacc tttaagacca atgacttaca aggcagctgt agatcttagc cactttttaa 9060
aagaaaaggg gggactggaa gggctaattc actcccaaag aagacaagat atccttgatc 9120
tgtggatcta ccacacacaa ggctacttcc ctgattggca gaactacaca ccagggccag 9180
gggtcagata tccactgacc tttggatggt gctacaagct agtaccagtt gagccagata 9240
aggtagaaga ggccaataaa ggagagaaca ccagcttgtt acaccctgtg agcctgcatg 9300
gaatggatga ccctgagaga gaagtgttag agtggaggtt tgacagccgc ctagcatttc 9360
atcacgtggc ccgagagctg catccggagt acttcaagaa ctgctgacat cgagcttgct 9420
acaagggact ttccgctggg gactttccag ggaggcgtgg cctgggcggg actggggagt 9480
ggcgagccct cagatgctgc atataagcag ctgctttttg cctgtactgg gtctctctgg 9540
ttagaccaga tctgagcctg ggagctctct ggctaactag ggaacccact gcttaagcct 9600
caataaagct tgccttgagt gcttcaagta gtgtgtgccc gtctgttgtg tgactctggt 9660
aactagagat ccctcagacc cttttagtca gtgtggaaaa tctctagcac cccccaggag 9720
gtagaggttg cagtgagcca agatcgcgcc actgcattcc agcctgggca agaaaacaag 9780
actgtctaaa ataataataa taagttaagg gtattaaata tatttataca tggaggtcat 9840
aaaaatatat atatttgggc tgggcgcagt ggctcacacc tgcgcccggc cctttgggag 9900
gccgaggcag gtggatcacc tgagtttggg agttccagac cagcctgacc aacatggaga 9960
aaccccttct ctgtgtattt ttagtagatt ttattttatg tgtattttat tcacaggtat 10020
ttctggaaaa ctgaaactgt ttttcctcta ctctgatacc acaagaatca tcagcacaga 10080
ggaagacttc tgtgatcaaa tgtggtggga gagggaggtt ttcaccagca catgagcagt 10140
cagttctgcc gcagactcgg cgggtgtcct tcggttcagt tccaacaccg cctgcctgga 10200
gagaggtcag accacagggt gagggctcag tccccaagac ataaacaccc aagacataaa 10260
cacccaacag gtccaccccg cctgctgccc aggcagagcc gattcaccaa gacgggaatt 10320
aggatagaga aagagtaagt cacacagagc cggctgtgcg ggagaacgga gttctattat 10380
gactcaaatc agtctcccca agcattcggg gatcagagtt tttaaggata acttagtgtg 10440
taggggggcca gtgagttgga gatgaaagcg tagggagtcg aaggtgtcct tttgcgccga 10500
gtcagttcct gggtgggggc cacaagatcg gatgagccag tttatcaatc cgggggtgcc 10560
agctgatcca tggagtgcag ggtctgcaaa atatctcaag cactgattga tcttaggttt 10620
tacaatagtg atgttacccc aggaacaatt tggggaaggt cagaatcttg tagcctgtag 10680
ctgcatgact cctaaaccat aatttctttt ttgtttttttt ttttttattt ttgagacagg 10740
gtctcactct gtcacctagg ctggagtgca gtggtgcaat cacagctcac tgcagcctca 10800
acgtcgtaag ctcaagcgat cctcccacct cagcctgcct ggtagctgag actacaagcg 10860
acgccccagt taatttttgt atttttggta gaggcagcgt tttgccgtgt ggccctggct 10920
ggtctcgaac tcctgggctc aagtgatcca gcctcagcct cccaaagtgc tgggacaacc 10980

ggggccagtc actgcacctg gccctaaacc ataatttcta atcttttggc taatttgtta 11040
gtcctacaaa ggcagtctag tccccaggca aaaagggggt ttgtttcggg aaagggctgt 11100
tactgtcttt gtttcaaact ataaactaag ttcctcctaa acttagttcg gcctacaccc 11160
aggaatgaac aaggagagct tggaggttag aagcacgatg gaattggtta ggtcagatct 11220
ctttcactgt ctgagttata attttgcaat ggtggttcaa agactgcccg cttctgacac 11280
cagtcgctgc attaatgaat cggccaacgc gcggggagag gcggtttgcg tattggcgct 11340
cttccgcttc ctcgctcact gactcgctgc gctcggtcgt tcggctgcgg cgagcggtat 11400
cagctcactc aaaggcggta atacggttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga 11460
acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt 11520
ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt 11580
ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc 11640
gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa 11700
gcgtggcgct ttctcaatgc tcacgctgta ggtatctcag ttcggtgtag gtcgttcgct 11760
ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg ttcagcccga ccgctgcgcc ttatccggta 11820
actatcgtct tgagtccaac ccggtaagac acgacttatc gccactggca gcagccactg 11880
gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac agagttcttg aagtggtggc 11940
ctaactacgg ctacactaga aggacagtat ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta 12000
ccttcggaaa aagagttggt agctcttgat ccggcaaaca aaccaccgct ggtagcggtg 12060
gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt 12120
tgatcttttc tacggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa ctcacgttaa gggattttgg 12180
tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta 12240
aatcaatcta aagtatatat gagtaaactt ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg 12300
aggcacctat ctcagcgatc tgtctatttc gttcatccat agttgcctga ctccccgtcg 12360
tgtagataac tacgatacgg gagggcttac catctggccc cagtgctgca atgataccgc 12420
gagacccacg ctcaccggct ccagatttat cagcaataaa ccagccagcc ggaagggccg 12480
agcgcagaag tggtcctgca actttatccg cctccatcca gtctattaat tgttgccggg 12540
aagctagagt aagtagttcg ccagttaata gtttgcgcaa cgttgttgcc attgctacag 12600
gcatcgtggt gtcacgctcg tcgtttggta tggcttcatt cagctccggt tcccaacgat 12660
caaggcgagt tacatgatcc cccatgttgt gcaaaaaagc ggttagctcc ttcggtcctc 12720
cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgcag tgttatcact catggttatg gcagcactgc 12780
ataattctct tactgtcatg ccatccgtaa gatgcttttc tgtgactggt gagtactcaa 12840
ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgcggc gaccgagttg ctcttgcccg gcgtcaatac 12900
gggataatac cgcgccacat agcagaactt taaaagtgct catcattgga aaacgttctt 12960
cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc tgttgagatc cagttcgatg taacccactc 13020

gtgcacccaa ctgatcttca gcatctttta ctttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa 13080
caggaaggca aaatgccgca aaaaagggaa taagggcgac acggaaatgt tgaatactca 13140
tactcttcct ttttcaatat tattgaagca tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat 13200
acatatttga atgtatttag aaaaataaac aaataggggt tccgcgcaca tttccccgaa 13260
aagtgccacc tgacgtctaa gaaaccatta ttatcatgac attaacctat aaaaataggc 13320
gtatcacgag gccctttcgt cttcaagaac tgcctcgcgc gtttcggtga tgacggtgaa 13380
aacctctgac acatgcagct cccggagacg gtcacagctt gtctgtaagc ggatgccggg 13440
agcagacaag cccgtcaggg cgcgtcagcg ggtgttggcg ggtgtcgggg cgcagccatg 13500
acccagtcac gtagcgatag cggagtgtac tggcttaact atgcggcatc agagcagatt 13560
gtactgagag tgcaccatat gcggtgtgaa ataccgcaca gatgcgtaag gagaaaatac 13620
cgcatcaggc gccattcgcc attcaggctg cgcaactgtt gggaagggcg atcggtgcgg 13680
gcctcttcgc tattacgcca gcgcggggag gcagagattg cagtaagctg agatcgcagc 13740
actgcactcc agcctgggcg acagagtaag actctgtctc aaaaataaaa taaataaatc 13800
aatcagatat tccaatcttt tcctttattt atttatttat tttctatttt ggaaacacag 13860
tccttcctta ttccagaatt acacatatat tctatttttc tttatatgct ccagtttttt 13920
ttagaccttc acctgaaatg tgtgtataca aaatctaggc cagtccagca gagcctaaag 13980
gtaaaaaata aaataataaa aaataaataa aatctagctc actccttcac atcaaaatgg 14040
agatacagct gttagcatta aataccaaat aacccatctt gtcctcaata attttaagcg 14100
cctctctcca ccacatctaa ctcctgtcaa aggcatgtgc cccttccggg cgctctgctg 14160
tgctgccaac caactggcat gtggactctg cagggtccct aactgccaag ccccacagtg 14220
tgccctgagg ctgccccttc cttctagcgg ctgcccccac tcggctttgc tttccctagt 14280
ttcagttact tgcgttcagc caaggtctga aactaggtgc gcacagagcg gtaagactgc 14340
gagagaaaga gaccagcttt acagggggtt tatcacagtg caccctgaca gtcgtcagcc 14400
tcacaggggg tttatcacat tgcaccctga cagtcgtcag cctcacaggg ggtttatcac 14460
agtgcaccct tacaatcatt ccatttgatt cacaattttt ttagtctcta ctgtgcctaa 14520
cttgtaagtt aaatttgatc agaggtgtgt tcccagaggg gaaaacagta tatacagggt 14580
tcagtactat cgcatttcag gcctccacct gggtcttgga atgtgtcccc cgaggggtga 14640
tgactacctc agttggatct ccacaggtca cagtgacaca agataaccaa gacacctccc 14700
aaggctacca caatgggccg ccctccacgt gcacatggcc ggaggaactg ccatgtcgga 14760
ggtgcaagca cacctgcgca tcagagtcct tggtgtggag ggagggacca gcgcagcttc 14820
cagccatcca cctgatgaac agaacctagg gaaagcccca gttctactta caccaggaaa 14880
ggc 14883

<210> 3
<211> 14883
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220> misc_recomb
<223> p4634

<400> 3

```
tggaagggct aatttggtcc caaaaaagac aagagatcct tgatctgtgg atctaccaca      60
cacaaggcta cttccctgat tggcagaact acacaccagg gccagggatc agatatccac     120
tgacctttgg atggtgcttc aagttagtac cagttgaacc agagcaagta gaagaggcca     180
aataaggaga gaagaacagc ttgttacacc ctatgagcca gcatgggatg gaggacccgg     240
agggagaagt attagtgtgg aagtttgaca gcctcctagc atttcgtcac atggcccgag     300
agctgcatcc ggagtactac aaagactgct gacatcgagc tttctacaag ggactttccg     360
ctggggactt tccagggagg tgtggcctgg gcgggactgg ggagtggcga gccctcagat     420
gctacatata agcagctgct ttttgcctgt actgggtctc tctggttaga ccagatctga     480
gcctgggagc tctctggcta actagggaac ccactgctta agcctcaata aagcttgcct     540
tgagtgctca 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
aggagagaga tgggtgcgag agcgtcggta ttaagcgggg gagaattaga taaatgggaa     840
aaaattcggt taaggccagg gggaaagaaa caatataaac taaaacatat agtatgggca     900
agcagggagc tagaacgatt cgcagttaat cctggccttt tagagacatc agaaggctgt     960
agacaaatac tgggacagct acaaccatcc cttcagacag gatcagaaga acttagatca    1020
ttatataata caatagcagt cctctattgt gtgcatcaaa ggatagatgt aaaagacacc    1080
aaggaagcct tagataagat agaggaagag caaaacaaaa gtaagaaaaa ggcacagcaa    1140
gcagcagctg acacaggaaa caacagccag gtcagccaaa attaccctat agtgcagaac    1200
ctccaggggc aaatggtaca tcaggccata tcacctagaa ctttaaatgc atgggtaaaa    1260
gtagtagaag agaaggcttt cagcccagaa gtaataccca tgttttcagc attatcagaa    1320
ggagccaccc cacaagattt aaataccatg ctaaacacag tgggggggaca tcaagcagcc    1380
atgcaaatgt taaaagagac catcaatgag gaagctgcag aatgggatag attgcatcca    1440
gtgcatgcag ggcctattgc accaggccag atgagagaac caaggggaag tgacatagca    1500
ggaactacta gtacccttca ggaacaaata ggatggatga cacataatcc acctatccca    1560
gtaggagaaa tctataaaag atggataatc ctgggattaa ataaaatagt aagaatgtat    1620
agccctacca gcattctgga cataagacaa ggaccaaagg aaccctttag agactatgta    1680
gaccgattct ataaaactct aagagccgag caagcttcac aagaggtaaa aaattggatg    1740
acagaaacct tgttggtcca aaatgcgaac ccagattgta agactatttt aaaagcattg    1800
ggaccaggag cgacactaga agaaatgatg acagcatgtc agggagtggg gggacccggc    1860
cataaagcaa gagttttggc tgaagcaatg agccaagtaa caaatccagc taccataatg    1920
```

atacagaaag gcaattttag gaaccaaaga aagactgtta agtgtttcaa ttgtggcaaa 1980
gaagggcaca tagccaaaaa ttgcagggcc cctaggaaaa agggctgttg gaaatgtgga 2040
aaggaaggac accaaatgaa agattgtact gagagacagg ctaatttttt agggaagatc 2100
tggccttccc acaagggaag gccagggaat tttcttcaga gcagaccaga gccaacagcc 2160
ccaccagaag agagcttcag gtttggggaa gagacaacaa ctccctctca gaagcaggag 2220
ccgatagaca aggaactgta tcctttagct tccctcagat cactctttgg cagcgacccc 2280
tcgtcacaat aaagataggg gggcaattaa aggaagctct attagataca ggagcagatg 2340
atacagtatt agaagaaatg aatttgccag gaagatggaa accaaaaatg ataggggggaa 2400
ttggaggttt tatcaaagta agacagtatg atcagatact catagaaatc tgcggacata 2460
aagctatagg tacagtatta gtaggaccta cacctgtcaa cataattgga agaaatctgt 2520
tgactcagat tggctgcact ttaaattttc ccattagtcc tattgagact gtaccagtaa 2580
aattaaagcc aggaatggat ggcccaaaag ttaaacaatg gccattgaca gaagaaaaaa 2640
taaaagcatt agtagaaatt tgtacagaaa tggaaaagga aggaaaaatt tcaaaaattg 2700
ggcctgaaaa tccatacaat actccagtat ttgccataaa gaaaaaagac agtactaaat 2760
ggagaaaatt agtagatttc agagaactta ataagagaac tcaagatttc tgggaagttc 2820
aattaggaat accacatcct gcagggttaa aacagaaaaa atcagtaaca gtactggatg 2880
tgggcgatgc atatttttca gttcccttag ataaagactt caggaagtat actgcattta 2940
ccatacctag tataaacaat gagacaccag ggattagata tcagtacaat gtgcttccac 3000
agggatggaa aggatcacca gcaatattcc agtgtagcat gacaaaaatc ttagagcctt 3060
ttagaaaaca aaatccagac atagtcatct atcaatacat ggatgatttg tatgtaggat 3120
ctgacttaga aatagggcag catagaacaa aaatagagga actgagacaa catctgttga 3180
ggtggggatt taccacacca gacaaaaaac atcagaaaga acctccattc ctttggatgg 3240
gttatgaact ccatcctgat aaatggacag tacagcctat agtgctgcca gaaaaggaca 3300
gctggactgt caatgacata cagaaattag tgggaaaatt gaattgggca agtcagattt 3360
atgcagggat taaagtaagg caattatgta aacttcttag gggaaccaaa gcactaacag 3420
aagtagtacc actaacagaa gaagcagagc tagaactggc agaaaacagg gagattctaa 3480
aagaaccggt acatggagtg tattatgacc catcaaaaga cttaatagca gaaatacaga 3540
agcaggggca aggccaatgg acatatcaaa tttatcaaga gccatttaaa aatctgaaaa 3600
caggaaaata tgcaagaatg aagggtgccc acactaatga tgtgaaacaa ttaacagagg 3660
cagtacaaaa aatagccaca gaaagcatag taatatgggg aaagactcct aaatttaaat 3720
tacccataca aaaggaaaca tgggaagcat ggtggacaga gtattggcaa gccacctgga 3780
ttcctgagtg ggagtttgtc aatacccctc ccttagtgaa gttatggtac cagttagaga 3840
aagaacccat aataggagca gaaactttct atgtagatgg ggcagccaat agggaaacta 3900
aattaggaaa agcaggatat gtaactgaca gaggaagaca aaaagttgtc cccctaacgg 3960
acacaacaaa tcagaagact gagttacaag caattcatct agctttgcag gattcgggat 4020

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

atgcaaccta taatagtagc aatagtagca ttagtagtag caataataat agcaatagtt 6120
gtgtggtcca tagtaatcat agaatatagg aaaatattaa gacaaagaaa aatagacagg 6180
ttaattgata gactaataga aagagcagaa gacagtggca atgagagtga aggagaagta 6240
tcagcacttg tggagatggg ggtggaaatg gggcaccatg ctccttggga tattgatgat 6300
ctgtagtgct acagaaaaat tgtgggtcac agtctattat ggggtacctg tgtggaagga 6360
agcaaccacc actctatttt gtgcatcaga tgctaaagca tatgatacag aggtacataa 6420
tgtttgggcc acacatgcct gtgtacccac agaccccaac ccacaagaag tagtattggt 6480
aaatgtgaca gaaaatttta acatgtggaa aaatgacatg gtagaacaga tgcatgagga 6540
tataatcagt ttatgggatc aaagcctaaa gccatgtgta aaattaaccc cactctgtgt 6600
tagtttaaag tgcactgatt tgaagaatga tactaatacc aatagtagta gcgggagaat 6660
gataatggag aaaggagaga taaaaaactg ctctttcaat atcagcacaa gcataagaga 6720
taaggtgcag aaagaatatg cattctttta taaacttgat atagtaccaa tagataatac 6780
cagctatagg ttgataagtt gtaacacctc agtcattaca caggcctgtc caaaggtatc 6840
ctttgagcca attcccatac attattgtgc cccggctggt tttgcgattc taaaatgtaa 6900
taataagacg ttcaatggaa caggaccatg tacaaatgtc agcacagtac aatgtacaca 6960
tggaatcagg ccagtagtat caactcaact gctgttaaat ggcagtctag cagaagaaga 7020
tgtagtaatt agatctgcca atttcacaga caatgctaaa accataatag tacagctgaa 7080
cacatctgta gaaattaatt gtacaagacc caacaacaat acaagaaaaa gtatccgtat 7140
ccagagggga ccagggagag catttgttac aataggaaaa ataggaaata tgagacaagc 7200
acattgtaac attagtagag caaaatggaa tgccacttta aaacagatag ctagcaaatt 7260
aagagaacaa tttggaaata ataaaacaat aatctttaag caatcctcag gaggggaccc 7320
agaaattgta acgcacagtt ttaattgtgg aggggaattt ttctactgta attcaacaca 7380
actgtttaat agtacttggt ttaatagtac ttggagtact gaagggtcaa ataacactga 7440
aggaagtgac acaatcacac tcccatgcag aataaaacaa tttataaaca tgtggcagga 7500
agtaggaaaa gcaatgtatg cccctcccat cagtggacaa attagatgtt catcaaatat 7560
tactgggctg ctattaacaa gagatggtgg taataacaac aatgggtccg agatcttcag 7620
acctggagga ggcgatatga gggacaattg gagaagtgaa ttatataaat ataaagtagt 7680
aaaaattgaa ccattaggag tagcacccac caaggcaaag agaagagtgg tgcagagaga 7740
aaaaagagca gtgggaatag gagctttgtt ccttgggttc ttgggagcag caggaagcac 7800
tatgggcgca gcgtcaatga cgctgacggt acaggccaga caattattgt ctgatatagt 7860
gcagcagcag aacaatttgc tgagggctat tgaggcgcaa cagcatctgt tgcaactcac 7920
agtctggggc atcaaacagc tccaggcaag aatcctggct gtggaaagat acctaaagga 7980
tcaacagctc ctggggattt ggggttgctc tggaaaactc atttgcacca ctgctgtgcc 8040
ttggaatgct agttggagta ataaatctct ggaacagatt tggaataaca tgacctggat 8100
ggagtgggac agagaaatta acaattacac aagcttaata cactccttaa ttgaagaatc 8160

gcaaaaccag caagaaaaga atgaacaaga attattggaa ttagataaat gggcaagttt 8220
gtggaattgg tttaacataa caaattggct gtggtatata aaattattca taatgatagt 8280
aggaggcttg gtaggtttaa gaatagtttt tgctgtactt tctatagtga atagagttag 8340
gcagggatat tcaccattat cgtttcagac ccacctccca atcccgaggg gacccgacag 8400
gcccgaagga atagaagaag aaggtggaga gagagacaga gacagatcca ttcgattagt 8460
gaacggatcc ttagcactta tctgggacga tctgcggagc ctgtgcctct tcagctacca 8520
ccgcttgaga gacttactct tgattgtaac gaggattgtg gaacttctgg gacgcagggg 8580
gtgggaagcc ctcaaatatt ggtggaatct cctacagtat tggagtcagg aactaaagaa 8640
tagtgctgtt aacttgctca atgccacagc catagcagta gctgagggga cagatagggt 8700
tatagaagta ttacaagcag cttatagagc tattcgccac atacctagaa gaataagaca 8760
gggcttggaa aggattttgc tataagatgg gtggcaagtg gtcaaaaagt agtgtgattg 8820
gatggcctgc tgtaagggaa agaatgagac gagctgagcc agcagcagat ggggtgggag 8880
cagtatctcg agacctagaa aaacatggag caatcacaag tagcaataca gcagctaaca 8940
atgctgcttg tgcctggcta gaagcacaag aggaggaaga ggtgggtttt ccagtcacac 9000
ctcaggtacc tttaagacca atgacttaca aggcagctgt agatcttagc cactttttaa 9060
aagaaaaggg gggactggaa gggctaattc actcccaaag aagacaagat atccttgatc 9120
tgtggatcta ccacacacaa ggctacttcc ctgattggca gaactacaca ccagggccag 9180
gggtcagata tccactgacc tttggatggt gctacaagct agtaccagtt gagccagata 9240
aggtagaaga ggccaataaa ggagagaaca ccagcttgtt acaccctgtg agcctgcatg 9300
gaatggatga ccctgagaga gaagtgttag agtggaggtt tgacagccgc ctagcatttc 9360
atcacgtggc ccgagagctg catccggagt acttcaagaa ctgctgacat cgagcttgct 9420
acaagggact ttccgctggg gactttccag ggaggcgtgg cctgggcggg actggggagt 9480
ggcgagccct cagatgctgc atataagcag ctgctttttg cctgtactgg gtctctctgg 9540
ttagaccaga tctgagcctg ggagctctct ggctaactag ggaacccact gcttaagcct 9600
caataaagct tgccttgagt gcttcaagta gtgtgtgccc gtctgttgtg tgactctggt 9660
aactagagat ccctcagacc cttttagtca gtgtggaaaa tctctagcac cccccaggag 9720
gtagaggttg cagtgagcca agatcgcgcc actgcattcc agcctgggca agaaaacaag 9780
actgtctaaa ataataataa taagttaagg gtattaaata tatttataca tggaggtcat 9840
aaaaatatat atatttgggc tgggcgcagt ggctcacacc tgcgcccggc cctttgggag 9900
gccgaggcag gtggatcacc tgagtttggg agttccagac cagcctgacc aacatggaga 9960
aaccccttct ctgtgtattt ttagtagatt ttattttatg tgtattttat tcacaggtat 10020
ttctggaaaa ctgaaactgt ttttcctcta ctctgatacc acaagaatca tcagcacaga 10080
ggaagacttc tgtgatcaaa tgtggtggga gagggaggtt ttcaccagca catgagcagt 10140
cagttctgcc gcagactcgg cgggtgtcct tcggttcagt tccaacaccg cctgcctgga 10200

gagaggtcag accacagggt gagggctcag tccccaagac ataaacaccc aagacataaa 10260
cacccaacag gtccaccccg cctgctgccc aggcagagcc gattcaccaa gacgggaatt 10320
aggatagaga aagagtaagt cacacagagc cggctgtgcg ggagaacgga gttctattat 10380
gactcaaatc agtctcccca agcattcggg gatcagagtt tttaaggata acttagtgtg 10440
taggggggcca gtgagttgga gatgaaagcg tagggagtcg aaggtgtcct tttgcgccga 10500
gtcagttcct gggtgggggc cacaagatcg gatgagccag tttatcaatc cgggggtgcc 10560
agctgatcca tggagtgcag ggtctgcaaa atatctcaag cactgattga tcttaggttt 10620
tacaatagtg atgttacccc aggaacaatt tggggaaggt cagaatcttg tagcctgtag 10680
ctgcatgact cctaaaccat aatttctttt ttgtttttt tttttattt ttgagacagg 10740
gtctcactct gtcacctagg ctggagtgca gtggtgcaat cacagctcac tgcagcctca 10800
acgtcgtaag ctcaagcgat cctcccacct cagcctgcct ggtagctgag actacaagcg 10860
acgccccagt taatttttgt atttttggta gaggcagcgt tttgccgtgt ggccctggct 10920
ggtctcgaac tcctgggctc aagtgatcca gcctcagcct cccaaagtgc tgggacaacc 10980
ggggccagtc actgcacctg gccctaaacc ataatttcta atcttttggc taatttgtta 11040
gtcctacaaa ggcagtctag tccccaggca aaaagggggt ttgtttcggg aaagggctgt 11100
tactgtcttt gtttcaaact ataaactaag ttcctcctaa acttagttcg gcctacaccc 11160
aggaatgaac aaggagagct tggaggttag aagcacgatg gaattggtta ggtcagatct 11220
ctttcactgt ctgagttata attttgcaat ggtggttcaa agactgcccg cttctgacac 11280
cagtcgctgc attaatgaat cggccaacgc gcggggagag gcggtttgcg tattggcgct 11340
cttccgcttc ctcgctcact gactcgctgc gctcggtcgt tcggctgcgg cgagcggtat 11400
cagctcactc aaaggcggta atacggttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga 11460
acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt 11520
ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt 11580
ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc 11640
gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa 11700
gcgtggcgct ttctcaatgc tcacgctgta ggtatctcag ttcggtgtag gtcgttcgct 11760
ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg ttcagcccga ccgctgcgcc ttatccggta 11820
actatcgtct tgagtccaac ccggtaagac acgacttatc gccactggca gcagccactg 11880
gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac agagttcttg aagtggtggc 11940
ctaactacgg ctacactaga aggacagtat ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta 12000
ccttcggaaa aagagttggt agctcttgat ccggcaaaca aaccaccgct ggtagcggtg 12060
gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt 12120
tgatcttttc tacggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa ctcacgttaa gggattttgg 12180
tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta 12240
aatcaatcta aagtatatat gagtaaactt ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg 12300

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

gagagaaaga gaccagcttt acagggggtt tatcacagtg caccctgaca gtcgtcagcc 14400
tcacaggggg tttatcacat tgcaccctga cagtcgtcag cctcacaggg ggtttatcac 14460
agtgcaccct tacaatcatt ccatttgatt cacaattttt ttagtctcta ctgtgcctaa 14520
cttgtaagtt aaatttgatc agaggtgtgt tcccagaggg gaaaacagta tatacagggt 14580
tcagtactat cgcatttcag gcctccacct gggtcttgga atgtgtcccc cgaggggtga 14640
tgactacctc agttggatct ccacaggtca cagtgacaca agataaccaa gacacctccc 14700
aaggctacca caatgggccg ccctccacgt gcacatggcc ggaggaactg ccatgtcgga 14760
ggtgcaagca cacctgcgca tcagagtcct tggtgtggag ggagggacca gcgcagcttc 14820
cagccatcca cctgatgaac agaacctagg gaaagcccca gttctactta caccaggaaa 14880
ggc 14883

<210> 4
<211> 14883
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220> misc_recomb
<223> p4696

<400> 4

tggaagggct aatttggtcc caaaaaagac aagagatcct tgatctgtgg atctaccaca 60
cacaaggcta cttccctgat tggcagaact acacaccagg gccagggatc agatatccac 120
tgacctttgg atggtgcttc aagttagtac cagttgaacc agagcaagta gaagaggcca 180
aataaggaga gaagaacagc ttgttacacc ctatgagcca gcatgggatg gaggacccgg 240
agggagaagt attagtgtgg aagtttgaca gcctcctagc atttcgtcac atggcccgag 300
agctgcatcc ggagtactac aaagactgct gacatcgagc tttctacaag ggactttccg 360
ctggggactt tccagggagg tgtggcctgg gcgggactgg ggagtggcga gccctcagat 420
gctacatata agcagctgct ttttgcctgt actgggtctc tctggttaga ccagatctga 480
gcctgggagc tctctggcta actagggaac ccactgctta agcctcaata aagcttgcct 540
tgagtgctca 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
aggagagaga tgggtgcgag agcgtcggta ttaagcgggg gagaattaga taaatgggaa 840
aaaattcggt taaggccagg gggaaagaaa caatataaac taaaacatat agtatgggca 900
agcagggagc tagaacgatt cgcagttaat cctggccttt tagagacatc agaaggctgt 960
agacaaatac tgggacagct acaaccatcc cttcagacag gatcagaaga acttagatca 1020
ttatataata caatagcagt cctctattgt gtgcatcaaa ggatagatgt aaaagacacc 1080
aaggaagcct tagataagat agaggaagag caaaacaaaa gtaagaaaaa ggcacagcaa 1140
gcagcagctg acacaggaaa caacagccag gtcagccaaa attaccctat agtgcagaac 1200

ctccaggggc aaatggtaca tcaggccata tcacctagaa ctttaaatgc atgggtaaaa 1260
gtagtagaag agaaggcttt cagcccagaa gtaataccca tgttttcagc attatcagaa 1320
ggagccaccc cacaagattt aaataccatg ctaaacacag tgggggggaca tcaagcagcc 1380
atgcaaatgt taaaagagac catcaatgag gaagctgcag aatgggatag attgcatcca 1440
gtgcatgcag ggcctattgc accaggccag atgagagaac caaggggaag tgacatagca 1500
ggaactacta gtacccttca ggaacaaata ggatggatga cacataatcc acctatccca 1560
gtaggagaaa tctataaaag atggataatc ctgggattaa ataaaatagt aagaatgtat 1620
agccctacca gcattctgga cataagacaa ggaccaaagg aaccctttag agactatgta 1680
gaccgattct ataaaactct aagagccgag caagcttcac aagaggtaaa aaattggatg 1740
acagaaacct tgttggtcca aaatgcgaac ccagattgta agactatttt aaaagcattg 1800
ggaccaggag cgacactaga agaaatgatg acagcatgtc agggagtggg gggacccggc 1860
cataaagcaa gagttttggc tgaagcaatg agccaagtaa caaatccagc taccataatg 1920
atacagaaag gcaattttag gaaccaaaga aagactgtta agtgtttcaa ttgtggcaaa 1980
gaagggcaca tagccaaaaa ttgcagggcc cctaggaaaa agggctgttg gaaatgtgga 2040
aaggaaggac accaaatgaa agattgtact gagagacagg ctaatttttt agggaagatc 2100
tggccttccc acaagggaag gccagggaat tttcttcaga gcagaccaga gccaacagcc 2160
ccaccagaag agagcttcag gtttggggaa gagacaacaa ctccctctca gaagcaggag 2220
ccgatagaca aggaactgta tcctttagct tccctcagat cactctttgg cagcgacccc 2280
tcgtcacaat aaagataggg gggcaattaa aggaagctct attagataca ggagcagatg 2340
atacagtatt agaagaaatg aatttgccag gaagatggaa accaaaaatg ataggggggaa 2400
ttggaggttt tatcaaagta agacagtatg atcagatact catagaaatc tgcggacata 2460
aagctatagg tacagtatta gtaggaccta cacctgtcaa cataattgga agaaatctgt 2520
tgactcagat tggctgcact ttaaattttc ccattagtcc tattgagact gtaccagtaa 2580
aattaaagcc aggaatggat ggcccaaaag ttaaacaatg gccattgaca gaagaaaaaa 2640
taaaagcatt agtagaaatt tgtacagaaa tggaaaagga aggaaaaatt tcaaaaattg 2700
ggcctgaaaa tccatacaat actccagtat ttgccataaa gaaaaaagac agtactaaat 2760
ggagaaaatt agtagatttc agagaactta ataagagaac tcaagatttc tgggaagttc 2820
aattaggaat accacatcct gcagggttaa aacagaaaaa atcagtaaca gtactggatg 2880
tgggcgatgc atatttttca gttcccttag ataaagactt caggaagtat actgcattta 2940
ccatacctag tataaacaat gagacaccag ggattagata tcagtacaat gtgcttccac 3000
agggatggaa aggatcacca gcaatattcc agtgtagcat gacaaaaatc ttagagcctt 3060
ttagaaaaca aaatccagac atagtcatct atcaatacat ggatgatttg tatgtaggat 3120
ctgacttaga aatagggcag catagaacaa aaatagagga actgagacaa catctgttga 3180
ggtggggatt taccacacca gacaaaaaac atcagaaaga acctccattc ctttggatgg 3240

gttatgaact ccatcctgat aaatggacag tacagcctat agtgctgcca gaaaaggaca 3300
gctggactgt caatgacata cagaaattag tgggaaaatt gaattgggca agtcagattt 3360
atgcagggat taaagtaagg caattatgta aacttcttag gggaaccaaa gcactaacag 3420
aagtagtacc actaacagaa gaagcagagc tagaactggc agaaaacagg gagattctaa 3480
aagaaccggt acatggagtg tattatgacc catcaaaaga cttaatagca gaaatacaga 3540
agcaggggca aggccaatgg acatatcaaa tttatcaaga gccatttaaa aatctgaaaa 3600
caggaaaata tgcaagaatg aagggtgccc acactaatga tgtgaaacaa ttaacagagg 3660
cagtacaaaa aatagccaca gaaagcatag taatatgggg aaagactcct aaatttaaat 3720
tacccataca aaaggaaaca tgggaagcat ggtggacaga gtattggcaa gccacctgga 3780
ttcctgagtg ggagtttgtc aatacccctc ccttagtgaa gttatggtac cagttagaga 3840
aagaacccat aataggagca gaaactttct atgtagatgg ggcagccaat agggaaacta 3900
aattaggaaa agcaggatat gtaactgaca gaggaagaca aaaagttgtc cccctaacgg 3960
acacaacaaa tcagaagact gagttacaag caattcatct agctttgcag gattcgggat 4020
tagaagtaaa catagtgaca gactcacaat atgcattggg aatcattcaa gcacaaccag 4080
ataagagtga atcagagtta gtcagtcaaa taatagagca gttaataaaa aaggaaaaag 4140
tctacctggc atgggtacca gcacacaaag gaattggagg aaatgaacaa gtagataaat 4200
tggtcagtgc tggaatcagg aaagtactat ttttagatgg aatagataag gcccaagaag 4260
aacatgagaa atatcacagt aattggagag caatggctag tgattttaac ctaccacctg 4320
tagtagcaaa agaaatagta gccagctgtg ataaatgtca gctaaaaggg gaagccatgc 4380
atggacaagt agactgtagc ccaggaatat ggcagctaga ttgtacacat ttagaaggaa 4440
aagttatctt ggtagcagtt catgtagcca gtggatatat agaagcagaa gtaattccag 4500
cagagacagg gcaagaaaca gcatacttcc tcttaaaatt agcaggaaga tggccagtaa 4560
aaacagtaca tacagacaat ggcagcaatt tcaccagtac tacagttaag gccgcctgtt 4620
ggtgggcggg gatcaagcag gaatttggca ttccctacaa tccccaaagt caaggagtaa 4680
tagaatcgat gaataaagaa ttaaagaaaa ttataggaca ggtaagagat caggctgaac 4740
atcttaagac agcagtacaa atggcagtat tcatccacaa ttttaaaaga aaagggggga 4800
ttgggggta cagtgcaggg gaaagaatag tagacataat agcaacagac atacaaacta 4860
aagaattaca aaaacaaatt acaaaaattc aaaattttcg ggtttattac agggacagca 4920
gagatccagt ttggaaagga ccagcaaagc tcctctggaa aggtgaaggg gcagtagtaa 4980
tacaagataa tagtgacata aaagtagtgc caagaagaaa agcaaagatc atcagggatt 5040
atggaaaaca gatggcaggt gatgattgtg tggcaagtag acaggatgag gattaacaca 5100
tggaaaagat tagtaaaaca ccatatgtat atttcaagga aagctaagga ctggttttat 5160
agacatcact atgaaagtac taatccaaaa ataagttcag aagtacacat cccactaggg 5220
gatgctaaat tagtaataac aacatattgg ggtctgcata caggagaaag agactggcat 5280
ttgggtcagg gagtctccat agaatggagg aaaaagagat atagcacaca agtagaccct 5340

gacctagcag accaactaat tcatctgcac tattttgatt gtttttcaga atctgctata 5400
agaaatacca tattaggacg tatagttagt cctaggtgtg aatatcaagc aggacataac 5460
aaggtaggat ctctacagta cttggcacta gcagcattaa taaaaccaaa acagataaag 5520
ccacctttgc ctagtgttag gaaactgaca gaggacagat ggaacaagcc ccagaagacc 5580
aagggccaca gagggagcca tacaatgaat ggacactaga gcttttagag gaacttaaga 5640
gtgaagctgt tagacatttt cctaggatat ggctccataa cttaggacaa catatctatg 5700
aaacttacgg ggatacttgg gcaggagtgg aagccataat aagaattctg caacaactgc 5760
tgtttatcca tttcagaatt gggtgtcgac atagcagaat aggcgttact cgacagagga 5820
gagcaagaaa tggagccagt agatcctaga ctagagccct ggaagcatcc aggaagtcag 5880
cctaaaactg cttgtaccaa ttgctattgt aaaaagtgtt gctttcattg ccaagtttgt 5940
ttcatgacaa aagccttagg catctcctat ggcaggaaga agcggagaca gcgacgaaga 6000
gctcatcaga acagtcagac tcatcaagct tctctatcaa agcagtaagt agtacatgta 6060
atgcaaccta taatagtagc aatagtagca ttagtagtag caataataat agcaatagtt 6120
gtgtggtcca tagtaatcat agaatatagg aaaatattaa gacaaagaaa aatagacagg 6180
ttaattgata gactaataga aagagcagaa gacagtggca atgagagtga aggagaagta 6240
tcagcacttg tggagatggg ggtggaaatg gggcaccatg ctccttggga tattgatgat 6300
ctgtagtgct acagaaaaat tgtgggtcac agtctattat ggggtacctg tgtggaagga 6360
agcaaccacc actctatttt gtgcatcaga tgctaaagca tatgatacag aggtacataa 6420
tgtttgggcc acacatgcct gtgtacccac agaccccaac ccacaagaag tagtattggt 6480
aaatgtgaca gaaaatttta acatgtggaa aaatgacatg gtagaacaga tgcatgagga 6540
tataatcagt ttatgggatc aaagcctaaa gccatgtgta aaattaaccc cactctgtgt 6600
tagtttaaag tgcactgatt tgaagaatga tactaatacc aatagtagta gcgggagaat 6660
gataatggag aaaggagaga taaaaaactg ctctttcaat atcagcacaa gcataagaga 6720
taaggtgcag aaagaatatg cattctttta taaacttgat atagtaccaa tagataatac 6780
cagctatagg ttgataagtt gtaacacctc agtcattaca caggcctgtc caaaggtatc 6840
ctttgagcca attcccatac attattgtgc cccggctggt tttgcgattc taaaatgtaa 6900
taataagacg ttcaatggaa caggaccatg tacaaatgtc agcacagtac aatgtacaca 6960
tggaatcagg ccagtagtat caactcaact gctgttaaat ggcagtctag cagaagaaga 7020
tgtagtaatt agatctgcca atttcacaga caatgctaaa accataatag tacagctgaa 7080
cacatctgta gaaattaatt gtacaagacc caacaacaat acaagaaaaa gtatccgtat 7140
ccagagggga ccagggagag catttgttac aataggaaaa ataggaaata tgagacaagc 7200
acattgtaac attagtagag caaaatggaa tgccacttta aaacagatag ctagcaaatt 7260
aagagaacaa tttggaaata ataaaacaat aatctttaag caatcctcag gaggggaccc 7320
agaaattgta acgcacagtt ttaattgtgg aggggaattt ttctactgta attcaacaca 7380

actgtttaat agtacttggt ttaatagtac ttggagtact gaagggtcaa ataacactga 7440
aggaagtgac acaatcacac tcccatgcag aataaaacaa tttataaaca tgtggcagga 7500
agtaggaaaa gcaatgtatg cccctcccat cagtggacaa attagatgtt catcaaatat 7560
tactgggctg ctattaacaa gagatggtgg taataacaac aatgggtccg agatcttcag 7620
acctggagga ggcgatatga gggacaattg gagaagtgaa ttatataaat ataaagtagt 7680
aaaaattgaa ccattaggag tagcacccac caaggcaaag agaagagtgg tgcagagaga 7740
aaaaagagca gtgggaatag gagctttgtt ccttgggttc ttgggagcag caggaagcac 7800
tatgggcgca gcgtcaatga cgctgacggt acaggccaga caattattgt ctgatatagt 7860
gcagcagcag aacaatttgc tgagggctat tgaggcgcaa cagcatctgt tgcaactcac 7920
agtctggggc atcaaacagc tccaggcaag aatcctggct gtggaaagat acctaaagga 7980
tcaacagctc ctggggattt ggggttgctc tggaaaactc atttgcacca ctgctgtgcc 8040
ttggaatgct agttggagta ataaatctct ggaacagatt tggaataaca tgacctggat 8100
ggagtgggac agagaaatta acaattacac aagcttaata cactccttaa ttgaagaatc 8160
gcaaaaccag caagaaaaga atgaacaaga attattggaa ttagataaat gggcaagttt 8220
gtggaattgg tttaacataa caaattggct gtggtatata aaattattca taatgatagt 8280
aggaggcttg gtaggtttaa gaatagtttt tgctgtactt tctatagtga atagagttag 8340
gcagggatat tcaccattat cgtttcagac ccacctccca atcccgaggg gacccgacag 8400
gcccgaagga atagaagaag aaggtggaga gagagacaga gacagatcca ttcgattagt 8460
gaacggatcc ttagcactta tctgggacga tctgcggagc ctgtgcctct tcagctacca 8520
ccgcttgaga gacttactct tgattgtaac gaggattgtg gaacttctgg gacgcagggg 8580
gtgggaagcc ctcaaatatt ggtggaatct cctacagtat tggagtcagg aactaaagaa 8640
tagtgctgtt aacttgctca atgccacagc catagcagta gctgagggga cagatagggt 8700
tatagaagta ttacaagcag cttatagagc tattcgccac atacctagaa gaataagaca 8760
gggcttggaa aggattttgc tataagatgg gtggcaagtg gtcaaaaagt agtgtgattg 8820
gatggcctgc tgtaagggaa agaatgagac gagctgagcc agcagcagat ggggtgggag 8880
cagtatctcg agacctagaa aaacatggag caatcacaag tagcaataca gcagctaaca 8940
atgctgcttg tgcctggcta gaagcacaag aggaggaaga ggtgggtttt ccagtcacac 9000
ctcaggtacc tttaagacca atgacttaca aggcagctgt agatcttagc cactttttaa 9060
aagaaaaggg gggactggaa gggctaattc actcccaaag aagacaagat atccttgatc 9120
tgtggatcta ccacacacaa ggctacttcc ctgattggca gaactacaca ccagggccag 9180
gggtcagata tccactgacc tttggatggt gctacaagct agtaccagtt gagccagata 9240
aggtagaaga ggccaataaa ggagagaaca ccagcttgtt acaccctgtg agcctgcatg 9300
gaatggatga ccctgagaga gaagtgttag agtggaggtt tgacagccgc ctagcatttc 9360
atcacgtggc ccgagagctg catccggagt acttcaagaa ctgctgacat cgagcttgct 9420
acaagggact ttccgctggg gactttccag ggaggcgtgg cctgggcggg actggggagt 9480

ggcgagccct cagatgctgc atataagcag ctgctttttg cctgtactgg gtctctctgg 9540
ttagaccaga tctgagcctg ggagctctct ggctaactag ggaacccact gcttaagcct 9600
caataaagct tgccttgagt gcttcaagta gtgtgtgccc gtctgttgtg tgactctggt 9660
aactagagat ccctcagacc cttttagtca gtgtggaaaa tctctagcac cccccaggag 9720
gtagaggttg cagtgagcca agatcgcgcc actgcattcc agcctgggca agaaaacaag 9780
actgtctaaa ataataataa taagttaagg gtattaaata tatttataca tggaggtcat 9840
aaaaatatat atatttgggc tgggcgcagt ggctcacacc tgcgcccggc cctttgggag 9900
gccgaggcag gtggatcacc tgagtttggg agttccagac cagcctgacc aacatggaga 9960
aaccccttct ctgtgtattt ttagtagatt ttattttatg tgtattttat tcacaggtat 10020
ttctggaaaa ctgaaactgt ttttcctcta ctctgatacc acaagaatca tcagcacaga 10080
ggaagacttc tgtgatcaaa tgtggtggga gagggaggtt ttcaccagca catgagcagt 10140
cagttctgcc gcagactcgg cgggtgtcct tcggttcagt tccaacaccg cctgcctgga 10200
gagaggtcag accacagggt gagggctcag tccccaagac ataaacaccc aagacataaa 10260
cacccaacag gtccaccccg cctgctgccc aggcagagcc gattcaccaa gacgggaatt 10320
aggatagaga aagagtaagt cacacagagc cggctgtgcg ggagaacgga gttctattat 10380
gactcaaatc agtctcccca agcattcggg gatcagagtt tttaaggata acttagtgtg 10440
taggggggcca gtgagttgga gatgaaagcg tagggagtcg aaggtgtcct tttgcgccga 10500
gtcagttcct gggtgggggc cacaagatcg gatgagccag tttatcaatc cgggggtgcc 10560
agctgatcca tggagtgcag ggtctgcaaa atatctcaag cactgattga tcttaggttt 10620
tacaatagtg atgttacccc aggaacaatt tggggaaggt cagaatcttg tagcctgtag 10680
ctgcatgact cctaaaccat aatttctttt ttgtttttttt ttttttattt ttgagacagg 10740
gtctcactct gtcacctagg ctggagtgca gtggtgcaat cacagctcac tgcagcctca 10800
acgtcgtaag ctcaagcgat cctcccacct cagcctgcct ggtagctgag actacaagcg 10860
acgccccagt taatttttgt atttttggta gaggcagcgt tttgccgtgt ggccctggct 10920
ggtctcgaac tcctgggctc aagtgatcca gcctcagcct cccaaagtgc tgggacaacc 10980
ggggccagtc actgcacctg gccctaaacc ataatttcta atcttttggc taatttgtta 11040
gtcctacaaa ggcagtctag tccccaggca aaaagggggt ttgtttcggg aaagggctgt 11100
tactgtcttt gtttcaaact ataaactaag ttcctcctaa acttagttcg gcctacaccc 11160
aggaatgaac aaggagagct tggaggttag aagcacgatg gaattggtta ggtcagatct 11220
ctttcactgt ctgagttata attttgcaat ggtggttcaa agactgcccg cttctgacac 11280
cagtcgctgc attaatgaat cggccaacgc gcggggagag gcggtttgcg tattggcgct 11340
cttccgcttc ctcgctcact gactcgctgc gctcggtcgt tcggctgcgg cgagcggtat 11400
cagctcactc aaaggcggta atacggttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga 11460
acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt 11520

ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt 11580
ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc 11640
gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa 11700
gcgtggcgct ttctcaatgc tcacgctgta ggtatctcag ttcggtgtag gtcgttcgct 11760
ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg ttcagcccga ccgctgcgcc ttatccggta 11820
actatcgtct tgagtccaac ccggtaagac acgacttatc gccactggca gcagccactg 11880
gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac agagttcttg aagtggtggc 11940
ctaactacgg ctacactaga aggacagtat ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta 12000
ccttcggaaa aagagttggt agctcttgat ccggcaaaca aaccaccgct ggtagcggtg 12060
gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt 12120
tgatcttttc tacggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa ctcacgttaa gggattttgg 12180
tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta 12240
aatcaatcta aagtatatat gagtaaactt ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg 12300
aggcacctat ctcagcgatc tgtctatttc gttcatccat agttgcctga ctccccgtcg 12360
tgtagataac tacgatacgg gagggcttac catctggccc cagtgctgca atgataccgc 12420
gagacccacg ctcaccggct ccagatttat cagcaataaa ccagccagcc ggaagggccg 12480
agcgcagaag tggtcctgca actttatccg cctccatcca gtctattaat tgttgccggg 12540
aagctagagt aagtagttcg ccagttaata gtttgcgcaa cgttgttgcc attgctacag 12600
gcatcgtggt gtcacgctcg tcgtttggta tggcttcatt cagctccggt tcccaacgat 12660
caaggcgagt tacatgatcc cccatgttgt gcaaaaaagc ggttagctcc ttcggtcctc 12720
cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgcag tgttatcact catggttatg gcagcactgc 12780
ataattctct tactgtcatg ccatccgtaa gatgcttttc tgtgactggt gagtactcaa 12840
ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgcggc gaccgagttg ctcttgcccg gcgtcaatac 12900
gggataatac cgcgccacat agcagaactt taaaagtgct catcattgga aaacgttctt 12960
cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc tgttgagatc cagttcgatg taacccactc 13020
gtgcacccaa ctgatcttca gcatctttta ctttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa 13080
caggaaggca aaatgccgca aaaaagggaa taagggcgac acggaaatgt tgaatactca 13140
tactcttcct ttttcaatat tattgaagca tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat 13200
acatatttga atgtatttag aaaaataaac aaataggggt tccgcgcaca tttccccgaa 13260
aagtgccacc tgacgtctaa gaaaccatta ttatcatgac attaacctat aaaaataggc 13320
gtatcacgag gccctttcgt cttcaagaac tgcctcgcgc gtttcggtga tgacggtgaa 13380
aacctctgac acatgcagct cccggagacg gtcacagctt gtctgtaagc ggatgccggg 13440
agcagacaag cccgtcaggg cgcgtcagcg ggtgttggcg ggtgtcgggg cgcagccatg 13500
acccagtcac gtagcgatag cggagtgtac tggcttaact atgcggcatc agagcagatt 13560
gtactgagag tgcaccatat gcggtgtgaa ataccgcaca gatgcgtaag gagaaaatac 13620

cgcatcaggc gccattcgcc attcaggctg cgcaactgtt gggaagggcg atcggtgcgg 13680
gcctcttcgc tattacgcca gcgcggggag gcagagattg cagtaagctg agatcgcagc 13740
actgcactcc agcctgggcg acagagtaag actctgtctc aaaaataaaa taaataaatc 13800
aatcagatat tccaatcttt tcctttattt atttatttat tttctatttt ggaaacacag 13860
tccttcctta ttccagaatt acacatatat tctatttttc tttatatgct ccagtttttt 13920
ttagaccttc acctgaaatg tgtgtataca aaatctaggc cagtccagca gagcctaaag 13980
gtaaaaaata aaataataaa aaataaataa aatctagctc actccttcac atcaaaatgg 14040
agatacagct gttagcatta aataccaaat aacccatctt gtcctcaata attttaagcg 14100
cctctctcca ccacatctaa ctcctgtcaa aggcatgtgc cccttccggg cgctctgctg 14160
tgctgccaac caactggcat gtggactctg cagggtccct aactgccaag ccccacagtg 14220
tgccctgagg ctgccccttc cttctagcgg ctgcccccac tcggctttgc tttccctagt 14280
ttcagttact tgcgttcagc caaggtctga aactaggtgc gcacagagcg gtaagactgc 14340
gagagaaaga gaccagcttt acagggggtt tatcacagtg caccctgaca gtcgtcagcc 14400
tcacaggggg tttatcacat tgcaccctga cagtcgtcag cctcacaggg ggtttatcac 14460
agtgcaccct tacaatcatt ccatttgatt cacaattttt ttagtctcta ctgtgcctaa 14520
cttgtaagtt aaatttgatc agaggtgtgt tcccagaggg gaaaacagta tatacagggt 14580
tcagtactat cgcatttcag gcctccacct gggtcttgga atgtgtcccc cgaggggtga 14640
tgactacctc agttggatct ccacaggtca cagtgacaca agataaccaa gacacctccc 14700
aaggctacca caatgggccg ccctccacgt gcacatggcc ggaggaactg ccatgtcgga 14760
ggtgcaagca cacctgcgca tcagagtcct tggtgtggag ggagggacca gcgcagcttc 14820
cagccatcca cctgatgaac agaacctagg gaaagcccca gttctactta caccaggaaa 14880
ggc 14883

<210> 5
<211> 23
<212> DNA
<213> Virus de la inmunodeficiencia humana

<400> 5

tccacctatc ccagtaagga gaa 23

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> virus de la inmunodeficiencia humana

<400> 6

cttcctgcca taggagatgc 20

<210> 7
<211> 22
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220> primer_bind
<223> Usado en la mutagénesis directa

<400> 7

gggccttatc gattccatct aa 22

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220> primer_bind
<223> Usado en la mutagénesis directa

<400> 8

catattcccg ggctacagtc 20

<210> 9
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220> primer_bind
<223> Usado en la mutagénesis directa

<400> 9

tgcttgatcc ccgggcacca acag 24

<210> 10
<211> 28
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220> primer_bind
<223> usado en la mutagénesis directa

<400> 10

ttattcatcg attctattac tccttgac 28

<210> 11
<211> 24

<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220> primer_bind
<223> usado en la mutagénesis directa

<400> 11

aggcatcgcc atatggatca cgac 24

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220> primer_bind
<223> Sitio de restricción ApaI

<400> 12

gctgaagcaa tgagccaagt 20

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201001193

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 30.09.2010

(32) Fecha de prioridad: **30-09-2008**

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
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.	1-2
A	ES 2244332 B1 (FUNCACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN Y LA PREVENCIÓN DEL SIDA EN ESPAÑA E INSTITUTO DE SALUD CARLOS III) 01.12.2007	1-2
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.	1-2
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.	1-2
A	ES 2246859 T3 (VIRCO BVBA) 13.03.2002	1-2

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	Examinador	Página
03.03.2011	M. García Bueno	1/4

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	1-2	**SI**
	Reivindicaciones		**NO**
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	1-2	**SI**
	Reivindicaciones		**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	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
D02	ES 2244332 B1 (FUNCACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN Y LA PREVENCIÓN DEL SIDA EN ESPAÑA E INSTITUTO DE SALUD CARLOS III)	01.12.2007
D03	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
D04	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
D05	ES 2246859 T3 (VIRCO BVBA)	13.03.2002

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 método de evaluación de resistencia de fenotipos VIH a antirretrovirales (reivindicaciones 1-2).

El documento D01 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 D02 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 D02 también divulga un sistema de determinación de resistencias fenotípicas a fármacos antirretrovirales (ver página 16 y reivindicación 9).

El documento D03 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 D04 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 D05 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).

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

1.1. REIVINDICACIONES 1-2.

La invención reivindicada difiere principalmente de los documentos citados en que ninguno de dichos documentos 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 los tanto, los documentos citados son solo documentos que reflejan el estado de la técnica. En consecuencia, las reivindicaciones 1-2 son nuevas y se considera que implican actividad inventiva según los artículos 6 y 8 de la Ley 11/1986.