

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 792**

21 Número de solicitud: 201130613

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/66** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **18.04.2011**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **31.10.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**31.10.2012**

71 Solicitante/s:  
**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (CSIC) (50.0%)  
SERRANO, 117  
28006 MADRID, ES y  
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA  
(50.0%)**

72 Inventor/es:  
**ORZÁEZ CALATAYUD, Diego Vicente;  
SARRIÓN PERDIGONES, Alejandro;  
GRANELL RICHARD, Antonio;  
JUÁREZ ORTEGA, Paloma y  
FERNÁNDEZ DEL CARMEN, Asunción**

74 Agente/Representante:  
**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

54 Título: **SISTEMA PARA ENSAMBLADO DE PIEZAS GENÉTICAS.**

57 Resumen:

Sistema para ensamblado de piezas genéticas.

La presente invención describe un sistema de ensamblado in vitro para piezas genéticas. El ensamblado de fragmentos de DNA constituye la base de la ingeniería genética y la biología sintética. Para el diseño de nuevos circuitos genéticos, ambas disciplinas tienden hacia la generación de colecciones de piezas genéticas intercambiables y reciclables (es decir, susceptibles de ser utilizadas en laboratorios distintos y para generar combinaciones genéticas distintas), que puedan ser unidas entre sí mediante el uso de un método estándar de ensamblaje. Es particularmente necesario el desarrollo de métodos que permitan gran eficiencia y versatilidad en el ensamblaje de piezas en los rangos que van entre 5 y 50 piezas individuales, ya que la naturaleza modular de las interacciones genéticas hace que buena parte de la ingeniería se desarrolle en torno a diseños genéticos que abarcan estos rangos de tamaño.

ES 2 389 792 A1

**DESCRIPCIÓN**

Sistema para ensamblado de piezas genéticas

5 La presente invención se engloba en el sector técnico de la Biotecnología, la Biología Sintética y por extensión a la Biotecnología Agraria y Biología Sintética de Plantas para la creación de plantas transgénicas, cisgénicas y/o intragénicas con nuevos caracteres agronómicos.

**ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

El ensamblaje de estructuras funcionales básicas de DNA (denominadas de aquí en adelante “piezas” o “partes”) para producir nuevas combinaciones (referidas de aquí en adelante como “módulos”, o “dispositivos” si resultan del ensamblaje de dos o más módulos) constituye la herramienta básica de la Biología Sintética.

10 Tradicionalmente, el ensamblado múltiple de fragmentos de DNA se ha llevado a cabo sobre plásmidos que contienen un sitio de clonaje múltiple (MCS). El MCS consiste en una secuencia de DNA con un número variable de dianas de enzimas de restricción tipo II (ERTII). En esta metodología, el ensamblaje de uno o más fragmentos para formar estructuras de complejidad creciente se realiza por inserciones sucesivas de nuevas piezas, utilizando para  
15 ello las dianas de restricción presentes en el MCS. Las clonaciones múltiples basadas en MCS tradicionales tienen importantes limitaciones, fundamentalmente la presencia de dianas de restricción internas en los nuevos fragmentos a ensamblar, el número finito de dianas del MCS, la complejidad técnica, que incluye separación electroforética/purificación de los fragmentos, o la permanencia de las secuencias diana en las zonas de unión entre las partes ensambladas (referidas de aquí en adelante como “costuras de ensamblado” o simplemente “costuras”).  
20 Todo ello hace que el método MCS tradicional no sea susceptible de estandarización y por tanto es susceptible de ser mejorado.

Como alternativa a MCS tradicional, se han venido desarrollando nuevos métodos de ensamblaje. La tendencia general es acercar el ensamblaje genético a los mecanismos habituales en otras ingenierías, y para ello se requieren cuatro características básicas:

25 (i) estandarización, es decir que las reglas de ensamblaje puedan aplicarse independientemente de la identidad de las partes;

(ii) reciclabilidad, es decir que los nuevos ensamblajes puedan reutilizarse para realizar ensamblajes más complejos;

(iii) eficiencia, es decir que permita la construcción de ensamblajes complejos de forma rápida y segura; y finalmente

(iv) simplicidad, es decir que el ensamblaje funcione con un conjunto mínimo de reglas sencillas para facilitar la automatización y la adopción del sistema por el usuario final.

30 Los métodos desarrollados en la actualidad son fundamentalmente de dos tipos: multipartitos, en los que el ensamblaje múltiple se realiza en un solo paso mediante adición de dos o más partes en tándem; o bien binarios, en los que el ensamblaje múltiple va creciendo paso a paso mediante uniones dos a dos de fragmentos ensamblados previamente.

35 Uno de los métodos más utilizados es el denominado “Gateway Cloning”, sujeto a las patentes US números 5888732, 6143557, 6171861, 6270969, 6277608, 6720140 y otras patentes pendientes pertenecientes a Invitrogen Corporation. El clonaje Gateway está basado en recombinación homóloga in vitro mediada por una mezcla de recombinasas denominadas BP y LR. En una elaboración ulterior se desarrolló el sistema Multisite Gateway (Invitrogen), que permite el ensamblaje multipartito de hasta cuatro partes de forma direccional en un vector de destino. Varios vectores de ensamblaje multigénico se han desarrollado a partir de la tecnología Gateway (Chen et al., 2006, Chung et al., 2005). A pesar de su alta eficiencia, el ensamblaje por Gateway cloning está limitado a un  
40 máximo de cuatro partes, lo que impide formar módulos de orden superior y/o dispositivos. Además la recombinación conduce a la formación de costuras (sitios attB) de 25 nucleótidos.

45 Un conjunto alternativo de metodologías (SLIC, Gibson, CPEC) está basado en la generación de fragmentos solapantes de simple cadena entre las “partes” a ensamblar. De esta forma el ensamblaje se estabiliza por apareamiento entre las cadenas complementarias, que posteriormente es cerrado covalentemente por ligasas o por la propia célula huésped. En todas estas tecnologías, las extensiones solapantes son introducidas por PCR, generando posteriormente los fragmentos de simple cadena mediante distintas técnicas. SLIC (Sequense and Ligase Independent Cloning), produce los fragmentos de simple cadena mediante la actividad exonucleasa de la ligasa T4 (Aslanidis and de Jong, 1990, Li and Elledge, 2007). El método de Gibson usa la polimerasa T5 perseguida por la polimerasa Phusion para generar y reparar las secuencias solapantes (Gibson et al., 2009). Finalmente el  
50 método llamado Circular Polymerase Extension Cloning (Quan and Tian, 2009), se basa en la actividad cebadora mutua de plásmido e inserto para ensamblar partes por PCR sin adición de oligonucleótidos. Todos estos sistemas de ensamblaje son multipartitos y generan ensamblajes sin costuras. Sin embargo, son bastante susceptibles de

introducir errores, ya que están basados en PCR. Además, debido a que están basados en apareamientos de secuencias complementarias, son poco compatibles con la existencia de zonas con alta estructura secundaria, secuencias repetitivas, etc. Otras metodologías multipartitas emplean distintas herramientas como el uso de enzimas de restricción con secuencias de reconocimiento largo (rare cutters) (Goderis et al., 2002) “homing endonucleases”,  
 5 secuencias de recombinación (Lin et al., 2003), o una combinación de dos o más de ellas como el kit ACEM (Bieniossek et al., 2009) (Berger, 2010) (WO/2010/100278).

Otra metodología de ensamblaje multipartito descrita recientemente es el llamado método Golden Gate (Engler et al., 2009, Engler et al., 2008). Está basado en el uso de enzimas de restricción de tipo IIS (ERTIIS). A diferencia de los ERTII convencionales, en los cuales el sitio de reconocimiento es palindrómico y coincide con el sitio de  
 10 digestión, los ERTIIS no tienen diana de corte sino que digieren algunos nucleótidos más allá del sitio de reconocimiento, independientemente de su secuencia, dejando extremos protuberantes generalmente de 4 nucleótidos. En Golden Gate, las partes a ensamblar están flanqueadas por dianas ERTIIS orientadas hacia dentro del fragmento. De esta forma la diana desaparece tras el ensamblaje, facilitando una unión sin costuras. Para el ensamblaje sólo se requiere una pequeña región solapante de 4 nucleótidos entre partes adyacentes, que se hace  
 15 coincidir con la zona de corte del ERTIIS. En una reacción Golden Gate los fragmentos a ensamblar se incuban en presencia del ERTIIS y ligasa T4 en ciclos de digestión y ligación en un único tubo. Esta técnica aumenta notablemente la eficiencia de los ensamblajes pues evita tener que realizar extracción de gel de los fragmentos a clonar. Golden Gate es fácilmente estandarizable, sin embargo en su desarrollo inicial, las construcciones no eran reusables, lo que impide su adopción como estándar en Biología Sintética.

20 En una subsiguiente innovación técnica, denominada MoClo (Weber, Engler et al. 2011), se introdujeron dos nuevas enzimas de restricción de tipo IIS en los plásmidos de destino, lo que permite la utilización de estas enzimas para una segunda ronda de ensamblaje multipartito. Con objeto de aproximarse al objetivo de reciclabilidad, el sistema MoClo introduce un nivel de ensamblaje llamado “intermedio” que consiste en adicionar un casete de selección negativa como una pieza más al final del ensamblaje. Esto permite crear versiones de construcciones múltiples  
 25 “abiertas”, que si bien no pueden ser directamente transferidas a la célula ya que contienen una pieza superflua (cassete de selección), sí que se puedan utilizar como molde sobre el que adicionar nuevas piezas y hacer así crecer la construcción en el futuro. El sistema MoClo es pues un sistema modular estandarizado susceptible de automatización. Aunque MoClo permite el crecimiento teóricamente indefinido de los ensamblajes Golden Gate, el diseño resultante presenta una serie de inconvenientes que complican su adopción por el usuario y que se  
 30 enumeran a continuación:

(i) el sistema requiere el uso de tres enzimas de restricción para asegurar un potencial crecimiento indefinido del sistema; para que el sistema funcione correctamente las piezas deben estar libres de dianas de restricción internas. Para ello es necesario mutagenizar (domesticar) aquellas piezas originales que presentan dianas de restricción  
 35 internas. El empleo de tres enzimas distintos aumenta la probabilidad de encontrar dianas internas en las piezas originales y por tanto aumenta los requerimientos de domesticación.

(ii) los módulos ensamblados en MoClo no son completamente reciclables dado el carácter “cerrado” de las construcciones: si no se le añade el casete de selección adicional no pueden seguir aumentando de tamaño;

(iii) el sistema en su conjunto es complejo: consta de 36 plásmidos (42 si se usa la opción de crecimiento reverso) y un gran número de reglas de ensamblaje;

40 (iv) la topología del sistema es básicamente lineal con diferentes niveles de ensamblaje y ramas laterales correspondientes a los niveles intermedios (figura 1A).

Por último, la propuesta más representativa que permite crecimientos binarios es el estándar de ensamblaje de Biobricks desarrollado en el MIT (Che, 2004, Knight, 2003), y comercializado recientemente por New England Biolabs y Ginkgo Bioworks. Los Biobricks son, en virtud de su simplicidad, una propuesta muy exitosa de  
 45 estandarización de las reglas de ensamblaje de piezas en Biología Sintética. Los biobricks son piezas genéticas básicas (biopiezas) flanqueadas por 4 enzimas de restricción de tipo II, A y B en su extremo 5', y C y D en su extremo 3'. En virtud de la compatibilidad entre B y C, la unión entre dos piezas básicas genera una pieza de orden superior indivisible (módulo) que contiene los mismos sitios flanqueantes que sus constituyentes iniciales. Esta propiedad se denomina “idempotencia”, y constituye la máxima simplificación en las reglas de ensamblaje, ya que  
 50 una sola regla gobierna todo tipo de ensamblajes. Esta simplicidad facilita la automatización y el intercambio de piezas genéticas entre laboratorios, ya que cualesquiera piezas genéticas generadas mediante esta metodología pueden a su vez ensamblarse entre sí independientemente de su origen y su secuencia nucleotídica. No obstante, el uso de enzimas tipo II genera “costuras”, lo que resulta problemático en la generación de ensamblajes “limpios” como los requeridos en fusiones de regiones codificantes. Por otra parte, esta estrategia hace uso de 4 enzimas de  
 55 restricción distintos, lo que obliga a sintetizar o mutagenizar (“domesticar”) gran cantidad de piezas básicas que contienen sitios de reconocimiento para estas enzimas en sus secuencias originales. Finalmente, al tratarse de un sistema que no incorpora uniones multipartitas, es necesario un gran número de uniones binarias para realizar ensamblajes complejos, lo que lo convierte en una metodología lenta y costosa para muchas aplicaciones.

**BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN**

Las metodologías de ensamblaje actuales son de dos tipos: multipartitas o binarias. Los métodos binarios pueden ser compatibles con el uso de piezas intercambiables y reciclables. En particular los sistemas del tipo Biobricks son idempotentes, es decir, utilizan una única regla para cualquier ensamblaje, lo que facilita enormemente su estandarización y automatización. Sin embargo los métodos descritos hasta el momento producen costuras entre las piezas ensambladas. Además, al tratarse en todo caso de ensamblajes binarios la construcción de circuitos complejos a partir de piezas básicas resulta más laboriosa que en el caso de los ensamblajes multipartitos.

Los métodos multipartitos son rápidos porque permiten ensamblajes simultáneos de más de dos elementos. Sin embargo los métodos actuales adolecen de ciertas limitaciones. Algunos son limitados en el número de piezas a ensamblar (multisite Gateway). Otros requieren la síntesis de piezas de novo en cada reacción de ensamblaje, generalmente mediante PCR, para poder así agregar regiones solapantes entre las piezas a ensamblar que no existían necesariamente en las piezas originales. La generación de amplias regiones solapantes asegura un ensamblado sin costuras pero dificulta la intercambiabilidad y reciclabilidad de las piezas. Además, hace necesaria la comprobación de la integridad de la pieza tras cada ensamblaje, ya que la síntesis de novo puede generar errores de copia. Por tanto estas metodologías multipartitas son poco aptas para su utilización como estándar de ensamblaje en colecciones de piezas genéticas intercambiables y reciclables.

Recientemente se describió metodología multipartita conocida como Golden Gate, basada en el uso de enzimas de restricción de tipo IIS. Golden Gate es altamente eficiente, y tiene como principal característica que permite un ensamblaje sin costuras sin utilizar PCR en el proceso de ensamblaje. Sin embargo, en su descripción original, Golden Gate tiene como principal inconveniente la falta de reciclabilidad de sus piezas, lo que dificulta su uso como sistema de ensamblaje estandarizado en Biología Sintética. Esta carencia de Golden Gate ha sido parcialmente superada más recientemente mediante la tecnología MoClo, que extiende de forma indefinida las capacidades de ensamblaje multipartito de Golden Gate. Para ello MoClo amplía la tecnología Golden Gate utilizando al menos dos enzimas de restricción de tipo IIs en orientación A12B, siendo A y B sitios de corte del primer enzima y 1 y 2 sitios de reconocimiento del segundo enzima (ej. Bpl-Bsal-Bsal-Bpl). Ello le permite llevar a cabo dos niveles de ensamblaje: en el nivel 1 se ensamblan las "partes" básicas utilizando el primero de los enzimas (Bsal), mientras que el segundo enzima se utiliza para ensamblaje de unidades transcripcionales (Bpl). Para conseguir abrir el sistema de forma indefinida a posteriores ensamblajes, existe la posibilidad de dejar "abierto" el nivel 2 mediante la adición, como una pieza más, de un nuevo casete de selección. El sistema MoClo tiene por tanto una estructura lineal con ramificaciones laterales (Figura 1A). Estas ramificaciones permiten dejar la estructura abierta a nuevos ensamblajes, aunque dicha estructura abierta no es directamente utilizable para su introducción en la célula ya que contiene un casete de selección ajeno al ensamblaje. Por tanto, la estrategia MoClo supone una solución parcial al problema de la reciclabilidad de los ensamblajes multipartitos Golden Gate, y está lastrada por una gran complejidad, muy alejada de la idempotencia de los BioBricks: el sistema completo contiene un total de 42 plásmidos incluyendo adaptadores, linkers y plásmidos para realizar ensamblajes reversos.

La presente invención consiste en un nuevo sistema modular de ensamblaje que permite combinar de forma indefinida las construcciones multipartitas Golden Gate haciendo uso de reglas muy simples, cercanas a la idempotencia y con un número muy pequeño de elementos. Tras una primera etapa de ensamblaje multipartito en el que se unen partes básicas de forma estandarizada, los ensamblajes multipartitos resultantes (dispositivos) se unen entre sí indefinidamente mediante uniones binarias. En su conjunto, el sistema de clonaje puede describirse como un doble bucle que permite un ensamblaje quasi-idempotente de ensamblajes multipartitos. Es por tanto una solución alternativa a MoClo que añade sencillez y reciclabilidad a los ensamblajes multipartitos, facilitando su aplicación a la Biología Sintética.

Brevemente, la invención consiste en un sistema de ensamblado *in vitro* para piezas genéticas basado en el uso de enzimas de restricción de tipo IIS. En el estado anterior de la técnica, el ensamblaje estandarizado MoClo, también basado en enzimas de restricción de tipo IIS, utilizaba dos dianas de dos enzimas de restricción en orientación definida (A12B), lo que daba lugar a un diseño lineal de sucesivos niveles jerárquicos, con ramificaciones laterales opcionales que permiten dejar ensamblajes abiertos para la adición de piezas adicionales (Fig 1A). La presente invención proporciona una solución alternativa sencilla al diseño lineal: un diseño de clonaciones en bucle que hace uso de sólo dos niveles que van alternándose entre sí (Figura 1B). Ello se consigue mediante el uso de 2 enzimas de restricción tipo IIS (E1 y E2), pero a diferencia de MoClo, en la presente invención, ambos enzimas se utilizan en los dos niveles y con orientaciones invertidas. Así en el nivel  $\alpha$  la orientación de los enzimas es del tipo general A12B, mientras que en el siguiente nivel (nivel  $\Omega$ ), la orientación es del tipo general 1AB2, donde los números representan sitios de corte del primer enzima y donde las letras representan sitios de corte del segundo enzima. Para conseguir la reciclabilidad de los ensamblajes resultantes (es decir, que estos puedan seguir ensamblándose entre sí), la presente invención necesita de sólo dos plásmidos de destino para cada nivel ( $\alpha$  y  $\Omega$ ). El sistema resultante tiene una estructura de doble bucle en el que los plásmidos de entrada de la primera ronda (nivel  $\alpha$ ) de ensamblaje se convierten en plásmidos de destino de la segunda ronda (nivel  $\Omega$ ) y viceversa, lo que permite ensamblar nuevas unidades de forma indefinida. Las únicas limitaciones serán las impuestas por el tamaño y/o composición de DNA que pueda ser propagado por un determinado vector. La presente invención permite por tanto

la estandarización de Golden Gate para su uso en Biología Sintética. Además, se consigue un crecimiento potencialmente indefinido con un conjunto pequeño de herramientas y un limitado número de reglas de ensamblaje.

**Plásmido pDGB K C12B (CECT 7899)**

5 Uno de los plásmidos de destino objetos de la presente invención para el ensamblaje *in vitro* de piezas de DNA de doble cadena, ha sido depositado el **21 de marzo de 2011**, en la **Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)** en el Edificio 3 CUE del parque científico de la Universidad de Valencia, Catedrático Agustín Escardino nº9, 46980 Paterna, Valencia (España), por **D. Diego Orzáez**, del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCO), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Universidad Politécnica de Valencia, Avenida Fausto Elio S/N 46022, Valencia (España).

10 El plásmido de destino para el ensamblaje *in vitro* de piezas de DNA de doble cadena depositado cuya referencia es **pDGB\_K\_C12B**, fue recibido por la CECT con el número de acceso **CECT 7 899** una vez dicha Autoridad Internacional para el Depósito declaró que el plásmido en cuestión era viable.

15 El plásmido **CECT 7899** es un plásmido circular y contiene un casete de selección positiva LacZ flanqueado en su extremo 5' por los sitios C y 1 y en su extremo 3' por los sitios 2 y B. El resto de elementos estructurales del plásmido son: un origen de replicación pSa, un origen de replicación ColE1 y un gen de resistencia a kanamicina. (**SEQ.ID.NO:11**).

**Plásmido pDGB K A12C (CECT 7900)**

20 Uno de los plásmidos de destino objetos de la presente invención para el ensamblaje *in vitro* de piezas de DNA de doble cadena, ha sido depositado el **25 de marzo de 2011**, en la **Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)** en el Edificio 3 CUE del parque científico de la Universidad de Valencia, Catedrático Agustín Escardino nº9, 46980 Paterna, Valencia (España), por **D. Diego Orzáez**, del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCO), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Universidad Politécnica de Valencia, Avenida Fausto Elio S/N 46022, Valencia (España).

25 El plásmido de destino para el ensamblaje *in vitro* de piezas de DNA de doble cadena depositado cuya referencia es **pDGB\_K\_A12C**, fue recibido por la CECT con el número de acceso **CECT 7 900** una vez dicha Autoridad Internacional para el Depósito declaró que el plásmido en cuestión era viable.

30 El plásmido **CECT 7900** es un plásmido circular y contiene un casete de selección positiva LacZ flanqueado en su extremo 5' por los sitios A y 1 y en su extremo 3' por los sitios 2 y C. El resto de elementos estructurales del plásmido son: un origen de replicación pSa, un origen de replicación ColE1 y un gen de resistencia a kanamicina. (**SEQ.ID.NO:10**).

**Plásmido pDGB K 3AB2 (CECT 7901)**

35 Uno de los plásmidos de destino objetos de la presente invención para el ensamblaje *in vitro* de piezas de DNA de doble cadena, ha sido depositado el **01 de abril de 2011**, en la **Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)** en el Edificio 3 CUE del parque científico de la Universidad de Valencia, Catedrático Agustín Escardino nº9, 46980 Paterna, Valencia (España), por **D. Diego Orzáez**, del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCO), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Universidad Politécnica de Valencia, Avenida Fausto Elio S/N 46022, Valencia (España).

40 El plásmido de destino para el ensamblaje *in vitro* de piezas de DNA de doble cadena depositado cuya referencia es **pDGB\_K\_3AB2**, fue recibido por la CECT con el número de acceso **CECT 7 901** una vez dicha Autoridad Internacional para el Depósito declaró que el plásmido en cuestión era viable.

El plásmido **CECT 7901** es un plásmido circular y contiene un casete de selección positiva LacZ flanqueado en su extremo 5' por los sitios 3 y A y en su extremo 3' por los sitios B y 2. El resto de elementos estructurales del plásmido son: un origen de replicación pSa, un origen de replicación ColE1 y un gen de resistencia a espectinomicina. (**SEQ.ID.NO:13**).

45 **Plásmido pDGB K 1AB3 (CECT 7902)**

50 Uno de los plásmidos de destino objetos de la presente invención para el ensamblaje *in vitro* de piezas de DNA de doble cadena, ha sido depositado el **21 de marzo de 2011**, en la **Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)** en el Edificio 3 CUE del parque científico de la Universidad de Valencia, Catedrático Agustín Escardino nº9, 46980 Paterna, Valencia (España), por **D. Diego Orzáez**, del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCO), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Universidad Politécnica de Valencia, Avenida Fausto Elio S/N 46022, Valencia (España).

El plásmido de destino para el ensamblaje *in vitro* de piezas de DNA de doble cadena depositado cuya referencia es **pDGB\_K\_1AB3**, fue recibido por la CECT con el número de acceso **CECT 7 902** una vez dicha Autoridad Internacional para el Depósito declaró que el plásmido en cuestión era viable.

- 5 El plásmido **CECT 7902** es un plásmido circular y contiene un casete de selección positiva LacZ flanqueado en su extremo 5' por los sitios 1 y A y en su extremo 3' por los sitios B y 3. El resto de elementos estructurales del plásmido son: un origen de replicación pSa, un origen de replicación ColE1 y un gen de resistencia a espectinomicina. (**SEQ.ID.NO:12**).

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- 10 La invención describe un sistema de ensamblado *in vitro* basado en el uso de enzimas de restricción de tipo IIS. El sistema Golden Gate anteriormente descrito permite realizar un ensamblaje multipartito sin costuras basado en enzimas de restricción de tipo IIS mediante el uso de dianas de un único enzima de restricción (E1). La presente invención permite, en virtud de un diseño especial de los plásmidos de destino en el que se usan al menos 2 enzimas de restricción de tipo IIS (E1, E2), además de realizar ensamblajes multipartitos como los previamente descritos, la posibilidad de combinarlos indefinidamente de forma binaria.

- 15 El sistema está formado por cuatro plásmidos de destino, pDGBs. Cada uno de los plásmidos de destino incorpora un casete delator que permita selección negativa (Sel), tal como LacZ o ccdB, o cualquier otro marcador que permita el crecimiento y la selección de aquellos clones que no contienen dicho marcador. Dicho marcador está flanqueado por un mínimo de 4 dianas de al menos 2 enzimas de restricción de tipo IIS, (E1 y E2). Las enzimas E1 y E2 pueden ser enzimas de restricción de tipo IIS tal como BsaI, BsmBI, BsbI, FokI, BsmAI, AarI, etc, o cualquier otro enzima de restricción con las siguientes características:

- 20 (i) que los sitios de reconocimiento y corte del enzima estén separados espacialmente, y preferentemente que el sitio de reconocimiento consista en una secuencia específica de cinco o más nucleótidos;
- (ii) que el sitio de corte del enzima no tenga requerimientos de secuencia, de forma que se pueda asignar a cada enzima cualquier secuencia de corte consistente en una serie de n nucleótidos (preferentemente cuatro o más)
- 25 donde n es una característica del propio enzima;
- (iii) que la digestión del DNA con el enzima tenga como consecuencia la formación de extremos cohesivos de DNA (preferentemente de 4 o más nucleótidos), que coincidirán con la secuencia de corte asignada por la invención.

- 30 Aprovechando la característica de las ERILs de tener distintos sitios de reconocimiento y corte y el hecho de que la zona de corte viene determinada por la orientación de la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción, se diseñó una disposición como la que se muestra en la Figura 2A. Las dianas de reconocimiento de las enzimas de restricción presentan sus secuencias de reconocimiento en dirección 5'→3' conforme se indica en la figura 2A con flechas sólidas. Estas se encuentran en orientaciones invertidas de modo que se pueden dirigir los sitios de reconocimiento conforme se indica en la Figura 2A mediante las flechas discontinuas.

- 35 Los sitios de corte de los ERTII son secuencias de nucleótidos cualesquiera, donde el número de nucleótidos que componen la diana, habitualmente cuatro, puede variar según el enzima concreto de que se trate. Por simplicidad, las secuencias nucleotídicas concretas asignadas a los sitios de corte del enzima E1 en los plásmidos de la invención se denotan con nomenclatura numérica (1,2,3...) y las propias de E2 una nomenclatura alfabética (A,B,C...).

- 40 Dado que los ERTII no tienen requerimientos respecto a los sitios de corte (sólo a los de reconocimiento), los sitios de corte 1, 2, 3, A, B y C asignados a los distintos enzimas en los distintos plásmidos de la invención pueden consistir en cualquier secuencia nucleotídica siempre que:

- (i) el número de nucleótidos de cada secuencia concreta sea igual a número de nucleótidos de la secuencia de corte de su enzima correspondiente (E1 o E2). Habitualmente se tratará de secuencias de 4 o más nucleótidos;
- 45 (ii) cada secuencia de corte concreta se localice a la distancia correcta del sitio de reconocimiento de su enzima y en la orientación correcta respecto de éste, de forma que pueda ser digerida por su enzima correspondiente dando lugar a la generación de un extremo cohesivo de cadena sencilla;
- (iii) las secuencias 1 2 y 3 sean distintas entre sí, y que preferiblemente se diferencien en 2 o más posiciones;
- (iv) las secuencias A, B y C sean distintas entre sí, y que preferiblemente se diferencien en 2 o más posiciones;
- (v) no se trate de secuencias palindrómicas.

- 50 En el sistema se usan al menos dos marcadores de selección positiva diferentes (M1 y M2) en la estructuras de los plásmidos, dando lugar a dos grupos de plásmidos, los plásmidos de nivel  $\alpha$ , que contienen el marcador M1 y los

plásmidos de nivel  $\Omega$ , que contienen el marcador M2. Los marcadores de selección positiva utilizados pueden ser cualquier tipo de marcador que permita el crecimiento y la selección de aquellos clones que sí llevan el marcador, como son los genes de resistencia a antibióticos como ampicilina, kanamicina, rifampicina, espectinomicina, estreptomycinina, tetraciclina, gentamicina, carbenicilina, etc.

5 Así, la primera pareja de plásmidos, correspondientes al nivel  $\alpha$  (pDGB\_A12C y pDGB\_C12B), contienen dianas de E2 en posición 5' respecto a las dianas de E1, con orientaciones son invertidas.

1. El plásmido pDGB\_A12C contiene un casete de selección que permite selección negativa con la siguiente estructura: 5'- Sitio de reconocimiento de E2-Sitio de corte de E2 tipo A-Sitio de corte de E1 tipo 1- Sitio de reconocimiento de E1-Casete de Selección-Sitio de reconocimiento de E1- Sitio de corte de E1 tipo 2-Sitio de corte de E2 tipo C- Sitio de reconocimiento de E2 -3'. (Figura 2B).

2. El plásmido pDGB\_C12B contiene un casete de selección que permite selección negativa con la siguiente estructura: 5' -Sitio de reconocimiento de E2-Sitio de corte de E2 tipo C-Sitio de corte de E1 tipo 1- Sitio de reconocimiento de E1-Casete de Selección-Sitio de reconocimiento de E1- Sitio de corte de E1 tipo 2-Sitio de corte de E2 tipo B- Sitio de reconocimiento de E2 -3'. (Figura 2C)

15 La pareja de plásmidos de nivel  $\Omega$  (pDGB\_1AB3 y pDGB\_3AB2) contiene dianas de E1 en posición 5' respecto a las dianas de E2, también con orientaciones invertidas.

1. El plásmido pDGB\_1AB3 contiene un casete de selección que permite selección negativa con la siguiente estructura: 5'- Sitio de reconocimiento de E1-Sitio de corte de E1 tipo 1-Sitio de corte de E2 tipo A- Sitio de reconocimiento de E2-Casete de Selección-Sitio de reconocimiento de E2- Sitio de corte de E2 tipo B-Sitio de corte de E1 tipo 3- Sitio de reconocimiento de E1-3'. (Figura 2D)

2. El plásmido pDGB\_3AB2 contiene un cassette de selección que permite selección negativa con la siguiente estructura: 5'-Sitio de reconocimiento de E1-Sitio de corte de E1 tipo 3-Sitio de corte de E2 tipo A- Sitio de reconocimiento de E2-Casete de Selección-Sitio de reconocimiento de E2- Sitio de corte de E2 tipo B-Sitio de corte de E1 tipo 2- Sitio de reconocimiento de E1 -3. (Figura 2E)'.  
20

25 El punto de partida del sistema es un ensamblaje multipartito de partes básicas (piezas) de DNA de doble cadena, flanqueadas por extremos de simple cadena (colas), de forma que la cola en 3' de cada pieza aparezca con la cola en 5' de la pieza subsiguiente, la cola en 5' de la primera pieza aparece con el sitio de corte tipo 1, y la cola en 3' de la última pieza aparece con el sitio de corte tipo 2 de los plásmidos tipo  $\alpha$  (figura 3A). En una realización particular, una o varias de las piezas pueden presentarse en forma de precursores, bien lineales, bien formando parte de un plásmido circular (plásmido de entrada o pENTR). Cada precursor contiene la pieza original flanqueada por secuencias adicionales que contienen dianas de E1. De esta forma, tras la digestión con el enzima E1, la pieza original se desprende del precursor, quedando flanqueada por extremos protuberantes que constituyen en sí mismos las colas necesarias para el ensamblaje. En el ejemplo ilustrado en la Figura 3A se ensamblan entre sí tres piezas de DNA (PR, CDS y TM), flanqueadas por extremos protuberantes representados con las etiquetas 1, IV, III y 2.  
30  
35 Será posible ensamblar el número de piezas que se desee siempre que el primer precursor contenga un sitio de corte para la E1 compatible con el sitio 1, el último precursor contenga un sitio de corte para la E1 compatible con el sitio 2 y las piezas adyacentes tengan extremos compatibles. Es recomendable que las piezas a ensamblar no contengan dianas para las enzimas E1 y E2 en su secuencia para aumentar la eficiencia de las clonaciones. También es recomendable que los pENTR contengan un marcador de selección diferente (M3) al de los pDGB.

40 En cada reacción de ensamblaje, el plásmido de destino de nivel  $\alpha$  (pDGB\_A12C o pDGB\_C12B) pierde su casete de selección negativa (ej LacZ), incorporando en su lugar el módulo ensamblado mediante una reacción de ligación entre los extremos protuberantes (1 y 2 en los extremos, y tantas ligaciones como partes se quiera ensamblar) dejados tras la digestión con E1. Tras la ligación, el plásmido resultante, que contiene al módulo ensamblado, pierde todas las dianas de E1, pero mantiene las dianas de E2, inherentes al plásmido.

45 A continuación, los módulos ensamblados sobre los plásmidos de nivel  $\alpha$  pueden ser considerados a su vez como plásmidos de entrada para un nuevo ensamblaje en nivel  $\Omega$  (Fig 3B). Dos módulos ensamblados sobre pDGB\_A12C y pDGB\_C12B respectivamente pueden a su vez ser ensamblados entre sí, esta vez utilizando el enzima E2 y un plásmido de nivel  $\Omega$ . En esta segunda ronda de ensamblaje, se pierden todos los sitios E2, pero se mantienen los sitios E1 del plásmido resultante.

50 En una tercera ronda de ensamblaje, y análogamente al caso anterior, los módulos construidos con plásmidos del nivel  $\Omega$  pueden nuevamente ensamblarse entre sí, utilizando el enzima E1 y un plásmido del nivel  $\alpha$ , cerrando un bucle iterativo e indefinido de ensamblajes jerárquicos (ver Figura 1B).

Análogamente al ejemplo anterior, la incorporación de módulos al sistema del ensamblaje multipartito puede realizarse directamente sobre los plásmidos del nivel  $\Omega$ . Una vez ensamblado el módulo sobre un plásmido de destino del nivel  $\Omega$ , el procedimiento de ensamblaje igual al descrito anteriormente. Esta posibilidad no altera el  
55

normal funcionamiento del sistema sino que lo dota de una mayor versatilidad.

El sistema en su conjunto está compuesto por sólo 4 plásmidos de destino y un sencillo conjunto de reglas de ensamblaje que formalmente se pueden definir como sigue:

1. REGLAS EGB para ensamblajes BINARIOS

- 5 1.  $pE [1 (Xi) 3] + pE [3 (Xj) 2] + pDGB (A12C) = pE [A (Xj+Xj) C]$   
 2.  $pE [1 (Xi) 3] + pE [3 (Xj) 2] + pDGB (C12B) = pE [C (Xi+Xj) B]$   
 3.  $pE [A (Xi) C] + pE [C (Xj) B] + pDGB (1AB3) = pE [1 (Xi+Xj) 3]$   
 4.  $pE [A (Xi) C] + pE [C (Xj) B] + pDGB (3AB2) = pE [3 (Xi+Xj) 2]$

Donde

- 10 •  $(Xi)$  y  $(Xj)$  son piezas de DNA a ensamblar, generalmente casetes de expresión.
- $(Xi+Xj)$  es un ensamblado idempotente de  $(Xi)$  y  $(Xj)$ , es decir, que  $(Xi+Xj)$  puede a su vez ensamblarse con otras piezas siguiendo estas mismas reglas.
- 1, 2, 3, son secuencias de 4 nucleótidos que flanquean a las piezas  $Xi$  y que se convierten en extremos protuberantes tras un corte con *BsaI*.
- 15 • A, B y C son secuencias que flanquean a las piezas  $Xi$  y que se convierten en extremos protuberantes tras un corte con *BsmBI*.
- $pE[ ]$  es un plásmido cualquiera (plásmido de entrada) que alberga una pieza de  $Xi$ , flanqueada por los sitios de corte y reconocimiento que se indican dentro del corchete.
- 20 •  $pDGB[ ]$  es un plásmido binario con un casete de selección que permite una selección negativa (plásmido de destino) flanqueado por los sitios de corte y reconocimiento que se indican dentro del corchete. Sólo hay 4 plásmidos binarios, que son los que aparecen en las reglas de ensamblaje.

Partiendo de piezas genéticas estandarizadas y mediante la aplicación de estas cuatro reglas de ensamblaje, el sistema de cuatro plásmidos de la invención permite generar nuevos ensamblajes totalmente reciclables de complejidad indefinidamente creciente para su uso en aplicaciones de Biología Sintética.

25 Las principales ventajas del sistema frente al estado actual de la técnica son:

- (i) Reciclabilidad/reusabilidad de sus piezas: todos los ensamblajes pueden ser usados directamente para su transformación en células o pueden ser integrados en construcciones más complejas, sin amplificación por PCR o posteriores modificaciones;
- 30 (ii) Velocidad: el punto de partida del sistema es un ensamblaje multipartito de modo que se ve acelerado con los sistemas puramente binarios como los BioBricks.;
- (iii) Precisión: se generan ensamblajes sin costuras gracias al uso de enzimas de tipo IIs.
- (iv) Simplicidad: el sistema objeto de la invención puede, teóricamente, realizar infinitos ensamblajes con solamente cuatro plásmidos y cuatro reglas de ensamblaje.

35 La presente invención hace referencia a un plásmido de destino (*pDGB*) para el ensamblaje *in vitro* de piezas de DNA de doble cadena, caracterizado porque comprende un esqueleto cualquiera de un plásmido de DNA de doble cadena que comprende:

- a) al menos un origen de replicación,
- b) al menos un marcador de selección, preferiblemente positiva,
- c) al menos un cassette que permite selección, preferiblemente negativa,
- 40 d) al menos 2 sitios de reconocimiento para una primera enzima de restricción de tipo IIS (E1) que dan lugar cada uno de ellos a un sitio de corte de 4 o más nucleótidos seleccionados entre 1, 2 y 3, siendo 1, 2 y 3 preferiblemente secuencias de cuatro nucleótidos cualesquiera distintas entre sí,
- e) al menos 2 sitios de reconocimiento para una segunda enzima de restricción de tipo IIS (E1) que dan lugar cada uno de ellos a un sitio de corte de 4 o más nucleótidos seleccionados entre A, B y C, siendo A, B y C preferiblemente



secuencias de cuatro nucleótidos cualesquiera distintas entre sí, de manera que los sitios de corte y reconocimiento citados en (d) y los sitios de corte y reconocimiento citados en (e) flanquean el cassette de selección citado en (c) en sus extremos 5' y 3' con orientaciones invertidas.

- 5 En una realización preferente la presente invención hace referencia a un plásmido de destino (pDGB) para el ensamblaje *in vitro* de piezas de DNA de doble cadena, caracterizado porque las orientaciones invertidas de los sitios de corte y reconocimiento citados en (d) y los sitios de corte y reconocimiento citados en (e) flanqueando el cassette de selección citado en (c) en sus extremos 5' y 3' preferiblemente están seleccionadas entre todas las combinaciones posibles entre 1, 2, 3, A, B, y C que cumplan las características arriba descritas, y más preferentemente están seleccionadas entre: A12C, C12B, 1AB3, y 3AB2;
- 10 En una realización preferente la presente invención hace referencia a un plásmido de destino (pDGB) para el ensamblaje *in vitro* de piezas de DNA de doble cadena, caracterizado porque la orientación de los dos sitios de corte y reconocimiento citados en (d) y los dos sitios de corte y reconocimiento citados en (e) es A12C, depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo como CECT 7900.
- 15 En una realización preferente la presente invención hace referencia a un plásmido de destino (pDGB) para el ensamblaje *in vitro* de piezas de DNA de doble cadena según la reivindicación 2, caracterizado porque la orientación de los dos sitios de corte y reconocimiento citados en (d) y los dos sitios de corte y reconocimiento citados en (e) es C12B, depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo como CECT 7899.
- 20 En una realización preferente la presente invención hace referencia a un plásmido de destino (pDGB) para el ensamblaje *in vitro* de piezas de DNA de doble cadena, caracterizado porque la orientación de los dos sitios de corte y reconocimiento citados en (d) y los dos sitios de corte y reconocimiento citados en (e) es 1AB3, depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo como CECT 7902.
- 25 En una realización preferente la presente invención hace referencia a un plásmido de destino (pDGB) para el ensamblaje *in vitro* de piezas de DNA de doble cadena, caracterizado porque la orientación de los dos sitios de corte y reconocimiento citados en (d) y los dos sitios de corte y reconocimiento citados en (e) es 3AB2, depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo como CECT 7901.
- En una realización preferente la presente invención hace referencia a un método de ensamblaje *in vitro* de piezas de DNA de doble cadena caracterizado porque comprende un bucle de ensamblaje indefinido que alterna el nivel  $\alpha$  y el nivel  $\Omega$  de ensamblaje binario quasi-idempotentes, donde el nivel  $\alpha$  comprende preferentemente las siguientes etapas:
- 30 i) construcción de los plásmidos de entrada (pE) de nivel  $\alpha$ , cada plásmido de entrada (pE) de nivel  $\alpha$  comprende una pieza de DNA de doble cadena seleccionada entre  $(X_i)$  y/o  $(X_j)$ , o  $(X_i+X_j)$ , flanqueada en sus extremos 5' y 3' por sendos sitios de corte y reconocimiento seleccionados entre 1, 2 y 3, para una primera enzima de restricción de tipo IIS (E1):
- pE [1  $(X_i)$  3] y pE [3  $(X_j)$  2]
- 35 ii) construcción de los plásmidos de destino (pDGB) de nivel  $\alpha$ :
- pDGB (A12C) (CECT 7900) y pDGB (C12B) (CECT 7899)
- iii) digestión enzimática de los plásmidos de entrada obtenidos en i) y los plásmidos de destino obtenidos en ii) en presencia de E1, preferentemente generando en sus extremos 3' y 5' secuencias terminales de cadena sencilla de DNA de al menos 3 o 4 nucleótidos, también denominados extremos protuberantes,
- 40 iv) ligación con ligasa T4 entre las secuencias terminales de cadena sencilla de los plásmidos de entrada y de destino digeridos en iii) formando los plásmidos ensamblados de nivel  $\alpha$  de DNA de doble cadena circular cerrado:
- pE [1  $(X_i)$  3] + pE [3  $(X_j)$  2] + pDGB (A12C) (CECT 7900) = pE [A  $(X_i+X_j)$  C]
- pE [1  $(X_i)$  3] + pE [3  $(X_j)$  2] + pDGB (C12B) (CECT 7899) = pE [C  $(X_i+X_j)$  B];
- y donde el nivel  $\Omega$  comprende las siguientes etapas:
- 45 v) construcción de los plásmidos de entrada (pE) de nivel  $\Omega$  cada plásmido de entrada (pE) de nivel  $\Omega$  comprende una pieza de DNA de doble cadena seleccionada entre  $(X_i)$  y/o  $(X_j)$ , flanqueada en sus extremos 5' y 3' por sendos sitios de corte y reconocimiento seleccionados entre A, B y C, para una segunda enzima de restricción de tipo IIS (E2):
- pE [A  $(X_i)$  C] y pE [C  $(X_j)$  B]

vi) construcción de los plásmidos de destino (pDGB) de nivel  $\Omega$ :

pDGB (1AB3) (CECT 7902) y pDGB (3AB2) (CECT 7901)

vii) digestión enzimática de los plásmidos de entrada obtenidos en v) y los plásmidos de destino obtenidos en vi) en presencia de E2, generando en sus extremos 3' y 5' secuencias terminales de cadena sencilla de DNA de al menos 4 nucleótidos, también denominados extremos protuberantes

viii) ligación con ligasa T4 entre las secuencias terminales de cadena sencilla de los plásmidos de entrada y de destino digeridos en vii) formando los plásmidos ensamblados de nivel A de DNA de doble cadena circular cerrado:

$pE [A (X_i) C] + pE [C (X_j) B] + pDGB (1AB3) (CECT 7902) = pE [1 (X_i+X_j) 3]$

$pE [A (X_i) C] + pE [C (X_j) B] + pDGB (3AB2) (CECT 7901) = pE [3 (X_i+X_j) 2];$

10 cuando el método de ensamblaje se inicia en el nivel  $\alpha$  y continua con el nivel  $\Omega$ , los plásmidos de entrada de nivel A  $pE [A (X_i) C]$  y  $pE [C (X_j) B]$  definidos en v) son sustituidos por los plásmidos ensamblados de nivel 1  $pE [A (X_i+X_j) C]$  y  $pE [C (X_i+X_j) B]$  obtenidos en iv); y

15 cuando el método de ensamblaje se inicia en el nivel  $\Omega$  y continua con el nivel  $\alpha$ , los plásmidos de entrada de nivel  $\alpha$   $pE [1 (X_i) 3]$  y  $pE [3 (X_j) 2]$  definidos en i) son sustituidos por los plásmidos ensamblados de nivel  $\Omega$   $pE [1 (X_i+X_j) 3]$  y  $pE [3 (X_i+X_j) 2]$  obtenidos en viii).

20 En una realización preferente la presente invención hace referencia a un método de ensamblaje *in vitro* de piezas de DNA de doble cadena caracterizado porque  $(X_i)$  y/o  $(X_j)$  se selecciona entre un promotor, una secuencia de localización subcelular, una secuencia codificante, una copia de DNA se secuencia de RNA interferente, una secuencia de terminación, o bien un casete de expresión de proteínas, enzimas, factores de transcripción, marcadores, anticuerpos, proteínas reguladoras, o un casete de expresión de RNAs funcionales o elementos estructurales de cromatina.

En una realización preferente la presente invención hace referencia a un método de ensamblaje *in vitro* de piezas de DNA de doble cadena caracterizado porque los plásmidos de destino (pDGB) son preferentemente plásmidos binarios para la transformación genética de plantas mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

25 En una realización preferente la presente invención hace referencia a un método de ensamblaje *in vitro* de piezas de DNA de doble cadena según la reivindicación 7 caracterizado porque  $(X_i+X_j)$  está formado preferentemente por un gen de kanamicina, un gen que codifica para la cadena ligera de un anticuerpo y un gen que codifica para la cadena pesada de un anticuerpo.

30 En una realización preferente la presente invención hace referencia a un método de ensamblaje *in vitro* de piezas de DNA de doble cadena caracterizado porque  $(X_i+X_j)$  está formado por cuatro casetes de expresión constitutiva preferentemente de tres genes que codifican tres proteínas fluorescentes y un cuarto gen que codifica la proteína p19.

35 En una realización preferente la presente invención hace referencia a una planta transformada mediante *Agrobacterium tumefaciens* mediante el método de ensamblaje descrito en la invención y caracterizada porque dicha planta expresa un anticuerpo recombinante de tipo IgA.

En una realización preferente la presente invención hace referencia a una planta transformada transitoriamente mediante *Agrobacterium tumefaciens* mediante el método de ensamblaje descrito en la invención y caracterizada porque dicha planta expresa, preferentemente de manera simultánea, las citadas tres proteínas fluorescentes.

#### DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

40 **Figura 1. Comparación de topologías entre MoClo y el sistema objeto de la invención.** (A) Topología jerárquica del ensamblaje MoClo. En el nivel 0 se ensamblan de forma flexible las subpartes para formar partes básicas, al tiempo que se permite la domesticación de dichas partes. En el nivel 1 se lleva a cabo el ensamblaje multipartito de partes básicas para dar lugar a unidades transcripcionales. En el nivel 2-1 tiene lugar el ensamblaje multipartito de unidades transcripcionales, dando lugar a una estructura final no reciclable. Alternativamente, el nivel 1 se puede bifurcar hacia el nivel 2-1i (intermedio) mediante la unión de un adaptador de cola, dando lugar a una estructura abierta (aunque no funcional), la cual puede albergar el ensamblaje de nuevas unidades transcripcionales (nivel 2-2). La creación de sucesivos niveles intermedios asegurará el crecimiento indefinido del sistema de clonaje. (B) Estructura de doble bucle del sistema objeto de la invención. Los plásmidos del nivel  $\alpha$  reciben los ensamblajes multipartitos de partes básicas dando lugar a unidades transcripcionales. Dos unidades transcripcionales ensambladas en el nivel  $\alpha$  pueden ser ensambladas entre sí dando lugar a dos complejos multigénicos alternativos de nivel  $\Omega$ . A su vez, dos complejos multigénicos de nivel  $\Omega$  pueden ser ensamblados entre sí en el nivel  $\alpha$ . La estructura general del sistema es un bucle doble iterativo que asegura el crecimiento indefinido de los ensamblajes.

**Figura 2** (A) Esquema de disposición de los sitios de reconocimiento y corte de las enzimas E1 y E2 en los pDGB. Los sitios de reconocimiento se disponen de forma invertida, de modo que se puede dirigir su acción de restricción conforme se necesita para el desarrollo de la invención. (B) Disposición de sitios de reconocimiento y corte de las enzimas en el plásmido pDGB\_A12C. (C) Disposición de sitios de reconocimiento y corte de las enzimas en el plásmido pDGB\_C12B (D) Disposición de sitios de reconocimiento y corte de las enzimas en el plásmido pDGB\_1AB3 (E) Disposición de sitios de reconocimiento y corte de las enzimas en el plásmido pDGB\_3AB2

**Figura 3. Mecanismo del sistema objeto de la invención.** (A) Ensamblaje multipartito de piezas estándar (PR, promotores; CDS, regiones codificantes; TM, terminadores) flanqueadas por sitios de restricción de E1 (representados con números arábigos y latinos). Los sitios de reconocimiento de E1 desaparecen tras el ensamblaje (representado con un cuadro tachado). El nuevo módulo ensamblado (DEV, representado como una flecha para simplificar el esquema) queda flanqueado por sitios de restricción de BsmBI (representado con círculos y letras mayúsculas). (B) Dos módulos ensamblados en plásmidos complementarios de tipo  $\alpha$  pueden ser reciclados como vectores de entrada (pEGB) para posteriores ensamblajes binarios en vectores de tipo  $\Omega$  ya que tienen un sitio de corte común (etiquetado con el círculo C). De igual manera, las construcciones realizadas sobre plásmidos complementarios de tipo  $\Omega$  pueden ser usadas para posteriores ensamblajes sobre vectores de tipo  $\alpha$  ya que ambas contienen un sitio de corte común (cuadrado 3). Los niveles  $\alpha$  y  $\Omega$  pueden alternarse de forma indefinida según se indica con las flechas que cruzan el bucle, creando estructuras cada vez más compleja. Los genes de resistencia a antibióticos se representan con círculos rallados verticales (resistencia a kanamicina) u horizontales (resistencia a espectinomicina).

**Figura 4. Domesticación de plásmidos de destino.** Ensamblaje de las piezas que conforman el esqueleto de los plásmidos pDGB del sistema GoldenBraid con los casetes de selección negativa (LacZ flanqueado de sitios BsaI y BsmBI) y positiva (genes de resistencia a kanamicina o espectinomicina). Se muestra un ejemplo de plásmido para cada uno de los niveles del sistema.

**Figura 5 Estructura del casete LacZ en el sistema.** La colección de plásmidos del sistema comprende cuatro plásmidos de destino (pDGBs), agrupándose en dos niveles,  $\alpha$  y  $\Omega$ . Los vectores incorporan un casete de selección LacZ flanqueado de cuatro sitios de reconocimiento de enzimas de restricción de tipo IIs (BsaI, BsmBI) en posiciones y orientaciones invertidas. Para facilitar la visualización del diseño, se etiqueta cada sitio de corte de 4 nucleótidos de la siguiente manera: los sitios de corte de BsaI con cuadrados y números arábigos (1, 2, 3); los sitios de corte de BsmBI con círculos y letras mayúsculas (A,B,C).

**Figura 6** (A) Análisis de restricción del plásmido pDGB\_K\_A12C con las enzimas de restricción BsaI (carril 2) y BsmBI (carril 3). (B) Análisis de restricción del plásmido pDGB\_S\_1AB3 con las enzimas de restricción BsmBI (carril 2) y BsaI (carril 3).

**Figura 7 Co-transformación de dispositivos fluorescentes.** (A) Itinerario seguido para el ensamblaje de las unidades transcripcionales YFP, p19, BFP y DsRED en un único T-DNA. (B) Patrones espaciales de expresión de BFP, YFP y DsRED en hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con pEGB\_A-YFP-P19-BFP-DsRed-C (capturas superiores, 1, 2 y 3) o con una mezcla de dispositivos individuales pEGB\_A-YFP-C, pEGB\_C-p19-B, pEGB\_A-BFP-C y pEGB\_C-DsRed-B (capturas inferiores 4, 5 y 6).

**Figura 8 Selección de isotipos de una IgA humana construidos con el sistema objeto de la invención.** (A) Estrategia seguida en el ensamblaje de diferentes isotipos de la IgA humana. En primer lugar, la fase de ensamblaje multipartito consistió en la combinación de diferentes partes básicas cada una ocupando una posición fija en el ensamblaje (P1-P5). Las cadenas individuales de inmunoglobulinas se ensamblaron en el plásmido pDGB\_C12B para generar los cuatro isotipos de la IgA. En la figura, 35S representa el promotor CamV35S; SP representa el péptido señal de una peptidasa de tomate; CH $\alpha$ 1 y CH $\alpha$ 2 son dominios constantes de la cadena pesada; C $\lambda$  y C $\kappa$  son dominios constantes de la cadena ligera; VH y VL son regiones variables de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo frente al péptido VP8\* de rotavirus. (B) Digestión BglII de dos colonias de cada una de las cuatro construcciones finales:  $\alpha$ 1 $\lambda$ , pEGB\_C-Ig $\alpha$ 1-Ig $\lambda$ -B;  $\alpha$ 1 $\kappa$ , pEGB\_C-Ig $\alpha$ 1-Ig $\kappa$ -B;  $\alpha$ 2 $\lambda$ , pEGB\_C-Ig $\alpha$ 2-B-Ig $\kappa$ -B,  $\alpha$ 2 $\kappa$ , pEGB\_C-Ig $\alpha$ 2-Ig $\kappa$ -B. (C) Análisis Western Blot de la expresión transitoria de las distintas construcciones en *Nicotiana benthamiana*. Las hojas de la planta se infiltraron con las cuatro construcciones anteriores. Las muestras se resolvieron en condiciones reductoras (izda) y no reductoras (dcha) y se revelaron con anticuerpos frente a la cadena pesada, ligera  $\lambda$  y ligera  $\kappa$  respectivamente. La carrera HS contiene un control de suero humano. (D) Titulado ELISA de punto final de las cuatro combinaciones de IgA ensayadas mediante expresión transitoria. Todas las muestras fueron tituladas frente a VP8\* o frente a Albúmina sérica bovina (BSA) y comparadas con muestras equivalentes derivadas de hojas silvestres.

## BIBLIOGRAFÍA

55 - Aslanidis C & PJ de Jong (1990) Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). *Nucleic Acids Res* 18: 6069-74.

- Berger I (2010) Nuclear acids for Cloning and Expressing Multiprotein Complexes. IN (EMBL), E. L. F. M. (Ed).

- Bieniossek C, Y Nie, D Frey, N Olieric, C Schaffitzel, I Collinson, C Romier, P Berger, TJ Richmond, MO Steinmetz & I Berger (2009) Automated unrestricted multigene recombineering for multiprotein complex production. *Nat Meth* 6: 447-450.
- 5 - Che A (2004) Synthetic Biology:BioBricks/3A assembly. BioBricks++ Assembly Scheme. Tech. rep., MIT Synthetic Biology Working Group Technical Reports
- Chen QJ, HM Zhou, J Chen & XC Wang (2006) A Gateway-based platform for multigene plant transformation. *Plant Mol Biol* 62: 927 - 36.
- Chung SM, EL Frankman & T Tzfira (2005) A versatile vector system for multiple gene expression in plants. *Trends Plant Sci* 10: 357-61.
- 10 - Engler C, R Gruetzner, R Kandzia & S Marillonnet (2009) Golden gate shuffling: a one-pot DNA shuffling method based on type IIs restriction enzymes. *PLoS One* 4: e5553.
- Engler C, R Kandzia & S Marillonnet (2008) A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS One* 3: e3647.
- 15 Gibson DG, L Young, R-Y Chuang, JC Venter, CA Hutchison & HO Smith (2009) Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Meth* 6: 343-345.
- Goderis IJWM, MFC De Bolle, IEJA François, PFJ Wouters, WF Broekaert & BPA Cammue (2002) A set of modular plant transformation vectors allowing flexible insertion of up to six expression units. *Plant Molecular Biology* 50: 17-27.
- 20 Hellens RP, EA Edwards, NR Leyland, S Bean & PM Mullineaux (2000) pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Plant Mol Biol* 42: 819-32.
- Karimi M, D Inze & A Depicker (2002) GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci* 7: 193-5.
- Knight TF (2003) Idempotent Vector Design for Standard Assembly of BioBricks. Tech. rep., MIT Synthetic Biology Working Group Technical Reports
- 25 - Li MZ & SJ Elledge (2007) Harnessing homologous recombination in vitro to generate recombinant DNA via SLIC. *Nat Meth* 4: 251-256.
- Lin L, Y-G Liu, X Xu & B Li (2003) Efficient linking and transfer of multiple genes by a multigene assembly and transformation vector system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 5962-5967.
- 30 - Monedero V, J Rodriguez-Diaz, R Viana, J Buesa & G Perez-Martinez (2004) Selection of single-chain antibodies against the VP8\*subunit of rotavirus VP4 outer capsid protein and their expression in *Lactobacillus casei*. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 6936-6939.
- Orzaez D, S Mirabel, WH Wieland & A Granell (2006) Agroinjection of tomato fruits. A tool for rapid functional analysis of transgenes directly in fruit. *Plant Physiol.* 140: 3-11.
- 35 - Qiu WP, JW Park & HB Scholthof (2002) Tombusvirus p19-mediated suppression of virus-induced gene silencing is controlled by genetic and dosage features that influence pathogenicity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15: 269-280.
- Quan J & J Tian (2009) Circular Polymerase Extension Cloning of Complex Gene Libraries and Pathways. *PLoS ONE* 4: e6441.
- 40 Weber, E., C. Engler, et al. (2011). "A modular cloning system for standardized assembly of multigene constructs." *PLoS One* 6(2): e16765.
- Wieland WH, A Lammers, A Schots & DV Orzaez (2006) Plant expression of chicken secretory antibodies derived from combinatorial libraries. *J Biotechnol* 122: 382-91.

#### **EJEMPLOS**

- 45 Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. En un primer ejemplo, desarrollamos la domesticación de los vectores pDGBs para adaptarlos al sistema objeto de la invención. En un segundo ejemplo,

ensamblamos en un único T-DNA tres proteínas fluorescentes y el supresor de silenciamiento p19, demostrando las ventajas de la construcción multigénica en *cis* al ser ensayada de forma transitoria por agroinfiltración en planta. En un tercer ejemplo, mostramos la versatilidad del sistema para ensayar diferentes isotipos de anticuerpos en una aproximación combinatorial de los mismos.

- 5 Así, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención en el campo de la Biología Sintética de Plantas, sin limitar el campo de aplicación de la misma en otros campos.

#### EJEMPLO 1: CONSTRUCCIÓN DE LOS VECTORES pDGB

- 10 En este ejemplo se describe la realización de la invención para el caso concreto de un sistema de ensamblaje destinado al ensamblaje de piezas genéticas para la transformación genética de plantas. Se describe la creación de un sistema de cuatro vectores binarios derivados del vector binario pGreenII, que incorporan el esquema descrito en la invención para los plásmidos de destino (pDGB). El esqueleto de cualquier plásmido podría adaptarse, de forma similar a la que se propone en el presente ejemplo, al sistema objeto de la invención.

- 15 Los vectores pDGB se construyeron por ensamblaje, mediante una reacción Golden Gate (Engler, Kandzia et al. 2008) con BbsI, de un número variable de piezas (Figura 4). Cada pieza fue amplificada por PCR incorporando en sus extremos sendos sitios de reconocimiento de BbsI y sitios de corte compatibles con la pieza contigua a ensamblar, generando los precursores de cada pieza. Posteriormente cada precursor fue clonado en un vector TA cloning pGEMT (Promega), generando los denominados vectores de entrada (pENTR) para cada pieza.

- 20 Los precursores necesarios para ensamblar un plásmido son, generalmente, un casete de selección negativa (LacZ, en este caso), un casete de selección positiva (resistencia a antibiótico) y un número variable de piezas que conforman el esqueleto del vector y contienen los orígenes de replicación y los bordes de T-DNA.

Para generar el set de vectores del sistema objeto de la invención, se generaron cuatro piezas de selección negativa (precursores LacZ-A12C, LacZ-C12B, LacZ-1AB3, LacZ-3Ab2), dos genes de resistencia a antibiótico (resistencia a kanamicina –precursores 2KA y 2KB- y espectinomycinina –precursor 2S-) y dos piezas (precursor 1 y precursor 3) que comprenden el esqueleto del plásmido pGreenII. Así, los precursores son:

- 25 a) El precursor 1 (SEQ.ID.NO:1) contiene la pieza 1, que corresponde a los nucleótidos 1296-2169 del esqueleto del plásmido pGreenII (Hellens, Edwards et al. 2000).
- b) El precursor 2KA (SEQ.ID.NO:2) contiene la pieza 2KA, que corresponde a los nucleótidos 2166-2542 del esqueleto del plásmido pGreenII. Incluye una mutación A>T en el nucleótido 2542 para eliminar un sitio de restricción BsmBI. Se corresponde con el fragmento 3' de la resistencia a kanamicina.
- 30 c) El precursor 2KB (SEQ.ID.NO:3) contiene la pieza 2KB, que corresponde a los nucleótidos 2539-2989 del esqueleto del plásmido pGreenII. Incluye una mutación A>T en el nucleótido 2542 para eliminar un sitio de restricción BsmBI. Se corresponde con el fragmento 5' de la resistencia a kanamicina.
- d) El precursor 2S (SEQ.ID.NO:4) contiene la pieza 2S, que corresponde a los nucleótidos 248-1392 del esqueleto del plásmido pCR8 (Invitrogen). Se corresponde con la resistencia a espectinomycinina.
- 35 e) El precursor 3 (SEQ.ID.NO:5) contiene la pieza 3, que corresponde a los nucleótidos 2986-565 del esqueleto del plásmido pGreenII.
- f) Los precursores de las piezas de selección negativa se amplifican a partir del plásmido pUC19 en cuatro versiones distintas. Cada pieza incorpora, junto con el gen lacZ, dianas y sitios de corte de dos ERTIIS en distintas posiciones relativas distintas, según se describe más abajo. Por simplicidad, los sitios de corte concretos de la enzima BsaI se nombran de forma numérica (1, 2, 3) y para los de BsmBI se usa una nomenclatura alfabética (A,B,C). Las secuencias nucleotídicas concretas también se muestran: A (CCAC), B (CGTC), C (GGCA), 1 (GGCA), 2 (CGAC) Y 3 (GATG). La estructura resultante y la composición nucleotídica resultante de cada uno de los precursores de las cuatro piezas de selección negativa son :
- 40
- 45 i. El precursor de la pieza LacZ-A12C (SEQ.ID.NO.6) tiene la siguiente estructura: 5' Sitio de reconocimiento de BsmBI -Sitio de corte de BsmBI tipo A-Sitio de corte de BsaI tipo 1- Sitio de reconocimiento de BsaI -LacZ-Sitio de reconocimiento de BsaI- Sitio de corte de BsaI tipo 2-Sitio de corte de BsmBI tipo C- Sitio de reconocimiento de BsmBI 3'. (Figura 5)

ii. El precursor de la pieza LacZ-C12B (SEQ.ID.NO.7) tiene la siguiente estructura: 5' Sitio de reconocimiento de BsmBI-Sitio de corte de BsmBI tipo C-Sitio de corte de Bsal tipo 1- Sitio de reconocimiento de Bsal-LacZ-Sitio de reconocimiento de Bsal- Sitio de corte de Bsal tipo 2-Sitio de corte de BsmBI tipo B- Sitio de reconocimiento de BsmBI 3'. (Figura 5)

5 iii. El precursor de la pieza LacZ-1AB3 (SEQ.ID.NO.8) tiene la siguiente estructura: 5' Sitio de reconocimiento de Bsal -Sitio de corte de Bsal tipo 1-Sitio de corte de BsmBI tipo A- Sitio de reconocimiento de BsmBI -LacZ-Sitio de reconocimiento de BsmBI- Sitio de corte de BsmBI B- Sitio de corte de BsmBI tipo 3- Sitio de reconocimiento de Bsal 3'. (Figura 5).

10 iv. El precursor de la pieza LacZ-3AB2 (SEQ.ID.NO.9) tiene la siguiente estructura: 5' Sitio de reconocimiento de Bsal -Sitio de corte de Bsal tipo 3-Sitio de corte de BsmBI tipo A- Sitio de reconocimiento de BsmBI-LacZ-Sitio de reconocimiento de BsmBI- Sitio de corte de BsmBI B- Sitio de corte de BsmBI tipo 2- Sitio de reconocimiento de Bsal 3' (Figura 5).

15 Todos los precursores se obtuvieron por amplificación PCR y se clonaron en el vector pGEMT, generando los correspondientes plásmidos de entrada pENTR\_Pieza. Como se indica, el ensamblaje de los vectores pDGBs se realiza mediante una reacción Golden Gate en un solo tubo (Engler, Kandzia et al. 2008) que contenía los distintos pENTRs, BbsI y ligasa T4 en 25 ciclos de 37°C y 14°C. Para eliminar falsos positivos, se realiza una digestión final adicional a la descrita por Engler et al.(2008) Las combinaciones de pENTRs para cada reacción fueron:

1. pENTR\_1, pENTR\_2KA, pENTR\_2KB, pENTR\_3 y pENTR\_LacZ-A12C para construir el plásmido pDGB\_K\_A12C (SEQ.ID.NO:10).

20 2. pENTR\_1, pENTR\_2KA, pENTR\_2KB, pENTR\_3 y pENTR\_LacZ-C12B para construir el plásmido pDGB\_K\_C12B (SEQ.ID.NO:11).

3. pENTR\_1, pENTR\_2S, pENTR\_3 y pENTR\_LacZ-1AB3 para construir el plásmido pDGB\_S\_1AB3 (SEQ.ID.NO:12).

25 4. pENTR\_1, pENTR\_2S, pENTR\_3 y pENTR\_LacZ-3AB2 para construir el plásmido pDGB\_S\_3AB2 (SEQ.ID.NO:13).

30 Tras realizar el ensamblaje Golden Gate, se utilizó un microlitro de cada reacción para transformar *E. coli*. Las células transformadas se sembraron en placas de LB con kanamicina y X-gal en el caso de las reacciones 1 y 2, y en placas de LB con espectinomicina y X-gal para las transformaciones resultantes de las reacciones 3 y 4. De cada reacción se seleccionaron cuatro colonias de color azul, se crecieron en medio líquido y se procedió a aislar y analizar el plásmido correspondiente mediante análisis de digestión y posterior secuenciación. Ambos análisis mostraron ensamblajes correctos en al menos tres de las cuatro colonias analizadas para cada reacción. La Figura 6 muestra los análisis de restricción obtenidos para las reacciones 1 y 3.

## EJEMPLO PRÁCTICO 2

35 La expresión de genes de forma transitoria en *N. benthamiana* mediada por *Agrobacterium* (agroinfiltración) es una tecnología eficiente para la producción de proteínas recombinantes en plantas. Un punto interesante del sistema es la alta eficiencia de co-transformación conseguida por combinación de dos o más cultivos independientes de *Agrobacterium* con distintos genes de interés (co-transformación *en trans*). El complicado ensamblaje de múltiples unidades transcripcionales en un único T-DNA conlleva el uso de la co-transformación *en trans* cuando se persigue la expresión coordinada de dos o más proteínas en una misma célula/tejido. El sistema objeto de la invención

40 permite un clonaje eficiente y sencillo de varias unidades transcripcionales en un mismo T-DNA (*en cis*). Para testar si esto es así y si la co-transformación *en cis* mejora una aproximación similar *en trans*, se ensamblan tres módulos fluorescentes junto con una proteína supresora de silenciamiento en un mismo T-DNA y se compara su resultado con una aproximación *en trans*.

45 De este modo, en el presente ejemplo se demuestra la funcionalidad de la presente invención para la construcción de estructuras multigénicas para la transformación genética de plantas. Se muestra el ensamblaje ordenado de un total 12 fragmentos consecutivos a partir de 7 piezas básicas distintas, incluyendo el vector binario. Las piezas estándar se agrupan de tres en tres (promotor, región codificante y terminador), dando lugar a cuatro módulos funcionales distintos (casetes de expresión) correspondientes a tres proteínas fluorescentes distintas (verde, roja y azul) y un supresor de silenciamiento p19 del TBSV (Qiu, Park et al. 2002) para potenciar los niveles de expresión

50 transitoria. El ensayo de la construcción mediante transformación transitoria de hojas de *N. benthamiana* demuestra que el ensamblaje multigénico resultante es totalmente funcional.

Para el ensamblaje se construyen los correspondientes plásmidos de entrada (pENTR), mediante clonaje TA de los distintos precursores en pGEM-T. Los precursores se obtuvieron por amplificación por PCR de cada pieza,

incluyendo los correspondientes sitios de corte y reconocimiento del enzima Bsal en las secuencias de los cebadores empleados en la amplificación, según se detalla a continuación:

- 5 a) Precursor del Promotor 35s (SEQ.ID.NO 14): el promotor 35S está flanqueado por dos sitios de restricción Bsal siendo los sitios de corte de tipo 1 en el extremo 5' y de tipo IV (GATG) en 3'. Se amplifica del vector pK2GW,0 (Karimi, Inze et al. 2002) e incluye una mutación C>G en el nucleótido 206 para eliminar un sitio de restricción Bsal.
- b) Precursor del Terminador Tnos (SEQ.ID.NO 15): el terminador está flanqueado por dos sitios de restricción Bsal siendo los sitios de corte de tipo III (TGAG) en el extremo 5' y de tipo 2 en 3'. Se amplifica del vector pBIN-YFP/GUS (Orzaez, Mirabel et al. 2006).
- 10 c) Precursores de los distintos CDS: los CDS están flanqueados por dos sitios de restricción Bsal, siendo estos sitios de corte tipo IV en el extremo 5' y de tipo III en el extremo 3'. Se construyen los siguientes módulos CDS:
  - i. YFP (SEQ.ID.NO 16): amplificado del vector pBIN-YFP/GUS (Orzaez, Mirabel et al. 2006).
  - 15 ii. DsRed (SEQ.ID.NO 17): Contiene la secuencia de la proteína fluorescente DsRed en la que se realiza una mutación silenciosa C>A en el nucleótido 491 para eliminar un sitio de restricción Bsal.
  - iii. BFP (SEQ.ID.NO 18): contiene la secuencia de la proteína fluorescente BFP en la que se realizan dos mutaciones silenciosas, ambas G>A, en los nucleótidos 443 y 632 para eliminar sendos sitios de restricción BsmBI y Bsal.
  - 20 iv. P19 (SEQ.ID.NO 19): amplificado del vector pBINp19. Se realizan tres mutaciones silenciosas para eliminar dos sitios Bsal (G>C en el nucleótido 386 y G>A en el nucleótido 503) y un sitio BsmBI (G>T en el nucleótido 155).

25 El ensamblaje de las distintas piezas para generar módulos (casetes de expresión) se realizó mediante una reacción Golden Gate en un solo tubo (Engler, Kandzia et al. 2008) que contenía los distintos pENTR\_pieza, enzima Bsal y ligasa T4 en 25 ciclos de 37°C y 14°C. Las combinaciones de pENTR\_pieza para los ensamblajes de esta estrategia se esquematizan en la figura 7.A y fueron:

- a. Ensamblaje tripartito de pENTR\_35S, pENTR\_YFP y pENTR\_terminador en el vector de destino pDGB\_K\_A12C, para dar lugar al vector de expresión pEGB\_K\_A-YFP-C (SEQ.ID.NO 20)
- 30 b. Ensamblaje tripartito del pENTR\_35S, el pENTR\_p19 y pENTR\_terminador en el vector de destino pDGB\_K\_C12B, para dar lugar al vector de expresión pEGB\_K\_C-p19-B. (SEQ.ID.NO 21)
- c. Ensamblaje tripartito del pENTR\_35S, el pENTR\_BFP y el pENTR\_terminador en el vector de destino pDGB\_K\_A12C, para dar lugar al vector de expresión pEGB\_K\_A-BFP-C. (SEQ.ID.NO 22)
- d. Ensamblaje tripartito del pENTR\_35S, el pENTR\_DsRed y el pENTR\_terminador el vector de destino pDGB\_K\_C12B, para dar lugar al vector de expresión pEGB\_K\_C-DsRed-B. (SEQ.ID.NO 23)

35 Tras realizar el ensamblaje, se utilizó un microlitro de cada reacción para transformar *E. coli*. Las células transformadas se sembraron en placas de LB con kanamicina y X-gal. De cada reacción se seleccionaron cuatro colonias de color blanco, se crecieron en medio líquido y se procedió a aislar y analizar el plásmido correspondiente mediante análisis de digestión y posterior secuenciación. Ambos análisis mostraron ensamblajes correctos en al menos tres de las cuatro colonias analizadas para cada reacción.

40 Los cuatro vectores pEGB resultantes pueden a su vez funcionar como plásmidos de entrada ya que en ellos los nuevos módulos genéticos están flanqueados por sitios de restricción BsmBI de tipo A, B o C. De este modo se pueden ensamblar módulos dos a dos sobre los vectores de destino pDGB de nivel  $\Omega$ , mediante reacciones Golden Gate con BsmBI como enzima de restricción.

45 El ensamblaje de los distintos módulos sencillos para generar módulos de orden superior (doble transgénico) se realizó mediante una reacción Golden Gate en un solo tubo (Engler, Kandzia et al. 2008) que contenía los distintos pEGB\_MODULO, el enzima BsmBI y ligasa T4 en 25 ciclos de 37°C y 14°C. Las combinaciones de pEGB\_MODULO para cada reacción fueron:

- a. Ensamblaje bipartito de pEGB\_K\_A-YFP-C y pEGB\_K\_C-p19-B en el vector de destino pDGB\_S\_1AB3, para dar lugar al vector de expresión pEGB\_S\_1-YFP-p19-3 (SEQ.ID.NO 24)
- 50 b. Ensamblaje bipartito de los módulos pEGB\_K\_A-BFP-C y pEGB\_K\_C-DsRed-B en el vector de destino pDGB\_S\_3AB2, para dar lugar al vector de expresión pEGB\_S\_3-BFP-DsRed-2 (SEQ.ID.NO 25)

55 Tras realizar el ensamblaje, se utilizó un microlitro de cada reacción para transformar *E. coli*. Las células transformadas se sembraron en placas de LB con espectinomicina y X-gal. De cada reacción se seleccionaron cuatro colonias de color blanco, se crecieron en medio líquido y se procedió a aislar y analizar el plásmido correspondiente mediante análisis de digestión y posterior secuenciación. Ambos análisis mostraron ensamblajes correctos en al menos tres de las cuatro colonias analizadas para cada reacción.

Los dos vectores pEGB doble transgénicos resultantes pueden funcionar como plásmidos de entrada por la presencia de sitios de restricción Bsal de tipo 1, 2 ó 3. De este modo, para ensamblar un el cassette de expresión cuádruple pEGB\_K\_A-YFP-P19-BFP-DsRed-C (SEQ.ID.NO 26), se incubaron en un solo tubo el vector de destino pDGB\_K\_A12C, y los plásmidos pEGB\_S\_1-YFP-p19-3 y pEGB\_S\_3-BFP-DsRed-2 en presencia de Bsal y T4 ligasa en 50 ciclos de 37°C y 14°C

Tras realizar el ensamblaje, se utilizó un microlitro de cada reacción para transformar *E. coli*. Las células transformadas se sembraron en placas de LB con kanamicina y X-gal. Posteriormente se seleccionaron cuatro colonias de color blanco, se crecieron en medio líquido y se procedió a aislar y analizar el plásmido correspondiente mediante análisis de digestión y posterior secuenciación. Ambos análisis mostraron ensamblajes correctos en las cuatro colonias analizadas (Figura 7B).

Se seleccionó una de las colonias correctas de la construcción final pEGB\_K\_A-YFP-P19-BFP-DsRed-C y se co-transformó con el vector pSOUP en *Agrobacterium tumefaciens* C58. Se comprobó la integridad del plásmido aislado de *Agrobacterium* mediante análisis de restricción de los clones seleccionados en placas de LB rifampicina, kanamicina, tetraciclina y gentamicina. Un clon de *Agrobacterium* que contenía la construcción correcta fue crecido en medio líquido y utilizado para transformar transitoriamente hojas de *Nicotiana benthamiana* (Wieland, Lammers et al. 2006). Tras cuatro días de incubación, se observaron las hojas infiltradas en la lupa de fluorescencia y, con filtros correspondientes, se comprobó la correcta expresión de las tres proteínas fluorescentes. En paralelo, se agroinfiltró *en trans* una mezcla de cultivos de *Agrobacterium* que expresaban por separado las tres proteínas fluorescentes y p19. Como se muestra en la figura 7C, las proteínas ensambladas en un mismo T-DNA mostraron una expresión coordinada en *N. benthamiana* como se deduce de la similar intensidad de fluorescencia observada en los tres canales. En cambio, cuando los módulos fluorescentes se agroinfiltraron *en trans*, cada canal mostró una distribución diferente en cuanto a las intensidades, evidenciando niveles de expresión heterogéneos para las diferentes proteínas. Además, demostramos como el sistema es permisivo, al menos en lo que se refiere a expresión transitoria, con la introducción de cuatro copias del promotor 35s en un único T-DNA sin afectar a la expresión de las proteínas fluorescentes. Según los resultados obtenidos, un ensamblaje de varias unidades transcripcionales asistido por la presente invención mejora la expresión de las mismas *en cis* frente al resultado obtenido por su agroinfiltración *en trans*.

### EJEMPLO PRÁCTICO 3

La producción de anticuerpos para uso terapéutico en plantas es un campo que requiere estrategias de clonajes muy flexibles. En el presente ejemplo se muestra una realización de la invención para la construcción de diferentes versiones de anticuerpos recombinantes y comparar los resultados obtenidos tras expresar las proteínas *in planta*. Se ensamblan, en primer lugar, piezas básicas para formar módulos de expresión de cadenas de inmunoglobulinas humanas. Posteriormente, se ensamblan dos módulos inmunoglobulina (ligera y pesada) para formar un dispositivo de expresión de una inmunoglobulina A completa, evaluándose cuál de todas ellas resulta en una mejor expresión. Finalmente, se ensambla un módulo de expresión de resistencia a kanamicina como marcador de selección a la combinación de cadena pesada y ligera que resulta más eficiente. En total se ensamblaron 8 piezas básicas incluyendo el vector binario. El resultado final es una construcción funcional de tres genes, lista para ser transformada en la planta.

Este ejemplo tiene la peculiaridad de que uno de los módulos se ensambla sobre un plásmido pDGB\_K (nivel  $\alpha$ ) y los dos restantes se ensamblan sobre los plásmidos pDGB\_S (nivel  $\Omega$ ), demostrando así la versatilidad de puntos de entrada que puede tener el sistema objeto de invención. Además, muestra la versatilidad y flexibilidad del sistema objeto de la invención para ensamblar construcciones combinatoriales a partir de unas piezas prefijadas.

En primer lugar se construyen los distintos plásmidos de entrada, amplificándose por PCR las secuencias de los precursores de los módulos, y clonándose en pGEM-T (Promega):

- a) Precursor Módulo KanR (SEQ.ID.NO 27): el módulo Resistencia a Kanamicina está flanqueado por dos sitios de restricción Bsal siendo los sitios de corte de tipo 1 en el extremo 5' y de tipo III en 3'. Se amplifica del vector pK2GW,0 (Karimi, Inze et al. 2002).
- b) Precursor Pieza 35sSP (SEQ.ID.NO 28): este módulo comprende el promotor 35s del vector pK2GW,0 (Karimi, Inze et al. 2002) junto con el péptido señal de la pectato liasa de *Solanum lycopersicum*. El módulo está flanqueado por dos sitios de restricción BsmBI, siendo los sitios de corte de tipo A en el extremo 5' y de tipo  $\beta$  (TGCC) en el extremo 3'.
- c) Precursor Pieza CL.Tnos (SEQ.ID.NO 29): incluye las secuencias de la región constante de la cadena ligera lambda de la IgA (Uniprot #P0CG04) y del terminador Tnos del vector pBIN-YFP/GUS (Orzaez, Mirabel et al. 2006). El módulo está flanqueado por dos sitios de restricción BsmBI, siendo los sitios de corte de tipo  $\gamma$  (GGTC) en el extremo 5' y de tipo B en el extremo 3'.
- d) Precursor Pieza CK.Tnos (SEQ.ID.NO 30): incluye las secuencias de la región constante de la cadena ligera kappa de la IgA (GenBank AAH62704.1) y del terminador Tnos del vector pBIN-YFP/GUS



(Orzaez, Mirabel et al. 2006). El módulo está flanqueado por dos sitios de restricción BsmBI, siendo los sitios de corte de tipo  $\gamma$  (GGTC) en el extremo 5' y de tipo B en el extremo 3'.

e) Precursor Pieza CH $\alpha$ 1.Tnos (SEQ.ID.NO 31): incluye las secuencias de la región constante de la cadena pesada de la IgA (Uniprot #P01876) y del terminador Tnos del vector pBIN-YFP/GUS (Orzaez, Mirabel et al. 2006). El módulo está flanqueado por dos sitios de restricción BsmBI, siendo los sitios de corte de tipo  $\gamma$ ' (GCAT) en el extremo 5' y de tipo B en el extremo 3'.

f) Precursor Pieza CH $\alpha$ 2.Tnos (SEQ.ID.NO 32): incluye las secuencias de la región constante de la cadena pesada de la IgA (Uniprot # P01877) y del terminador Tnos del vector pBIN-YFP/GUS (Orzaez, Mirabel et al. 2006). El módulo está flanqueado por dos sitios de restricción BsmBI, siendo los sitios de corte de tipo  $\gamma$ ' (GCAT) en el extremo 5' y de tipo B en el extremo 3'.

g) Precursor Pieza VL (SEQ.ID.NO 33): región variable de la cadena ligera del scFv\_2A1 (Monedero, Rodríguez-Díaz et al. 2004). El módulo está flanqueado por dos sitios de restricción BsmBI, siendo los sitios de corte de tipo  $\beta$  en el extremo 5' y de tipo  $\gamma$  en el extremo 3'.

h) Precursor Pieza VH (SEQ.ID.NO 34): región variable de la cadena pesada del scFv\_2A1 (Monedero, Rodríguez-Díaz et al. 2004). El módulo está flanqueado por dos sitios de restricción BsmBI, siendo los sitios de corte de tipo  $\beta$  en el extremo 5' y de tipo  $\gamma$ ' en el extremo 3'.

Una vez construidos los plásmidos de entrada de las distintas piezas (pENTR\_PIEZA), se realizan los ensamblajes esquematizados en la figura 8A para generar los siguientes módulos:

1 Los módulos de expresión de las cadenas pesada de la inmunoglobulina A humana (IgH $\alpha$ 1 e IgH $\alpha$ 2) se ensamblaron mediante sendas reacciones Golden Gate con BsmBI y ligasa T4 los plásmidos de entrada pENTR\_35sSP, pENTR\_VH y pENTR\_CH $\alpha$ 1.Tnos ó pENTR\_CH $\alpha$ 2 con el vector de destino pDGB\_S\_1AB3, dando lugar a los vectores de expresión pEGB\_S\_1-IgH $\alpha$ 1-3 (SEQ.ID.NO 35) y pEGB\_S\_1-IgH $\alpha$ 2.-3 (SEQ.ID.NO 36).

2 Los módulos de expresión de las cadenas ligeras de la inmunoglobulina A humana (IgL e Igk) se ensamblaron combinando en un solo tubo, en presencia de BsmBI y ligasa T4 los plásmidos de entrada pENTR\_35sSP, pENTR\_VL y pENTR\_C $\lambda$ .Tnos ó pENTR\_Ck.Tnos con el vector de destino pDGB\_S\_3AB2, dando lugar a los vectores de expresión pEGB\_S\_3-IgL-2 (SEQ.ID.NO 37) y pEGB\_S\_3-Igk-2 (SEQ.ID.NO 38).

3 El módulo de resistencia a kanamicina se ensambló combinando en un solo tubo en presencia de BsaI y ligasa T4 los plásmidos de entrada PENTR\_KanR, PENTR\_Tnos con el vector de destino pDGB\_K\_A12C, dando lugar al vector de pEGB\_S\_A-KanR-C (SEQ.ID.NO 39)

Tras realizar los ensamblajes descritos, se utilizó un microlitro de cada reacción para transformar *E. coli*. Las células transformadas se sembraron en placas de LB con espectinomicina y X-gal. De cada reacción se seleccionaron cuatro colonias de color blanco, se crecieron en medio líquido y se procedió a aislar y analizar el plásmido correspondiente mediante análisis de digestión y posterior secuenciación. Ambos análisis mostraron ensamblajes correctos en al menos tres de las cuatro colonias analizadas para cada reacción.

Seguidamente los cuatro vectores que contienen las cadenas pesadas y ligeras de la IgA se ensamblaron entre sí en las cuatro combinaciones posibles mediante reacciones Golden Gate con BsaI sobre el vector de destino pDGB\_K\_C12B para dar lugar a los vector de expresión pEGB\_K\_C-IgH $\alpha$ 1-IgL-B (SEQ.ID.NO 40), pEGB\_K\_C-IgH $\alpha$ 2-IgL-B (SEQ.ID.NO 41), pEGB\_K\_C-IgH $\alpha$ 1-Igk-B (SEQ.ID.NO 42) y pEGB\_K\_C-IgH $\alpha$ 2-Igk-B (SEQ.ID.NO 43) con los cuales se pueden expresar cuatro isotipos de la IgA\_2A1.

Los cuatro vectores anteriores, una vez comprobados por digestión (se seleccionaron dos colonias en cada caso, resultando las dos correctas –Figura 8B-), se emplearon para transformar células de *Agrobacterium tumefaciens* C58. Se comprobó la integridad del plásmido aislado de *Agrobacterium* mediante análisis de restricción seleccionadas en placas de LB Rifampicina y Spectinomicina. Un clon de *Agrobacterium* que contenía la construcción correcta en cada uno de los casos fue crecido en medio líquido y utilizado para transformar transitoriamente hojas de *Nicotiana benthamiana* (Wieland, Lammers et al. 2006). Tras cinco días de incubación, la presencia de una IgA recombinante correctamente ensamblada se comprobó mediante western blot en condiciones reductoras y no reductoras (Figura 8C) con los anticuerpos adecuados anti IgH, anti IgL y anti Igk. Adicionalmente, se realizaron tests antígeno ELISA con titulado a punto final. Brevemente, los pocillos se tapizaron con antígeno VP8\* recombinante o BSA como control negativo (10 ug/mL). Tras bloquear los pocillos, éstos se incubaron con extracto crudo de plantas transformadas en diluciones seriadas y se lavaron 5 veces con PBS. Posteriormente se incubaron con un anticuerpo secundario anti-IgA (SIGMA) conjugado con peroxidasa y el resultado de la reacción colorimétrica se cuantificó en un espectrofotómetro. Los resultados del ensayo de actividad anti-VP8 de los extractos transgénicos pueden verse en la Figura 8D. Del test antígeno ELISA y del Western Blot se puede concluir que las cuatro construcciones son funcionales si bien la versión IgH $\alpha$ 1-IgL muestra una mejor expresión *in planta*.

Dado que el vector pEGB\_K\_C-IgH $\alpha$ 1-IgL-B puede funcionar como plásmido de entrada por la presencia de los sitios de restricción BsmBI de tipo C y B, los *dispositivos* A-KanR-C y C-IgH $\alpha$ 1-IgL-B se ensamblaron binariamente,

mediante una reacción Golden Gate con BsmBI como enzima de restricción, sobre el vector de destino pDGB\_S\_1AB3 para dar lugar al vector de expresión pEGB\_S\_1-KanR-IgH $\alpha$ 1-Ig $\lambda$ -3 (SEQ.ID.NO 44).

5 Tras el ensamblaje enzimático, se utilizó un microlitro de cada reacción para transformar *E. coli*. Las células transformadas se sembraron en placas de LB con espectinomicina y X-gal. De cada reacción se seleccionaron cuatro colonias de color blanco, se crecieron en medio líquido y se procedió a aislar y analizar el plásmido correspondiente mediante análisis de digestión y posterior secuenciación. Ambos análisis mostraron ensamblajes correctos en al menos tres de las cuatro colonias analizadas para cada reacción. El vector resultante pEGB\_S\_1-KanR-IgH $\alpha$ 1-Ig $\lambda$ -3 está listo para ser transformado establemente en planta.

## REIVINDICACIONES

1. Un plásmido de destino (pDGB) para el ensamblaje *in vitro* de piezas de DNA de doble cadena, **caracterizado porque** comprende un esqueleto de un plásmido de DNA de doble cadena que comprende:
- al menos un origen de replicación,
  - al menos un marcador de selección positiva,
  - al menos un cassette que permite selección negativa,
  - al menos 2 sitios de reconocimiento para una primera enzima de restricción de tipo IIS (E1) que dan lugar cada uno de ellos a un sitio de corte de 4 o más nucleótidos seleccionados entre 1, 2 y 3, siendo 1, 2 y 3 secuencias de cuatro nucleótidos cualesquiera distintas entre sí, y
  - al menos 2 sitios de reconocimiento para una segunda enzima de restricción de tipo IIS (E1) que dan lugar cada uno de ellos a un sitio de corte de 4 o más nucleótidos seleccionados entre A, B y C, siendo A, B y C secuencias de cuatro nucleótidos cualesquiera distintas entre sí de manera que los sitios de corte y reconocimiento citados en (d) y los sitios de corte y reconocimiento citados en (e) flanquean el cassette de selección citado en (c) en sus extremos 5' y 3' con orientaciones invertidas.
2. El plásmido de destino (pDGB) para el ensamblaje *in vitro* de piezas de DNA de doble cadena según la reivindicación 1, **caracterizado porque** las orientaciones invertidas de los sitios de corte y reconocimiento citados en (d) y los sitios de corte y reconocimiento citados en (e) flanqueando el cassette de selección citado en (c) en sus extremos 5' y 3' están seleccionadas entre: A12C, C12B, 1AB3, y 3AB2.
3. El plásmido de destino (pDGB) para el ensamblaje *in vitro* de piezas de DNA de doble cadena según la reivindicación 2, **caracterizado porque** la orientación de los dos sitios de corte y reconocimiento citados en (d) y los dos sitios de corte y reconocimiento citados en (e) es A12C, depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo como CECT 7900.
4. El plásmido de destino (pDGB) para el ensamblaje *in vitro* de piezas de DNA de doble cadena según la reivindicación 2, **caracterizado porque** la orientación de los dos sitios de corte y reconocimiento citados en (d) y los dos sitios de corte y reconocimiento citados en (e) es C12B, depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo como CECT 7899.
5. El plásmido de destino (pDGB) para el ensamblaje *in vitro* de piezas de DNA de doble cadena según la reivindicación 2, **caracterizado porque** la orientación de los dos sitios de corte y reconocimiento citados en (d) y los dos sitios de corte y reconocimiento citados en (e) es 1AB3, depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo como CECT 7902.
6. El plásmido de destino (pDGB) para el ensamblaje *in vitro* de piezas de DNA de doble cadena según la reivindicación 2, **caracterizado porque** la orientación de los dos sitios de corte y reconocimiento citados en (d) y los dos sitios de corte y reconocimiento citados en (e) es 3AB2, depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo como CECT 7901.
7. Un método de ensamblaje *in vitro* de piezas de DNA de doble cadena **caracterizado porque** comprende un bucle de ensamblaje indefinido que alterna el nivel  $\alpha$  y el nivel  $\Omega$  de ensamblaje binario quasi-idempotentes, donde el nivel  $\alpha$  comprende las siguientes etapas:
- construcción de los plásmidos de entrada (pE) de nivel  $\alpha$ , cada plásmido de entrada (pE) de nivel  $\alpha$  comprende una pieza de DNA de doble cadena seleccionada entre  $(X_i)$  y/o  $(X_j)$ , flanqueada en sus extremos 5' y 3' por sendos sitios de corte y reconocimiento seleccionados entre 1, 2 y 3, para una primera enzima de restricción de tipo IIS (E1):  
pE [1  $(X_i)$  3] y pE [3  $(X_j)$  2]
  - construcción de los plásmidos de destino (pDGB) de nivel  $\alpha$  definidos en las reivindicaciones 3 y 4:  
pDGB (A12C) (CECT 7900) y pDGB (C12B) (CECT 7899)
  - digestión enzimática de los plásmidos de entrada obtenidos en i) y los plásmidos de destino obtenidos en ii) en presencia de E1, generando en sus extremos 3' y 5' secuencias terminales de cadena sencilla de DNA de al menos 3 nucleótidos,
  - ligación con ligasa T4 entre las secuencias terminales de cadena sencilla de los plásmidos de entrada y de destino digeridos en iii) formando los plásmidos ensamblados de nivel  $\alpha$  de DNA de doble cadena circular cerrado:  
pE [1  $(X_i)$  3] + pE [3  $(X_j)$  2] + pDGB (A12C) (CECT 7900) = pE [A  $(X_i+X_j)$  C]

$pE [1 (X_i) 3] + pE [3 (X_j) 2] + pDGB (C12B) (CECT 7899) = pE [C (X_i+X_j) B];$

y donde el nivel  $\Omega$  comprende las siguientes etapas:

- 5 v) construcción de los plásmidos de entrada (pE) de nivel  $\Omega$  cada plásmido de entrada (pE) de nivel  $\Omega$  comprende una pieza de DNA de doble cadena seleccionada entre  $(X_i)$  y/o  $(X_j)$ , flanqueada en sus extremos 5' y 3' por sendos sitios de corte y reconocimiento seleccionados entre A, B y C, para una segunda enzima de restricción de tipo IIS (E2):

$pE [A (X_i) C]$  y  $pE [C (X_j) B]$

vi) construcción de los plásmidos de destino (pDGB) de nivel  $\Omega$  definidos en las reivindicaciones 5 y 6:

$pDGB (1AB3) (CECT 7902)$  y  $pDGB (3AB2) (CECT 7901)$

- 10 vii) digestión enzimática de los plásmidos de entrada obtenidos en v) y los plásmidos de destino obtenidos en vi) en presencia de E2, generando en sus extremos 3' y 5' secuencias terminales de cadena sencilla de DNA de al menos 3 nucleótidos,

viii) ligación con ligasa T4 entre las secuencias terminales de cadena sencilla de los plásmidos de entrada y de destino digeridos en vii) formando los plásmidos ensamblados de nivel A de DNA de doble cadena circular cerrado:

- 15  $pE [A (X_i) C] + pE [C (X_j) B] + pDGB (1AB3) (CECT 7902) = pE [1 (X_i+X_j) 3]$

$pE [A (X_i) C] + pE [C (X_j) B] + pDGB (3AB2) (CECT 7901) = pE [3 (X_i+X_j) 2];$

cuando el método de ensamblaje se inicia en el nivel  $\alpha$  y continua con el nivel  $\Omega$ , los plásmidos de entrada de nivel A  $pE [A (X_i) C]$  y  $pE [C (X_j) B]$  definidos en v) son sustituidos por los plásmidos ensamblados de nivel 1  $pE [A (X_i+X_j) C]$  y  $pE [C (X_i+X_j) B]$  obtenidos en iv); y

- 20 cuando el método de ensamblaje se inicia en el nivel  $\Omega$  y continua con el nivel  $\alpha$ , los plásmidos de entrada de nivel  $\alpha$   $pE [1 (X_i) 3]$  y  $pE [3 (X_j) 2]$  definidos en i) son sustituidos por los plásmidos ensamblados de nivel  $\Omega$   $pE [1 (X_i+X_j) 3]$  y  $pE [3 (X_i+X_j) 2]$  obtenidos en viii).

8. El método de ensamblaje *in vitro* de piezas de DNA de doble cadena según la reivindicación 7 **caracterizado porque**  $(X_i)$  y/o  $(X_j)$  se selecciona entre un promotor, una secuencia de localización subcelular, una secuencia codificante, una copia de DNA de secuencia de RNA interferente, y una secuencia de terminación, un casete de expresión de proteínas, enzimas, factores de transcripción, marcadores, anticuerpos, proteínas reguladoras, o un casete de expresión de RNAs funcionales o elementos estructurales de cromatina.
- 25

9. El método de ensamblaje *in vitro* de piezas de DNA de doble cadena según la reivindicación 7 **caracterizado porque** los plásmidos de destino (pDGB) son plásmidos binarios para la transformación genética de plantas mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.
- 30

10. El método de ensamblaje *in vitro* de piezas de DNA de doble cadena según la reivindicación 7 **caracterizado porque**  $(X_i+X_j)$  está formado por un gen de kanamicina, un gen que codifica para la cadena ligera de un anticuerpo y un gen que codifica para la cadena pesada de un anticuerpo.

11. El método de ensamblaje *in vitro* de piezas de DNA de doble cadena según la reivindicación 7 **caracterizado porque**  $(X_i+X_j)$  está formado por cuatro casetes de expresión constitutiva de tres genes que codifican tres proteínas fluorescentes y un cuarto gen que codifica la proteína p19.
- 35

12. Una planta transformada mediante *Agrobacterium tumefaciens* mediante el método de ensamblaje descrito en la reivindicación 11 y **caracterizada porque** dicha planta expresa un anticuerpo recombinante de tipo IgA.

13. Una planta transformada transitoriamente mediante *Agrobacterium tumefaciens* mediante el método de ensamblaje descrito en la reivindicación 12 y **caracterizada porque** dicha planta expresa simultáneamente las citadas tres proteínas fluorescentes.
- 40

FIGURA 1

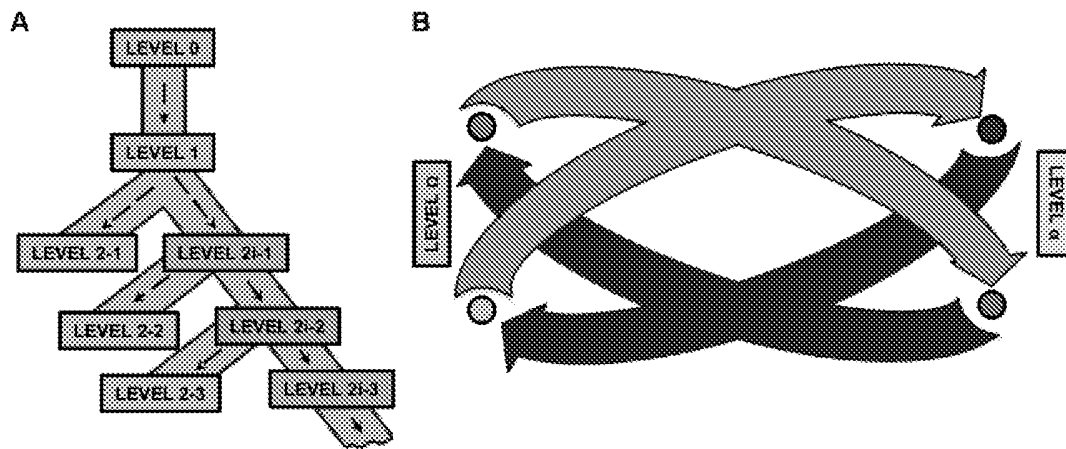


FIGURA 2

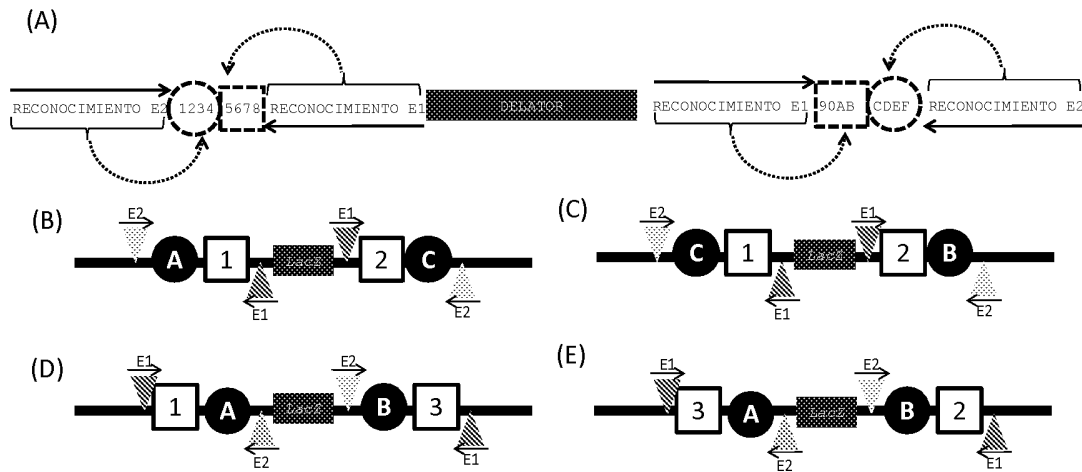


FIGURA 3

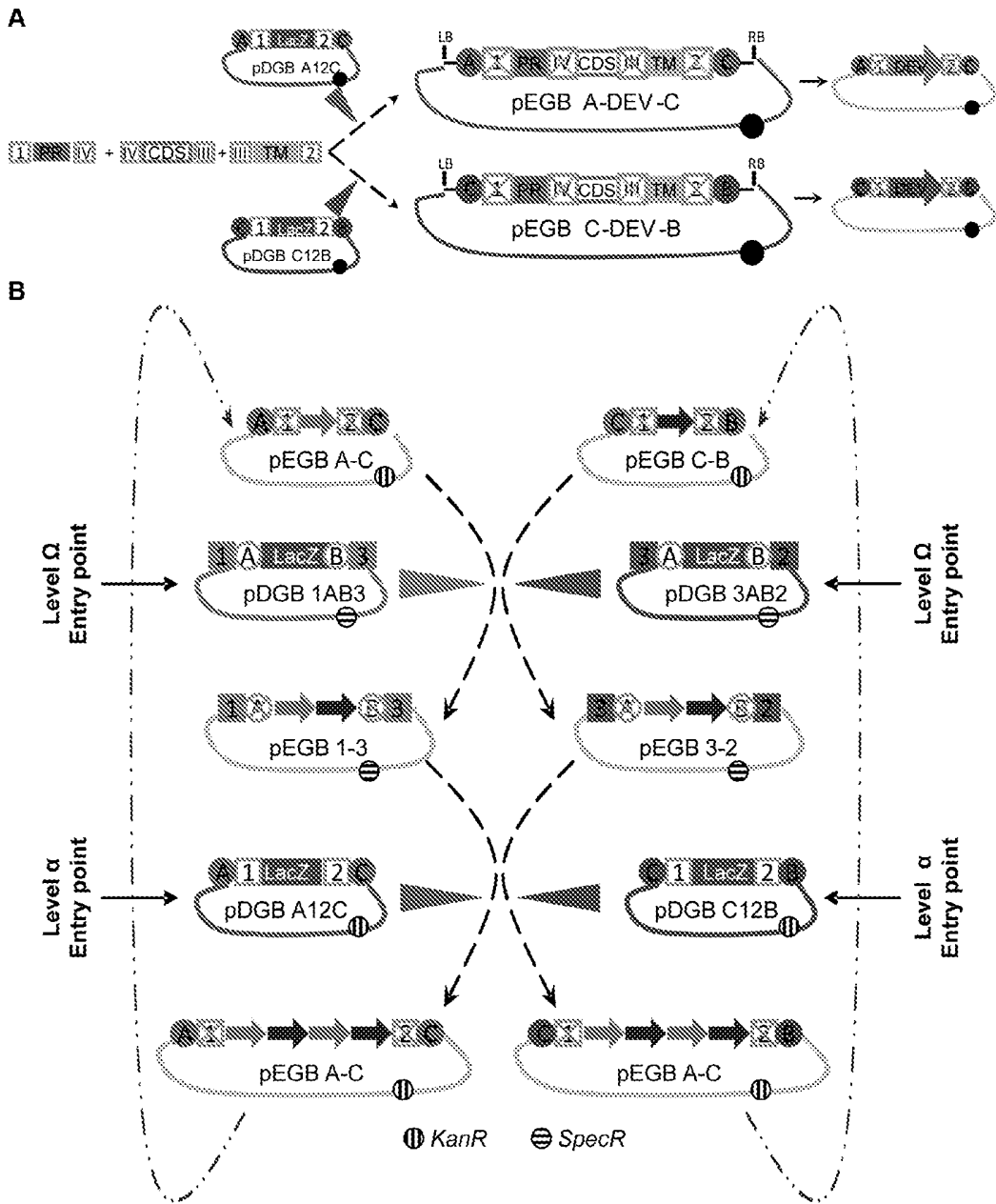


FIGURA 4

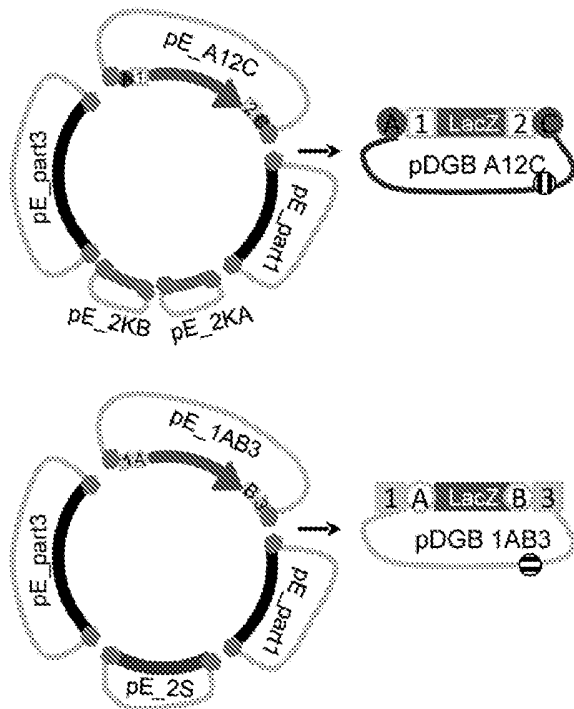
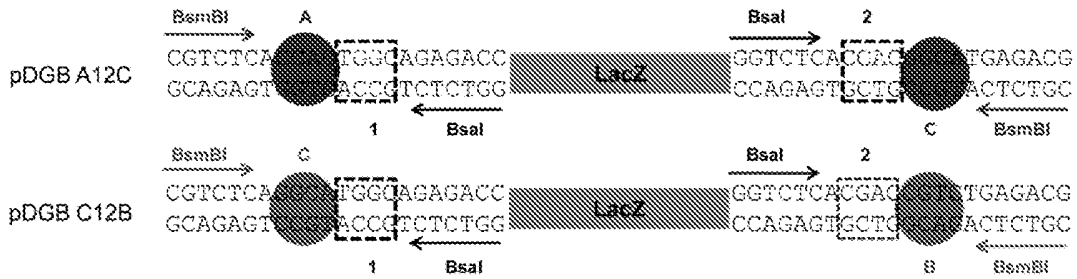


FIGURA 5

LEVEL  $\alpha$  PLASMIDS



LEVEL  $\Omega$  PLASMIDS

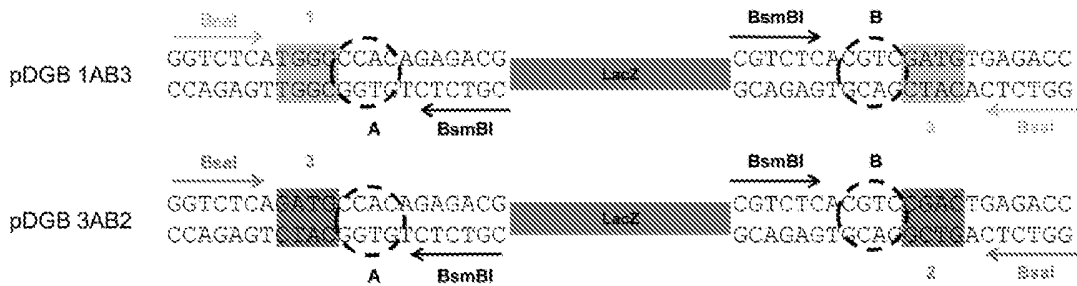


FIGURA 6

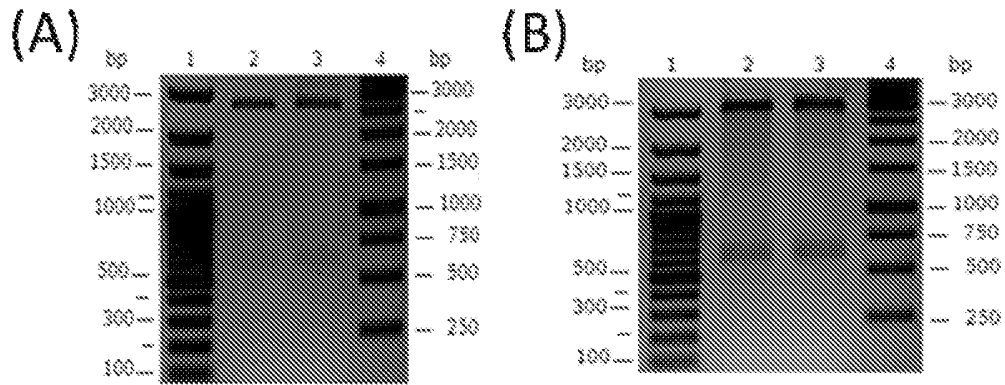


FIGURA 7

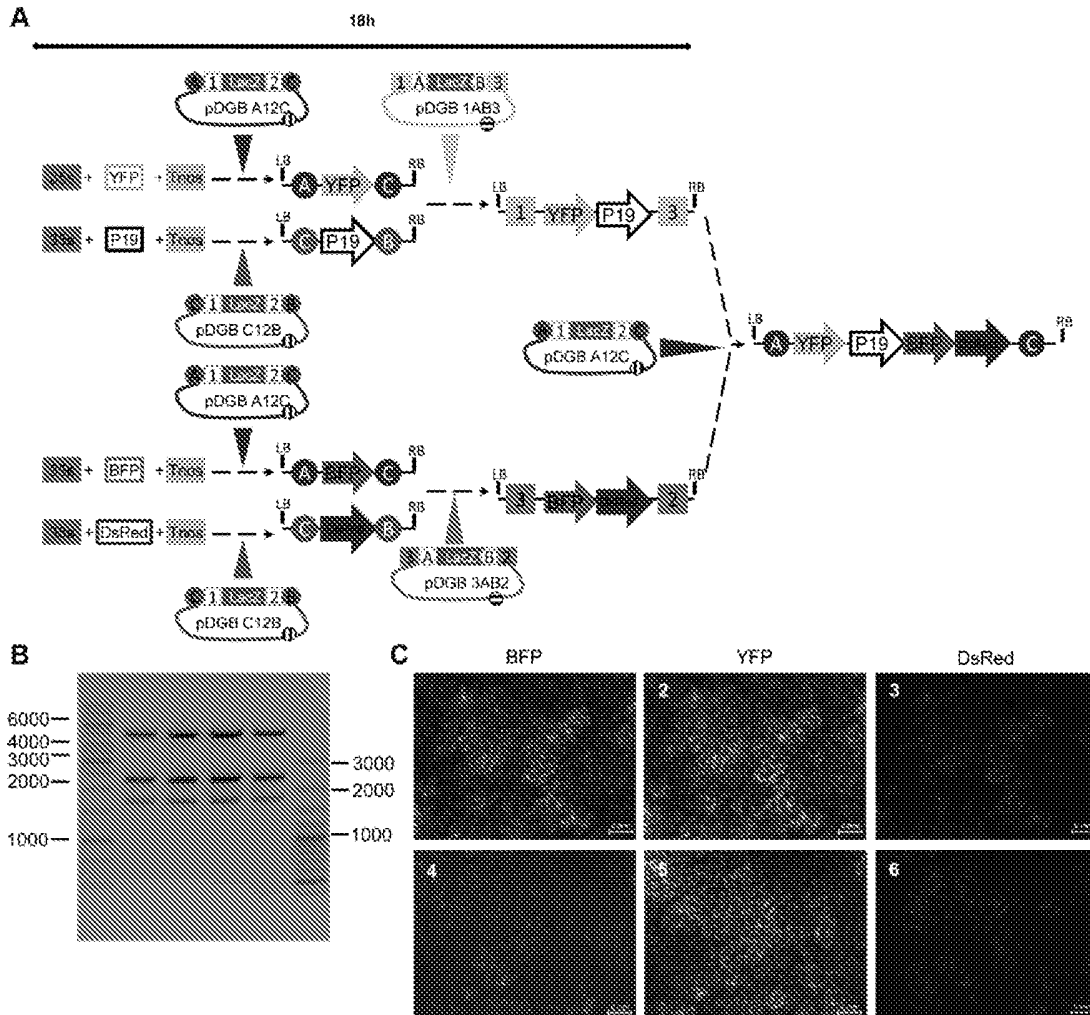
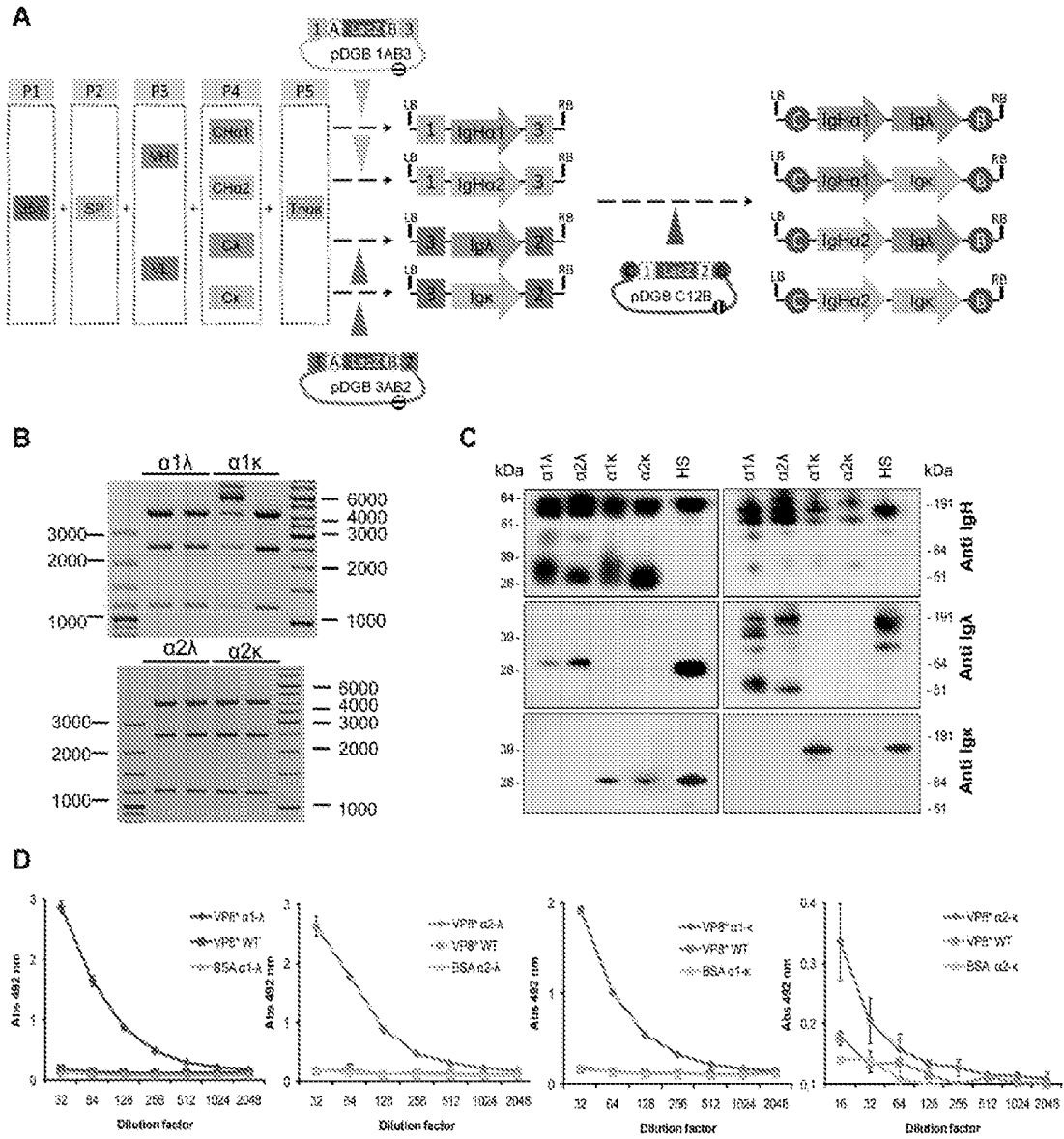




FIGURA 8



# ES 2 389 792 A1

## Listado de secuencias

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS Y UNIVERSIDAD  
POLITECNICA DE VALENCIA

<120> SISTEMA PARA ENSAMBLADO DE PIEZAS GENETICAS

<130> SISTEMA PARA ENSAMBLADO DE PIEZAS GENETICAS

<160> 44

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 890

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Nucleotidos 1296-2169 del esqueleto del plasmido pGreenII

<400> 1

gaagacaatg acaggatata ttggcgggta aactaagtcg ctgtatgtgt ttgtttgaga  
60

tctcatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc  
120

gtttttccat aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtcagag  
180

gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt cccctggaa gtcacctcgt  
240

gcgctctcct gttccgacc tgcgcttac cggatacctg tccgccttc tcccttcggg  
300

aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg aggtcgttcg  
360

ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg cttatccgg  
420

taactatcgt cttgagtcca acccggttaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac  
480

tggtaacagg attagcagag cgaggatgt aggcgggtgct acagagttct tgaagtggg  
540

gcctaactac ggctacaacta gaagaacagt atttgggtatc tgcgctctgc tgaagccagt  
600

taccttcgga agaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaacaccg ctggtagcgg  
660

tggttttttt gtttgcaagc agcagattac ggcgagaaaa aaaggatctc aagaagatcc  
720

tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacggt aagggatctt  
780

ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaa aatgaagttt  
840

taaatcaatc taaagtatat atgtgtaaca ttggtctagt gattgtcttc  
890

## ES 2 389 792 A1

<210> 2  
<211> 393  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Nucleotidos 2166-2542 del esqueleto del plasmido pGreenII.  
Incluye una mutacion A>T en el nucleotido 2542

<400> 2  
gaagacaagt gattagaaaa actcatcgag catcaaatga aactgcaatt tattcatatc  
60  
aggattatca ataccatatt ttggaaaaag ccgtttctgt aatgaaggag aaaactcacc  
120  
gaggcagttc cataggatgg caagatcctg gtatcgggtct gcgattccga ctcgccaac  
180  
atcaatacaa cctattaatt tcccctcgtc aaaaataagg ttatcaagtg agaaatcacc  
240  
atgagtgacg actgaatccg gtgagaatgg caaaagtta tgcatttctt tccagacttg  
300  
ttcaacaggc cagccattac gctcgtcatc aaaatcactc gcatcaacca aaccgttatt  
360  
cattcgtgat tgcgcctgag cgagtttgtc ttc  
393

<210> 3  
<211> 467  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Nucleotidos 2539-2989 del esqueleto del plasmido pGreenII.  
Incluye una mutacion A>T en el nucleotido 2542

<400> 3  
gaagacaaga gtcgaaatac gcgatcgctg ttaaaggac aattacaaac aggaatcgaa  
60  
tgcaaccggc gcaggaacac tgccagcgca tcaacaatat tttcacctga atcaggatat  
120  
tcttctaata cctggaatgc tgttttccct gggatcgag tggtagtaa ccatgcatca  
180  
tcaggagtac ggataaaatg cttgatggtc ggaagaggca taaattccgt cagccagttt  
240  
agtctgacca tctcatctgt aacaacattg gcaacgctac ctttgccatg tttcagaaac  
300  
aactctggcg catcgggctt ccatacaat cggtagattg tcgcacctga ttgcccgaca  
360  
ttatcgcgag cccatttata cccatataaa tcagcatcca tgttgaatt taatcgcggc  
420  
cttgagcaag acgtttcccg ttgaatatgg ctcataacat tgtcttc

# ES 2 389 792 A1

467

<210> 4  
<211> 1169  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Nucleotidos 248-1392 del esqueleto del plasmido pCR8.  
Resistencia  
Espectinomicina

<400> 4  
gaagacaatg ttccagccag gacagaaatg cctcgacttc gctgctgcc aaggttgccg  
60  
ggtgacgcac accgtggaaa cggatgaagg cacgaaccca gtggacataa gcctgttcgg  
120  
ttcgtaagct gtaatgcaag tagcgtatgc gctcacgcaa ctggtccaga accttgaccg  
180  
aacgcagcgg tggtaacggc gcagtggcgg ttttcatggc ttggtatgac tgtttttttg  
240  
gggtacagtc tatgcctcgg gcatccaagc agcaagcggc ttacgccgtg ggtcgatgtt  
300  
tgatgttatg gagcagcaac gatgttacgc agcagggcag tcgccctaaa acaaagtaa  
360  
acatcatgag ggaagcgggt atgccgaag tatcgactca actatcagag gtagttggcg  
420  
tcacgcagcg ccacctcga cgcagcgttc tggccgtaca tttgtacggc tccgcagtg  
480  
atggcggcct gaagccacac agtgatattg atttgctggc tacggtgacc gtaaggcttg  
540  
atgaaacaac gggcgagct ttgatcaacg accttttggg aacttcggct tcccctggag  
600  
agagcgagat tctccgcgct gtagaagtca ccattggtgt gcacgacgac atcattccgt  
660  
ggcgttatcc agctaagcgc gaactgcaat ttggagaatg gcagcgcaat gacattcttg  
720  
caggtatctt cgagccagcc acgatcgaca ttgatctggc tatcttgctg acaaaagcaa  
780  
gagaacatag cgttgccttg gtaggtccag cggcggagga actctttgat ccggttcctg  
840  
aacaggatct atttgaggcg ctaaagaaa ccttaacgct atggaactcg ccgcccgact  
900  
gggctggcga tgagcgaat gtagtgctta cgttgtcccg catttggtac agcgcagtaa  
960  
ccggcaaaaat cgcgccgaag gatgtcgtg cgcactgggc aatggagcgc ctgcccggcc  
1020  
agtatcagcc cgtcactt gaagctagac aggotatct tggacaagaa gaagatcgt

ES 2 389 792 A1

1080

tggcctcgcg cgcagatcag ttggaagaat ttgtccacta cgtgaaaggc gagatcacca  
1140

aggtagtcgg caaataatca cttgtcttc  
1169

<210> 5

<211> 900

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Nucleotidos 2986-565 del esqueleto del plasmido pGreenII

<400> 5

gaagacaaaa cacccttgt attactgttt atgtaagcag acagttttat tgttcatgat  
60

gatatatttt tatcttgtgc aatgtaacat cagagatttt gagacacaac gtggctttgt  
120

tgaataaatc gaacttttgc tgagttgaag gatcagatca cgcactctcc cgacaacgca  
180

gaccgttcog tggcaaagca aaagttcaaa atcaccaact ggtccaccta caacaaagct  
240

ctcatcaacc gtggctccct cactttctgg ctggatgatg gggcgattca ggcgatcccc  
300

atccaacagc ccgccgtcga gcgggctttt ttatccccgg aagcctgtgg atagagggta  
360

gttatccacg tgaaacccgt aatgccccgc aaagccttga ttcaocggggc tttccggccc  
420

gtcccaaaaa ctatccacgt gaaatcgcta atcaggggtac gtgaaatcgc taatcggagt  
480

acgtgaaatc gctaataagg tcacgtgaaa tcgctaataca aaaaggcacg tgagaacgct  
540

aatagccctt tcagatcaac agcttgcaaa caccctcgc tccggcaagt agttacagca  
600

agtagtatgt tcaattagct tttcaattat gaatatatat atcaattatt ggtcgcctt  
660

ggcttgtgga caatgcgcta cgcgcaccgg ctccgcccgt ggacaaccgc aagcggttgc  
720

ccaccgtcga gcgccagcgc ctttgcccac aaccggcgg ccggccgcaa cagatcgttt  
780

tataaatatt tttttttgaa aaagaaaaag cccgaaaggc ggcaacctct cgggcttctg  
840

gatttccgat ccccggaatt agagatcttg gcaggatata ttgtggtgta acttgccttc  
900

<210> 6

<211> 623

## ES 2 389 792 A1

<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Precursor pieza LacZ A12C

<400> 6  
gacgtctcac cactggcaga gacccacagc ttgtctgtaa gcggatgccg ggagcagaca  
60  
agcccgtcag ggcgcgtcag cgggtggttg cgggtgtcgg ggctggctta actatgcggc  
120  
atcagagcag attgtactga gagtgcacca tatgcgggtgt gaaataccgc acagatgcgt  
180  
aaggagaaaa taccgcatca ggcgccattc gccattcagg ctgcgcaact gttgggaagg  
240  
gcgatcggtg cgggcctctt cgctattacg ccagctggcg aaaggggat gtgctgcaag  
300  
gcgattaagt tgggtaacgc cagggttttc ccagtcacga cgttgtaaaa cgacggccag  
360  
tgaattcgag ctcggtagcc ggggatcctc tagagtogac ctgcaggcat gcaagcttgg  
420  
cgtaatcatg gtcatactg tttcctgtgt gaaattgta tccgctcaca attccacaca  
480  
acatacgagc cggaagcata aagtgtaaag cctgggggtgc ctaatgagtg agctaactca  
540  
cattaattgc gttgcgctca ctgcccgtt tccagtcggg aaacctgtcg tgccagctgg  
600  
gtctctcgac ggcatgagac gtc  
623

<210> 7  
<211> 623  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Precursor pieza LacZ C12B

<400> 7  
gacgtctcag gcatggcaga gacccacagc ttgtctgtaa gcggatgccg ggagcagaca  
60  
agcccgtcag ggcgcgtcag cgggtggttg cgggtgtcgg ggctggctta actatgcggc  
120  
atcagagcag attgtactga gagtgcacca tatgcgggtgt gaaataccgc acagatgcgt  
180  
aaggagaaaa taccgcatca ggcgccattc gccattcagg ctgcgcaact gttgggaagg  
240  
gcgatcggtg cgggcctctt cgctattacg ccagctggcg aaaggggat gtgctgcaag  
300  
gcgattaagt tgggtaacgc cagggttttc ccagtcacga cgttgtaaaa cgacggccag

# ES 2 389 792 A1

360

tgaattcgag ctcggtaccc ggggatcctc tagagtcgac ctgcaggcat gcaagcttgg  
420

cgtaatcatg gtcatagctg tttcctgtgt gaaattgtta tccgctcaca attccacaca  
480

acatacgagc cggaagcata aagtgtaaag cctgggggtgc ctaatgagtg agctaactca  
540

cattaattgc gttgcgctca ctgcccgtt tccagtcggg aaacctgtcg tgccagctgg  
600

gtctctcgac cgtctgagac gtc  
623

<210> 8

<211> 643

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Precursor pieza LacZ 1AB3

<400> 8

gaagacaata acggctctctt ggcccactga gacgcacagc ttgtctgtaa gcggatgccg  
60

ggagcagaca agcccgtcag ggcgcgtcag cgggtgttgg cgggtgtcgg ggctggctta  
120

actatgcggc atcagagcag attgtactga gagtgcacca tatgcgggtgt gaaataccgc  
180

acagatgcgt aaggagaaaa taccgcatca ggcgccattc gccattcagg ctgcgcaact  
240

gttgggaagg gcgatcggtg cgggcctctt cgctattacg ccagctggcg aaaggggat  
300

gtgctgcaag gcgattaagt tgggtaacgc cagggttttc ccagtcacga cgttgtaaaa  
360

cgacggccag tgaattcgag ctcggtaccc ggggatcctc tagagtcgac ctgcaggcat  
420

gcaagcttgg cgtaatcatg gtcatagctg tttcctgtgt gaaattgtta tccgctcaca  
480

attccacaca acatacgagc cggaagcata aagtgtaaag cctgggggtgc ctaatgagtg  
540

agctaactca cattaattgc gttgcgctca ctgcccgtt tccagtcggg aaacctgtcg  
600

tgccagctgc gtctcagtag gatgagagac ctgacttgtc ttc  
643

<210> 9

<211> 649

<212> DNA

<213> Artificial sequence

## ES 2 389 792 A1

<220>

<223> Precursor pieza LacZ 3AB2

<400> 9

gaagacaata acggtctctg atgccactga gacgcacagc ttgtctgtaa gcggatgccg  
60

ggagcagaca agcccgtcag ggcgcgtcag cgggtgttgg cgggtgtcgg ggctggctta  
120

actatgcggc atcagagcag attgtactga gagtgcacca tatgcgggtg gaaataccgc  
180

acagatgcgt aaggagaaaa taccgcatca ggcgccattc gccattcagg ctgcgcaact  
240

gttgggaagg gcgatcggtg cgggcctctt cgctattacg ccagctggcg aaagggggat  
300

gtgctgcaag gcgattaagt tgggtaacgc cagggttttc ccagtcacga cgttgtaaaa  
360

cgacggccag tgaattggag cttggtaccc gtggatcttc tagtgtcgat ctgcacgcat  
420

gtaagctggg cgtaatcatg gtcatagctg tttcctgtgt gaaattgtta tccgctcaca  
480

attccacaca acatacgagc cgggaagcata aagtgtaaag cctgggggtgc ctaatgagtg  
540

agctaactca cattaattgc gttgcgctca ctgcccgtt tccagtcggg aaacctgtcg  
600

tgccagctgc agctgcgtct cacgtccgac agagacctga cttgtcttc  
649

<210> 10

<211> 3194

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Plasmido de destino Golden Braid con casete LacZ A12C y  
resistencia a kanamicina

<400> 10

taaccgtctc accactggca gagaccaca gcttgtctgt aagcggatgc cgggagcaga  
60

caagcccgtc agggcgcgtc agcgggtgtt ggcgggtgtc ggggctggct taactatgcg  
120

gcatcagagc agattgtact gagagtgcac catatgcggg gtgaaatacc gcacagatgc  
180

gtaaggagaa aataccgcat caggcgccat tcgccattca ggctgcgcaa ctgttgggaa  
240

ggcgatcgg tcggggcctc ttcgctatta cgccagctgg cgaaggggg atgtgctgca  
300

aggcgattaa gttgggtaac gccagggtt tcccagtcac gacgttgtaa aacgacggcc  
360



# ES 2 389 792 A1

agtgaattcg agctcggtag ccggggatcc tctagagtcg acctgcaggc atgcaagctt  
420

ggcgtaatca tggatcatagc tgtttcctgt gtgaaattgt tatccgctca caattccaca  
480

caacatacga gccggaagca taaagtgtaa agcctggggg gcctaagtag tgagctaact  
540

cacattaatt gcggtgcgct cactgcccgc tttccagtcg ggaaacctgt cgtgccagct  
600

ggggctcttc gacggcatga gacgtgacag gatataattgg cgggtaaaact aagtcgctgt  
660

atgtgtttgt ttgagatctc atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa  
720

aggccgcggt gctggcggtt ttccataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc  
780

gacgctcaag tcagaggtgg cgaaaccgca caggactata aagataccag gcgtttcccc  
840

ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg  
900

cctttctccc ttcgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt  
960

cggtgtaggt cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga accccccggt cagccccgacc  
1020

gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc  
1080

cactggcagc agccactggt aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag  
1140

agttcttgaa gtgggtggcct aactacggct aactagaag aacagtattt ggtatctcgc  
1200

ctctgctgaa gccagttacc ttcggaagaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaaaaa  
1260

ccaccgctgg tagcgggtgt tttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag  
1320

gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cggggctctga cgctcagtg aacgaaaact  
1380

cacgttaagg gattttggtc atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa  
1440

attaaaaatg aagttttaaa tcaatctaaa gtatatatgt gtaacattgg tctagtgatt  
1500

agaaaaactc atcgagcatc aatgaaact gcaatttatt catatcagga ttatcaatac  
1560

catatttttg aaaaagccgt ttctgtaatg aaggagaaaa ctaccgagg cagttccata  
1620

ggatggcaag atcctggtat oggtctgcga ttccgactcg tccaacatca atacaacct  
1680

ES 2 389 792 A1

ttaatttccc ctctgcaaaa ataaggttat caagtgagaa atcaccatga gtgacgactg  
1740

aatccggtga gaatggcaaa agtttatgca tttctttcca gacttgttca acaggccagc  
1800

cattacgctc gtcatacaaaa tcaactcgcat caaccaaacc gttattcatt cgtgattgcg  
1860

cctgagcgag tcgaaatagc cgatcgctgt taaaaggaca attacaaaca ggaatcgaat  
1920

gcaaccggcg caggaacact gccagcgcat caacaatatt ttcacctgaa tcaggatatt  
1980

cttctaatac ctggaatgct gttttccctg ggatcgcagt ggtgagtaac catgcatcat  
2040

caggagtaag gataaaatgc ttgatggctg gaagaggcat aaattccgtc agccagttta  
2100

gtctgaccat ctcatctgta acaacattgg caacgctacc tttgccatgt ttcagaaaaca  
2160

actctggcgc atcgggcttc ccatacaatc ggtagattgt cgcacctgat tgcccagacat  
2220

tatcgcgagc ccatttatac ccataataat cagcatccat gttggaattt aatcgcggcc  
2280

ttgagcaaga cgtttcccgt tgaatatggc tcataacacc ccttgattta ctgtttatgt  
2340

aagcagacag ttttattggt catgatgata tatttttata ttgtgcaatg taacatcaga  
2400

gattttgaga cacacgtgg ctttggtgaa taaatcgaac ttttgctgag ttgaaggatc  
2460

agatcacgca tcttcccagc aacgcagacc gttccgtggc aaagcaaaag ttcaaaatca  
2520

ccaactggtc cacctacaac aaagctctca tcaaccgtgg ctccctcact ttctggctgg  
2580

atgatggggc gattcaggcg atccccatcc aacagcccgc cgtcagagcg gcttttttat  
2640

ccccggaagc ctgtggatag agggtagtta tccacgtgaa accgctaata ccccgcaaag  
2700

ccttgattca cggggctttc cggcccgcctc caaaaactat ccacgtgaaa tcgctaataca  
2760

gggtacgtga aatcgctaata cggagtagct gaaatcgcta ataaggtcac gtgaaatcgc  
2820

taatcaaaaa ggcacgtgag aacgctaata gccctttcag atcaacagct tgcaaacacc  
2880

cctcgcctcg gcaagtagtt acagcaagta gtatgttcaa ttagcttttc aattatgaat  
2940

atatatatca attattggct gcccttggct tgtggacaat gcgctacgcg caccggctcc  
3000

## ES 2 389 792 A1

gcccgtggac aaccgcaagc ggttgcccac cgtcgagcgc cagcgccttt gccacaacc  
3060

cggcggccgg ccgcaacaga tcgttttata aatTTTTTTT tttgaaaaag aaaaagcccg  
3120

aaaggcggca acctctcggg cttctggatt tccgatcccc ggaattagag atcttggcag  
3180

gatatattgt ggtg  
3194

<210> 11

<211> 3193

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Plasmido de destino Golden Braid con casete LacZ C12B y  
resistencia a kanamicina

<400> 11

tgacaggata tattggcggg taaactaagt cgctgtatgt gtttgtttga gatctcatgt  
60

gagcaaaaagg ccagcaaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc  
120

ataggctccg cccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa  
180

acccgacagg actataaaga taccaggcgt ttccccctgg aagctccctc gtgcgctctc  
240

ctgttccgac cctgccgctt accggatacc tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg  
300

cgctttctca tagctcacgc tgtaggatc tcagttcggg gtaggtcgtt cgctccaagc  
360

tgggctgtgt gcacgaacc cccgttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc  
420

gtcttgagtc caaccggta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggttaaca  
480

ggattagcag agcaggtat gtaggcggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact  
540

acggctacac tagaagaaca gtatttggtg tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg  
600

gaagaagagt tggtagctct tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc ggtggTTTTT  
660

ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct  
720

tttctacggg gtctgacgct cagtggaacg aaaactcacg ttaagggatt ttggtcatga  
780

gattatcaaa aaggatcttc acctagatcc ttttaaatta aaaatgaagt tttaaatcaa  
840

tctaaagtat atatgtgtaa cattggctca gtgattagaa aaactcatcg agcatcaaat

ES 2 389 792 A1

900

gaaactgcaa tttattcata tcaggattat caataccata tttttgaaaa agccgtttct  
960

gtaatgaagg agaaaaactca ccgagggcagt tccataggat ggcaagatcc tggtatcggg  
1020

ctgcgattcc gactcgtcca acatcaatac aacctattaa tttcccctcg tcaaaaataa  
1080

ggttatcaag tgagaaatca ccatgagtga cgactgaatc cggtgagaat ggcaaaagtt  
1140

tatgcatttc tttccagact tgttcaacag gccagccatt acgctcgtca tcaaaatcac  
1200

tgcgatcaac caaacggta ttcattcgtg attgcgctg agcgagtoga aatcgcgat  
1260

cgctgttaaa aggacaatta caaacaggaa tcgaatgcaa ccggcgcagg aacctgcca  
1320

gcgcatcaac aatattttca cctgaatcag gatattcttc taatacctgg aatgctgttt  
1380

tcctgggat cgcagtggtg agtaaccatg catcatcagg agtacggata aaatgcttga  
1440

tggtcggaag aggcataaat tccgtcagcc agtttagtct gaccatctca tctgtaacaa  
1500

cattggcaac gctacctttg ccatgtttca gaaacaactc tggcgcacg ggcttcccat  
1560

acaatcggta gattgtcgca cctgattgcc cgacattatc gcgagcccat ttatacccat  
1620

ataaatcagc atccatggtg gaatttaatc gcggccttga gcaagacggt tcccgttgaa  
1680

tatggctcat aacaccctt gtattactgt ttatgtaagc agacagtttt attgttcatg  
1740

atgatatatt tttatcttgt gcaatgtaac atcagagatt ttgagacaca acgtggcttt  
1800

gttgaataaa tcgaactttt gctgagttga aggatcagat cacgcatctt cccgacaacg  
1860

cagaccgttc cgtggcaaag caaaagttca aaatcaccaa ctggtccacc tacaacaaag  
1920

ctctcatcaa ccgtggctcc ctcactttct ggctggatga tggggcgatt caggcgatcc  
1980

ccatccaaca gcccgcgctc gagcgggctt ttttatcccc ggaagcctgt ggatagaggg  
2040

tagttatcca cgtgaaaccg ctaatgcccc gcaaagcctt gattcacggg gctttccggc  
2100

ccgtccaaa aactatccac gtgaaatcgc taatcagggg acgtgaaatc gctaactcga  
2160

gtacgtgaaa tcgctaataa ggtcacgtga aatcgctaat caaaaaggca cgtgagaacg

# ES 2 389 792 A1

2220

ctaatagcc tttcagatca acagcttgca aacaccocctc gctccggcaa gtagttacag  
2280

caagtagtat gttcaattag cttttcaatt atgaatatat atatcaatta ttggctgccc  
2340

ttggcttggtg gacaatgcgc tacgcgcacc ggctccgccc gtggacaacc gcaagcggtt  
2400

gccaccgctc gagcgccagc gcctttgccc acaaccgggc ggccggccgc aacagatcgt  
2460

tttataaatt tttttttttg aaaaagaaaa agcccgaag ggggcaacct ctcgggcttc  
2520

tggatttccg atccccggaa ttagagatct tggcaggata tattgtgggtg taaccgtctc  
2580

aggcatggca gagaccaca gcttgtctgt aagcggatgc cgggagcaga caagccgctc  
2640

agggcgctc agcgggtgtt ggcggtgtc ggggtggct taactatgcg gcatcagagc  
2700

agattgtact gagagtgcac catatgcggt gtgaaatacc gcacagatgc gtaaggagaa  
2760

aataccgat caggcgccat tcgccattca ggctgcgcaa ctgttgggaa gggcgatcgg  
2820

tgcgggcctc ttcgctatta cgccagctgg cgaaaggggg atgtgctgca aggcgattaa  
2880

gttgggtaac gccagggtt toccagtcac gacgttgtaa aacgacggcc agtgaattcg  
2940

agctcggtac ccggggatcc tctagagtgc acctgcaggc atgcaagctt ggcgtaatca  
3000

tggatcatagc tgtttcctgt gtgaaattgt tatccgctca caattccaca caacatacga  
3060

gccggaagca taaagtgtaa agcctgggggt gcctaatagag tgagctaact cacattaatt  
3120

gcgttgctc cactgcccgc tttccagctg ggaaacctgt cgtgccagct ggtctctctg  
3180

accgtctgag acg  
3193

<210> 12

<211> 3523

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Plasmido de destino Golden Braid con casete LacZ 1AB3 y  
resistencia a espectinomicina

<400> 12

taacggctctc ttggcccact gagacgcaca gcttgtctgt aagcggatgc cgggagcaga  
60

ES 2 389 792 A1

caagcccgtc agggcgcgtc agcgggtggt ggcgggtgtc ggggctggct taactatgcg  
120

gcatcagagc agattgtact gagagtgcac catatgcggt gtgaaatacc gcacagatgc  
180

gtaaggagaa aataccgcat caggcgccat togccattca ggctgcgcaa ctgttgggaa  
240

ggcgatcggg tgcgggcctc ttcgctatta cgccagctgg cgaaaggggg atgtgctgca  
300

aggcgattaa gttgggtaac gccagggttt tcccagtcac gacgttgtaa aacgacggcc  
360

agtgaattcg agctcggtag ccggggatcc tctagagtcg acctgcaggc atgcaagctt  
420

ggcgtaatca tggatcatagc tgtttcctgt gtgaaattgt tatccgctca caattccaca  
480

caacatacga gccggaagca taaagtgtaa agcctggggg gcctaatagag tgagctaact  
540

cacattaatt gcggttcgct cactgcccgc tttccagtcg ggaaaacctgt cgtgccagct  
600

gcgtctcacg tcgatgagag acctgacagg atatattggc gggtaaaacta agtcgctgta  
660

tgtgtttggt tgagatctca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa  
720

ggccgcggtg ctggcgtttt tccataggct ccgccccct gacgagcatc acaaaaatcg  
780

acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac aggactataa agataccagg cgtttcccc  
840

tggaagctcc ctctgctgct ctccctgttc gaccctgccc cttaccggat acctgtccgc  
900

ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttc tcatagctca cgctgtaggt atctcagttc  
960

ggtgtaggtc gttcgtcca agctgggctg tgtgcacgaa cccccgttc agcccgaccg  
1020

ctgcgcotta tccggtaact atcgtcttga gtccaaccg gtaagacacg acttatcgcc  
1080

actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga  
1140

gttcttgaag tgggtggccta actacggcta cactagaaga acagtatttg gtatctgccc  
1200

tctgctgaag ccagttacct tcggaagaag agttggtagc tottgatccg gcaaacaaac  
1260

caccgctggg agcgggtggt tttttgtttg caagcagcag attacgcca gaaaaaaagg  
1320

atctcaagaa gatcctttga tcttttctac ggggtctgac gctcagtgga acgaaaactc  
1380

ES 2 389 792 A1

acgttaaggg attttggcca tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tccttttaaa  
1440

ttaaaaatga agttttaaat caatctaaag tatatatgtg taacattggg ctagtgatta  
1500

tttgcgact accttgggga tctcgccttt caogtagtgg acaaattctt ccaactgatc  
1560

tgcgcgag gccaagcgat cttcttcttg tccaagataa gcctgtctag cttcaagtat  
1620

gacgggctga tactgggccc gcagggcctc cattgcccag tcggcagcga catccttcgg  
1680

cgcgattttg cgggttactg cgctgtacca aatgcgggac aacgtaagca ctacatttcg  
1740

ctcatcgcca gccagtcgg gggcgagtt ccatagcgtt aaggtttcat ttagcgctc  
1800

aaatagatcc tgttcaggaa ccggatcaaa gagttcctcc gccgctggac ctaccaaggc  
1860

aacgctatgt tctcttgctt ttgtcagcaa gatagccaga tcaatgtcga tcgtggctgg  
1920

ctcgaagata cctgcaagaa tgtcattgag ctgccattct ccaaattgca gttcgcgctt  
1980

agctggataa cgccacggaa tgatgtcgtc gtgcacaaca atggtgactt ctacagcgag  
2040

gagaatctcg ctctctccag ggggaagccga agtttccaaa aggtcgttga tcaaagctcg  
2100

ccgcttggtt tcatcaagcc ttacggtcac cgtaaccagc aatcaatat cactgtgtgg  
2160

cttcaggccg ccatccactg cggagccgta caaatgtacg gccagcaacg tcggttcgag  
2220

atggcgctcg atgacgcaa ctacctctga tagttgagtc gatacttcgg cgatcacccg  
2280

ttcctcatg atgtttaact ttgttttagg ggcactgcc tgctgcgtaa catcgttgct  
2340

gtccataaac atcaaacatc gaccacggc gtaacgcgct tgctgcttgg atgcccaggg  
2400

catagactgt acccaaaaa aacagtcata acaagccatg aaaaccgcca ctgcccgtt  
2460

accaccgctg cgttcggtca aggttctgga ccagttgcgt gagcgcatc gctacttgca  
2520

ttacagctta cgaaccgaac aggttatgt ccactgggtt cgtgccttca tccgtttcca  
2580

cggtgtcgt caccggcaa ccttgggag cagcgaagtc gaggcatttc tgtcctggct  
2640

gggaacacc cttgtattac tgtttatgta agcagacagt tttattgttc atgatgat  
2700

## ES 2 389 792 A1

atTTTTatct tgtgcaatgt aacatcagag atTTTgagac acaacgtggc tttgttgaat  
2760

aaatcgaact tttgctgagt tgaaggatca gatcacgcat cttcccgaca acgcagaccg  
2820

ttccgtggca aagcaaaagt tcaaaatcac caactgggcc acctacaaca aagctctcat  
2880

caaccgtggc tccctcactt tctggctgga tgatggggcg attcaggcga tccccatcca  
2940

acagcccgcc gtcgagcggg cTTTTtTatc cccggaagcc tgtggataga gggtagttat  
3000

ccacgtgaaa ccgctaatac cccgcaaagc cttgattcac ggggctttcc ggcccgcctc  
3060

aaaaactatc cacgtgaaat cgctaatacag ggtacgtgaa atcgctaatac ggagtacgtg  
3120

aaatcgctaa taaggtcacg tgaaatcgct aatcaaaaag gcacgtgaga acgctaatac  
3180

ccctttcaga tcaacagctt gcaaacaccc ctcgctccgg caagtagtta cagcaagtag  
3240

tatgttcaat tagcttttca attatgaata tatatatcaa ttattggctg cccttggtt  
3300

gtggacaatg cgctacgcgc accggctccg cccgtggaca accgcaagcg gttgccacc  
3360

gtcgagcgc agcgccttg cccacaaccc gggggccggc cgcaacagat cgttttataa  
3420

atTTTTTTTT ttgaaaaaga aaaagcccga aaggcggcaa cctctcgggc ttctggattt  
3480

ccgatccccg gaattagaga tcttggcagg atatattgtg gtg  
3523

<210> 13

<211> 3528

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Plasmido de destino Golden Braid con casete LacZ 3AB2 y  
resistencia a espectinomicina

<400> 13

taacggctctc tgatgccact gagacgcaca gcttgtctgt aagcggatgc cgggagcaga  
60

caagcccgtc agggcgcgtc agcgggtgtt ggggggtgtc ggggctggct taactatgct  
120

gcacagagc agattgtact gagagtgcac catatgcggt gtgaaatacc gcacagatgc  
180

gtaaggagaa aataccgcat caggcgcctat togccattca ggctgcgcaa ctgttgggaa  
240



ES 2 389 792 A1

gggcgatcgg tgcgggcctc ttcgctatta cgccagctgg cgaaaggggg atgtgctgca  
300

aggcgattaa gttgggtaac gccagggttt tcccagtcac gacgttgtaa aacgacggcc  
360

agtgaattgg agcttggtac ccgtggatct tctagtgtcg atctgcacgc atgtaagctg  
420

ggcgtaatca tggatcatagc tgtttcctgt gtgaaattgt tatccgctca caattccaca  
480

caacatacga gccggaagca taaagtgtaa agcctggggg gcctaagag tgagctaaact  
540

cacattaatt gcgttgctc cactgcccgc tttccagtcg ggaaacctgt cgtgccagct  
600

gcagctcgt ctcacgtccg acagagacct gacaggatat attggcgggt aaactaagtc  
660

gctgtatgtg tttgtttgag atctcatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg  
720

taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca taggctccgc cccctgacg agcatcacia  
780

aatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcgtt  
840

tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta ccggatacct  
900

gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcaagct gtaggtatct  
960

cagttcgggtg taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc  
1020

cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aaccggtaa gacacgactt  
1080

atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcgggtc  
1140

tacagagttc ttgaagtggg ggcctaacta cggctacact agaagaacag tatttggtat  
1200

ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg aagaagagtt ggtagctctt gatccggcaa  
1260

acaaaccacc gctggtagcg gtgggtttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgagaaa  
1320

aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaacga  
1380

aaactcacgt taagggattt tggatcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct  
1440

tttaaattaa aatgaagt ttaaataat ctaaagtata tatgtgtaac attggtctag  
1500

tgattatttg ccgactacct tggatgatct gcctttcacg tagtggacaa attcttccaa  
1560

ES 2 389 792 A1

ctgatctgcg cgcgaggcca agcgatcttc ttcttgtcca agataagcct gtctagcttc  
1620

aagtatgacg ggctgatact gggccggcag gcgctccatt gccagtcgg cagcgacatc  
1680

cttcggcgcg attttgccgg ttactgcgct gtaccaaagc cgggacaacg taagcactac  
1740

atctcgctca tcgccagccc agtcggggcg cgagttccat agcgttaagg tttcatttag  
1800

cgctcctcaat agatcctgtt caggaaccgg atcaaagagt tcctccgccc ctggacctac  
1860

caaggcaacg ctatgtttctc ttgcttttgt cagcaagata gccagatcaa tgtcgatcgt  
1920

ggctggctcg aagatacctg caagaatgtc attgcgctgc cattctocaa attgcagttc  
1980

gcgcttagct ggataacgcc acggaatgat gtcgctcgtgc acaacaatgg tgacttctac  
2040

agcgcggaga atctcgctct ctccagggga agccgaagtt tccaaaaggt cgttgatcaa  
2100

agctcgccgc gttgtttcat caagccttac ggtcaccgta accagcaaat caatatcact  
2160

gtgtggcttc aggccgccat ccaactgcgga gccgtacaaa tgtacggcca gcaacgctcg  
2220

ttcgagatgg cgctcgatga cgccaactac ctctgatagt tgagtcgata cttcggcgat  
2280

caccgcttcc ctcatgatgt ttaactttgt tttagggcga ctgccctgct gcgtaacatc  
2340

gttgcctgctc cataacatca aacatcgacc cacggcgtaa cgcgcttgct gcttggatgc  
2400

ccgaggcata gactgtacc caaaaaaaa gtcataacaa gccatgaaaa ccgccactgc  
2460

gccgttacca ccgctgcggt cgggtcaaggt tctggaccag ttgcgtgagc gcatacgtc  
2520

cttgattac agcttacgaa cogaacaggc ttatgtccac tgggttcgtg ccttcatccg  
2580

tttccacggg gtgctgcacc cggcaacctt gggcagcagc gaagtcgagg ctttctgtc  
2640

ctggctggaa cacccttgt attactgttt atgtaagcag acagttttat tgttcatgat  
2700

gatatatatt tatcttgtgc aatgtaacat cagagatttt gagacacaac gtggctttgt  
2760

tgaataaatc gaacttttgc tgagttgaag gatcagatca cgcacttcc cgacaacgca  
2820

gaccgttccg tggcaaagca aaagttcaaa atcaccaact ggtccaccta caacaaagct  
2880

## ES 2 389 792 A1

ctcatcaacc gtggctccct cactttctgg ctggatgatg gggcgattca ggcgatcccc  
2940

atccaacagc ccgccgtcga gcgggctttt ttatccccgg aagcctgtgg atagagggta  
3000

gttatccacg tgaaacccgt aatgccccgc aaagccttga ttcacggggc tttccggccc  
3060

gctccaaaaa ctatccacgt gaaatcgcta atcaggggtac gtgaaatcgc taatcggagt  
3120

acgtgaaatc gctaataagg tcacgtgaaa togctaataca aaaaggcacg tgagaacgct  
3180

aatagccctt tcagatcaac agcttgcaaa caccctcgc tccggcaagt agttacagca  
3240

agtagtatgt tcaattagct tttcaattat gaatatatat atcaattatt ggtcgcctt  
3300

ggcttgtgga caatgcgcta cgcgcaccgg ctccgccctg ggacaaccgc aagcggttgc  
3360

ccaccgtcga gcgccagcgc ctttgcccac aaccggcgg cggcccgcaa cagatcgttt  
3420

tataaatttt ttttttgaa aaagaaaaag cccgaaaggc ggcaacctct cgggcttctg  
3480

gatttccgat ccccggaatt agagatcttg gcaggatata ttgtggtg  
3528

<210> 14

<211> 1049

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Precursor pieza Promotor 35S del CAMV

<400> 14

ggtctcatgg cactagagcc aagctgatct cctttgcccc ggagatcacc atggacgact  
60

ttctctatct ctacgatcta ggaagaaagt tcgacggaga aggtgacgat accatgttca  
120

ccaccgataa tgagaagatt agcctcttca atttcagaaa gaatgotgac ccacagatgg  
180

ttagagagggc ctacgaggca ggtctgatca agacgatcta cccgagtaat aatctccagg  
240

agatcaaata ccttccaag aaggtaaag atgcagtcaa aagattcagg actaactgca  
300

tcaagaacac agagaaagat atatttctca agatcagaag tactattcca gtatggacga  
360

ttcaaggctt gcttcataaa ccaaggcaag taatagagat tggagtctct aagaaagtag  
420

ttcctactga atcaaaggcc atggagtcaa aaattcagat cgaggatcta acagaactcg  
480

## ES 2 389 792 A1

ccgtgaagac tggcgaacag ttcatacaga gtcttttacg actcaatgac aagaagaaaa  
540

tcttcgtcaa catggtggag caccgacctc togtctactc caagaatatc aaagatacag  
600

tctcagaaga ccaaagggtc attgagactt ttcaacaaag ggtaatatcg ggaaacctcc  
660

tgggattcca ttgccagct atctgtcact tcatcaaaag gacagtagaa aaggaagggtg  
720

gcacctaaa atgccatcat tgggataaag gaaaggctat cgttcaagat gcctctgccg  
780

acagtgggtcc caaagatgga cccccacca cgaggagcat cgtggaaaaa gaagacgttc  
840

caaccacgtc ttcaaagcaa gtggattgat gtgatatctc cactgacgta agggatgacg  
900

cacaatccca ctatccttcg caagaccctt cctctatata aggaagtcca tttcatttgg  
960

agaggactcc ggtatTTTTA caacaatacc acaacaaaac aaacaacaaa caacattaca  
1020

atttactatt ctagtgcgaga tgtgagacc  
1049

<210> 15

<211> 514

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Precursor pieza Terminador de la Nopalina Sintasa

<400> 15

ggtctcatga gggaatggat cttcgatccc gatcgttcaa acatttggca ataaagtttc  
60

ttaagattga atcctgttgc cggctcttgcg atgattatca tataatttct gttgaattac  
120

gttaagcatg taataattaa catgtaatgc atgacgttat ttatgagatg ggtttttatg  
180

attagagtcc cgcaattata catttaatac gcgatagaaa acaaaatata gcgcgcaaac  
240

taggataaat tatcgcgcdc ggtgtcatct atgttactag atcgggaatt gccaaagctaa  
300

ttcttgaaga cgaaagggcc tcgtgatacg cctatTTTTA taggttaatg tcatgataat  
360

aatggtttct tagacgtcag gtggcacttt tcggggaaat gtgcgcgga cccctatttg  
420

tttatttttc taaatacatt caaatatgta tccgctcatg agacaataac cctgataaat  
480

gcttcaataa tgggaccgac tcggccatga gacc

ES 2 389 792 A1

514

<210> 16  
<211> 748  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Precursor pieza CDS de la yellow fluorescent protein

<400> 16  
ggctctcagat ggtgagcaag ggcgaggagc tgttcaccgg ggtggtgccc atcctgggtcg  
60  
  
agctggacgg cgacgtaaac ggccacaagt tcagcgtgtc cggcgagggc gagggcgatg  
120  
  
ccacctacgg caagctgacc ctgaagttca tctgcaccac cggcaagctg cccgtgccct  
180  
  
ggcccaccct cgtgaccacc ttcgggtacg gcctgaagtg ctctgcccgc taccgccacc  
240  
  
acatgaagca gcacgacttc ttcaagtccg ccatgcccga aggctacgtc caggagcgca  
300  
  
ccatcttctt caaggacgac ggcaactaca agaccgcgc cgaggtgaag ttcgagggcg  
360  
  
acaccctggt gaaccgcatc gagctgaagg gcatcgactt caaggaggac ggcaacatcc  
420  
  
tggggcaciaa gctggagtac aactacaaca gccacaacgt ctatatcatg gccgacaagc  
480  
  
agaagaacgg catcaaggtg aacttcaaga tccgccaciaa catcgaggac ggcagcgtgc  
540  
  
agctcgccga ccactaccag cagaacaccc ccacggcga cggccccgtg ctgctgcccg  
600  
  
acaaccacta cctgagctac cagtccgcc tgagcaaaga cccaacgag aagcgcgatc  
660  
  
acatggtcct gctggagttc gtgaccgccg ccgggatcac tctcggcatg gacgagctct  
720  
  
acaagtcagt catgagctga gtgagacc  
748

<210> 17  
<211> 694  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Precursor pieza CDS de la Discosoma sp. Red Fluorescent Protein

<400> 17  
ggctctcagat ggcctcctcc gagaacgtca tcaccgagtt catgcgcttc aaggtgcgca  
60  
  
tggagggcac cgtgaacggc cacgagttcg agatcgaggg cgagggcgag ggccgcccct

# ES 2 389 792 A1

120

acgagggcca caacaccgtg aagctgaagg tgaccaaggg cggccccctg cccttcgct  
180

gggacatcct gtccccccag ttccagtagc gtcccaaggt gtacgtgaag cccccgccc  
240

acatccccga ctacaagaag ctgtccttcc ccgagggcct caagtgggag cgcgtgatga  
300

acttcgagga cggcggcgtg gcgaccgtga cccaggactc ctccctgcag gacggctgct  
360

tcctctacaa ggtgaagttc atcggcgtga acttccccctc cgacggcccc gtgatgcaga  
420

agaagacgat gggctgggag gcctccaccg agcgcctgta cccccgagac ggcgtgctga  
480

agggcgagac acacaaggcc ctgaagctga aggacggcgg ccactacctg gtggagtcca  
540

agtccatcta catggccaag aagcccgtgc agctgcccggt ctactactac gtggacgcca  
600

agctggacat cacctcccac aacgaggact acaccatcgt ggagcagtag gagcgcaccg  
660

agggccgcca ccacctgttc ctgtgagtga gacc  
694

<210> 18

<211> 718

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Precursor pieza CDS de la Blue Fluorescent Protein

<400> 18

ggctcagat gagcagctg attaaggaga acatgcacat gaagctgtac atggagggca  
60

ccgtggacaa ccatcacttc aagtgcacat ccgagggcga aggcaagccc tacgagggca  
120

cccagaccat gagaatcaag gtggtcgagg ggggccctct ccccttcgcc ttcgacatcc  
180

tggctactag cttcctctac ggcagcaaga cttcatcaa ccacaccag ggcattccccg  
240

acttttcaa gcagtccttc cctgagggct tcacatggga gagagtcacc acatacgaag  
300

acggggcgt gctgaccgt acccaggaca ccagcctcca ggacggctgc ctcatctaca  
360

acgtcaagat cagaggggtg aacttcacat ccaacggccc tgtgatgcag aagaaaacac  
420

tcggctggga ggccttcacc gaaacgctgt accccgctga cggcggcctg gaaggcagaa  
480

## ES 2 389 792 A1

acgacatggc cctgaagctc gtgggcggga gccatctgat cgcaaacatc aagaccacat  
540

atagatccaa gaaacccgct aagaacctca agatgcctgg cgtctactat gtggactaca  
600

gactggaaag aatcaaggag gccacaacg aaacctacgt cgagcagcac gaggtggcag  
660

tggccagata ctgcgacctc cctagcaaac tggggcacaa gcttaattga gtgagacc  
718

<210> 19  
<211> 535  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Precursor pieza CDS del supresor de silenciamiento p19 del  
TBSV

<400> 19  
ggtctcagat ggaacgagct atacaaggaa acgacgctag ggaacaagct aacagtgaac  
60

gttgggatgg aggatcagga ggtaccactt ctcccttcaa acttctctgac gaaagtccga  
120

gttggactga gtggcggcta cataacgatg agactaattc gaatcaagat aatccccttg  
180

gtttcaagga aagctggggg ttcgggaaag ttgtatttaa gagatatctc agatacgaca  
240

ggacggaagc ttcactgcac agagtccttg gatcttggac gggagattcg gttaactatg  
300

cagcatctcg atttttcggg ttcgaccaga tcggatgtac ctatagtatt cggtttcgag  
360

gagttagtat caccgtttct ggaggctctc gaactcttca gcatctctgt gagatggcaa  
420

ttcggtctaa gcaagaactg ctacagcttg cccaatcga agtggaaagt aatgtatcaa  
480

gaggatgccc tgaaggtact gaaaccttcg aaaaagaaag cgagtgagtg agacc  
535

<210> 20  
<211> 4857  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Vector de expresion de YFP bajo el promotor 35s

<400> 20  
tggcactaga gccaaagctga tctcctttgc cccggagatc accatggacg actttctcta  
60

tctctacgat ctaggaagaa agttcgacgg agaaggtgac gataccatgt tcaccaccga  
120

ES 2 389 792 A1

taatgagaag attagcctct tcaatttcag aaagaatgct gaccacaga tggtagaga  
180

ggcctacgcg gcaggtctga tcaagacgat ctacccgagt aataatctcc aggagatcaa  
240

ataccttccc aagaaggtta aagatgcagt caaaagattc aggactaact gcatcaagaa  
300

cacagagaaa gatataattc tcaagatcag aagtactatt ccagtatgga cgattcaagg  
360

cttgcttcat aaaccaaggc aagtaataga gattggagtc tctaagaaag tagttcctac  
420

tgaatcaaag gccatggagt caaaaattca gatcgaggat ctaacagaac tcgccgtgaa  
480

gactggcgaa cagttcatac agagtctttt acgactcaat gacaagaaga aaatcttcgt  
540

caacatggtg gagcacgaca ctctcgtcta ctccaagaat atcaaagata cagtctcaga  
600

agaccaaagg gctattgaga cttttcaaca aagggttaata tcgggaaacc tcctcggatt  
660

ccattgocca gctatctgtc acttcatcaa aaggacagta gaaaaggaag gtggcaccta  
720

caaatgccat cattgcgata aaggaaaggc tatcgttcaa gatgcctctg ccgacagtgg  
780

tcccaaagat ggacccccac ccacgaggag catcgtggaa aaagaagacg ttccaaccac  
840

gtcttcaaag caagtggatt gatgtgatat ctccactgac gtaagggatg acgcacaatc  
900

ccactatcct tcgcaagacc cttcctctat ataaggaagt tcatttcatt tggagaggac  
960

tccggtattt ttacaacaat accacaaca aacaacaac aaacaacatt acaatttact  
1020

attctagtcg agatggtgag caagggcgag gagctgttca cgggggtggt gcccatcctg  
1080

gtcgagctgg acggcgacgt aaacggccac aagttcagcg tgtccggcga gggcgagggc  
1140

gatgccacct acggcaagct gaccctgaag ttcatctgca ccaccggcaa gctgcccgtg  
1200

ccctggccca ccctcgtgac caccttcggc tacggcctga agtgcttcgc ccgctacccc  
1260

gaccacatga agcagcacga cttcttcaag tccgccatgc ccgaaggcta cgtccaggag  
1320

cgcaccatct tcttcaagga cgacggcaac tacaagacc gcgccgaggt gaagttcgag  
1380

ggcgacacc tcggtgaaccg catcgagctg aaggcatcg acttcaagga ggacggcaac  
1440



ES 2 389 792 A1

atcctggggc acaagctgga gtacaactac aacagccaca acgtctatat catggccgac  
1500

aagcagaaga acggcatcaa ggtgaacttc aagatccgcc acaacatcga ggacggcagc  
1560

gtgcagctcg ccgaccacta ccagcagaac acccccatcg gcgacggccc cgtgctgctg  
1620

cccgacaacc actacctgag ctaccagtcc gccctgagca aagaccccaa cgagaagcgc  
1680

gatcacatgg tcctgctgga gttcgtgacc gccgccggga tcaactctcg catggacgag  
1740

ctctacaagt cagtcatgag ctgagggaaat ggatcttcca tcccgatcgt tcaaacattt  
1800

ggcaataaag tttcttaaga ttgaatcctg ttgccggtct tgcgatgatt atcatataat  
1860

ttctgttgaa ttacgttaag catgtaataa ttaacatgta atgcatgacg ttatttatga  
1920

gatgggtttt tatgattaga gtcccgaat tatacattta atacgcgata gaaaacaaaa  
1980

tatagcgcgc aaactaggat aaattatcgc gdcgggtgtc atctatgta ctagatcggg  
2040

aattgccaaag ctaattcttg aagacgaaag ggcctcgtga tacgcctatt tttatagggt  
2100

aatgtcatga taataatggt ttcttagacg tcaggtggca cttttcgggg aaatgtgcgc  
2160

ggaaccoccta tttgtttatt tttctaaata cattcaaata tgtatccgct catgagacaa  
2220

taaccctgat aaatgcttca ataatgggac cgactcgcga cggcatgaga cgtgacagga  
2280

tatattggcg ggtaactaa gtcgctgtat gtgtttgttt gagatctcat gtgagcaaaa  
2340

ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcggtgc tggcgttttt ccataggctc  
2400

cgccccctg acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agagggtggcg aaaccgcaca  
2460

ggactataaa gataccaggc gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttccg  
2520

acctgcgcgc ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct  
2580

catagctcac gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgctcaa gctgggctgt  
2640

gtgcacgaac cccccgttca gcccgaccgc tgcgccttat ccggtaacta togtcttgag  
2700

tccaaccogg taagacacga cttatcgcca ctggcagcag cactggtaa caggattagc  
2760

ES 2 389 792 A1

agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac  
2820

actagaagaa cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaagaaga  
2880

gttggtagct cttgatccgg caaacaacc accgctggta gcggtggttt ttttgtttgc  
2940

aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg  
3000

gggtctgacg ctccagtggaa cgaaaactca cgtaagggga ttttggatcat gagattatca  
3060

aaaaggatct tcacctagat ccttttaaata taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt  
3120

atatatgtgt aacattggtc tagtgattag aaaaactcat cgagcatcaa atgaaactgc  
3180

aatttattca tatcaggatt atcaatacca tatttttgaa aaagccgttt ctgtaatgaa  
3240

ggagaaaact caccgaggca gttccatagg atggcaagat cctggatcgc gtctgcgatt  
3300

ccgactcgtc caacatcaat acaacctatt aatttcccct cgtcaaaaat aaggttatca  
3360

agtgagaaat caccatgagt gacgactgaa tccggtgaga atggcaaaag tttatgcatt  
3420

tctttccaga cttgttcaac aggccagcca ttacgctcgt catcaaaatc actcgcacatca  
3480

accaaaccgt tattcattcg tgattgcgcc tgagcgagtc gaaatacgcg atcgcctgta  
3540

aaaggacaat tacaacagc aatcgaatgc aaccggcgca ggaacactgc cagcgcacatca  
3600

acaatatttt cacctgaatc aggatattct tctaatacct ggaatgctgt tttccctggg  
3660

atcgcagtggt tgagtaacca tgcacatca ggagtacgga taaaatgctt gatggctcgga  
3720

agaggcataa attccgtcag ccagtttagt ctgaccatct catctgtaac aacattggca  
3780

acgctacctt tgccatgttt cagaaacaac tctggcgcac cgggcttccc atacaatcgg  
3840

tagattgtcg cacctgattg cccgacatta tcgagagccc atttatacc atataaatca  
3900

gcatccatgt tggaaattaa tcgcgccctt gagcaagacg tttccggtg aatatggctc  
3960

ataacacccc ttgtattact gtttatgtaa gcagacagtt ttattgttca tgatgatata  
4020

ttttatctt gtgcaatgta acatcagaga ttttgagaca caacgtggct ttgttgaata  
4080

# ES 2 389 792 A1

aatcgaactt ttgctgagtt gaaggatcag atcacgcac tccccgacaa cgcagaccgt  
4140

tccgtggcaa agcaaaagt caaaatcacc aactggcca cctacaacaa agctctcatc  
4200

aaccgtggct ccctcacttt ctggctggat gatggggcga ttcaggcgat ccccatccaa  
4260

cagcccgccg tcgagcgggc tttttatcc ccggaagcct gtggatagag ggtagttatc  
4320

cacgtgaaac cgctaagcc ccgcaaagcc ttgattcacg gggctttccg gcccgctcca  
4380

aaaactatcc acgtgaaatc gctaatacagg gtacgtgaaa tcgctaatac gagtacgtga  
4440

aatcgctaata aaggtcacgt gaaatcgcta atcaaaaagg cacgtgagaa cgctaatagc  
4500

cctttcagat caacagcttg caaacacccc tcgctccggc aagtagttac agcaagtagt  
4560

atgttcaatt agcttttcaa ttatgaatat atatatcaat tattggtcgc ccttggttg  
4620

tggacaatgc gctacgcgca ccggctccgc ccgtggacaa ccgcaagcgg ttgcccaccg  
4680

tcgagcgcca ggcctttg cccacaacccg gcggccggcc gcaacagatc gttttataaa  
4740

ttttttttt tgaaaaagaa aaagcccga agggggcaac ctctcgggct tctggatttc  
4800

cgatccccgg aattagagat cttggcagga tatattgtgg tgtaaccgtc tcaccac  
4857

<210> 21  
<211> 4644  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Vector de expresion de p19 bajo el promotor 35s

<400> 21  
gatggaacga gctatacaag gaaacgacgc tagggaacaa gctaacagtg aacgttggga  
60

tggaggatca ggaggtacca cttctccctt caaacttcct gacgaaagtc cgagttggac  
120

tgagtggcgg ctacataacg atgagactaa ttcgaatcaa gataatcccc ttggtttcaa  
180

ggaaagctgg ggtttcggga aagttgtatt taagagatat ctgagatagc acaggacgga  
240

agcttcaactg cacagagtcc ttggatcttg gacgggagat tcggttaact atgcagcatc  
300

tcgatttttc ggtttcgacc agatcggatg tacctatagt attcggtttc gaggagttag  
360

ES 2 389 792 A1

tatcacggtt tctggaggct ctggaactct tcagcatctc tgtgagatgg caattcggtc  
420

taagcaagaa ctgctacagc ttgccccaat cgaagtggaa agtaatgtat caagaggatg  
480

cctgaagggt actgaaacct tcgaaaaaga aagcgagtga gggaatggat cttcgatccc  
540

gatcgttcaa acatttggca ataaagtctt ttaagattga atcctggtgc cggctcttgcg  
600

atgattatca tataatttct gttgaattac gttaagcatg taataattaa catgtaatgc  
660

atgacgttat ttatgagatg ggtttttatg attagagtcc cgcaattata catttaatac  
720

gcgatagaaa acaaaatata gcgcgcaaac taggataaat tatcgcgcdc ggtgtcatct  
780

atgttactag atcgggaatt gccaaagctaa ttcttgaaga cgaaagggcc tcgtgatacg  
840

cctattttta taggttaatg tcatgataat aatggtttct tagacgtcag gtggcacttt  
900

tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta  
960

tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa tgggaccgac tcgcgaccgt  
1020

ctgagacgtg acaggatata ttggcgggta aactaagtcg ctgtatgtgt ttgtttgaga  
1080

tctcatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgcctggc  
1140

gtttttccat aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtcagag  
1200

gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt cccctggaa gtcacctgt  
1260

gcgctctcct gttccgacct tgccgcttac cggatacctg tccgcctttc tccttcggg  
1320

aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg aggtcgttcg  
1380

ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg ccttatccgg  
1440

taactatcgt cttgagtcca acccggttaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac  
1500

tggtaacagg attagcagag cgaggatgtt aggcgggtgct acagagttct tgaagtggtg  
1560

gcctaactac ggctacacta gaagaacagt atttgggtatc tgcgctctgc tgaagccagt  
1620

taccttcgga agaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaacaccgg ctggtagcgg  
1680

ES 2 389 792 A1

tggttttttt gtttgcaagc agcagattac ggcgagaaaa aaaggatctc aagaagatcc  
1740

tttgatcttt tctacggggc ctgacgctca gtggaacgaa aactcacggt aagggatctt  
1800

ggtcacgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaa aatgaagttt  
1860

taaatcaatc taaagtatat atgtgtaaca ttggcttagt gattagaaaa actcatcgag  
1920

catcaaatga aactgcaatt tattcatatc aggattatca ataccatatt tttgaaaaag  
1980

ccgtttctgt aatgaaggag aaaactcacc gaggcagttc cataggatgg caagatcctg  
2040

gtatcggctc gcgattccga ctcgccaac atcaatacaa cctattaatt tcccctcgtc  
2100

aaaaataagg ttatcaagtg agaaatcacc atgagtgacg actgaatccg gtgagaatgg  
2160

caaaagttaa tgcatttctt tccagacttg ttcaacaggc cagccattac gctcgtcatc  
2220

aaaatcactc gcatcaacca aaccgttatt cattcgtgat tgcgcctgag cgagtcgaaa  
2280

tacgcgatcg ctgttaaaaag gacaattaca aacaggaatc gaatgcaacc ggcgcaggaa  
2340

cactgccagc gcatcaacaa tattttcacc tgaatcagga tattcttcta atacctggaa  
2400

tgctgttttc cctgggatcg cagtggtag taaccatgca tcatcaggag tacggataaa  
2460

atgcttgatg gtcggaagag gcataaattc cgtcagccag tttagtctga ccatctcatc  
2520

tgtaacaaca ttggcaacgc tacctttgcc atgtttcaga aacaactctg ggcacatggg  
2580

cttcccatac aatcggtaga ttgtcgcacc tgattgcccg acattatcgc gagcccattt  
2640

ataccatata aatcagcat ccattgttga atttaatcgc ggccttgagc aagacgtttc  
2700

ccgttgaata tggctcataa cacccttgt attactgttt atgtaagcag acagttttat  
2760

tgttcatgat gatataatct tatcttgctc aatgtaacat cagagatctt gagacacaac  
2820

gtggctttgt tgaataaatc gaacttttgc tgagttgaag gatcagatca cgcactctcc  
2880

cgacaacgca gaccgttccg tggcaaagca aaagttcaaa atcaccaact ggtccaccta  
2940

caacaaagct ctcatcaacc gtggctccct cactttctgg ctggatgatg gggcgattca  
3000

ES 2 389 792 A1

ggcgatcccc atccaacagc cgcgctcga ggggctttt ttatccccg aagcctgtgg  
 3060  
 atagagggtta gttatccacg tgaaacgct aatgccccgc aaagccttga ttcacggggc  
 3120  
 tttccggccc gctcaaaaa ctatccacgt gaaatcgcta atcagggtac gtgaaatcgc  
 3180  
 taatcggagt acgtgaaatc gctaataagg tcacgtgaaa tcgctaataca aaaaggcagc  
 3240  
 tgagaacgct aatagccctt tcagatcaac agcttgcaaa caccctcgc tccggcaagt  
 3300  
 agttacagca agtagtatgt tcaattagct tttcaattat gaatatatat atcaattatt  
 3360  
 ggtcgccctt ggcttgtgga caatgctgta cgcgcaccgg ctccgcccgt ggacaacgcg  
 3420  
 aagcggttgc ccacgctcga ggcgcagcgc ctttgcccac aaccggcggc cggccgcaa  
 3480  
 cagatcgttt tataaatTTT tttttttgaa aaagaaaaag cccgaaaggc ggcaacctct  
 3540  
 cgggcttctg gatttccgat ccccggaatt agagatcttg gcaggatata ttgtggtgta  
 3600  
 accgtctcag gcatggcact agagccaagc tgatctcctt tgccccggag atcaccatgg  
 3660  
 acgactttct ctatctctac gatctaggaa gaaagtctga cggagaaggt gacgatacca  
 3720  
 tgttcaccac cgataatgag aagattagcc tcttcaattt cagaaagaat gctgaccac  
 3780  
 agatggttag agaggcctac ggggcaggtc tgatcaagac gatctaccgg agtaataatc  
 3840  
 tccaggagat caaatacctt cccaagaagg ttaaagatgc agtcaaaaga ttcaggacta  
 3900  
 actgcatcaa gaacacagag aaagatatat ttctcaagat cagaagtact attccagtat  
 3960  
 ggacgattca aggcttgctt cataaaccaa ggcaagtaat agagattgga gtctctaaga  
 4020  
 aagtagttcc tactgaatca aaggccatgg agtcaaaaat tcagatcgag gatctaacag  
 4080  
 aactcgccgt gaagactggc gaacagttca tacagagtct tttacgactc aatgacaaga  
 4140  
 agaaaatctt cgtcaacatg gtggagcacg acactctcgt ctactccaag aatatcaaag  
 4200  
 atacagtctc agaagaccaa agggctattg agacttttca acaaagggtta atatcgggaa  
 4260  
 acctcctcgg attccattgc ccagctatct gtcacttcat caaaaggaca gtagaaaagg  
 4320

# ES 2 389 792 A1

aagggtggcac ctacaaatgc catcattgcy ataaaggaaa ggctatcgtt caagatgcct  
4380

ctgcccagacag tgggtcccaaa gatggacccc cacccacgag gagcatcgtg gaaaaagaag  
4440

acgttccaac cacgtcttca aagcaagtgg attgatgtga tatctccact gacgtaaggg  
4500

atgacgcaca atcccactat ccttcgcaag acccttcctc tatataagga agttcatttc  
4560

atttgagag gactccggta tttttacaac aataccacaa caaaacaac aacaacaac  
4620

attacaattt actattctag tcga  
4644

<210> 22

<211> 4827

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Vector de expresion de BFP bajo el promotor 35s

<400> 22

tggcactaga gccaaactga tctcctttgc cccggagatc accatggacg actttctcta  
60

tctctacgat ctaggaagaa agttcgacgg agaaggtgac gataccatgt tcaccaccga  
120

taatgagaag attagcctct tcaatttcag aaagaatgct gaccacacaga tgggttagaga  
180

ggcctacgcy gcaggtctga tcaagacgat ctacccgagt aataatctcc aggagatcaa  
240

ataccttccc aagaaggtta aagatgcagt caaaagatcc aggactaact gcatcaagaa  
300

cacagagaaa gatataatttc tcaagatcag aagtactatt ccagtatgga cgattcaagg  
360

cttgcttcat aaaccaaggc aagtaataga gattggagtc tctaagaaag tagttcctac  
420

tgaatcaaag gccatggagt caaaaattca gatcgaggat ctaacagaac togccgtgaa  
480

gactggcgaa cagttcatac agagtctttt acgactcaat gacaagaaga aaatcttcgt  
540

caacatggtg gagcacgaca ctctcgtcta ctccaagaat atcaaagata cagtctcaga  
600

agaccaaagg gctattgaga cttttcaaca aagggttaata tcgggaaacc tcctcggatt  
660

ccattgccc gctatctgct acttcatcaa aaggacagta gaaaaggaag gtggcaccta  
720

caaatgccat cattgcgata aaggaaaggc tatcgttcaa gatgcctctg ccgacagtg

# ES 2 389 792 A1

780

tcccaaagat ggacccccac ccacgaggag catcgtggaa aaagaagacg ttccaaccac  
840

gtcttcaaa caagtggatt gatgtgatat ctccactgac gtaagggatg acgcacaatc  
900

ccactatcct tcgcaagacc cttcctctat ataaggaagt tcatttcatt tggagaggac  
960

tccggtattt ttacaacaat accacaacaa aacaacaac aaacaacatt acaatttact  
1020

attctagtcg agatgagcga gctgattaag gagaacatgc acatgaagct gtacatggag  
1080

ggcaccgtgg acaaccatca cttcaagtgc acatccgagg gcgaaggcaa gccctacgag  
1140

ggcaccaga ccatgagaat caaggtggtc gagggcggcc ctctcccctt cgccttcgac  
1200

atcctggcta ctagcttctt ctacggcagc aagaccttca tcaaccacac ccagggcatc  
1260

cccgacttct tcaagcagtc cttccctgag ggcttcacat gggagagagt caccacatac  
1320

gaagacgggg gctgctgac cgctaccag gacaccagcc tccaggacgg ctgcctcatc  
1380

tacaacgtca agatcagagg ggtgaacttc acatccaacg gccctgtgat gcagaagaaa  
1440

acactcggct gggaggcctt caccgaaacg ctgtaccccg ctgacggcgg cctggaaggc  
1500

agaaacgaca tggccctgaa gctcgtgggc gggagccatc tgatcgcaaa catcaagacc  
1560

acatatagat ccaagaaacc cgctaagaac ctcaagatgc ctggcgtcta ctatgtggac  
1620

tacagactgg aaagaatcaa ggaggccaac aacgagacct acgtcgagca gcacgaggtg  
1680

gcagtggcca gatactgcga cctccctagc aaactggggc acaagcttaa ttgagggaat  
1740

ggatcttcga tcccgatcgt tcaaacattt ggcaataaag tttcttaaga ttgaatcctg  
1800

ttgccggtct tgcgatgatt atcatataat ttctgttgaa ttacgttaag catgtaataa  
1860

ttaacatgta atgcatgacg ttatttatga gatgggtttt tatgattaga gtcccgcaat  
1920

tatacattta atacgcgata gaaaacaaaa tatagcgcgc aaactaggat aaattatcgc  
1980

gdcgggtgct atctatgtta ctagatcggg aattgccaaag ctaattcttg aagacgaaag  
2040

ggcctcgtga tacgcctatt tttataggtt aatgcatga taataatggt ttcttagacg



ES 2 389 792 A1

2100

tcagggtggca cttttcgggg aaatgtgccc ggaaccocca tttgtttatt tttctaata  
2160  
cattcaaata tgtatccgct catgagacaa taaccctgat aaatgcttca ataatgggac  
2220  
cgactcgcga cggcatgaga cgtgacagga tatattggcg ggtaactaa gtcgctgtat  
2280  
gtgtttgttt gagatctcat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaaag  
2340  
gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc cgccccctg acgagcatca caaaaatcga  
2400  
cgctcaagtc agagggtggcg aaaccgcaca ggactataaa gataccaggc gtttccccct  
2460  
ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttccg accctgccgc ttaccggata cctgtccgcc  
2520  
tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct catagctcac gctgtaggta tctcagttcg  
2580  
gtgtaggtcg ttcgctcaa gctgggctgt gtgcacgaac cccccgttca gcccgaccgc  
2640  
tgcgccttat ccgtaacta tcgtcttgag tccaaccgg taagacacga cttatcgcca  
2700  
ctggcagcag cactggtaa caggattagc agagcgaggc atgtaggcgg tgctacagag  
2760  
ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagaa cagtatttgg tatctgcgct  
2820  
ctgctgaagc cagttacctt cggagaaga gttggtagct cttgatccgg caaacaacc  
2880  
accgctggta gcgggtggtt ttttgttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaagga  
2940  
tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggctctgacg ctcagtggaa cgaaaactca  
3000  
cgttaaggga ttttggcat gagattatca aaaaggatct tcacctagat ctttttaaat  
3060  
taaaaatgaa gtttttaatc aatctaaagt atatatgtgt aacattggtc tagtgattag  
3120  
aaaaactcat cgagcatcaa atgaaactgc aatttattca tatcaggatt atcaatacca  
3180  
tatttttgaa aaagccgttt ctgtaatgaa ggagaaaact caccgaggca gttccatagg  
3240  
atggcaagat cctggtatcg gtctgogatt ccgactcgtc caacatcaat acaacctatt  
3300  
aatttcccct cgtcaaaaat aaggttatca agtgagaaat caccatgagt gacgactgaa  
3360  
tccgggtgaga atggcaaaaag tttatgcatt ttttccaga cttgttcaac aggccagcca

ES 2 389 792 A1

3420

ttacgctcgt catcaaaatc actcgcacatc accaaaccgt tattcattcg tgattgcgcc  
3480

tgagcgagtc gaaatacgcg atcgcgtgta aaaggacaat tacaacacag aatcgaatgc  
3540

aaccggcgca ggaacactgc cagcgcacatc acaatatttt cacctgaatc aggatattct  
3600

tctaatacct ggaatgctgt tttccctggg atcgcagtggt tgagtaacca tgcatcatca  
3660

ggagtacgga taaaatgctt gatggtcgga agaggcataa attccgtcag ccagtttagt  
3720

ctgaccatct catctgtaac aacattggca acgctacctt tgccatgttt cagaaacaac  
3780

tctggcgcac cgggcttccc atacaatcgg tagattgtcg cacctgattg cccgacatta  
3840

tcggagagccc atttataccc atataaatca gcatccatgt tggaaattta tcgcgccctt  
3900

gagcaagacg tttcccgttg aatatggctc ataacacccc ttgtattact gtttatgtaa  
3960

gcagacagtt ttattgttca tgatgatata tttttatctt gtgcaatgta acatcagaga  
4020

ttttgagaca caacgtggct ttgttgaata aatcgaactt ttgctgagtt gaaggatcag  
4080

atcacgcac tccccgaca cgcagaccgt tccgtggcaa agcaaaagt caaaatcacc  
4140

aactgggtcca cctacaacaa agctctcacc aaccgtggct ccctcacttt ctggctggat  
4200

gatggggcga ttcaggcgat ccccatccaa cagcccggcg tcgagcgggc ttttttatcc  
4260

ccggaagcct gtggatagag ggtagttatc cacgtgaaac cgctaagcc ccgcaaagcc  
4320

ttgattcacg gggctttccg gcccgctcca aaaactatcc acgtgaaatc gctaactcag  
4380

gtacgtgaaa tcgctaactc gagtacgtga aatcgctaata aaggtcacgt gaaatcgcta  
4440

atcaaaaagg cacgtgagaa cgctaatagc cctttcagat caacagcttg caaacacccc  
4500

tcgctccggc aagtagttac agcaagtagt atgttcaatt agcttttcaa ttatgaatat  
4560

atatatcaat tattggctgc ccttggttgg tggacaatgc gctacgcgca ccggctccgc  
4620

ccgtggacaa ccgcaagcgg ttgccaccg tcgagcgcca ggcctttgc ccacaacccg  
4680

gcggccggcc gcaacagatc gttttataaa tttttttttt tgaaaaagaa aaagcccga

# ES 2 389 792 A1

4740

aggcggcaac ctctcgggct tctggatttc cgatccccgg aattagagat cttggcagga  
4800

tatattgtgg tgtaaccgtc tcaccac  
4827

<210> 23

<211> 4806

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Vector de expresion de DsRed bajo el promotor 35s

<400> 23

tggcactaga gccaaagtga tctcctttgc cccggagatc accatggacg actttctcta  
60

tctctacgat ctaggaagaa agttcgacgg agaaggtgac gataccatgt tcaccaccga  
120

taatgagaag attagcctct tcaatttcag aaagaatgct gaccacaga tggtagaga  
180

ggcctacgog gcaggtctga tcaagacgat ctacccgagt aataatctcc aggagatcaa  
240

ataccttccc aagaaggta aagatgcagt caaaagattc aggactaact gcatcaagaa  
300

cacagagaaa gatatatttc tcaagatcag aagtactatt ccagtatgga cgattcaagg  
360

cttgcttcat aaaccaaggc aagtaataga gattggagtc tctaagaaag tagttcctac  
420

tgaatcaaag gccatggagt caaaaattca gatogaggat ctaacagaac tcgccgtgaa  
480

gactggcgaa cagttcatac agagtctttt acgactcaat gacaagaaga aaatcttcgt  
540

caacatggtg gagcacgaca ctctcgtcta ctccaagaat atcaaagata cagtctcaga  
600

agaccaaagg gctattgaga cttttcaaca aagggtaata tcgggaaacc tcctcggatt  
660

ccattgcca gctatctgtc acttcatcaa aaggacagta gaaaaggaag gtggcaccta  
720

caaatgccat cattgcgata aaggaaaggc tatcgttcaa gatgcctctg ccgacagtgg  
780

tcccaaagat ggacccccac ccacgaggag catcgtggaa aaagaagacg ttccaaccac  
840

gtcttcaaag caagtggatt gatgtgatat ctccaactgac gtaagggatg acgcacaatc  
900

ccactatcct tcgcaagacc ctctctctat ataaggaagt tcatttcatt tggagaggac  
960

ES 2 389 792 A1

tccggatattt ttacaacaat accacaacaa aacaaacaac aaacaacatt acaatttact  
1020

attctagtcg agatggcctc ctccgagaac gtcatcaccg agttcatgcg cttcaaggcg  
1080

cgcatggagg gcaccgtgaa cggccacgag ttcgagatcg agggcgaggg cgagggcgcg  
1140

ccctacgagg gccacaacac cgtgaagctg aagggtgacca agggcgggccc cctgcccttc  
1200

gcctgggaca tcctgtcccc ccagttccag tacggctcca aggtgtacgt gaagcacccc  
1260

gccgacatcc ccgactacaa gaagctgtcc ttccccgagg gcttcaagtg ggagcgcgctg  
1320

atgaacttcg aggacggcgg cgtggcgacc gtgacccagg actcctccct gcaggacggc  
1380

tgcttcatct acaaggtgaa gttcatcggc gtgaacttcc cctccgacgg ccccgatgag  
1440

cagaagaaga cgatgggctg ggaggcctcc accgagcgcg tgtacccccg cgacggcgtg  
1500

ctgaagggcg agacacacaa ggccctgaag ctgaaggacg gcggccacta cctggtggag  
1560

ttcaagtcca tctacatggc caagaagccc gtgcagctgc ccggctacta ctacgtggac  
1620

gccaagctgg acatcacctc ccacaacgag gactacacca tcgtggagca gtacgagcgc  
1680

accgagggcc gccaccacct gttcctgtag tgagggaatg gatcttcgat cccgatcgtt  
1740

caaacatttg gcaataaagt ttcttaagat tgaatcctgt tgccgggtctt gcgatgatta  
1800

tcataataat tctgttgaat tacgttaagc atgtaataat taacatgtaa tgcgatgacgt  
1860

tatttatgag atggggtttt atgattagag tcccgcgaatt atacatttaa tacgcatag  
1920

aaaacaaaat atagcgcgca aactaggata aattatcgcg cdcggtgtca tctatgttac  
1980

tagatcggga attgccaaagc taattcttga agacgaaagg gcctcgtgat acgcctattt  
2040

ttataggtta atgtcatgat aataatgggt tcttagacgt caggtggcac ttttcgggga  
2100

aatgtgcgcg gaaccctat ttgtttatct ttctaaatac attcaaatat gtatccgctc  
2160

atgagacaat aacctgata aatgcttcaa taatgggacc gactcgcgac cgtctgagac  
2220

gtgacaggat atattggcgg gtaaactaag tcgctgtatg tgtttggttg agatctcatg  
2280

ES 2 389 792 A1

tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcggtgct ggcgtttttc  
2340

cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga  
2400

aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct  
2460

cctgttccga cctgcccgt taccggatac ctgtccgct ttctccctc ggggaagcgtg  
2520

gcgctttctc atagctcacg ctgtaggat ctgagttcgg tgtaggtcgt togetccaag  
2580

ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct ggccttctc cggtaactat  
2640

cgtcttgagt ccaaccggg aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac  
2700

aggattagca gagcgggta tgtaggcggt gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac  
2760

tacggctaca ctagaagaac agtatttggg atctgcgctc tgctgaagcc agttacctc  
2820

ggaagaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cggtggtttt  
2880

ttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc  
2940

ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gtaagggat ttggtcatg  
3000

agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaatt aaaaatgaag ttttaaatca  
3060

atctaaagta tatatgtgta acattgggtc agtgattaga aaaactcatc gagcatcaaa  
3120

tgaaactgca atttattcat atcaggatta tcaataccat atttttgaaa aagccgttct  
3180

tgtaatgaag gagaaaactc accgaggcag ttccatagga tggcaagatc ctggtatcgg  
3240

tctgcgattc cgactcgtcc aacatcaata caacctatta atttccctc gtcaaaaata  
3300

aggttatcaa gtgagaaatc accatgagtg acgactgaat ccggtgagaa tggcaaaagt  
3360

ttatgcattt ctttccagac ttgttcaaca ggccagccat tacgctcgtc atcaaaatca  
3420

ctcgcacaa ccaaacgggt attcattcgt gattgcgcct gagcagatcg aaatacgcga  
3480

tcgctgttaa aaggacaatt acaaacagga atcgaatgca accggcgcag gaacactgcc  
3540

agcgcaccaa caatattttc acctgaatca ggatattctt ctaatacctg gaatgctggt  
3600

ES 2 389 792 A1

ttccctggga tgcagtggt gagtaacct gcatcatcag ggtacggat aaaatgcttg  
3660

atgggtcgaa gaggcataaa ttccgtcagc cagtttagtc tgaccatctc atctgtaaca  
3720

acattggcaa cgctaccttt gccatgttcc agaaacaact ctggcgcatc gggcttccca  
3780

tacaatcggg agattgtcgc acctgattgc ccgacattat cgcgagccca tttataccca  
3840

tataaatcag catccatggt ggaatttaat cgcggccttg agcaagacgt ttcccgttga  
3900

atatggctca taacaccctt tgtattactg tttatgtaag cagacagttt tattgttcat  
3960

gatgatatat ttttatcttg tgcaatgtaa catcagagat tttgagacac aacgtggctt  
4020

tgttgaataa atcgaacttt tgctgagttg aaggatcaga tcacgcatct tcccgacaac  
4080

gcagaccgtt ccgtggcaa gcaaaagttc aaaatcacca actggtccac ctacaacaaa  
4140

gctctcatca accgtggctc cctcactttc tggttgatg atggggcgat tcaggcgatc  
4200

cccatccaac agcccgccgt cgagcgggct tttttatccc cggaagcctg tggatagagg  
4260

gtagttatcc acgtgaaacc gctaattgcc cgcaaagcct tgattcacgg ggctttccgg  
4320

cccgtccaa aaactatcca cgtgaaatcg ctaatcaggg tacgtgaaat cgctaatcgg  
4380

agtacgtgaa atcgctaata aggtcacgtg aaatcgctaa tcaaaaaggc acgtgagaac  
4440

gctaatagcc ctttcagatc aacagcttgc aaacaccctc cgctccggca agtagttaca  
4500

gcaagtagta tgttcaatta gcttttcaat tatgaatata tatatcaatt attggtcgcc  
4560

cttggttgt ggacaatgcg ctaogcgcac cggctccgcc cgtggacaac cgcaagcggg  
4620

tgcccaccgt cgagcgccag cgcctttgcc cacaaccggg cggccggccg caacagatcg  
4680

ttttataaat tttttttttt gaaaaagaaa aagcccgaaa ggcggcaacc tctcgggctt  
4740

ctggatttcc gatccccgga attagagatc ttggcaggat atattgtggt gtaaccgtct  
4800

caggca  
4806

<210> 24  
<211> 7247

## ES 2 389 792 A1

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Vector de expresion de YFP y p19 bajo sendos promotores 35s

<400> 24

ccactggcac tagagccaag ctgatctcct ttgccccgga gatcaccatg gacgactttc  
60

tctatctcta cgatctagga agaaagttcg acggagaagg tgacgatacc atgttcacca  
120

ccgataatga gaagattagc ctcttcaatt tcagaaagaa tgctgaccca cagatgggta  
180

gagaggccta cggggcaggt ctgatcaaga cgatctacco gagtaataat ctccaggaga  
240

tcaaatacct tccaagaag gttaaagatg cagtcaaaag attcaggact aactgcatca  
300

agaacacaga gaaagatata tttctcaaga tcagaagtac tattccagta tggacgattc  
360

aaggcttgct tcataaacca aggcaagtaa tagagattgg agtctctaag aaagtagttc  
420

ctactgaatc aaaggccatg gagtcaaaaa ttcagatcga ggatctaaca gaactcgccg  
480

tgaagactgg cgaacagttc atacagagtc ttttacgact caatgacaag aagaaaatct  
540

tcgtcaacat ggtggagcac gacactctcg tctactcaa gaatatcaa gatacagttc  
600

cagaagacca aagggctatt gagacttttc aacaaagggc aatatcggga aacctcctcg  
660

gattccattg ccagctatc tgtcacttca tcaaaaggac agtagaaaag gaaggtggca  
720

cctacaaatg ccatcattgc gataaaggaa aggctatcgt tcaagatgcc tctgcccaga  
780

gtggtcccaa agatggaccc ccaccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa gacgttccaa  
840

ccagtccttc aaagcaagtg gattgatgtg atatctccac tgacgtaagg gatgacgcac  
900

aatcccacta tccttcgcaa gacccttct ctatataagg aagttcattt catttggaga  
960

ggactccggt atttttacaa caataccaca acaaaacaaa caacaaacaa cattacaatt  
1020

tactattcta gtcgagatgg tgagcaaggg cgaggagctg ttcaccgggg tggtgcccat  
1080

cctggctcag ctggacggcg acgtaaacgg ccacaagttc agcgtgtccg gcgagggcga  
1140

ggcgatgcc acctacggca agctgaccct gaagttcatc tgcaccaccg gcaagctgcc  
1200

# ES 2 389 792 A1

cgtgccctgg cccaccctcg tgaccacctt cggctacggc ctgaagtgct tcgcccgcta  
1260

ccccgaccac atgaagcagc acgacttctt caagtccgcc atgcccgaag gctacgtcca  
1320

ggagcgcacc atctttcttca aggacgacgg caactacaag acccgcgccc aggtgaagtt  
1380

cgagggcgac accctggtga accgcatcga gctgaagggc atcgacttca aggaggacgg  
1440

caacatcctg gggcacaagc tggagtacaa ctacaacagc cacaacgtct atatcatggc  
1500

cgacaagcag aagaacggca tcaaggtgaa cttcaagatc cgccacaaca tcgaggacgg  
1560

cagcgtgcag ctgcgccgacc actaccagca gaacaccccc atcggcgacg gccccgtgct  
1620

gctgccccgac aaccactacc tgagctacca gtccgccctg agcaaagacc ccaacgagaa  
1680

gcgcgatcac atggctctgc tggagtctgt gaccgccgcc gggatcactc tcggcatgga  
1740

cgagctctac aagtcagtca tgagctgagg gaatggatct tcgatcccga tcgttcaaac  
1800

atttggcaat aaagtttctt aagattgaat cctgttgccg gtcttgcgat gattatcata  
1860

taatttctgt tgaattacgt taagcatgta ataattaaca tgtaatgcat gacgttattt  
1920

atgagatggg tttttatgat tagagtcccg caattataca tttaatcgc gatagaaaac  
1980

aaaatatagc gcgcaaaacta ggataaatta tcgcgcocgg tgtcatctat gttactagat  
2040

cggaattgc caagctaatt cttgaagacg aaagggcctc gtgatacgcc tatttttata  
2100

ggttaatgtc atgataataa tggttttctta gacgtcaggc ggcacttttc ggggaaatgt  
2160

gcgcggaacc cctatttggt tatttttcta aatacattca aatatgtatc cgctcatgag  
2220

acaataaccc tgataaatgc ttcaataatg ggaccgactc gcgacggcat ggcactagag  
2280

ccaagctgat ctcccttgcc ccggagatca ccatggacga ctttctctat ctctacgatc  
2340

taggaagaaa gttcgacgga gaaggtgacg ataccatggt caccaccgat aatgagaaga  
2400

ttagcctctt caatttcaga aagaatgctg acccacagat ggtagagag gcctacgagg  
2460

caggtctgat caagacgatc taccggagta ataatctcca ggagatcaaa taccttccca  
2520



# ES 2 389 792 A1

agaaggtaa agatgcagtc aaaagattca ggactaactg catcaagaac acagagaaag  
 2580

atatatttct caagatcaga agtactattc cagtatggac gattcaaggc ttgcttcata  
 2640

aaccaaggca agtaatagag attggagtct ctaagaaagt agttcctact gaatcaaagg  
 2700

ccatggagtc aaaaattcag atcgaggatc taacagaact cgccgtgaag actggcgaac  
 2760

agttcataca gagtctttta cgactcaatg acaagaagaa aatcttcgtc aacatgggtg  
 2820

agcacgacac tctcgtctac tccaagaata tcaaagatac agtctcagaa gaccaaaggg  
 2880

ctattgagac ttttcaacaa agggtaatat cgggaaacct cctcggattc cattgcccag  
 2940

ctatctgtca cttcatcaaa aggacagtag aaaaggaagg tggcacctac aaatgccatc  
 3000

attgcgataa aggaaaggct atcgttcaag atgcctctgc cgacagtggc cccaaagatg  
 3060

gacccccacc cacgaggagc atcgtaggaa aagaagacgt tccaaccacg tcttcaaagc  
 3120

aagtggattg atgtgatatc tccactgacg taagggatga cgcacaatcc cactatcctt  
 3180

cgcaagacct ttctctata taaggaagtt catttcattt ggagaggact cgggtatctt  
 3240

tacaacaata ccacaacaaa acaacaaca aacaacatta caatttacta ttctagtcga  
 3300

gatggaacga gctatacaag gaaacgacgc tagggaacaa gctaacagtg aacgttggga  
 3360

tggaggatca ggaggtagca cttctccctt caaacttctt gacgaaagtc cgagttggac  
 3420

tgagtggcgg ctacataacg atgagactaa ttcgaatcaa gataatcccc ttggtttcaa  
 3480

ggaaagctgg ggtttcggga aagttgtatt taagagatat ctcagatagc acaggacgga  
 3540

agcttcaactg cacagagtc cttggatcttg gacgggagat tcggttaact atgcagcatc  
 3600

tcgatttttc ggtttcgacc agatcggatg tacctatagt attcggtttc gaggagttag  
 3660

tatcaccggt tctggaggct ctcgaactct tcagcatctc tgtgagatgg caattcggtc  
 3720

taagcaagaa ctgctacagc ttgccccaat cgaagtggaa agtaatgtat caagaggatg  
 3780

ccctgaaggc actgaaacct tcgaaaaaga aagcagatga gggaaatggat cttcgatccc  
 3840

# ES 2 389 792 A1

gatcgttcaa acatttggca ataaagtffc ttaagattga atcctgttgc cggctctgcg  
3900

atgattatca tataatcttct gttgaattac gttaagcatg taataattaa catgtaatgc  
3960

atgacgttat ttatgagatg ggTTTTtatg attagagtcc cgcaattata cattaatac  
4020

gcatagaaa acaaaatata gcgcgcaaac taggataaat tatcgcgcdc ggtgtcatct  
4080

atgttactag atcgggaatt gccaaagctaa ttcttgaaga cgaaagggcc tcgtgatagc  
4140

cctatcttta taggttaatg tcatgataat aatggtttct tagacgtcag gtggcacttt  
4200

tcggggaaat gtgcgoggaa ccctatttg tttatcttc taaatacatt caaatatgta  
4260

tcgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa tgggaccgac tcgcgaccgt  
4320

cgatgagaga cctgacagga tatattggcg ggtaactaa gtcgctgtat gtgtttgttt  
4380

gagatctcat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc  
4440

tggcgTTTTT ccataggctc cccccctg acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc  
4500

agaggtggcg aaaccogaca ggactataaa gataccaggc gtttccccct ggaagctccc  
4560

tcgtgcgctc tcctgttccg accctgcgc ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt  
4620

cggaagcgt ggcgctttct catagctcac gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggctg  
4680

ttcgcctcaa gctgggctgt gtgcacgaac cccccgttca gcccgaccgc tgcgccttat  
4740

ccggtaacta tcgtcttgag tccaaccgg taagacacga cttatcgcca ctggcagcag  
4800

ccactggtaa caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt  
4860

ggtggcctaa ctacggctac actagaagaa cagtatttg tatctgcgct ctgctgaagc  
4920

cagttacctt cgaagaaga gttgtagct cttgatccg caaacaacc accgctggta  
4980

gcggtggttt ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgag aaaaaagga tctcaagaag  
5040

atcctttgat cttttctacg gggctgacg ctcagtggaa cgaaaactca cgtaagggg  
5100

ttttggctcat gagattatca aaaaggatct tcacctagat ctttttaaat taaaaatgaa  
5160

ES 2 389 792 A1

gttttaaadc aatctaaagt atatatgtgt aacattggtc tagtgattat ttgccgacta  
5220

ccttggatgat ctgcgctttc acgtagtgga caaattcttc caactgatct gcgcgcgagg  
5280

ccaagcgatc ttcttcttgt ccaagataag cctgtctagc ttcaagtatg acgggctgat  
5340

actggggccgg caggcgctcc attgcccagt cggcagcgac atccttcggc gcgattttgc  
5400

cggttactgc gctgtaccaa atgcgggaca acgtaagcac tacatttcgc tcatcgccag  
5460

cccagtcggg cggcgagtcc catagcgta aggtttcatt tagcgctca aatagatcct  
5520

gttcaggaac cggatcaaag agttcctccg ccgctggacc taccaaggca acgctatggt  
5580

ctcttgcttt tgtcagcaag atagccagat caatgctgat cgtggctggc tcgaagatac  
5640

ctgcaagaat gtcattgcgc tgccattctc caaattgcag ttgcgcgctta gctggataac  
5700

gccacggaat gatgctgctg tgcacaacaa tgggtgacttc tacagcgcgg agaatctcgc  
5760

tctctccagg ggaagccgaa gtttccaaaa ggtcgttgat caaagctcgc cgcgttggtt  
5820

catcaagcct tacggtcacc gtaaccagca aatcaatctc actgtgtggc ttcaggccgc  
5880

catccaactgc ggagccgtac aatgtacgg ccagcaacgt cggttcgaga tggcgctcga  
5940

tgacgccaac tacctctgat agttgagctg atacttcggc gatcaccgct tcctcatga  
6000

tgtttaactt tgttttaggg cgactgccct gctgcgtaac atcgttgctg ctccataaca  
6060

tcaaacatcg acccacggcg taacgcgctt gctgcttggg tgcccagggc atagactgta  
6120

ccccaaaaaa acagtcataa caagccatga aaaccgccac tgcgcccgtta ccaccgctgc  
6180

gttcgggtcaa ggttctggac cagttgcgtg agcgcatacg ctacttgcat tacagcttac  
6240

gaaccgaaca ggcttatgtc cactgggttc gtgccttcat ccgtttccac ggtgtgcgtc  
6300

accggcaac cttgggcagc agcgaagctg aggcatttct gtctggctg ggaacacccc  
6360

ttgtattact gtttatgtaa gcagacagtt ttattgttca tgatgatata tttttatctt  
6420

gtgcaatgta acatcagaga ttttgagaca caacgtggct ttggtgaata aatcgaactt  
6480

## ES 2 389 792 A1

ttgctgagtt gaaggatcag atcacgcac tccccgacaa cgcagaccgt tccgtggcaa  
6540

agcaaaagtt caaaatcacc aactgggtcca cctacaacaa agctctcatc aaccgtggct  
6600

ccctcacttt ctggctggat gatggggcga ttcaggcgat ccccatccaa cagcccggcg  
6660

tcgagcgggc ttttttatcc ccggaagcct gtggatagag ggtagttatc cacgtgaaac  
6720

cgctaatacc ccgcaaagcc ttgattcacg gggctttccg gcccgctcca aaaactatcc  
6780

acgtgaaatc gctaatacag gtacgtgaaa tcgctaatac gactacgtga aatcgtaata  
6840

aaggctcacgt gaaatcgcta atcaaaaagg cacgtgagaa cgctaatagc cttttcagat  
6900

caacagcttg caaacacccc tcgctccggc aagtagttac agcaagtagt atgttcaatt  
6960

agcttttcaa ttatgaatat atatatcaat tattggctgc ccttggcttg tggacaatgc  
7020

gctacggcga ccggctccgc ccgtggacaa ccgcaagcgg ttgccaccgc tcgagcgcca  
7080

gcgcttttgc ccacaacccg gcggccggcc gcaacagatc gttttataaa tttttttttt  
7140

tgaaaaagaa aaagcccga aggcggcaac ctctcgggct tctggatttc cgatccccgg  
7200

aattagagat cttggcagga tatattgtgg tgtaacggtc tcttggc  
7247

<210> 25

<211> 7378

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Vector de expresion de BFP y DsRed bajo sendos promotores 35s

<400> 25

ccactggcac tagagccaag ctgatctcct ttgccccgga gatcaccatg gacgactttc  
60

tctatctcta cgatctagga agaaagtctg acggagaagg tgacgatacc atgttcacca  
120

ccgataatga gaagattagc ctcttcaatt tcagaaagaa tgctgacca cagatgggta  
180

gagaggccta cgcggcaggt ctgatcaaga cgatctacc gagtaataat ctccaggaga  
240

tcaaatacct tccaagaag gttaaagatg cagtcaaaag attcaggact aactgcatca  
300

agaacacaga gaaagatata tttctcaaga tcagaagtac tattccagta tggacgattc

# ES 2 389 792 A1

360

aaggcttgct tcataaacca aggcaagtaa tagagattgg agtctctaag aaagtagttc  
420

ctactgaatc aaaggccatg gagtcaaaaa ttcagatcga ggatctaaca gaactcgccg  
480

tgaagactgg cgaacagttc atacagagtc ttttacgact caatgacaag aagaaaatct  
540

tcgtcaacat ggtggagcac gacactctcg tctactccaa gaatatcaaa gatacagtct  
600

cagaagacca aagggtatt gagacttttc aacaaagggt aatatcggga aacctcctcg  
660

gattccattg cccagctatc tgtcacttca tcaaaaggac agtagaaaag gaagggtggca  
720

cctacaaatg ccatcattgc gataaaggaa aggctatcgt tcaagatgcc tctgccgaca  
780

gtgggtccaa agatggaccc ccaccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa gacgttccaa  
840

ccacgtcttc aaagcaagtg gattgatgtg atatctccac tgacgtaagg gatgacgcac  
900

aatcccacta tccttcgcaa gacccttctt ctatataagg aagttcattt catttgagga  
960

ggactcgggt atttttacaa caataccaca acaaaacaaa caacaacaaa cattacaatt  
1020

tactattcta gtcgagatga gcgagctgat taaggagaac atgcacatga agctgtacat  
1080

ggagggcacc gtggacaacc atcacttcaa gtgcacatcc gagggcgaag gcaagcccta  
1140

cgagggcacc cagaccatga gaatcaaggt ggtcaggggc ggccctctcc ccttcgcctt  
1200

cgacatcctg gctactagct tcctctacgg cagcaagacc ttcatacaacc acaccaggg  
1260

catccccgac ttcttcaage agtccttccc tgagggcttc acatgggaga gagtcaccac  
1320

atacgaagac gggggcgtgc tgaccgctac ccaggacacc agcctccagg acggctgcct  
1380

catctacaac gtcaagatca gagggtgaa cttcacatcc aacggccctg tgatgcagaa  
1440

gaaaacactc ggctgggagg ccttcaccga aacgctgtac cccgctgacg gggcctgga  
1500

aggcagaaac gacatggccc tgaagctcgt gggcgggagc catctgatcg caaacatcaa  
1560

gaccacatat agatccaaga aaccgctaa gaacctcaag atgcctggcg tctactatgt  
1620

ggactacaga ctggaaagaa tcaaggaggc caacaacgag acctacgtcg agcagcacga

# ES 2 389 792 A1

1680

ggtggcagtg gccagatact gcgacctccc tagcaaactg gggcacaagc ttaattgagg  
1740

gaatggatct tcgatcccga tcgttcaaac atttggcaat aaagtttctt aagattgaat  
1800

cctgttgccg gtcttgcgat gattatcata taatttctgt tgaattacgt taagcatgta  
1860

ataattaaca tgtaatgcat gacgttatth atgagatggg tttttatgat tagagtcccg  
1920

caattataca tttaatcgc gatagaaaac aaaatatagc gcgcaaaacta ggataaatta  
1980

tcgcgcdogg tgtcatctat gttactagat cgggaattgc caagctaatt cttgaagacg  
2040

aaagggcctc gtgatacgcc tatttttata ggtaaatgtc atgataataa tggtttctta  
2100

gacgtcaggt ggcacttttc ggggaaatgt gcgcggaacc cctatttggt tatttttcta  
2160

aatacattca aatatgtatc cgctcatgag acaataaccg tgataaatgc ttcaataatg  
2220

ggaccgactc gcgacggcat ggcactagag ccaagctgat ctcttttgcc cgggagatca  
2280

ccatggacga ctttctctat ctctacgatc taggaagaaa gttcgacgga gaaggtgacg  
2340

ataccatggt caccaccgat aatgagaaga ttagcctctt caatttcaga aagaatgctg  
2400

accacagat ggtagagag gcctacgcgg caggtctgat caagacgatc taccgagta  
2460

ataatctcca ggagatcaaa taccttcca agaaggtaa agatgcagtc aaaagattca  
2520

ggactaactg catcaagaac acagagaaaag atatatttct caagatcaga agtactattc  
2580

cagtatggac gattcaaggc ttgcttcata aaccaaggca agtaatagag attggagtct  
2640

ctaagaaagt agttcctact gaatcaaagg ccatggagtc aaaaattcag atcgaggatc  
2700

taacagaact cgccgtgaag actggcgaac agttcataca gagtctttta cgactcaatg  
2760

acaagaagaa aatcttcgtc aacatggtgg agcacgacac tctcgtctac tccaagaata  
2820

tcaaagatac agtctcagaa gaccaaaggg ctattgagac ttttcaacaa agggtaatat  
2880

cgggaaacct cctcggatc cattgccag ctatctgtca cttcatcaaa aggacagtag  
2940

aaaaggaagg tggcacctac aaatgccatc attgcgataa aggaaaggct atcgttcaag

ES 2 389 792 A1

3000

atgcctctgc cgacagtggc cccaaagatg gacccccacc cacgaggagc atcgtggaaa  
3060

aagaagacgt tccaaccacg tcttcaaagc aagtggattg atgtgatatc tccactgacg  
3120

taagggatga cgcacaatcc cactatcctt cgcaagacc ttcctctata taaggaagtt  
3180

catttcattt ggagaggact cgggtatctt tacaacaata ccacaacaaa acaaacaaca  
3240

aacaacatta caatttacta ttctagtcca gatggcctcc tccgagaacg tcatcaccga  
3300

gttcatgcgc ttcaaggtgc gcatggaggg caccgtgaac ggccacgagt tcgagatcga  
3360

gggcgagggc gagggccgcc cctacgaggg ccacaacacc gtgaagctga aggtgaccaa  
3420

gggcgggccc ctgcccttgg cctgggacat cctgtcccc cagttccagt acggctccaa  
3480

ggtgtacgtg aagcaccocg ccgacatccc cgactacaag aagctgtcct tccccgaggg  
3540

cttcaagtgg gagcgcgtga tgaacttcca ggacggcggc gtggcgaccg tgaccacagga  
3600

ctcctccctg caggacggct gcttcatcta caaggtgaag ttcacggcgg tgaacttccc  
3660

ctccgacggc cccgtgatgc agaagaagac gatgggctgg gaggcctcca ccgagcgcct  
3720

gtacccccgc gacggcgtgc tgaagggcga gacacacaag gccctgaagc tgaaggacgg  
3780

cgccactac ctggtggagt tcaagtccat ctacatggcc aagaagcccg tgcagctgcc  
3840

cgctactac tacgtggacg ccaagctgga catcacctcc cacaacgagg actacacat  
3900

cgtggagcag tacgagcga ccgagggccg ccaccacctg ttcctgtagt gagggaatgg  
3960

atcttcgatc ccgatcgttc aaacatttgg caataaagtt tcttaagatt gaatcctggt  
4020

gccgtcttgc cgatgattat catataatct ctggtgaatt acgttaagca tgaataaatt  
4080

aacatgtaat gcatgacggt atttatgaga tgggttttta tgattagagt cccgcaatta  
4140

tacatttaac acgcgataga aaacaaaata tagcgcgcaa actaggataa attatcgcgc  
4200

dccgtgtcat ctatgttact agatcgggaa ttgccaaagct aattcttgaa gacgaaaggg  
4260

cctcgtgata cgcctatctt tatagggttaa tgatcatgata ataatgggtt cttagacgtc

ES 2 389 792 A1

4320

aggTggcact tttcggggaa atgtgcgagg aaccctatt tgtttatfff tctaaataca  
4380

ttcaaataag tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat aatgggaccg  
4440

actcgcgacc gtccgacaga gacctgacag gatataattg cgggtaaact aagtcgctgt  
4500

atgtgtttgt ttgagatctc atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa  
4560

aggccgcggt gctggcgttt ttccatagge tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc  
4620

gacgctcaag tcagaggagg cgaaacccga caggactata aagataccag gcgtttcccc  
4680

ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg  
4740

cctttctccc ttcgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt  
4800

cgggtgtaggt cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga accccccggt cagcccgacc  
4860

gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccg ggtaagacac gacttatcgc  
4920

cactggcagc agccactggt aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag  
4980

agttcttgaa gtggaggcct aactacggct aactagaag aacagtattt ggtatctgcg  
5040

ctctgctgaa gccagttacc ttcggaagaa gagttgtag ctcttgatcc ggcaaacaaa  
5100

ccaccgctgg tagcggagggt tttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaaaag  
5160

gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cggggctctga cgctcagtgg aacgaaaact  
5220

caagtttaagg gattttggtc atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa  
5280

attaaaaatg aagttttaaa tcaatctaaa gtatatatgt gtaacattgg tctagtgatt  
5340

atttgccgac taccttgggt atctcgcctt tcacgtagtg gacaaattct tccaactgat  
5400

ctgcgcgcga ggccaagcga tcttcttctt gtccaagata agcctgtcta gcttcaagta  
5460

tgacgggctg aactcgggcc ggcaggcgct ccattgccca gtcggcagcg acatccttcg  
5520

gcgagatttt gccggttact gcgctgtacc aatgcgggga caacgtaagc actacatttc  
5580

gctcatcgcc agcccagtcg ggcggcgagt tccatagcgt taaggtttca tttagcgcct



ES 2 389 792 A1

5640

caaatagatc ctgttcagga accggatcaa agagttcctc cgccgctgga cctaccaagg  
5700

caacgctatg ttctcttget tttgtcagca agatagccag atcaatgtcg atcgtggctg  
5760

gctcgaagat acctgcaaga atgtcattgc gctgccattc tccaaattgc agttcgcgct  
5820

tagctggata acgccacgga atgatgtcgt cgtgcacaac aatggtgact tctacagcgc  
5880

ggagaatctc gctctctcca ggggaagccg aagtttcaa aaggctgctg atcaaagctc  
5940

gccgcttgt ttcataaage cttacggtca ccgtaaccag caaatcaata tcaactgtgtg  
6000

gcttcaggcc gccatccact ggggagccgt acaaatgtac ggccagcaac gtcggttcga  
6060

gatggcgctc gatgacgcca actacctctg atagttgagt cgatacttcg gcgatcaccg  
6120

cttccctcat gatgtttaac tttgttttag ggcgactgcc ctgctgcgta acatcgttgc  
6180

tgctccataa catcaaacat cgaccacggy cgtaacgcy tgctgcttg gatgcccggg  
6240

gcatagactg taccckaaa aaacagtcac aacaagccat gaaaaccgcc actgcyccgt  
6300

taccaccgct gcgttcggtc aaggttctgg accagttgcy tgagcgcata cgctacttgc  
6360

attacagctt acgaaccgaa caggcttatg tccactgggt tcytgccctc atccgtttcc  
6420

acggtgtgcy tcaccggca accttgggca gcagcgaagt cgaggcattt ctgtcctggc  
6480

tggaacacc cttgtattac tgtttatgta agcagacagt tttattgttc atgatgatat  
6540

atTTTTatct tgtgcaatgt aacatcagag atTTTgagac acaacgtggc tttgttgaat  
6600

aatcgaact tttgctgagt tgaaggatca gatcacgcat cttcccgaca acgcagaccg  
6660

ttcgtggca aagcaaaagt tcaaatcac caactggctc acctacaaca aagctctcat  
6720

caaccgtggc tccctcactt tctggctgga tgatggggcg attcaggcga tcccatcca  
6780

acagcccgcc gtcgagcggg cttttttatc cccggaagcc tgtggataga gggtagttat  
6840

ccacgtgaaa ccgctaagc cccgcaaagc cttgattcac ggggctttcc ggcccgtcc  
6900

aaaaactatc cacgtgaaat cgctaatac ggtacgtgaa atcgtaatc ggagtacgtg

# ES 2 389 792 A1

6960

aaatcgctaa taaggtcacg tgaaatcgct aatcaaaaag gcacgtgaga acgctaatag  
7020

ccctttcaga tcaacagctt gcaaacaccc ctcgctccgg caagtagtta cagcaagtag  
7080

tatgttcaat tagcttttca attatgaata tatatatcaa ttattggctg cccttggtt  
7140

gtggacaatg cgtaacgcg accggctccg cccgtggaca accgcaagcg gttgcccacc  
7200

gtcgagcgcc agcgctttg ccacaaccc ggcgccggc cgcaacagat cgttttataa  
7260

atTTTTTTTT ttgaaaaaga aaaagccga aaggcggcaa cctctcgggc ttctggattt  
7320

ccgatccccg gaattagaga tcttggcagg atatattgtg gtgtaacggt ctctgatg  
7378

<210> 26

<211> 11382

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Vector de expresion de YFP, p19, BFP y DsRed bajo promotores  
35s

<400> 26

tgGCCACTG gCactagagc caagctgac tcctttgccc cggagatcac catggacgac  
60

tttctctatc tctacgatct aggaagaaag ttcgacggag aaggtgacga taccatgttc  
120

accaccgata atgagaagat tagcctcttc aatttcagaa agaatgctga cccacagatg  
180

gttagagagg cctacgcggc aggtctgac aagacgatct acccgagtaa taatctccag  
240

gagatcaaat accttcccaa gaaggttaa gatgcagtca aaagattcag gactaactgc  
300

atcaagaaca cagagaaaga tatatttctc aagatcagaa gtactattcc agtatggacg  
360

attcaaggct tgcttcataa accaaggcaa gtaatagaga ttggagtctc taagaaagta  
420

gttcctactg aatcaaaggc catggagtca aaaattcaga tcgaggatct aacagaactc  
480

gccgtgaaga ctggcgaaca gttcatacag agtcttttac gactcaatga caagaagaaa  
540

atcttcgtca acatggtgga gcacgacact ctcgtctact ccaagaatat caaagataca  
600

gtctcagaag accaaagggc tattgagact tttcaacaaa gggtaatatc gggaaacctc  
660

ES 2 389 792 A1

ctcggattcc attgcccage tatctgtcac ttcataaaaa ggacagtaga aaaggaaggt  
720

ggcacctaca aatgccatca ttgcgataaa ggaaaggcta tcgttcaaga tgcctctgcc  
780

gacagtggtc ccaaagatgg acccccaccc acgaggagca tcgtggaaaa agaagacggt  
840

ccaaccacgt cttcaaagca agtggattga tgtgatatct ccaactgacgt aagggatgac  
900

gcacaatccc actatccttc gcaagaccct tcctctatat aaggaagttc atttcatttg  
960

gagaggactc cggtatTTTT acaacaatac cacaacaaaa caaacacaa acaacattac  
1020

aatttactat tctagtcgag atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtgggtc  
1080

ccatcctggg cgagctggac ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg  
1140

gcgagggcga tgccacctac ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc  
1200

tgcccgtgcc ctggcccacc ctctgtacca ccttcggcta cggcctgaag tgcttgcgcc  
1260

gctaccccga ccacatgaag cagcacgact tcttcaagtc cgccatgcc gaaggetacg  
1320

tccaggagcg caccatcttc ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga  
1380

agttcgaggg cgacaccctg gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg  
1440

acggcaacat cctggggcac aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca  
1500

tggccgacaa gcagaagaac ggcacaaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg  
1560

acggcagcgt gcagctcgcc gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg  
1620

tgctgotgcc cgacaaccac tacctgagct accagtccgc cctgagcaaa gaccccaacg  
1680

agaagcgcga tcacatggtc ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcggca  
1740

tggacgagct ctacaagtca gtcacgagct gagggaatgg atcttcgatc ccgatcgttc  
1800

aaacatttgg caataaagtt tcttaagatt gaatcctgtt gccggctctg cgatgattat  
1860

catataatTT ctgttgaatt acgttaagca tgtaataatt aacatgtaat gcatgacggt  
1920

atttatgaga tgggtTTTTA tgattagagt cccgcaatta tacatttaat acgggataga  
1980

ES 2 389 792 A1

aaacaaaata tagcgcgcaa actaggataa attatcgcgc dcggtgtcat ctatgttact  
2040

agatcgggaa ttgccaagct aattcttgaa gacgaaaggg cctcgtgata cgcctatfff  
2100

tatagggttaa tgtcatgata ataatggttt cttagacgtc aggtggcact tttcggggaa  
2160

atgtgcgagg aaccctatt tgtttatfff tctaaataca ttcaaatatg tatccgctca  
2220

tgagacaata accctgataa atgcttcaat aatgggaccg actcgcgacg gcatggcact  
2280

agagccaagc tgatctcctt tgccccggag atcaccatgg acgactttct ctatctctac  
2340

gatctaggaa gaaagtctga cggagaaggt gacgatacca tgttcaccac cgataatgag  
2400

aagattagcc tcttcaatff cagaaagaat gctgaccac agatgggttag agaggcctac  
2460

gcggcaggtc tgatcaagac gatctaccog agtaataatc tccaggagat caaatacctt  
2520

cccaagaagg ttaaagatgc agtcaaaaga ttcaggacta actgcatcaa gaacacagag  
2580

aaagatatat ttctcaagat cagaagtact attccagtat ggacgattca aggcttgctt  
2640

cataaaccaa ggcaagtaat agagattgga gtctctaaga aagtagttcc tactgaatca  
2700

aaggccatgg agtcaaaaat tcagatcgag gatctaacag aactcgccgt gaagactggc  
2760

gaacagttca tacagagtct tttacgactc aatgacaaga agaaaatctt cgtaacatg  
2820

gtggagcacg aactctcgt ctactccaag aatatcaaag atacagtctc agaagaccaa  
2880

agggtattg agacttttca acaaagggtt atatcgggaa acctcctcgg attccattgc  
2940

ccagctatct gtcacttcat caaaaggaca gtagaaaagg aaggtggcac ctacaaatgc  
3000

catcattgag ataaaggaaa ggctatcgtt caagatgcct ctgcogacag tggccccaaa  
3060

gatggacccc caccacgag gagcatcgtg gaaaaagaag acgttccaac cacgtcttca  
3120

aagcaagtgg attgatgtga tatctccact gacgtaaggg atgacgcaca atcccactat  
3180

ccttcgcaag acccttcctc tatataagga agttcatttc atttggagag gactccggta  
3240

tttttacaac aataccacaa caaaacaaac aacaaacaac attacaatff actattctag  
3300

ES 2 389 792 A1

tcgagatgga acgagctata caaggaaacg acgctagggg acaagctaac agtgaacggt  
3360

gggatggagg atcaggaggt accacttctc ccttcaaact tcttgacgaa agtcogagtt  
3420

ggactgagtg gcggtacat aacgatgaga ctaattcgaa tcaagataat ccccttggtt  
3480

tcaaggaaaag ctggggtttc gggaaagtgt tatttaagag atatctcaga tacgacagga  
3540

cggaagcttc actgcacaga gtccttggat cttggacggg agattcgggt aactatgcag  
3600

catctcgatt tttcggtttc gaccagatcg gatgtaccta tagtattcgg tttcgaggag  
3660

ttagtatcac cgtttctgga ggctctcgaa ctcttcagca tctctgtgag atggcaattc  
3720

ggctcaagca agaactgcta cagcttgccc caatcgaagt ggaaagtaat gtatcaagag  
3780

gatgccctga aggtactgaa accttcgaaa aagaaagcga gtgaggggat ggatcttcga  
3840

tcccgatcgt tcaaacattt ggcaataaag tttcttaaga ttgaatcctg ttgccggctc  
3900

tgcgatgatt atcatataat ttctgttgaa ttacgttaag catgtaataa ttaacatgta  
3960

atgcatgacg ttatttatga gatgggtttt tatgattaga gtcccgcaat tatacattta  
4020

atagcgata gaaaacaaaa tatagcgcgc aaactaggat aaattatcgc gdcgggtgc  
4080

atctatgtta ctagatcggg aattgccaaag ctaattcttg aagacgaaag ggcctcgtga  
4140

tacgcctatt tttataggtt aatgtcatga taataatggt ttcttagacg tcaggtggca  
4200

cttttcgggg aaatgtgcgc ggaacccta tttgtttatt tttctaaata cattcaaata  
4260

tgtatccgct catgagacaa taaccctgat aatgcttca ataatgggac cgactcgcga  
4320

ccgtcgatgc cactggcact agagccaagc tgatctcctt tgccccggag atcaccatgg  
4380

acgactttct ctatctctac gatctaggaa gaaagttcga cggagaaggt gacgatacca  
4440

tgttcaccac cgataatgag aagattagcc tcttcaattt cagaaagaat gctgaccac  
4500

agatggttag agaggcctac gcggcaggtc tgatcaagac gatctaccg agtaataatc  
4560

tccaggagat caaatacctt cccaagaagg ttaaagatgc agtcaaaaga ttcaggacta  
4620

ES 2 389 792 A1

actgcatcaa gaacacagag aaagatatat ttctcaagat cagaagtact attccagtat  
4680

ggacgattca aggcttgctt cataaaccaa ggcaagtaat agagattgga gtctctaaga  
4740

aagtagttcc tactgaatca aaggccatgg agtcaaaaaat tcagatcgag gatctaacag  
4800

aactcgccgt gaagactggc gaacagttca tacagagtct tttacgactc aatgacaaga  
4860

agaaaatctt cgtcaacatg gtggagcacg aactctctgt ctactccaag aatatcaaag  
4920

atacagtctc agaagaccaa agggctattg agacttttca acaaagggtat atatcgggaa  
4980

acctcctcgg attccattgc ccagctatct gtcacttcat caaaaggaca gtagaaaagg  
5040

aagggtggcac ctacaaatgc catcattgcg ataaaggaaa ggctatcgtt caagatgcct  
5100

ctgccgacag tggtoceaaa gatggacccc cacccacgag gagcatcgtg gaaaaagaag  
5160

acgttccaac cacgtottca aagcaagtgg attgatgtga tatctccact gacgtaaggg  
5220

atgacgcaca atcccactat ccttcgcaag acccttcctc tatataagga agttcatttc  
5280

atttggagag gactccggta tttttacaac aataccacaa caaaacaaac aacaacaac  
5340

attacaattt actattctag tcgagatgag cgagctgatt aaggagaaca tgcacatgaa  
5400

gctgtacatg gagggcaccg tggacaacca tcacttcaag tgcacatccg agggcgaagg  
5460

caagccctac gagggcaccg agaccatgag aatcaagggtg gtcgagggcg gccctctccc  
5520

cttcgccttc gacatcctgg ctactagctt cctctacggc agcaagacct tcatcaacca  
5580

caccagggc atccccgact tcttcaagca gtccttccct gagggcttca catgggagag  
5640

agtcaccaca tacgaagacg ggggcgtgct gaccgctacc caggacacca gcctccagga  
5700

cggtgcctc atctacaacg tcaagatcag aggggtgaac ttcacatcca acggccctgt  
5760

gatgcagaag aaaacactcg gctgggaggc cttcaccgaa acgctgtacc ccgctgacgg  
5820

cggcctggaa ggacagaaacg acatggccct gaagctcgtg ggcgggagcc atctgatcgc  
5880

aaacatcaag accacatata gatccaagaa acccgctaag aacctcaaga tgctggcgt  
5940

ES 2 389 792 A1

ctactatgtg gactacagac tggaaagaat caaggaggcc aacaacgaga cctacgtcga  
6000

gcagcacgag gtggcagtgg ccagatactg cgacctccct agcaaactgg gcacaagct  
6060

taattgaggg aatggatctt cgatccccgat cgttcaaaca tttggcaata aagtttctta  
6120

agattgaatc ctgttgcggg tcttgcgatg attatcatat aatttctggt gaattacggt  
6180

aagcatgtaa taattaacat gtaatgcatg acgttattta tgagatgggt ttttatgatt  
6240

agagtccgcg aattatacat ttaatacgcg atagaaaaca aaatatagcg cgcaaactag  
6300

gataaattat cgcgcdcggg gtcactctatg ttactagatc ggaattgcc aagctaattc  
6360

ttgaagacga aagggcctcg tgatacgcct atttttatag gttaatgtca tgataataat  
6420

ggtttcttag acgtcaggtg gcacttttcg gggaaatgtg cgcggaacc ctatttgttt  
6480

atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct  
6540

tcaataatgg gaccgactcg cgacggcatg gcactagagc caagctgatc tcctttgccc  
6600

cggagatcac catggacgac tttctctatc tctacgatct aggaagaaag ttcgacggag  
6660

aaggtgacga taccatgttc accaccgata atgagaagat tagcctcttc aatttcagaa  
6720

agaatgctga cccacagatg gttagagagg cctacgcggc aggtctgatc aagacgatct  
6780

acccgagtaa taatctccag gagatcaaat accttccca gaagggttaa gatgcagtca  
6840

aaagattcag gactaactgc atcaagaaca cagagaaaga tatatttctc aagatcagaa  
6900

gtactattcc agtatggaog attcaaggct tgcttcataa accaaggcaa gtaatagaga  
6960

ttggagtctc taagaaagta gttcctactg aatcaaaggc catggagtca aaaattcaga  
7020

tcgaggatct aacagaactc gccgtgaaga ctggcgaaca gttcatacag agtcttttac  
7080

gactcaatga caagaagaaa atcttcgtca acatggtgga gcacgacact ctcgctact  
7140

ccaagaatat caaagataca gtctcagaag accaaagggc tattgagact tttcaacaaa  
7200

gggtaatatc gggaaacctc ctcgattcc attgccagc tatctgtcac ttcataaaaa  
7260

ES 2 389 792 A1

ggacagtaga aaaggaaggt ggcacctaca aatgccatca ttgcgataaa ggaaaggcta  
7320

tcgttcaaga tgccctctgcc gacagtggtc ccaaagatgg acccccaccc acgaggagca  
7380

tcgtggaaaa agaagacggt ccaaccaogt cttcaaagca agtggattga tgtgatatct  
7440

ccactgacgt aagggatgac gcacaatccc actatccttc gcaagaccct tcctctatat  
7500

aaggaagttc atttcatttg gagaggactc cggatattttt acaacaatac cacaacaaaa  
7560

caaacaacaa acaacattac aatttactat tctagtcgag atggcctcct cggagaacgt  
7620

catcaccgag ttcattgcgt tcaaggtgcy catggagggc accgtgaacg gccacgagtt  
7680

cgagatcgag ggcgagggcg agggccgccc ctacgagggc cacaacaccg tgaagctgaa  
7740

ggtgaccaag ggcggccccc tgcctctgc ctgggacatc ctgtccccc agttccagta  
7800

cggtcccaag gtgtacgtga agcaccocgc cgacatcccc gactacaaga agctgtcctt  
7860

ccccgagggc ttcaagtggg agcgcgtgat gaacttcgag gacggcggcg tggcgaccgt  
7920

gaccocaggac tcctccctgc aggacggctg cttcatctac aaggtgaagt tcatcggcgt  
7980

gaacttcccc tccgacggcc ccgtgatgca gaagaagacg atgggctggg aggcctccac  
8040

cgagcgcctg taccoccgcy acggcgtgct gaagggcgag acacacaagg ccctgaagct  
8100

gaaggacggc ggccactacc tgggtggagtt caagtccatc tacatggcca agaagcccgt  
8160

gcagctgccc ggctactact acgtggacgc caagctggac atcacctccc acaacgagga  
8220

ctacaoccatc gtggagcagt acgagcgcac cgagggccgc caccacctgt tcctgtagtg  
8280

agggaatgga tcttcgatcc cgatcgttca aacatttggc aataaagttt cttagattg  
8340

aatcctgttg ccggtcctgc gatgattatc atataatttc tgttgaatta cgtaagcat  
8400

gtaataatta acatgtaatg catgacgtta tttatgagat gggtttttat gattagagtc  
8460

ccgcaattat acatttaata ccgatagaa aacaaaatat agcgcgcaaa ctaggataaa  
8520

ttatcgcgcd cgggtgcatc tatgttacta gatcgggaat tgccaagcta attcctgaag  
8580



# ES 2 389 792 A1

acgaaagggc ctctgtgatac gcctatTTTT ataggTtaat gTcatgataa taatggTTTc  
8640

ttagacgtca ggtggcactt ttcggggaaa tgtgcgcgga acccctattt gTTTatTTTT  
8700

ctaaatacat tcaaatatgt atccgctcat gagacaataa ccctgataaa Tgcttcaata  
8760

atgggaccga ctctgcgaccg tccgacggca tgagacgtga caggatataT tggcgggTaa  
8820

actaagtctc TgtatgtgTt Tgtttgagat ctcatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc  
8880

aggaaccgta aaaaggccgc gTtgctggcg tttttccata ggctccgcc ccctgacgag  
8940

catcacaAAA atcgcgcctc aagtcagagg Tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac  
9000

caggcgTTTc ccctggaag ctccctcgtg cgctctcctg ttccgaccct gccgcttacc  
9060

ggatacctgt ccgcTTTTcT cccttcggga agcgtggcgc tttctcatag ctcaCgctgt  
9120

aggTatctca gTtcggTgta ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc  
9180

gTtcagcccg accgctgcgc cttatccggt aactatcgtc ttgagtcaa cccggtaaga  
9240

cacgacttat cgccactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta  
9300

ggcggTgcta cagagTtctt gaagtggTgg cctaactacg gctacactag aagaacagta  
9360

tttggTatct gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa gaagagTtgg tagctcttga  
9420

tccggcaaac aaaccaccgc TggtagcggT ggTTTTTTTg tttgcaagca gcagattacg  
9480

cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct ttgatctttt ctacggggTc Tgacgctcag  
9540

Tggaacgaaa actcacgTta agggatTTTg gTcatgagat tatcaaaaag gatcttcacc  
9600

tagatccttt taaattaaaa atgaagTttt aaatcaatct aaagtatata Tgtgtaacat  
9660

TggtctagTg attagaaaaa ctcatcgagc atcaaatgaa actgcaattt attcatatca  
9720

ggattatcaa taccatattt ttgaaaaagc cgTTTctgta atgaaggaga aaactcaccg  
9780

aggcagTtcc ataggatggc aagatcctgg tatcggTctg cgattccgac Tcgtccaaca  
9840

tcaatacaac ctattaattt ccctcgtca aaaataaggt tatcaagtga gaaatcacca  
9900

ES 2 389 792 A1

tgagtgacga ctgaatccgg tgagaatggc aaaagtttat gcatttcttt ccagacttgt  
9960

tcaacaggcc agccattacg ctcgatcaaa aaatcactcg catcaaccaa accgttattc  
10020

attcgtgatt ggcctgagc gagtcgaaat acgcgatcgc tgttaaaagg acaattacaa  
10080

acaggaatcg aatgcaaccg ggcgaggaac actgccagcg catcaacaat attttcacct  
10140

gaatcaggat attcttctaa tacctggaat gctgttttcc ctgggatcgc agtggtgagt  
10200

aaccatgcat catcaggagt acggataaaa tgcttgatgg tcggaagagg cataaattcc  
10260

gtcagccagt ttagtctgac catctcatct gtaacaacat tggcaacgct acctttgcca  
10320

tgtttcagaa acaactctgg cgcacgggc ttcccataca atcggtagat tgtcgcacct  
10380

gattgcccga cattatcgcg agccattta taccatata aatcagcatc catggtggaa  
10440

tttaatcgcg gccttgagca agacgtttcc cgttgaatat ggctcataac accccttgta  
10500

ttactgttta tgtaagcaga cagttttatt gttcatgatg atatattttt atcttgtgca  
10560

atgtaacatc agagattttg agacacaacg tggctttggt gaataaatcg aacttttgct  
10620

gagttgaagg atcagatcac gcatcttccc gacaacgcag accgttccgt ggcaaagcaa  
10680

aagttcaaaa tcaccaactg gtccacctac aacaaagctc tcatcaaccg tggctccctc  
10740

actttctggc tggatgatgg ggcgattcag gcgatcccca tccaacagcc cgccgctgag  
10800

cgggcttttt tatccccgga agcctgtgga tagagggtag ttatccacgt gaaaccgcta  
10860

atgccccgca aagccttgat tcacgggggt ttccggcccg ctccaaaaac tatccacgtg  
10920

aatcgcgtaa tcagggtagc tgaaatcgct aatcggagta cgtgaaatcg ctaataaggt  
10980

cacgtgaaat cgctaataaa aaaggcacgt gagaacgcta atagcccttt cagatcaaca  
11040

gcttgcaaac acccctcgct ccggcaagta gttacagcaa gtagtatggt caattagctt  
11100

ttcaattatg aatatatata tcaattattg gtcgcccttg gcttgtggac aatgcgctac  
11160

gcgcaccggc tccgcccgtg gacaaccgca agcgggtgcc caccgctgag cgccagcgcc  
11220

# ES 2 389 792 A1

tttgcccaca acccggcggc cggccgcaac agatcgtttt ataaattttt ttttttgaaa  
11280

aagaaaaagc ccgaaaggcg gcaacctctc gggcttctgg atttccgatc occggaatta  
11340

gagatcttgg caggatatat tgtgggtgtaa cegtctcacc ac  
11382

<210> 27

<211> 1419

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Promotor y CDS de resistencia a kanamicina de plantas

<400> 27

ggtctcatgg catacatgag aattaagga gtcacgttat gacccccgcc gatgacgcg  
60

gacaagccgt tttacgttcg gaactgacag aaccgcaacg ttgaaggagc cactgagccg  
120

cgggtttctg gagtttaatg agctaagcac atacgtcaga aaccattatt ggcggttcaa  
180

aagtgcgcta aggtcactat cagctagcaa atatttcttg tcaaaaatgc tccactgacg  
240

ttccataaat tcccctcggc atccaattag agtctcatat tcactctcaa ctcgatcgag  
300

gcatgattga acaagatgga ttgcaacgag gttctccggc cgcttgggtg gagaggctat  
360

tcggctatga ctgggcacaa cagacaatcg gctgctctga tgccgccgtg ttcgggctgt  
420

cagcgcaggg gcgcccgggt ctttttgtoa agaccgacct gtccggtgcc ctgaatgaac  
480

tccaagacga ggcagcggc ctatcgtggc tggccacgac gggcgctcct tgcgcagctg  
540

tgctcgacgt tgctactgaa gcgggaaggg actggctgct attgggcgaa gtgccggggc  
600

aggatctcct gtcactcac cttgctcctg ccgagaaagt atccatcatg gctgatgcaa  
660

tgcggcggct gcatacgttt gatccggcta cctgccatt cgaccaccaa gcgaaacatc  
720

gcatcgagcg agcacgtact cggatggaag ccggtcttgt cgatcaggat gatctggacg  
780

aagagcatca ggggctcgcg ctagccgaac tgttcgccag gctcaaggcg cggatgcccg  
840

acggcgagga tctcgtcgtg acccacggcg atgcctgctt gccgaatc atggtggaaa  
900

atggccgctt ttctggattc atcgactgtg gccggctggg tgtggcggac cgctatcagg

# ES 2 389 792 A1

960

acatagcggtt ggctaccocgt gatattgctg aagagccttg cggcgaatgg gctgaccgct  
1020

tcctcgtgct ttacgggtatc gccgctcccg attcgcagcg catcgccttc tatcgccttc  
1080

ttgacgagtt cttctgagcg ggactctggg gttcggactc tagctagagt caagcagatc  
1140

gttcaaacat ttggcaataa agtttcttaa gattgaatcc tgttgccggt cttgcgatga  
1200

ttatcatata atttctggtg aattacgtta agcatgtaat aattaacatg taatgcatga  
1260

cgttatttat gagatggggtt tttatgatta gagtcccgca attatacatt taatcgcga  
1320

tagaaaacaa aatatagcgc gcaaactagg ataaattatc gcgcgcgggtg tcactatgt  
1380

tactagatcg accggcatgc aagctgattg agtgagacc  
1419

<210> 28

<211> 3697

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Promtor 35s

<400> 28

tcactgcttc accacactag agccaagctg atctccttg ccccggagat caccatggac  
60

gactttctct atctctacga tctaggaaga aagttcgacg gagaaggtga cgataccatg  
120

ttcaccaccg ataatgagaa gattagcctc ttcaatttca gaaagaatgc tgaccacag  
180

atggttagag aggcctacgc ggcaggtctg atcaagacga tctaccgag taataatctc  
240

caggagatca aataccttcc caagaagggt aaagatgcag tcaaaagatt caggactaac  
300

tgcatcaaga acacagagaa agatatattt ctcaagatca gaagtactat tccagtatgg  
360

acgattcaag gcttgcttca taaaccaagg caagtaatag agattggagt ctctaagaaa  
420

gtagttccta ctgaatcaaa ggccatggag tcaaaaattc agatcgagga tctaacagaa  
480

ctcgccgtga agactggcga acagttcata cagagtcttt tacgactcaa tgacaagaag  
540

aaaatcttcg tcaacatggt ggagcacgac actctcgtct actccaagaa tatcaagat  
600

ES 2 389 792 A1

acagtctcag aagaccaaag ggctattgag acttttcaac aaagggtaat atcgggaaac  
660

ctcctcggat tccattgccc agctatctgt cacttcatca aaaggacagt agaaaaggaa  
720

ggtggcacct acaaatgcca tcattgcat aaaggaaagg ctatcgttca agatgcctct  
780

gccgacagtg gtcccaaaga tggaccccca cccacgagga gcacgtgga aaaagaagac  
840

gttccaacca cgtcttcaaa gcaagtggat tgatgtgata tctccactga cgtaagggat  
900

gacgcacaat cccactatcc ttcgcaagac ccttctctta tataaggaag ttcatttcat  
960

ttggagagga ctccgggtatt ttacaacaa taccacaaca aaacaacaa caaacacat  
1020

tacaatttac tattctagtc gagatgggca cttctctgt ttttctacta ttccttcttt  
1080

cttttcttct ccttctcccg tccctccttg cctgagacgt gcctgacagg atatattggc  
1140

gggtaaacta agtcgctgta tgtgtttggt tgagatctca tgtgagcaaa aggccagcaa  
1200

aaggccagga accgtaaaaa ggccgcggtg ctggcgtttt tccataggct ccgccccct  
1260

gacgagcatc acaaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac aggactataa  
1320

agataccagg cgtttcccc tggaaagctcc ctctgctgct ctctgttcc gaccctgccc  
1380

cttaccggat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgcttcc tcatagctca  
1440

cgctgtagggt atctcagttc ggtgtaggtc gttcgtcca agctgggctg tgtgcacgaa  
1500

cccccgttc agcccgaccg ctgcgcctta tccgtaact atcgtcttga gtccaaccgg  
1560

gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg  
1620

tatgtaggag gtgctacaga gttcttgaag tgggtgccta actacggcta cactagaaga  
1680

acagtatttg gtatctgccc tctgctgaag ccagttacct tcggaagaag agttggtagc  
1740

tcttgatccg gcaaacaaac caccgctggg agcgggtggt tttttgtttg caagcagcag  
1800

attacgcgca gaaaaaagg atctcaagaa gatccttga tcttttctac ggggtctgac  
1860

gctcagtgga acgaaaactc acgtaaggg attttggcca tgagattatc aaaaaggatc  
1920

ES 2 389 792 A1

ttcacctaga tccttttaaa ttaaaaatga agtttttaat caatctaaag tatatatgtg  
 1980  
 taacattggt ctagtgatta gaaaaactca tcgagcatca aatgaaactg caattttattc  
 2040  
 atatcaggat tatcaatacc atatttttga aaaagccggt tctgtaatga aggagaaaaa  
 2100  
 tcaccgaggc agttccatag gatggcaaga tcctggtatc ggtctgcatc tccgactcgt  
 2160  
 ccaacatcaa tacaacctat taatttcccc tcgtcaaaaa taaggttatc aagtgagaaa  
 2220  
 tcaccatgag tgacgactga atccggtgag aatggcaaaa gtttatgcat ttctttccag  
 2280  
 acttgttcaa caggccagcc attacgctcg tcatcaaaat cactcgcac c aaccaaacccg  
 2340  
 ttattcattc gtgattgccc ctgagcgagt cgaaatacgc gatcgctggt aaaaggacaa  
 2400  
 ttacaaacag gaatcgaatg caaccggcgc aggaacactg ccagcgcac c aacaatattt  
 2460  
 tcacctgaat caggatattc ttctaatacc tggaatgctg ttttccctgg gatcgagctg  
 2520  
 gtgagtaacc atgcatcac aggagtacgg ataaaatgct tgatggctcg aagaggcata  
 2580  
 aattccgtca gccagtttag tctgaccatc tcactctgtaa caacattggc aacgctacct  
 2640  
 ttgccatggt tcagaaacaa ctctggcgca tcgggcttcc catacaatcg gtagattgtc  
 2700  
 gcacctgatt gcccgacatt atcgcgagcc cattataacc catataaatc agcatccatg  
 2760  
 ttggaattta atcggggcct tgagcaagac gtttcccggt gaatatggct cataacacc  
 2820  
 cttgtattac tgtttatgta agcagacagt tttattgttc atgatgatat atttttatct  
 2880  
 tgtgcaatgt aacatcagag attttgagac acaacgtggc tttgttgaat aaatcgaact  
 2940  
 tttgctgagt tgaaggatca gatcacgcat cttcccgaca acgcagaccg ttccgtggca  
 3000  
 aagcaaaagt tcaaaatcac caactggctc acctacaaca aagctctcat caaccgtggc  
 3060  
 tcctcactt tctggetgga tgatggggcg attcaggcga tccccatcca acagcccgcc  
 3120  
 gtcgagcggg cttttttatc cccggaagcc tgtggataga gggtagttat ccacgtgaaa  
 3180  
 ccgctaatagc cccgcaaagc cttgattcac ggggctttcc ggcccgcctc aaaaactatc  
 3240

ES 2 389 792 A1

cacgtgaaat cgctaatacag ggtacgtgaa atcgctaatac ggagtacgtg aaatcgctaa  
3300

taaggtcacg tgaatacgcct aatcaaaaag gcacgtgaga acgctaatac ccctttcaga  
3360

tcaacagctt gcaaacaccc ctgcctccgg caagtagtta cagcaagtag tatgttcaat  
3420

tagcttttca attatgaata tatatatcaa ttattggtcg cccttggctt gtggacaatg  
3480

cgctacgcgc accggctcgc cccgtggaca accgcaagcg gttgcccacc gtcgagcgcc  
3540

agcgcctttg ccacaacccc ggcgccggc cgcaacagat cgttttataa atttttttt  
3600

ttgaaaaaga aaaagcccca aaggcggcaa cctctcgggc ttctggattt cogatccccg  
3660

gaattagaga tcttggcagg atatattgtg gtgtaac  
3697

<210> 29

<211> 3419

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Precursor Pieza Region constante de la Cadena ligera lambda de  
la

IgA fusionada con el terminador de la nopalina sintasa

<400> 29

tgcctgacag gatataattgg cgggtaaaact aagtcgctgt atgtgtttgt ttgagatctc  
60

atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgctt gctggcgctt  
120

ttccataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg  
180

cgaaacccga caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc  
240

tctcctgttc cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg cctttctccc ttcggaagc  
300

gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggc cgttcgcctc  
360

aagctgggct gtgtgcacga accccccgtt cagccccgacc gctgcgcctt atccggtaac  
420

tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggc  
480

aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtggggcct  
540

aactacggct aactagaag aacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc  
600

ES 2 389 792 A1

ttcgggaagaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaacaaa ccaccgctgg tagcgggtggt  
660

ttttttgttt gcaagcagca gattacgcbc agaaaaaag gatctcaaga agatcctttg  
720

atcttttcta cggggtctga cgctcagtg aacgaaaact cacgttaagg gattttggtc  
780

atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa attaaaaatg aagttttaaa  
840

tcaatctaaa gtatatatgt gtaacattgg tctagtatt agaaaaactc atcgagcatc  
900

aaatgaaact gcaatttatt catatcagga ttatcaatac catatttttg aaaaagccgt  
960

ttctgtaatg aaggagaaaa ctccaccgagg cagttccata ggatggcaag atcctgggat  
1020

cggtctgcga ttccgactcg tccaacatca atacaaccta ttaatttccc ctctgcaaaa  
1080

ataaggttat caagtgagaa atcaccatga gtgacgactg aatccggtga gaatggcaaa  
1140

agtttatgca tttctttcca gacttgttca acaggccagc cattacgctc gtcacaaaa  
1200

tcactcgcac caaccaaacc gttattcatt cgtgattgcg cctgagcgag tcgaaatagc  
1260

cgatcgcgtg taaaaggaca attacaaaca ggaatcgaat gcaaccggcg caggaacact  
1320

gccagcgcac caacaatatt ttcacctgaa tcaggatatt cttctaatac ctggaatgct  
1380

gttttccctg ggatcgcagt ggtgagtaac catgcatcat caggagtacg gataaaatgc  
1440

ttgatggctg gaagaggcat aaattccgct agccagtta gtctgacct ctcactctgta  
1500

acaacattgg caacgctacc tttgcatgt ttcagaaaca actctggcgc atcgggcttc  
1560

ccatacaatc ggtagattgt cgcacctgat tgcccagacat tatcgcgagc ccatttatac  
1620

ccatataaat cagcatccat gttggaatth aatcgcggcc ttgagcaaga cgtttcccgt  
1680

tgaatatggc tcataacacc ccttgatta ctgtttatgt aagcagacag ttttattggt  
1740

catgatgata tatttttatc ttgtgcaatg taacatcaga gattttgaga cacaacgtgg  
1800

ctttgttgaa taaatogaac tttgctgag ttgaaggatc agatcacgca tcttcccagc  
1860

aacgcagacc gttccgtggc aaagcaaaag ttcaaaatca ccaactggtc cacctacaac  
1920



# ES 2 389 792 A1

aaagctctca tcaaccgtgg ctccctcact ttctggctgg atgatggggc gattcagggc  
1980

atccccatcc aacagcccgc cgtcgagcgg gcttttttat ccccggaagc ctgtggatag  
2040

agggtagtta tccacgtgaa accgctaata ccccgcaaag ccttgattca cggggctttc  
2100

cggcccgtc caaaaactat ccacgtgaaa tcgctaata gggtagctga aatcgctaata  
2160

cggagtacgt gaaatcgcta ataaggctcac gtgaaatcgc taatcaaaaa ggcacgtgag  
2220

aacgctaata gccctttcag atcaacagct tgcaaacacc cctcgctccg gcaagtagtt  
2280

acagcaagta gtatgttcaa ttagcttttc aattatgaat atatatatca attattggtc  
2340

gcccttggct tgtggacaat gcgctacgag caccggtccc gcccgtagac aaccgcaagc  
2400

ggttgcccac cgtcgagcgc cagcgccttt gccacaacc cggcggccgg ccgcaacaga  
2460

tcgttttata aatttttttt tttgaaaag aaaaagcccg aaaggcggca acctctcggg  
2520

cttctggatt tccgatcccc ggaattagag atcttggcag gatataattgt ggtgtaactc  
2580

atcgtctcaa ggtggtaaac caaaggccgc cccctctgtc actctgttcc cgccctcctc  
2640

tgaggagctc caagccaaca aggccacact agtgtgtctg atcagtgact tctaccggg  
2700

agctgtgaca gtggcctgga aggcagatgg cagccccgtc aaggcgggag tggagacaac  
2760

caaaccctcc aaacagagca acaacaagta cgcggccagc agctacctga gcctgacgcc  
2820

cgagcagtg gagtcccaca gaagctacag ctgccaggtc acgcatgaag ggagcaccgt  
2880

ggagaagaca gtggccccta cagaatgttc atgagggaaat ggatcttcga tccgatcgt  
2940

tcaaacattt ggcaataaag tttcttaaga ttgaatcctg ttgccggtct tgcgatgatt  
3000

atcatataat ttctgttgaa ttacgttaag catgtaataa ttaacatgta atgcatgacg  
3060

ttatttatga gatgggtttt tatgattaga gtcccgaat tatacattta atacgcgata  
3120

gaaaacaaaa tatagcgcgc aaactaggat aaattatcgc gcdcgggtgc atctatgtta  
3180

ctagatcggg aattgccaag ctaattcttg aagacgaaag ggcctcgtga tacgcctatt  
3240

# ES 2 389 792 A1

tttatagggt aatgtcatga taataatggt ttcttagacg tcaggtggca cttttcgggg  
3300

aatgtgctgc ggaaccoccta tttgtttatt tttctaaata cattcaaata tgtatccgct  
3360

catgagacaa taaccctgat aatgcttca ataatgggac cgactcgccg tctgagacg  
3419

<210> 30

<211> 3422

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Precursor Pieza Region constante de la Cadena ligera kappa de  
la

IgA fusionada con el terminador de la nopalina sintasa

<400> 30

tcatcgtctc aaggtaggac tgttgctgct ccatctgttt ttatttttcc accatctgat  
60

gaacaactta aatctggaac tgcttctggt gtttgccttc ttaataattt ttatccaaga  
120

gaagctaaag ttcaatggaa agttgataat gctcttcaat ctggaaattc tcaagaatct  
180

gttactgaac aagattctaa agattctact tattctcttt cttctactct tactctttct  
240

aaagctgatt atgaaaaaca taaagtttat gcttgatgaag ttactcatca aggactttct  
300

tctccagtta ctaaattcttt taatagagga gaatgttgag ggaatggatc ttcgatcccc  
360

atcgttcaaa catttggaac taaagtttct taagattgaa tcctggtgcc ggtcttgcca  
420

tgattatcat ataatttctg ttgaattacg ttaagcatgt aataattaac atgtaatgca  
480

tgacgttatt tatgagatgg gtttttatga ttagagtccc gcaattatac atttaatac  
540

cgatagaaaa caaaatatag cgcgcaaact aggataaatt atcgcgcgdcg gtgtcatcta  
600

tgttactaga tcgggaattg ccaagctaat tcttgaagac gaaagggcct cgtgatacgc  
660

ctatttttat aggttaatgt catgataata atggtttctt agacgtcagg tggcactttt  
720

cggggaaatg tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct aaatacattc aaatatgtat  
780

ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg cttcaataat gggaccgact cgccgtctga  
840

gacgtgcctg acaggatata ttggcgggta aactaagtcg ctgtatgtgt ttgtttgaga  
900

ES 2 389 792 A1

tctcatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc  
960

gtttttccat aggctcggcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtcagag  
1020

gtggcgaaac cggacaggac tataaagata ccaggcgttt ccccctggaa gctccctcgt  
1080

gcgctctcct gtccgacccc tgccgcttac cggatacctg tccgcctttc tcccttcggg  
1140

aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg aggtcgttcg  
1200

ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg ccttatccgg  
1260

taactatcgt cttgagtcca acccggtaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac  
1320

tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt aggcggtgct acagagttct tgaagtgggtg  
1380

gcctaactac ggctacacta gaagaacagt atttggtatc tgcgctctgc tgaagccagt  
1440

taccttcgga agaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg  
1500

tggttttttt gtttgcaagc agcagattac ggcgagaaaa aaaggatctc aagaagatcc  
1560

tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt aagggatttt  
1620

ggtcattgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaaa aatgaagttt  
1680

taaatcaatc taaagtatat atgtgtaaca ttggtctagt gattagaaaa actcatcgag  
1740

catcaaatga aactgcaatt tattcatatc aggattatca ataccatatt tttgaaaaag  
1800

ccgtttctgt aatgaaggag aaaactcacc gaggcagttc cataggatgg caagatcctg  
1860

gtatcgggtc gcgattccga ctcgctccaac atcaatacaa cctattaatt tcccctcgtc  
1920

aaaaataagg ttatcaagtg agaaatcacc atgagtgacg actgaatccg gtgagaatgg  
1980

caaaagttta tgcattttct tccagacttg ttcaacaggc cagccattac gctcgtcatc  
2040

aaaatcactc gcatcaacca aaccgttatt cattcgtgat tgcgcctgag cgagtcgaaa  
2100

tacgcgatcg ctgttaaaag gacaattaca aacaggaatc gaatgcaacc ggcgcaggaa  
2160

cactgccagc gcatcaacaa tattttcacc tgaatcagga tattcttcta atacctggaa  
2220

ES 2 389 792 A1

tgctgttttc cctgggatcg cagtggtag taaccatgca tcatcaggag tacggataaa  
2280

atgcttgatg gtcggaagag gcataaattc cgtcagccag tttagtctga ccatctcatc  
2340

tgtaacaaca ttggcaacgc tacctttgcc atgtttcaga aacaactctg ggcgatcggg  
2400

cttcccatac aatcggtaga ttgtcgcacc tgattgcccg acattatcgc gagcccattt  
2460

atacccatat aaatcagcat ccatgttgga atttaatcgc ggccttgagc aagacgtttc  
2520

ccgttgaata tggctcataa caccocctgt attactgttt atgtaagcag acagttttat  
2580

tgttcatgat gatataatct tatcttctgc aatgtaacat cagagatttt gagacacaac  
2640

gtggctttgt tgaataaatc gaacttttgc tgagttgaag gatcagatca cgcactctcc  
2700

cgacaacgca gaccgttccg tggcaaagca aaagttcaaa atcaccaact ggtccaccta  
2760

caacaaagct ctcatcaacc gtggctccct cactttctgg ctggatgatg gggcgattca  
2820

ggcgatcccc atccaacagc ccgccgtcga gggggctttt ttatccccgg aagcctgtgg  
2880

atagagggta gttatccacg tgaaccgct aatgccccgc aaagccttga ttcacggggc  
2940

tttccggccc gctccaaaaa ctatccaagt gaaatcgcta atcagggtag gtgaaatcgc  
3000

taatcggagt acgtgaaatc gctaataagg tcacgtgaaa tcgctaatca aaaaggcacg  
3060

tgagaacgct aatagccctt tcagatcaac agcttgcaaa caccctcgc tccggcaagt  
3120

agttacagca agtagtatgt tcaattagct tttcaattat gaatatata atcaattatt  
3180

ggtcgccctt ggcttctgga caatgcgcta cgcgcaccgg ctccgccctg ggacaaccgc  
3240

aagcggttgc ccaccgtcga ggcaccagcg ctttgccac aaccggcgg cgggccgcaa  
3300

cagatcgttt tataaatttt ttttttgaa aaagaaaaag cccgaaaggc ggcaacctct  
3360

cgggcttctg gatttccgat ccccggaatt agagatcttg gcaggatata ttgtgggtga  
3420

ac  
3422

<210> 31  
<211> 4168

## ES 2 389 792 A1

<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Precursor Pieza Region constante de la Cadena pesada alfa 1 de la IgA fusionada con el terminador de la nopalina sintasa

<400> 31  
tgcctgacag gatataattgg cgggtaaact aagtcgctgt atgtgtttgt ttgagatctc  
60  
atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcggt gctggcgttt  
120  
ttccataggc tcggccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagagggtg  
180  
cgaaaccga caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc  
240  
tctcctgttc cgaccctgcc gcttacggga tacctgtccg ctttctccc ttcgggaagc  
300  
gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtagt cgttcgctcc  
360  
aagctgggct gtgtgcacga acccccggt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac  
420  
tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt  
480  
aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtgggtggcct  
540  
aactacggct aactagaag aacagtattt ggtatctgog ctctgctgaa gccagttacc  
600  
ttcgggaaga gaggtaggag ctcttgatcc ggcaaacaaa ccaccgctgg tagcgggtgg  
660  
ttttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaag gatctcaaga agatcctttg  
720  
atcttttcta cggggtctga cgctcagtgg aacgaaaact cacgttaagg gattttggtc  
780  
atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa attaaaaatg aagttttaaa  
840  
tcaatctaaa gtatatatgt gtaacattgg tctagtgatt agaaaaactc atcgagcatc  
900  
aatgaaact gcaatttatt catatcagga ttatcaatac catatttttg aaaaagcgt  
960  
ttctgtaatg aaggagaaaa ctaccgagg cagttccata ggatggcaag atcctgggat  
1020  
cggctcgcga ttccgactcg tccaacatca atacaaceta ttaatttccc ctctcaaaaa  
1080  
ataaggttat caagtgagaa atcaccatga gtgacgactg aatccgggtg gaatggcaaa  
1140

ES 2 389 792 A1

agtttatgca tttctttcca gacttgttca acaggccagc cattacgctc gtcatacaaaa  
1200

tcactcgcat caaccaaac gttattcatt cgtgattgcg cctgagcgag tcgaaatac  
1260

cgatcgctgt taaaaggaca attacaaaaca ggaatcgaat gcaaccggcg caggaacact  
1320

gccagcgcat caacaatatt ttcaoctgaa tcaggatatt cttctaatac ctggaatgct  
1380

gttttccctg ggatcgcagt ggtgagtaac catgcatcat caggagtacg gataaaaatgc  
1440

ttgatggctg gaagaggcat aaattccgctc agccagttta gtctgaccat ctcatctgta  
1500

acaacattgg caacgctacc tttgccatgt ttcagaaaca actctggcgc atcgggcttc  
1560

ccatacaatc ggtagattgt cgcacctgat tgcccacat tatcgcgagc ccatttatac  
1620

ccatataaat cagcatccat gttggaattt aatcgcggcc ttgagcaaga cgtttcccgt  
1680

tgaatatggc tcataacacc ccttgtatta ctgtttatgt aagcagacag ttttattggt  
1740

catgatgata tatttttatac ttgtgcaatg taacatcaga gattttgaga cacaacgtgg  
1800

ctttgttgaa taaatcgaac ttttgctgag ttgaaggatc agatcacgca tottcccagc  
1860

aacgcagacc gttccgtggc aaagcaaaaag ttcaaaaatca ccaactggctc cacctacaac  
1920

aaagctctca tcaacogtgg ctccctcaact ttctggctgg atgatggggc gattcaggcg  
1980

atccccatcc aacagcccgc cgtcgcgagcg gcttttttat ccccggaagc ctgtggatag  
2040

agggtagtta tccacgtgaa accgctaatz ccccgcaaag ccttgattca cggggctttc  
2100

cgggccgctc caaaaactat ccacgtgaaa tcgctaataca gggtagctga aatcgctaata  
2160

cgtagtacgt gaaatcgcta ataaggctac gtgaaatcgc taatcaaaaa ggcacgtgag  
2220

aacgctaata gccctttcag atcaacagct tgcaaacacc cctcgctccg gcaagtagtt  
2280

acagcaagta gtatgttcaa ttagcttttc aattatgaat atatataca attattggct  
2340

gcccttggct tgtggacaat gcgctacgag caccggctcc gcccgtaggac aaccgcaagc  
2400

ggttgccac cgtcgcgagc cagcgccttt gccacaacc cggcgccggc cgcacaacaga  
2460

ES 2 389 792 A1

tcgttttata aatTTTTTTTT tttgaaaaag aaaaagcccc aaaggcggca acctctcggg  
2520

cttctggatt tccgatcccc ggaattagag atcttggcag gatataattgt ggtgtaactc  
2580

atcgtctcag catccccgac cagccccaaag gtcttccccg tgagcctctg cagcacccag  
2640

ccagatggga acgtgggtcat cgctgcctg gtccagggct tcttccccca ggagccactc  
2700

agtgtgacct ggagcgaaag cggacagggc gtgaccgcca gaaacttccc acccagccag  
2760

gatgcctcgg gggacctgta caccacgagc agccagctga ccctgccggc cacacagtgc  
2820

ctagccggca agtccgtgac atgccacgtg aagcactaca cgaatcccag ccaggatgtg  
2880

actgtgccct gccagttcc ctcaactcca cctaccccat ctccctcaac tccacctacc  
2940

ccatctccct catgctgcca cccccgactg tcaactgcacc gaccggccct tgaggacctg  
3000

ctcttaggtt cagaagcgaa cctcacgtgc acaactgaccg gcctgagaga tgcctcaggt  
3060

gtcaccttca cctggacgcc ctcaagtggg aagagcgctg ttcaaggacc acctgagcgt  
3120

gacctctgtg gctgctacag cgtgtccagt gtccctgccgg gctgtgccga gcottggaat  
3180

catgggaaga ccttcaactg cactgctgcc taccocgagt ccaagacccc gctaaccgcc  
3240

accctctcaa aatccggaaa cacattccgg cccgaggtcc acctgctgcc gccgccgtcg  
3300

gaggagctgg ccctgaacga gctggtgacg ctgacgtgcc tggcacgtgg cttcagcccc  
3360

aaggatgtgc tggttcgctg gctgcagggg tcacaggagc tgccccgca gaagtacctg  
3420

acttgggcat cccggcagga gccagccag ggcaccacca ccttcgctgt gaccagcata  
3480

ctgcgcgtgg cagccgagga ctggaagaag ggggacacct tctcctgcat ggtgggccac  
3540

gaggccctgc cgttggcctt cacacagaag accatcgacc gottggcggg taaaccacc  
3600

catgtcaatg tgtctgttgt catggcggag gtggacggca cctgctacaa ggacgaactc  
3660

tgagggaatg gatcttcgat cccgatcgtt caaacatttg gcaataaagt ttcttaagat  
3720

tgaatcctgt tgccggctct gcgatgatta tcatataatt tctgttgaat tacgttaagc  
3780

# ES 2 389 792 A1

atgtaataat taacatgtaa tgcacgacgt tatttatgag atgggttttt atgattagag  
3840

tcccgcgaatt atacatttaa tacgcgatag aaaacaaaat atagcgcgca aactaggata  
3900

aattatcgcg odcggtgtca tctatgttac tagatcggga attgccaagc taattcttga  
3960

agacgaaagg gcctcgtgat acgcctatct ttataggtta atgtcatgat aataatggtt  
4020

tcttagacgt cagggtggcac ttttcgggga aatgtgcgcg gaaccctat ttgtttatct  
4080

ttctaaatac attcaaatat gtatccgctc atgagacaat aaccctgata aatgcttcaa  
4140

taatgggacc gactcgcctg ctgagacg  
4168

<210> 32  
<211> 4120  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Precursor Pieza Region constante de la Cadena pesada alfa2 de  
la  
IgA fusionada con el terminador de la nopalina sintasa

<400> 32  
tcatcgtctc agcatgcatc cccgaccagc cccaaggctt tcccgtgag cctcgacagc  
60

accccccaag atgggaacgt ggtcgtcgca tgcctggctc agggcttctt cccccaggag  
120

ccactcagtg tgacctggag cgaaagcgga cagaacgtga cgcagagaa cttcccacct  
180

agccaggatg cctccgggga cctgtacacc acgagcagcc agctgacct gccggccaca  
240

cagtgccagc acggcaagtc cgtgacatgc cacgtgaagc actacacgaa tcccagccag  
300

gatgtgactg tgccctgccc agtccccca cctcccccat gctgccacc cgcactgtcg  
360

ctgcaccgac cggccctcga ggacctgctc ttaggttcag aagcgaacct cacgtgcaca  
420

ctgaccggcc tgagagatgc ctctggtgcc accttcacct ggacgcctc aagtgggaag  
480

agcgtgttc aaggaccacc tgagcgtgac ctctgtggct gctacagcgt gtccagtgtc  
540

ctgcctggct gtgccagcc atggaacct ggggaaacct tcacctgcac tgctgccacc  
600

cccagttga agacccact aaccgccaac atcacaaaat ccggaacac attccggccc  
660



# ES 2 389 792 A1

gaggtocacc tgctgccc gccgtcggag gagctggccc tgaacgagct ggtgacgctg  
720

acgtgcctgg cacgtggctt cagccccaag gatgtgctgg ttcgctggct gcaggggtca  
780

caggagctgc cccgcgagaa gtacctgact tgggcatccc ggcaggagcc cagccagggc  
840

accaccacct tcgctgtgac cagcatactg cgcgtggcag ccgaggactg gaagaagggg  
900

gacaccttct cctgcatggt gggccacgag gccctgccgc tggccttcac acagaagacc  
960

atcgaccgct tggcgggtaa acccaccat gtcaatgtgt ctggtgtcat ggcggaggtg  
1020

gacggcacct gctatgaggg aatggatctt cgatcccgat cgttcaaaca tttggcaata  
1080

aagtttctta agattgaatc ctggtgccgg tcttgcatg attatcatat aatttctggt  
1140

gaattacggt aagcatgtaa taattaacat gtaatgcatg acgttattta tgagatgggt  
1200

ttttatgatt agagtccgc aattatacat ttaatacgcg atagaaaaca aaatatagcg  
1260

cgcaaactag gataaattat cgcgcocggg gtcacatctatg ttactagatc ggggaattgcc  
1320

aagctaattc ttgaagacga aagggcctcg tgatacgctt atttttatag gttaatgtca  
1380

tgataataat ggtttcttag acgtcagggtg gcacttttcg gggaaatgtg cgcggaaacc  
1440

ctatgtgttt atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct  
1500

gataaatgct tcaataatgg gaccgactcg ccgtctgaga cgtgcctgac aggatatatt  
1560

ggcgggtaaa ctaagtcgct gtatgtgttt gtttgagatc tcatgtgagc aaaaggccag  
1620

caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc  
1680

cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaacc cagaggacta  
1740

taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc tcctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg  
1800

ccgcttaccg gataoctgtc cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgtt ttctcatagc  
1860

tcacgctgta ggtatctcag ttcggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac  
1920

gaacccccg ttcagcccga ccgctgcgcc ttatccggta actatcgtct tgagtccaac  
1980

ES 2 389 792 A1

ccggtaagac acgacttata gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg  
2040

aggtatgtag gcgggtgctac agagttcttg aagtgggtggc ctaactacgg ctacactaga  
2100

agaacagtat ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta ccttcggaag aagagttggt  
2160

agctcttgat cgggcaaaca aaccaccgct ggtagcgggtg gtttttttgg ttgcaagcag  
2220

cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacgggggtct  
2280

gacgctcagt ggaacgaaaa ctacagttaa gggatTTTTGG tcatgagatt atcaaaaagg  
2340

atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat  
2400

gtgtaacatt ggtctagtga ttagaaaaac tcatcgagca tcaaatgaaa ctgcaattta  
2460

ttcatatcag gattatcaat accatatttt tgaaaaagcc gtttctgtaa tgaaggagaa  
2520

aactcaccga ggcagttcca taggatggca agatcctggg atcgggtctgc gattccgact  
2580

cgccaacat caatacaacc tattaatttc cctcgtcaa aaataaggtt atcaagtgag  
2640

aaatcaccat gagtgacgac tgaatccggg gagaatggca aaagtttatg ctttctttc  
2700

cagacttggt caacaggcca gccattacgc tcgtcatcaa aatcactcgc atcaaccaa  
2760

ccgttattca ttcgtgattg cgcctgagcg agtcgaaata cgcgatcgtc gttaaaagga  
2820

caattacaaa caggaatcga atgcaaccgg cgcaggaaca ctgccagcgc atcaacaata  
2880

ttttcacctg aatcaggata ttcttctaata acctggaatg ctgttttccc tgggatcgc  
2940

gtgggtgagta accatgcata atcaggagta cggataaaat gcttgatggt cgggaagaggc  
3000

ataaattccg tcagccagtt tagtctgacc atctcatctg taacaacatt ggcaacgcta  
3060

cctttgccat gtttcagaaa caactctggc gcacggggct tccatacaa tcggtagatt  
3120

gtcgcacctg attgcccagc attatcgcga gccatttat acccatataa atcagcatcc  
3180

atgttggaat ttaatcggg ccttgagcaa gacgtttccc gttgaatatg gctcataaca  
3240

cccttggat tactgtttat gtaagcagac agttttattg ttcgatgata tatattttta  
3300

# ES 2 389 792 A1

tcttgtgcaa tgtaacatca gagattttga gacacaacgt ggctttgttg aataaatoga  
3360

acttttgctg agttgaagga tcagatcacg catcttcccg acaacgcaga cgttccgtg  
3420

gcaaagcaaa agttcaaaaat caccaactgg tccacctaca acaaagctct catcaacogt  
3480

ggctccctca ctttctggct ggatgatggg gcgattcagg cgatcccat ccaacagccc  
3540

gccgtcgagc gggctttttt atccccggaa gcctgtggat agagggtagt tatccacgtg  
3600

aaaccgctaa tgccccgcaa agccttgatt cacggggctt tccggcccgc tccaaaaact  
3660

atccacgtga aatcgctaat cagggtacgt gaaatcgcta atcggagtac gtgaaatcgc  
3720

taataaggtc acgtgaaatc gctaatacaa aaggcacgtg agaacgctaa tagccctttc  
3780

agatcaacag cttgcaaaca cccctcgctc oggcaagtag ttacagcaag tagtatgttc  
3840

aattagcttt tcaattatga atatatatat caattattgg tggcccttgg cttgtggaca  
3900

atgcgctacg cgcaccggct ccgcccgtgg acaaccgcaa gcggttggcc accgtcgagc  
3960

gccagcgcct ttgccacaa cccggcggcc ggccgcaaca gatcgtttta taaatTTTTT  
4020

TTTTTgaaaa agaaaaagcc cgaaaggcgg caacctctcg ggcttctgga tttccgatcc  
4080

ccggaattag agatcttggc aggatattatt gtgggtgtaac  
4120

<210> 33

<211> 352

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Precursor pieza region variable de la cadena ligera del scFv\_2A1

<400> 33

ccgtctcat gcctcttctg agctgactca ggaccctgct gtgtctgtgg ccttgggaca  
60

gacagtcagg atcacatgcc aaggagacag cctcagaagc tattatgcaa gctggtagca  
120

gcagaagcca ggacaggccc ctgtacttgt catctatggc aaaaacaacc ggccctcagg  
180

gatcccagac cgattctctg gctccagctc aggaaacaca gcttccttga ccatcactgg  
240

ggctcaggcg gaagatgagg ctgactatta ctgtaactcc cgggacagca gtggtaacca

## ES 2 389 792 A1

300

tgatttgga ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggttgagacg gg  
352

<210> 34  
<211> 371  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Precursor pieza region variable de la cadena pesada del scFv\_  
2A1

<400> 34  
cccgtctcat gcccaggtgc agctgttgca gtctgcagca gaggtgaaaa agcccgggga  
60

gtctctgaag atctcctgta agggttctgg atacagcttt accagctact ggatcggctg  
120

ggtgcgccag atgcccggga aaggcctgga gtggatgggg atcatctatc ctggtgactc  
180

tgataccga tacagccgt cttccaagg ccaggtcacc atctcagccg acaagtccat  
240

cagcaccgcc tacctgcagt ggagcagcct gaaggcctcg gacacggccg tgtattactg  
300

tgcaagatat aggcggaata cttttgacta ttggggccaa ggtagcctgg tcaccgtcgc  
360

attgagacgg g  
371

<210> 35  
<211> 5940  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Vector de expresion de la cadena pesada alfa 1 de la  
inmunoglobulina A humana

<400> 35  
cgtcagatgag agacctgaca ggatatattg gccggtaaac taagtcgctg tatgtgtttg  
60

tttgagatct catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt  
120

tgctggcggt tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa  
180

gtcagagggt gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct  
240

ccctcgtgcg ctctcctggt ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc  
300

cttcgggaag cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg  
360

ES 2 389 792 A1

tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt tcagcccgcg cgctgcgcct  
420

tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg ccaactggcag  
480

cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cggtgctaca gagttcttga  
540

agtgggtggc taactacggc tacactagaa gaacagtatt tggtatctgc gctctgctga  
600

agccagttac cttcggaaga agagtggta gctcttgatc cggcaaacaa accaccgctg  
660

gtagcggtag tttttttggt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaaa ggatctcaag  
720

aagatccttt gatcttttct acggggtctg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag  
780

ggattttggt catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatccttita aattaaaat  
840

gaagttttaa atcaatctaa agtatatatg tgtaacattg gtctagtgat tatttgccga  
900

ctaccttggg gatctgcctt ttcacgtagt ggacaaattc ttccaactga tctgcgcgcg  
960

aggccaagcg atcttcttct tgtccaagat aagcctgtct agcttcaagt atgacgggct  
1020

gatactgggc cggcaggcgc tccattgccc agtcggcagc gacatccttc ggcgcgattt  
1080

tgccggttac tgcgctgtac caaatgcggg acaacgtaag cactacattt cgctcatcgc  
1140

cagcccagtc gggcggcgag ttccatagcg ttaaggtttc atttagcgcc tcaaatagat  
1200

cctgttcagg aaccggatca aagagtctct cgcgcgctgg acctaccaag gcaacgctat  
1260

gttctcttgc tttgtcagc aagatagcca gatcaatgtc gatcgtggct ggctogaaga  
1320

tacctgcaag aatgtcattg cgetgccatt ctccaaattg cagttcgcgc ttagctggat  
1380

aacgccacgg aatgatgtcg tcgtgcacaa caatggtgac ttctacagcg cggagaatct  
1440

cgctctctcc aggggaagcc gaagtttcca aaaggctggt gatcaaagct cgccgcggtg  
1500

tttcatcaag ccttacggtc accgtaacca gcaaatcaat atcactgtgt ggcttcaggc  
1560

cgccatccac tgcggagcgc tacaaatgta cggccagcaa cgtcggttcg agatggcgct  
1620

cgatgacgcc aactacctct gatagttgag tcgatacttc ggcgatcacc gcttccctca  
1680

ES 2 389 792 A1

tgatgtttaa ctttgtttta gggcgactgc cctgctgcgt aacatcgttg ctgctccata  
1740

acatcaaaca tcgaccacg gcgtaacgcg cttgctgctt ggatgcccga ggcatagact  
1800

gtaccccaaa aaaacagtca taacaagcca tgaaaaccgc cactgcgccg ttaccaccgc  
1860

tgcggttcggt caaggttctg gaccagtgc gtgagcgcat acgctacttg cattacagct  
1920

tacgaaccga acaggcttat gtccactggg ttcgtgcctt catccgtttc cacgggtgtc  
1980

gtcaccggc aaccttgggc agcagcgaag tcgaggcatt tctgtcctgg ctggaacacc  
2040

ccttgatta ctgtttatgt aagcagacag ttttattggt catgatgata tatttttatc  
2100

ttgtgcaatg taacatcaga gattttgaga cacaacgtgg ctttgttgaa taaatcgaac  
2160

ttttgctgag ttgaaggatc agatcacgca tcttcccgac aacgcagacc gttccgtggc  
2220

aaagcaaaag ttcaaaatca ccaactggtc cacctacaac aaagctctca tcaaccgtgg  
2280

ctccctcact ttctggctgg atgatggggc gattcagggc atcccatcc aacagcccgc  
2340

cgctcgagcgg gcttttttat ccccggaagc ctgtggatag agggtagtta tccacgtgaa  
2400

accgctaag ccccgcaaag ccttgattca cggggctttc cggcccgcctc caaaaactat  
2460

ccacgtgaaa tcgctaatac gggtacgtga aatcgctaata cggagtagct gaaatcgcta  
2520

ataaggtcac gtgaaatcgc taatcaaaaa ggcacgtgag aacgctaata gccctttcag  
2580

atcaacagct tgcaaacacc cctcgctccg gcaagtagtt acagcaagta gtatgttcaa  
2640

ttagcttttc aattatgaat atatataatca attattggtc gcccttggct tgtggacaat  
2700

gcgctacgcg cacgggctcc gcccgaggac aaccgcaagc ggttgccac cgctcgagcg  
2760

cagcgcttt gccacaacc cggcgccgg cgcacaacaga tcgttttata aattttttt  
2820

tttgaaaaag aaaaagcccg aaaggcggca acctctcggg cttctggatt tccgatcccc  
2880

ggaattagag atcttggcag gatataattgt ggtgtaacgg tctcttggcc cacactagag  
2940

ccaagctgat ctcccttggc ccggagatca ccatggacga ctttctctat ctctacgat  
3000

ES 2 389 792 A1

taggaagaaa gttcgacgga gaaggtgacg ataccatggt caccaccgat aatgagaaga  
3060

ttagcctctt caatttcaga aagaatgctg acccacagat ggtagagag gcctacgagg  
3120

caggtctgat caagacgac taccgagta ataatctcca ggagatcaaa taccttccca  
3180

agaaggtaa agatgcagtc aaaagattca ggactaactg catcaagaac acagagaaag  
3240

atatatttct caagatcaga agtactattc cagtatggac gattcaaggc ttgcttcata  
3300

aaccaaggca agtaatagag attggagtct ctaagaaagt agttcctact gaatcaaagg  
3360

ccatggagtc aaaaattcag atcgaggatc taacagaact cgccgtgaag actggcgaac  
3420

agttcataca gagtctttta cgactcaatg acaagaagaa aatcttcgtc aacatgggtg  
3480

agcacgacac tctcgtctac tccaagaata tcaaagatac agtctcagaa gaccaaggg  
3540

ctattgagac ttttaacaaa agggtaatat cgggaaacct cctcggattc cattgccag  
3600

ctatctgtca cttcatcaaa aggacagtag aaaaggaagg tggcacctac aaatgccatc  
3660

attgcgataa aggaaaggct atcgttcaag atgcctctgc cgacagtggc cccaagatg  
3720

gacccccacc cacgaggagc atcgtggaaa aagaagacgt tccaaccacg ttttcaaagc  
3780

aagtggattg atgtgatatc tccactgacg taagggatga cgcacaatcc cactatcctt  
3840

cgcaagacc ttctctata taaggaagtt catttcattt ggagaggact ccggtatttt  
3900

tacaacaata ccacaacaaa acaacaaca aacaacatta caatttacta ttctagtcca  
3960

cctgcaggcg gccgcactag tgatatogat gggcacttcc tctgtttttc tactattcct  
4020

tctttctttt cttctccttc tcccgctcct ccttgcccag gtgcagctgt tgcagtctgc  
4080

agcagagggtg aaaaagcccc gggagtctct gaagatctcc tgtaagggtt ctggatacag  
4140

ctttaccagc tactggatcg gctgggtgcg ccagatgccc gggaaaggcc tggagtggat  
4200

ggggatcatc tatcctgggtg actctgatac ccgatacagc ccgtccttcc aaggccaggt  
4260

caccatctca gccgacaagt ccatcagcac cgctacctg cagtggagca gcctgaaggc  
4320

ES 2 389 792 A1

ctcggacacg gccgtgtatt actgtgcaag atataggcgg aatacttttg actattgggg  
4380

ccaaggtagc ctggtcaccg tcgcatcccc gaccagcccc aaggtcttcc cgctgagcct  
4440

ctgcagcacc cagccagatg ggaacgtggt catcgctgc ctggtcacag gcttcttccc  
4500

ccaggagcca ctcaagtgtga cctggagcga aagcggacag ggcgtgaccg ccagaaactt  
4560

cccaccacg caggatgcct ccggggacct gtacaccaacg agcagccagc tgaccctgcc  
4620

ggccacacag tgccatagccg gcaagtccgt gacatgccac gtgaagcaact acacgaatcc  
4680

cagccaggat gtgactgtgc cctgcccagt tccctcaact ccacctacc cactctcctc  
4740

aactccacct accccatctc cctcatgctg ccacccccga ctgtcactgc accgaccggc  
4800

ccttgaggac ctgctcttag gttcagaagc gaacctcacg tgcacactga ccggcctgag  
4860

agatgcctca ggtgtcacct tcacctggac gcctcaagt ggaagagcg ctgttcaagg  
4920

accacctgag cgtgacctct gtggctgcta cagcgtgtcc agtgtcctgc cgggctgtgc  
4980

cgagccttgg aatcatggga agaccttcac ttgcaactgt gcctaccccg agtccaagac  
5040

cccgctaacc gccaccctct caaaatccgg aaacacatc cggcccagag tccacctgct  
5100

gccgcccggc tcggaggagc tggccctgaa cgagctggtg acgctgacgt gcctggcacg  
5160

tggcttcagc cccaaggatg tgctggttcg ctggctgcag gggtcacagg agctgccccg  
5220

cgagaagtac ctgacttggg catcccggca ggagcccagc cagggcacca ccaccttcgc  
5280

tgtgaccagc atactgcgcg tggcagccga ggactggaag aagggggaca ccttctcctg  
5340

catggtgggc cagcaggccc tggcgtggc cttcacacag aagaccatcg accgcttggc  
5400

gggtaaaccc acccatgtca atgtgtctgt tgtcatggcg gaggtggacg gcacctgcta  
5460

caaggacgaa ctctgagga atggatcttc gatcccgatc gttcaaacaat ttggcaataa  
5520

agtttcttaa gattgaatcc tgttgccggc cttgcatga ttatcatata atttctgttg  
5580

aattacgtta agcatgtaat aattaacatg taatgcatga cgttatttat gagatgggtt  
5640



## ES 2 389 792 A1

tttatgatta gagtcccgca attatacatt taatacgcga tagaaaacaa aatatagcgc  
5700

gcaaactagg ataaattatc gcgcdcggtg tcatctatgt tactagatcg ggaattgcc  
5760

agctaattct tgaagacgaa agggcctcgt gatacgccta tttttatagg ttaatgtcat  
5820

gataataatg gtttcttaga cgtcagggtg cacttttcgg ggaaatgtgc gcggaacccc  
5880

tatttgttta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg  
5940

<210> 36

<211> 5896

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Vector de expresion de la cadena pesada alfa 2 de la  
inmunoglobulina A humana

<400> 36

ccacactaga gccaaagtga tctcctttgc cccggagatc accatggacg acttttctta  
60

tctctacgat ctaggaagaa agtctgacgg agaaggtgac gataccatgt tcaccaccga  
120

taatgagaag attagcctct tcaatttcag aaagaatgct gaccacaga tggttagaga  
180

ggcctacgcg gcaggtctga tcaagacgat ctacccgagt aataatctcc aggagatcaa  
240

ataccttccc aagaaggtta aagatgcagt caaaagatc aggactaact gcatcaagaa  
300

cacagagaaa gatataattc tcaagatcag aagtactatt ccagtatgga cgattcaagg  
360

cttgcttcat aaaccaaggc aagtaataga gattggagtc tctaagaaag tagttcctac  
420

tgaatcaaag gccatggagt caaaaattca gatcgaggat ctaacagaac tcgccgtgaa  
480

gactggcgaa cagttcatac agagtctttt acgactcaat gacaagaaga aaatcttcgt  
540

caacatgggtg gagcacgaca ctctcgtcta ctccaagaat atcaaagata cagtctcaga  
600

agaccaaagg gctattgaga cttttcaaca aagggttaata tcgggaaacc tcctcggatt  
660

ccattgccc gctatctgtc acttcatcaa aaggacagta gaaaaggaag gtggcaccta  
720

caaatgccat cattgcgata aaggaaaggc tatcgttcaa gatgcctctg ccgacagtgg  
780

tcccaaagat ggacccccac ccacgaggag catcgtggaa aaagaagacg ttccaaccac

# ES 2 389 792 A1

840

gtcttcaaag caagtggatt gatgtgatat ctccactgac gtaagggatg acgcacaatc  
900

ccactatcct tcgcaagacc cttcctctat ataaggaagt tcatttcatt tggagaggac  
960

tccggtatth ttacaacaat accacaacaa aacaaacaac aaacaacatt acaatttact  
1020

attctagtcg agatgggcac ttcctctgtt tttctactat tccttctttc ttttcttctc  
1080

cttctcccggt ccctccttgc ccaggtgcag ctggtgcagt ctgcagcaga ggtgaaaaag  
1140

cccggggagt ctctgaagat ctctgttaag ggttctggat acagctttac cagctactgg  
1200

atcggctggg tgcgccagat gcccgggaaa ggctctggagt ggatggggat catctatcct  
1260

ggtgactctg ataccggata cagcccgctc ttccaaggcc aggtcaccat ctgagccgac  
1320

aagtccatca gcaccgcta cctgcagtgg agcagcctga aggcctcgga cacggccgtg  
1380

tattactgtg caagatatag gcggaatact tttgactatt ggggccaagg tagcctggtc  
1440

accgtcgcac gcatccccga ccagcccaa ggtcttcccg ctgagcctcg acagcaccoc  
1500

ccaagatggg aacgtggtcg tcgcatgcct ggtccagggc ttcttcccc aggagccact  
1560

cagtgtgacc tggagcgaaa gggacagaa cgtgaccgcc agaaacttcc cacctagcca  
1620

ggatgcctcc ggggaacctgt acaccacgag cagccagctg accctgccgg ccacacagtg  
1680

cccagacggc aagtccgtga catgccacgt gaagcactac acgaatcca gccaggatgt  
1740

gactgtgccc tgcccagttc ccccacctcc cccatgctgc ccccccgac tgtcgtgca  
1800

ccgaccggcc ctcgaggacc tgctcttagg ttcagaagcg aacctcacgt gcacactgac  
1860

cggcctgaga gatgcctctg gtgccacctt cacctggacg ccctcaagtg ggaagagcgc  
1920

tgttcaagga ccacctgagc gtgacctctg tggtgtctac agcgtgtcca gtgtcctgcc  
1980

tggtgtgccc cagccatgga accatgggga aaccttcacc tgcactgctg cccacccccga  
2040

gttgaagacc cactaaccg ccaacatcac aaaatccgga aacacattcc ggcccagagt  
2100

ccacctgctg ccgccgcgt cggaggagct ggcctgaac gagctgggtga cgctgacgtg

# ES 2 389 792 A1

2160

cctggcacgt ggcttcagcc ccaaggatgt gctggttcgc tggctgcagg ggtcacagga  
2220

gctgccccgc gagaagtacc tgacttgggc atccccgcag gagcccagcc agggcaccac  
2280

caccttcgct gtgaccagca tactgcgcgt ggcagccgag gactggaaga agggggacac  
2340

cttctcctgc atggtgggcc acgaggccct gccgctggcc ttcacacaga agaccatcga  
2400

ccgcttggcg ggtaaaccce cccatgtcaa tgtgtctggt gtcacggcgg aggtggacgg  
2460

caoctgctat gagggaaatgg atcttcgata ccgatcgttc aaacatttgg caataaagtt  
2520

tcttaagatt gaatcctggt gccggtcttg cgatgattat catataattt ctggtgaatt  
2580

acgttaagca tgtaataatt aacatgtaat gcatgacggt atttatgaga tgggttttta  
2640

tgattagagt cccgcaatta tacatttaat acgcgataga aaacaaaata tagcgcgcaa  
2700

actaggataa attatcgcgc doggtgtcat ctatgttact agatcgggaa ttgccaagct  
2760

aattcttgaa gacgaaaggg cctcgtgata cgcctathtt tataggttaa tgtcatgata  
2820

ataatggttt cttagacgtc aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg aaccctatt  
2880

tgtttathtt tctaaataca ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa  
2940

atgcttcaat aatgggaccg actcgcgcgc gatgagagac ctgacaggat atattggcgg  
3000

gtaaactaag tcgctgtatg tgtttgtttg agatctcatg tgagcaaaaag gccagcaaaa  
3060

ggccaggaac cgtaaaaagg ccgctgtgct ggcgtttttc cataggctcc gccccctga  
3120

cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga aaccgcagac gactataaag  
3180

ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga cctgcccgt  
3240

taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc ggggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg  
3300

ctgtaggat ctcagttcgg tgtaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc  
3360

ccccgttcag cccgaaccgt gcgccttata ccgtaactat cgtcttgagt ccaaccgggt  
3420

aagacacgac ttatcgcac tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcgaggta

ES 2 389 792 A1

3480

tgtaggcggg gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca ctagaagaac  
3540

agtatttggg atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc ggaagaagag ttggtagctc  
3600

ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cggtggtttt tttgtttgca agcagcagat  
3660

tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc  
3720

tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat tttggtcatg agattatcaa aaaggatctt  
3780

cacctagatc cttttaaatt aaaaatgaag ttttaaatca atctaaagta tatatgtgta  
3840

acattggctc agtgattatt tgccgactac cttggtgatc tcgcctttca cgtagtggac  
3900

aaattcttcc aactgatctg cgcgcgaggg caagcgatct tcttcttgtc caagataagc  
3960

ctgtctagct tcaagtatga cgggctgata ctgggccggc aggcgctcca ttgccagtc  
4020

ggcagcgaca tccttoggcg cgattttgcc gggtactgcg ctgtaccaa tgccgggacaa  
4080

cgtaagcact acatttcgct catcgccagc ccagtcgggc ggcgagttcc atagcgtaa  
4140

ggtttcattt agcgcctcaa atagatcctg ttcaggaacc ggatcaaaga gttcctccgc  
4200

cgctggacct accaaggcaa cgetatgttc tcttgctttt gtcagcaaga tagccagatc  
4260

aatgtcgatc gtggctggct cgaagatacc tgcaagaatg tcattgcgct gccattctcc  
4320

aaattgcagt tcgcgcttag ctggataacg ccacggaatg atgtcgtcgt gcacaacaat  
4380

ggtgacttct acagcgcgga gaatctcgct ctctccaggg gaagccgaag tttccaaaag  
4440

gtcgttgatc aaagctcgcc gcgttgtttc atcaagcctt acggtcaccg taaccagcaa  
4500

atcaatatca ctgtgtggct tcaggccgcc atccactgcg gagccgtaca aatgtacggc  
4560

cagcaacgtc ggttcgagat ggcgctcgat gacgccaaact acctctgata gttgagtcga  
4620

tacttcggcg atcaccgctt cctcatgat gtttaacttt gttttagggc gactgccttg  
4680

ctgcgtaaca tcgttgctgc tccataacat caaacatcga cccacggcgt aacgcgcttg  
4740

ctgcttggat gcccgaggca tagactgtac cccaaaaaaa cagtcataac aagccatgaa

ES 2 389 792 A1

4800

aaccgccact gcgccgttac caccgctgcg ttcggccaag gttctggacc agttgcgtga  
4860

gcgcatacgc tacttgcaatt acagcttacg aaccgaacag gcttatgtcc actgggttcg  
4920

tgccttcacg cgtttccacg gtgtgcgta cccggcaacc ttgggcagca gcgaagtcca  
4980

ggcatttctg tcctggctgg gaacaccctt tgtattactg tttatgtaag cagacagttt  
5040

tattgttcat gatgatatat tttatcttg tgcaatgtaa catcagagat tttgagacac  
5100

aacgtggctt tgttgaataa atcgaacttt tgctgagttg aaggatcaga tcacgcatct  
5160

tcccgacaac gcagaccggt ccgtggcaaa gcaaaagttc aaaatcacca actgggtccac  
5220

ctacaacaaa gctctcatca accgtggctc cctcactttc tggctggatg atggggcgat  
5280

tcaggcgatc cccatccaac agcccgcctg cgagcgggct tttttatccc cggaagcctg  
5340

tggatagagg gtagtattcc acgtgaaacc gctaatagcc cgcaaagcct tgattcacgg  
5400

ggctttccgg cccgctccaa aaactatcca cgtgaaatcg ctaatcaggg tacgtgaaat  
5460

cgctaatacg agtacgtgaa atcgtaata aggtcacgtg aaatcgctaa tcaaaaaggc  
5520

acgtgagaac gctaatagcc ctttcagatc aacagcttgc aaacaccctt cgctccggca  
5580

agtagttaca gcaagtagta tgttcaatta gcttttcaat tatgaatata tatatcaatt  
5640

attggtcgcc cttggcttgt ggacaatgag ctacgcgcac cggctccgcc cgtggacaac  
5700

cgcaagcggg tgcaccctg cgagcgcag cgcctttgcc cacaaccggg cggccggccg  
5760

caacagatcg ttttataaat ttttttttt gaaaaagaaa aagcccgaag ggccggcaacc  
5820

tctcgggctt ctggatttcc gatccccgga attagagatc ttggcaggat atattgtggt  
5880

gtaacggtct cttggc  
5896

<210> 37

<211> 5175

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

## ES 2 389 792 A1

<223> Vector de expresion de la cadena ligera lambda de la  
inmunoglobulina A humana

<400> 37

ccacactaga gccaaagtga tctcctttgc cccggagatc accatggacg acttttctcta  
60

tctctacgat ctaggaagaa agttcgacgg agaaggtgac gataccatgt tcaccaccga  
120

taatgagaag attagcctct tcaatttcag aaagaatgct gaccacacaga tggttagaga  
180

ggcctacgcg gcaggtctga tcaagacgat ctacccgagt aataatctcc aggagatcaa  
240

ataccttccc aagaaggtta aagatgcagt caaaagattc aggactaact gcatcaagaa  
300

cacagagaaa gatatatttc tcaagatcag aagtactatt ccagtatgga cgattcaagg  
360

cttgcttcat aaaccaaggc aagtaataga gattggagtc tctaagaaag tagttcctac  
420

tgaatcaaag gccatggagt caaaaattca gatcgaggat ctaacagaac tcgocgtgaa  
480

gactggcgaa cagttcatac agagtctttt acgactcaat gacaagaaga aaatcttcgt  
540

caacatgggtg gagcacgaca ctctcgtcta ctccaagaat atcaaagata cagtctcaga  
600

agaccaaagg gctattgaga cttttcaaca aaggtaata tcgggaaacc tcctcggatt  
660

ccattgccc a gctatctgtc acttcatcaa aaggacagta gaaaaggaag gtggcaccta  
720

caaatgccat cattgogata aaggaaaggc tatcgttcaa gatgcctctg ccgacagtgg  
780

tcccaaagat ggacccccac ccacgaggag catcgtggaa aaagaagacg ttccaaccac  
840

gtcttcaaag caagtggatt gatgtgatat ctccactgac gtaagggatg acgcacaatc  
900

ccactatcct tcgcaagacc cttcctctat ataaggaagt tcatttcatt tggagaggac  
960

tccggtatth ttacaacaat accacaacaa aacaacaac aaacaacatt acaatttact  
1020

attctagtcg agatgggac ttcctctggt tttctactat tccttctttc ttttcttctc  
1080

cttctccgt cctccttgc ctctctgag ctgactcagg accctgctgt gtctgtggcc  
1140

ttgggacaga cagtcaggat cacatgcaa ggagacagcc tcagaageta ttatgcaagc  
1200

tggtagcagc agaagccagg acaggccct gtacttgtca tctatggtaa aaacaaccgg  
1260

ES 2 389 792 A1

cctcagga tcccagaccg attctctggc tccagctcag gaaacacagc ttccttgacc  
1320

atcactgggg ctcaggcgga agatgaggct gactattact gtaactcccg ggacagcagt  
1380

ggtaaccatg atttgggtatt cggcggaggg accaagctga ccgctcctagg tggccaacca  
1440

aaggccgccc cctctgtcac tctgttcccg ccctcctctg aggagctcca agccaacaag  
1500

gccacactag tgtgtctgat cagtgacttc taccggggag ctgtgacagt ggccctggaag  
1560

gcagatggca gccccgtcaa ggcgggagtg gagacaacca aaccctcaa acagagcaac  
1620

aacaagtacg cggccagcag ctacctgagc ctgacgcccg agcagtggaa gtcccacaga  
1680

agctacagct gccaggtcac gcatgaaggg agcaccgtgg agaagacagt ggcccctaca  
1740

gaatgttcat gagggaatgg atcttcgac ccgatcgttc aacatttgg caataaagt  
1800

tcttaagatt gaatcctggt gccggctctg cgatgattat catataattt ctgttgaatt  
1860

acgttaagca tgtaataatt aacatgtaat gcatgacgtt atttatgaga tgggttttta  
1920

tgattagagt cccgcaatta tacatttaac acgcataga aaacaaaata tagcgcgcaa  
1980

actaggataa attatcgogc dcggtgtcat ctatgttact agatcgggaa ttgccaagct  
2040

aattcttgaa gacgaaaggg cctcgtgata cgcctathtt tataggtaa tgtcatgata  
2100

ataatggttt cttagacgtc aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg aaccocctatt  
2160

tgtttathtt tctaaataca ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa  
2220

atgcttcaat aatgggaocg actcgcgctc cgacagagac ctgacaggat atattggcgg  
2280

gtaaactaag tcgctgtatg tgtttgtttg agatctcatg tgagcaaaag gccagcaaaa  
2340

ggccaggaac cgtaaaaagg ccgctgtgct ggcgtttttc cataggctcc gccccctga  
2400

cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga aaccgcagag gactataaag  
2460

ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga ccctgcccgt  
2520

taccggatac ctgtccgctt ttctcccttc ggggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg  
2580

ES 2 389 792 A1

ctgtaggtat ctcagttcgg tgtaggctgt tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc  
2640

ccccgttcag cccgaaccgt ggccttata cggtaactat cgtcttgagt ccaaccggg  
2700

aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcgaggta  
2760

tgtaggcggg gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca ctagaagaac  
2820

agtatttggg atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc ggaagaagag ttggtagctc  
2880

ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cggtggtttt tttgtttgca agcagcagat  
2940

tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc  
3000

tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat tttggcatg agattatcaa aaaggatctt  
3060

cacctagatc cttttaaatt aaaaatgaag ttttaaatca atctaaagta tatatgtgta  
3120

acattggctc agtgattatt tgcgcactac cttgggtgatc tcgcctttca cgtagtggac  
3180

aaattcttcc aactgatctg cgcgcgagge caagcgatct ttttcttgtc caagataagc  
3240

ctgtctagct tcaagtatga cgggctgata ctgggccggc aggcgctcca ttgccagtc  
3300

ggcagcgaca tccttcggcg cgattttgcc ggttactgcg ctgtaccaa tgcgggacaa  
3360

cgtaagcact acatttcgct catcgccagc ccagtcgggc ggcgagttcc atagcgttaa  
3420

ggtttcattt agcgcctcaa atagatcctg ttcaggaacc ggatcaaaga gttcctccgc  
3480

cgctggacct accaaggcaa cgctatgttc tcttgctttt gtcagcaaga tagccagatc  
3540

aatgtcgatc gtggctggct cgaagatacc tgcaagaatg tcattgcgct gccattctcc  
3600

aaattgcagt tcgcgcttag ctggataacg ccacggaatg atgtcgtcgt gcacaacaat  
3660

ggtgacttct acagcgcgga gaatctcgtc ctctccaggg gaagccgaag tttccaaaag  
3720

gtcgttgatc aaagctcgcc gcggtgtttc atcaagcctt acggtcaccg taaccagcaa  
3780

atcaatatca ctgtgtggct tcaggccgcc atccactgcy gagccgtaca aatgtacggc  
3840

cagcaacgtc ggttcgagat ggcgctcgat gacgccaaact acctctgata gttgagtcga  
3900



ES 2 389 792 A1

tacttcggcg atcacgctt ccctcatgat gtttaacttt gtttagggc gactgccctg  
3960

ctgcgtaaca tcgttgctgc tccataacat caaacatcga cccacggcgt aacgcgcttg  
4020

ctgcttgat gcccgaggca tagactgtac cccaaaaaaaa cagtcataac aagccatgaa  
4080

aaccgccact gcgccgttac caccgctgog ttcgggtcaag gttctggacc agttgcgtga  
4140

gcgcatacgc tacttgcat acagcttacg aaccgaacag gcttatgtcc actgggttcg  
4200

tgcttcatc cgtttccacg gtgtgctca cccggcaacc ttgggcagca gcgaagtcga  
4260

ggcatttctg tcctggctgg aacaccctt gtattactgt ttatgtaagc agacagttt  
4320

attgttcatt atgatata tttatcttgc gcaatgtaac atcagagatt ttgagacaca  
4380

acgtggcttt gttgaataaa tcgaactttt gctgagttga aggatcagat cacgcattct  
4440

cccgacaacg cagaccgttc cgtggcaaag caaaagttca aaatcaccaa ctggtccacc  
4500

tacaacaaag ctctcatcaa ccgtggctcc ctcaacttct ggctggatga tggggcgatt  
4560

caggcgatcc ccatccaaca gcccgccgtc gagcgggctt ttttatcccc ggaagcctgt  
4620

ggatagaggg tagttatcca cgtgaaaccg ctaatgcccc gcaaagcctt gattcacggg  
4680

gctttccggc ccgctccaaa aactatccac gtgaaatcgc taatcagggt acgtgaaatc  
4740

gctaatacga gtacgtgaaa tcgctaataa ggtcacgtga aatcgctaat caaaaaggca  
4800

cgtgagaacg ctaatagccc tttcagatca acagcttgca aacaccctc gctccggcaa  
4860

gtagttacag caagtagtat gttcaattag cttttcaatt atgaatata atataatta  
4920

ttggctgccc ttggcttggt gacaatgctc tacgcgcacc ggctccgccc gtggacaacc  
4980

gcaagcgggt gccaccgct gagcgccagc gcctttgccc acaaccggc gccggccgc  
5040

aacagatcgt tttataaatt ttttttttg aaaaagaaaa agcccgaaag gcggcaacct  
5100

ctcgggcttc tggatttccg atccccgaa ttagagatct tggcaggata tattgtggtg  
5160

taacggtctc tgatg  
5175

## ES 2 389 792 A1

<210> 38  
<211> 5190  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Vector de expresion de la cadena ligera kappa de la  
inmunoglobulina A humana

<400> 38  
cgtccgacag agacctgaca ggatatattg ggggtaaac taagtcgctg tatgtgtttg  
60  
tttgagatct catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt  
120  
tgctggcggtt tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa  
180  
gtcagagggtg gcgaaaccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct  
240  
ccctcgtgcg ctctcctggt cggacctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc  
300  
cttcgggaag cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt tcgggtgtagg  
360  
tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcaag aacccccgt tcagcccgac cgctgcgctc  
420  
tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg ccaactggcag  
480  
cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cggtgctaca gatttcttga  
540  
agtggtgccc taactacggc tacactagaa gaacagtatt tggatatctgc gctctgctga  
600  
agccagttac cttcgggaaga agagttggta gctcttgatc cggcaaaaaa accaccgctg  
660  
gtagcgggtgg tttttttggt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaaa ggatctcaag  
720  
aagatccttt gatcttttct acggggtctg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag  
780  
ggattttggg catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta aattaaaat  
840  
gaagttttaa atcaatctaa agtatatatg tgtaacattg gtctagtgat tatttgccga  
900  
ctaccttggg gatctcgctt ttcacgtagt ggacaaattc ttccaactga tctgcgcgcg  
960  
aggccaagcg atctttctct tgtccaagat aagcctgtct agcttcaagt atgacgggct  
1020  
gatactgggc cggcaggcgc tocattgccc agtcggcagc gacatccttc ggcgcgattt  
1080

# ES 2 389 792 A1

tgccggttac tgcgctgtac caaatgcggg acaacgtaag cactacattt cgctcatcgc  
1140

cagcccagtc gggcggcgag ttccatagcg ttaaggtttc atttagcgcc tcaaatagat  
1200

cctgttcagg aaccggatca aagagttcct ccgccgctgg acctaccaag gcaacgctat  
1260

gttctcttgc ttttgtcagc aagatagcca gatcaatgtc gatcgtggct ggctcgaaga  
1320

tacctgcaag aatgtcattg cgctgccatt ctccaaattg cagttcgcgc ttagctggat  
1380

aagccacgg aatgatgtcg tcgtgcacaa caatggtgac ttctacagcg cggagaatct  
1440

cgctctctcc aggggaagcc gaagtttcca aaaggtcgtt gatcaaagct cgcgcggttg  
1500

tttcatcaag ccttacggtc accgtaacca gcaaatcaat atcactgtgt ggcttcaggc  
1560

cgccatccac tgcggagccg tacaaatgta cggccagcaa cgtcggttcg agatggcgct  
1620

cgatgacgcc aactacctct gatagttgag tcgatacttc ggcgatcacc gttccctca  
1680

tgatgtttaa ctttgtttta gggcgactgc cctgctgcgt aacatcgttg ctgctccata  
1740

acatcaaaca tcgaccacg gcgtaacgcg cttgctgctt ggatgcccga ggcatagact  
1800

gtaccccaaa aaaacagtca taacaagcca tgaaaaccgc cactgcgccg ttaccaccgc  
1860

tgcgttcggt caaggtctg gaccagttgc gtgagcgcac acgctacttg cattacagct  
1920

tacgaaccga acaggcttat gtccactggg ttcgtgcctt catccgtttc cacggtgtgc  
1980

gtcaccggc aaccttggc agcagcgaag tcgaggcatt tctgtcctgg ctggaacacc  
2040

ccttgattta ctgtttatgt aagcagacag ttttattggt catgatgata tatttttatc  
2100

ttgtgcaatg taacatcaga gattttgaga cacaacgtgg ctttgttgaa taaatcgaac  
2160

ttttgtgag ttgaaggatc agatcacgca ttttcccgac aacgcagacc gttccgtggc  
2220

aaagcaaaag ttcaaatca ccaactggtc cacctacaac aaagctctca tcaaccgtgg  
2280

ctccctcact ttctggctgg atgatggggc gattcaggcg atccccatcc aacagcccgc  
2340

cgtcgagcgg gcttttttat ccccgaagc ctgtggatag agggtagtta tccacgtgaa  
2400

ES 2 389 792 A1

accgctaatg ccccgcaaag ccttgattca cggggctttc cggcccgcctc caaaaactat  
2460

ccacgtgaaa tcgctaataca gggtagctga aatcgctaata cggagtagct gaaatcgcta  
2520

ataaggtcac gtgaaatcgc taatcaaaaa ggcacgtgag aacgctaata gccctttcag  
2580

atcaacagct tgcaaacacc cctcgcctccg gcaagtagtt acagcaagta gtatgttcaa  
2640

ttagcttttc aattatgaat atatataca attattggtc gcccttggct tgtggacaat  
2700

gcgctacgcg caccggctcc gcccgtagac aaccgcaagc ggttgcccac cgtcagagcg  
2760

cagcgctttt gccacacaacc cggcggccgg ccgcaacaga tcgttttata aatttttttt  
2820

ttgaaaaaag aaaaagcccg aaaggcggca acctctcggg cttctggatt tccgatcccc  
2880

ggaattagag atcttggcag gatataattgt ggtgtaacgg tctctgatgc cacactagag  
2940

ccaagctgat ctcccttgcc ccggagatca ccatggacga ctttctctat ctctacgatc  
3000

taggaagaaa gttcagcggga gaaggtagc ataccatggt caccaccgat aatgagaaga  
3060

ttagcctctt caatttcaga aagaatgctg acccacagat ggtagagag gcctacgagg  
3120

caggtctgat caagacgatc taccgagta ataactcca ggagatcaaa taccttccca  
3180

agaaggttaa agatgcagtc aaaagattca ggactaactg catcaagaac acagagaaa  
3240

atatatttct caagatcaga agtactattc cagtagggac gattcaaggc ttgcttcata  
3300

aaccaaggca agtaatagag attggagtct ctaagaaagt agttcctact gaatcaaagg  
3360

ccatggagtc aaaaattcag atcgaggatc taacagaact cggcgtgaag actggcgaac  
3420

agttcataca gagtctttta cgactcaatg acaagaagaa aatcttcgtc aacatgggtg  
3480

agcacgacac tctcgtctac tccaagaata tcaaagatac agtctcagaa gaccaaaagg  
3540

ctattgagac ttttcaacaa agggtaatat cgggaaacct cctcggattc cattgcccag  
3600

ctatctgtca cttcatcaaa aggacagtag aaaaggaagg tggcacctac aaatgccatc  
3660

attgcgataa aggaaaggct atcgttcaag atgcctctgc cgacagtggt cccaaagatg  
3720

ES 2 389 792 A1

gacccccacc cacgaggagc atcgtggaaa aagaagacgt tccaaccacg tcttcaaagc  
3780

aagtggattg atgtgatatc tccactgacg taagggatga cgcacaatcc cactatcctt  
3840

cgcaagacco ttcctctata taaggaagt catttcattt ggagaggact ccggtatfff  
3900

tacaacaata ccacaacaaa acaacaaca aacaacatta caatttacta ttctagtoga  
3960

gatgggcact tcctctgttt ttctactatt ccttctttct tttcttctcc ttctcccgtc  
4020

cctccttgcc tcttctgagc tgactcagga ccctgctgtg tctgtggcct tgggacagac  
4080

agtcaggatc acatgccaag gagacagcct cagaagctat tatgcaagct ggtaccagca  
4140

gaagccagga caggcccctg tacttgatc ctatggtaaa aacaaccggc cctcagggat  
4200

ccagaccga ttctctggct ccagctcagg aaacacagct tccttgacca tctctggggc  
4260

tcaggcggaa gatgaggctg actattactg taactcccgg gacagcagtg gtaaccatga  
4320

tttggtatcc gccggaggga ccaagctgac cgtcctaggt aggactggtg ctgctccatc  
4380

tgtttttatt tttccaccat ctgatgaaca acttaaactc ggaactgctt ctggtggttg  
4440

tcttcttaat aatttttatc caagagaagc taaagttcaa tggaaagttg ataatgctct  
4500

tcaatctgga aattctcaag aatctgttac tgaacaagat tctaaagatt ctacttattc  
4560

tctttcttct actcttactc tttctaaagc tgattatgaa aaacataaag tttatgcttg  
4620

tgaagttact catcaaggac tttcttctcc agttactaaa tcttttaata gaggagaatg  
4680

taaagatgaa ctttgaggga atggatcttc gatcccgatc gttcaaacat ttggcaataa  
4740

agtttcttaa gattgaatcc tgttgccggc cttgcatgga ttatcatata atttctggtg  
4800

aattacgtta agcatgtaat aattaacatg taatgcatga cgttatttat gagatggggt  
4860

tttatgatta gagtcccgca attatacatt taatacgcga tagaaaacaa aatatagcgc  
4920

gcaaactagg ataaattatc gcgcdcgggtg tcatctatgt tactagatcg ggaattgcca  
4980

agctaattct tgaagacgaa agggcctcgt gatacgccta tttttatagg ttaatgcat  
5040

# ES 2 389 792 A1

gataataatg gtttcttaga cgtcaggtgg cacttttcgg ggaaatgtgc gcggaacccc  
5100

tatttgttta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg  
5160

ataaatgctt caataatggg accgactcgc  
5190

<210> 39

<211> 4548

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Vector de expresion de resistencia a kanamicina para plantas

<400> 39

tgaggggaatg gatcttcgat cccgatcgtt caaacatttg gcaataaagt ttcttaagat  
60

tgaatcctgt tgccggtctt gcgatgatta tcatataatt tctggtgaat tacgttaagc  
120

atgtaataat taacatgtaa tgcacgacgt tatttatgag atggggtttt atgattagag  
180

tcccgcgaatt atacatttaa tacgcgatag aaaacaaaat atagcgcgca aactaggata  
240

aattatcgcg cdccggtgtca tctatgttac tagatcggga attgcccaagc taattcttga  
300

agacgaaagg gcctcgtgat acgcctattt ttataggtta atgtcatgat aataatggtt  
360

tcttagacgt caggtggcac ttttcgggga aatgtgcgcg gaaccctat ttgtttattt  
420

ttctaaatac attcaaatac gtatccgctc atgagacaat aaccctgata aatgcttcaa  
480

taatgggacc gactcgcgac ggcacgagac gtgacaggat atattggcgg gtaaaactaag  
540

tcgctgtatg tgtttgtttg agatctcatg tgagcaaaag gccagcaaaa gccaggaac  
600

cgtaaaaagg ccgctgtgct ggcgtttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac  
660

aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga aaccgcacag gactataaag ataccaggcg  
720

tttccccctg gaagctcctt cgtgcgctct cctgttccga cctgcccctt tacccgatac  
780

ctgtcccctt ttctcccttc ggggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat  
840

ctcagttcgg tgtaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag  
900

cccgaaccgt gcgccttacc cggtaactat cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac  
960

# ES 2 389 792 A1

ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggg  
1020

gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca ctagaagaac agtatttggg  
1080

atctgogctc tgctgaagcc agttaccttc ggaagaagag ttggtagctc ttgatccggc  
1140

aaacaaaacca ccgctggtag cgggtggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga  
1200

aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac  
1260

gaaaactcac gttaagggat tttggctatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc  
1320

cttttaaatt aaaaatgaag ttttaaatac atctaaagta tatatgtgta acattgggtc  
1380

agtgattaga aaaactcatc gagcatcaaa tgaactgca atttattcat atcaggatta  
1440

tcaataccat atttttgaaa aagccgtttc tgtaatgaag gagaaaactc accgaggcag  
1500

ttccatagga tggcaagatc ctggtatcgg tctgcgattc cgactcgtcc aacatcaata  
1560

caacctatta atttcccctc gtcaaaaata aggttatcaa gtgagaaatc accatgagtg  
1620

acgactgaat ccggtgagaa tggcaaaagt ttatgcattt ctttccagac ttgttcaaca  
1680

ggccagccat tacgctcgtc atcaaaatca ctccgatcaa ccaaaccggt attcattcgt  
1740

gattgcgcct gagcgagtcg aaatacgcga tcgctgttaa aaggacaatt acaaacagga  
1800

atcgaatgca accggcgcag gaacactgcc agcgcatcaa caatattttc acctgaatca  
1860

ggatattcct ctaatacctg gaatgctgtt ttccctggga tcgcagtggt gagtaacct  
1920

gcatcatcag gagtacggat aaaatgcttg atggtcggaa gaggcataaa ttccgtcagc  
1980

cagtttagtc tgaccatctc atctgtaaca acattggcaa cgctaccttt gccatgtttc  
2040

agaaacaact ctggcgcacg gggcttccca tacaatcggg agattgtcgc acctgattgc  
2100

ccgacattat cgcgagccca tttataccca tataaatcag catccatggt ggaatttaat  
2160

cgcggccttg agcaagacgt ttcccgttga atatggctca taacaccctt tgtattactg  
2220

tttatgtaag cagacagttt tattgttcat gatgatatat ttttatcttg tgcaatgtaa  
2280

ES 2 389 792 A1

catcagagat tttgagacac aacgtggctt tgttgaataa atcgaacttt tgctgagttg  
2340

aaggatcaga tcacgcatct tcccgacaac gcagaccggt ccgtggcaaa gcaaaagttc  
2400

aaaatcacca actgggccac ctacaacaaa gctctcatca accgtggctc cctcactttc  
2460

tggctggatg atggggcgat tcaggcgatc cccatccaac agcccgccgt cgagcgggct  
2520

tttttatccc cggaagcctg tggatagagg gtagttatcc acgtgaaacc gctaagccc  
2580

cgcaaagcct tgattcacgg ggctttccgg cccgctccaa aaactatcca cgtgaaatcg  
2640

ctaactcaggg tacgtgaaat cgctaactcg agtacgtgaa atcgctaata aggtcacgtg  
2700

aaatcgctaa tcaaaaaggc acgtgagaac gctaatagcc ctttcagatc aacagcttgc  
2760

aaacacccct cgctccggca agtagttaca gcaagtagta tgttcaatta gcttttcaat  
2820

tatgaatata tatatcaatt attggtcgcc cttggcttgt ggacaatgag ctacggccac  
2880

cggtccgcc cgtggacaac cgcaagcggg tgcccaccgt cgagcggccag cgctttgcc  
2940

cacaaccggg cggccggcgg caacagatcg ttttataaat tttttttttt gaaaaagaaa  
3000

aagcccgaaa ggccggcaacc tctcgggctt ctggatttcc gatccccgga attagagatc  
3060

ttggcaggat atattgtggg gtaaccgtct caccactggc atacatgaga attaagggag  
3120

atacatgaga attaagggag tcacgttatg acccccggcg atgacggggg acaagccgtt  
3180

ttacgtttgg aactgacaga accgcaacgt tgaaggagcc actcagccgc gggtttctgg  
3240

agtttaatga gctaagcaca tacgtcagaa accattattg cgggttcaaa agtcgcctaa  
3300

ggtcactatc agctagcaaa ttttcttgt caaaaatgct ccaactgacgt tccataaatt  
3360

cccctoggta tccaattaga gtctcatatt cactctcaac tcgatcgagg catgattgaa  
3420

caagatggat tgcacgcagg ttctccggcc gcttgggtgg agaggctatt cggtatgac  
3480

tgggcacaac agacaatcgg ctgctctgat gccgccgtgt tccggctgct agcgcagggg  
3540

cgcccggttc tttttgtcaa gaccgacctg tccgggtgcc tgaatgaact ccaagacgag  
3600



ES 2 389 792 A1

gcagcgcggc tatcgtggct ggccacgacg ggcgttcctt ggcagctgt gctcgcgctt  
3660

gtcactgaag cgggaagggg ctggctgcta ttgggcgaag tgccggggca ggatctcctg  
3720

tcctctcacc ttgctcctgc cgagaaagta tccatcatgg ctgatgcaat gcggcgctg  
3780

catacgcttg atccggctac ctgcccattc gaccaccaag cgaaacatcg catcgagcga  
3840

gcacgtactc ggatggaagc cggctctgtc gatcaggatg atctggacga agagcatcag  
3900

gggctcgcgc cagccgaact gttcgccagg ctcaaggcgc ggatgcccgga cggcgaggat  
3960

ctcgtcgtga cccacggcga tgcctgcttg ccgaatatca tgggtgaaaa tggccgcttt  
4020

tctggattca tcgactgtgg ccggctgggt gtggcggacc gctatcagga catagcgttg  
4080

gctaccctg atattgctga agagcttggc ggccaatggg ctgaccgctt cctcgtgctt  
4140

tacggtatcg ccgctcccga ttcgcagcgc atgccttct atgccttct tgacgagttc  
4200

ttctgagcgg gactctgggg ttcggactct agctagagtc aagcagatcg ttcaaacatt  
4260

tggcaataaa gtttcttaag attgaatcct gttgccggtc ttgcgatgat tatcatataa  
4320

ttctgttga attacgttaa gcatgtaata attaacatgt aatgcatgac gttatttatg  
4380

agatggggtt ttatgattag agtcccgcaa ttatacattt aatacgcgat agaaaacaaa  
4440

atatagcgcg caaactagga taaattatcg cgcgcgggtg catctatggt actagatcga  
4500

ccggcatgca agctgataat tcaaagatcg accggcatgc aagctgat  
4548

<210> 40

<211> 7860

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Vector de expresion de la IgA\_2A1 con cadena pesada alfa 1 y  
cadena ligera lambda

<400> 40

tggccacac tagagccaag ctgatctcct ttgcccggga gatcaccatg gacgactttc  
60

tctatctcta cgatctagga agaaagtctg acggagaagg tgacgatacc atgttcacca  
120

ES 2 389 792 A1

cggataatga gaagattagc ctcttcaatt tcagaaagaa tgctgacca cagatggta  
180

gagaggccta cgcggcaggt ctgatcaaga cgatctacc gagtaataat ctccaggaga  
240

tcaaatacct tccaagaag gttaaagatg cagtcaaaag attcaggact aactgcatca  
300

agaacacaga gaaagatata tttctcaaga tcagaagtac tattccagta tggacgattc  
360

aaggcttgct tcataaacca aggcaagtaa tagagattgg agtctctaag aaagtagttc  
420

ctactgaatc aaaggccatg gagtcaaaaa ttcagatcga ggatctaaca gaactcgccg  
480

tgaagactgg cgaacagttc atacagagtc ttttacgact caatgacaag aagaaaatct  
540

tcgtcaacat ggtggagcac gacactctcg tctactcaa gaatatcaaa gatacagttc  
600

cagaagacca aagggtatt gagacttttc acaaagggt aatctcggga aacctcctcg  
660

gattccattg cccagctatc tgtcacttca tcaaaaggac agtagaaaag gaagggtggca  
720

cctacaaatg ccatcattgc gataaaggaa aggctatcgt tcaagatgcc tctgcccaca  
780

gtgggtoccaa agatggacc ccaccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa gacgttccaa  
840

ccacgtcttc aaagcaagtg gattgatgtg atatctccac tgacgtaagg gatgacgcac  
900

aatcccacta tctctgcaa gacccttct ctatataagg aagttcattt catttgagga  
960

ggactccggg atttttacaa caataccaca acaaaacaaa caacaacaa cattacaatt  
1020

tactattcta gtcgacctgc aggcggccgc actagtata tcgatgggca cttcctctgt  
1080

tttttacta ttccttctt cttttctct ccttctccg tccctcctg cccaggtgca  
1140

gctgttgag tctgcagcag aggtgaaaaa gcccggggag tctctgaaga tctcctgtaa  
1200

gggttctgga tacagcttta ccagctactg gatcggctgg gtgcgccaga tgccccggaa  
1260

aggcctggag tggatgggga tcatctatcc tgggtactct gataccgat acagcccgtc  
1320

cttccaaggc caggtcacca tctcagccga caagtccatc agcaccgct acctgcagtg  
1380

gagcagctg aaggcctcgg acacggcctg gtattactgt gcaagatata ggccgaatac  
1440

ES 2 389 792 A1

ttttgactat tggggccaag gtagcctggc caccgtcgca tccccgacca gcccgaaggt  
1500

cttcccgtg agcctctgca gcacccagcc agatgggaac gtggtcacg cctgcctggc  
1560

ccaggccttc tccccccagg agccactcag tgtgacctgg agcgaaagcg gacagggcgt  
1620

gaccgccaga aacttcccac ccagccagga tgcctccggg gacctgtaca ccacgagcag  
1680

ccagctgacc ctgcccggcca cacagtgcct agccggcaag tccgtgacat gccacgtgaa  
1740

gcactacacg aatcccagcc aggatgtgac tgtgccctgc ccagttccct caactccacc  
1800

taccccatct cctcaactc cacctacccc atctccctca tgetgccacc cccgactgtc  
1860

actgaccga cggcccttg aggacctgct cttaggttca gaagcgaacc tcacgtgcac  
1920

actgaccggc ctgagagatg cctcaggtgt caccttcacc tggacgccct caagtgggaa  
1980

gagcgtggt caaggaccac ctgagcgtga cctctgtggc tgctacagcg tgtccagtgt  
2040

cctgccgggc tgtgccgagc cttggaatca tgggaagacc ttcacttgca ctgctgccta  
2100

ccccgagtc aagaccccg c taaccgccac cctctcaaaa tccggaaaca cattccggcc  
2160

cgaggtccac ctgctgccgc cgccgtcgga ggagctggcc ctgaacgagc tggtgacgct  
2220

gacgtgcctg gcacgtggct tcagcccca ggatgtgctg gttogctggc tgcaggggtc  
2280

acaggagctg ccccgcgaga agtacctgac ttgggcatcc cggcaggagc ccagccaggg  
2340

caccaccacc ttcgctgtga ccagcactt gcgcgtggca gccgaggact ggaagaaggg  
2400

ggacaccttc tcctgcatgg tgggccacga ggccctgccg ctggccttca cacagaagac  
2460

catcgaccgc ttggcgggta aaccaccca tgtcaatgtg tctggtgtca tggcggaggt  
2520

ggacggcacc tgctacaagg acgaactctg agggaatgga tottcgatcc cgatcgttca  
2580

aacatttggc aataaagttt cttagattg aatcctgtg cgggtcttgc gatgattatc  
2640

atataatttc tgttgaatta cgttaagcat gtaataatta acatgtaatg catgacgtta  
2700

tttatgagat gggtttttat gattagagtc ccgcaattat acatttaata cgcgatagaa  
2760

# ES 2 389 792 A1

aacaaaatat agcgcgcaaa ctaggataaa ttatcgcgcd cgggtgcatc tatgttacta  
2820

gatcggaat tgccaagcta attcttgaag acgaaagggc ctctgatac gcctatTTTT  
2880

ataggttaat gtcataata taatggtttc ttagacgtca ggtggcactt ttcggggaaa  
2940

tgtgcgcgga acccctatTT gtttatTTTT ctaaatacat tcaaatatgt atccgctcat  
3000

gagacaataa ccctgataaa tgcttcaata atgggaccga ctgcgccgtc atgccacact  
3060

agagccaagc tgatctcctt tgccccggag atcaccatgg acgactttct ctatctctac  
3120

gatctaggaa gaaagttoga cggagaaggt gacgatacca tgttcaccac cgataatgag  
3180

aagattagcc tcttcaatTT cagaagaat gctgaccac agatggttag agaggcctac  
3240

gcggcaggtc tgatcaagac gatctaccog agtaataatc tccaggagat caaatacctt  
3300

cccaagaagg ttaaagatgc agtcaaaaga ttcaggacta actgcatcaa gaacacagag  
3360

aaagatatat ttctcaagat cagaagtact attccagtat ggacgattca aggcttgctt  
3420

cataaaccaa ggcaagtaat agagattgga gtctctaaga aagtagttcc tactgaatca  
3480

aaggccatgg agtcaaaaat tcagatogag gatctaacag aactcgccgt gaagactggc  
3540

gaacagttca tacagagtct tttacgactc aatgacaaga agaaaatctt cgtcaacatg  
3600

gtggagcacg aactctcgt ctactccaag aatatcaaag atacagtctc agaagaccaa  
3660

agggtattg agacttttca acaaagggtc atatcgggaa acctcctcgg attccattgc  
3720

ccagctatct gtcacttcat caaaaggaca gtagaaaagg aagggtggcac ctacaaatgc  
3780

catcattgcg ataaaggaaa ggctatcgtt caagatgcct ctgcccacag tgggtccaaa  
3840

gatggacccc caccacgag gagcatcgtg gaaaaagaag acgttccaac cacgtcttca  
3900

aagcaagtgg attgatgtga tatctccact gacgtaaggg atgacgcaca atcccactat  
3960

ccttcgcaag acccttctc tatataagga agttcatttc atttgagag gactccggtc  
4020

ttttacaac aataccacaa caaaacaac aacaaacaac attacaatTT actattctag  
4080

ES 2 389 792 A1

tcgagatggg cacttctct gttttctac tattcctct ttctttctt ctcttctcc  
4140

cgccctctt tgctctctt gagctgactc aggacctgc tgtgtctgtg gccttgggac  
4200

agacagtcag gatcacatgc caaggagaca gcctcagaag ctattatgca agctgggtacc  
4260

agcagaagcc aggacaggcc cctgtacttg tcatctatgg taaaaacaac cggccctcag  
4320

ggatcccaga ccgattctct ggctccagct caggaaacac agcttccttg accatcactg  
4380

gggctcaggc ggaagatgag gctgactatt actgtaactc cggggacagc agtggttaacc  
4440

atgatttggg attcggcgga gggaccaagc tgacctcct aggtgggtcaa ccaaaggccg  
4500

ccccctctgt cactctgttc ccgccctct ctgaggagct ccaagccaac aaggccacac  
4560

tagtgtgtct gatcagtgc ttctaccgg gagctgtgac agtggcctgg aaggcagatg  
4620

gcagccccgt caaggcggga gtggagacaa ccaaaccctc caaacagagc aacaacaagt  
4680

acgcggccag cagctacctg agcctgacgc ccgagcagtg gaagtccac agaagctaca  
4740

gctgccaggt cacgcatgaa gggagcaccg tggagaagac agtggcccct acagaatggt  
4800

catgagggaa tggatcttgc atcccgatcg ttcaaacatt tggcaataaa gtttcttaag  
4860

attgaatcct gttgocggtc ttgcatgat tatcatataa tttctgttga attacgttaa  
4920

gcatgtaata attaacatgt aatgcatgac gttatztatg agatggggtt ttatgattag  
4980

agtcccgcaa ttatacattt aatagcgat agaaaacaaa atatagcgcg caaactagga  
5040

taaattatcg cgdcgggtg catctatggt actagatcgg gaattgcaa gctaattctt  
5100

gaagacgaaa gggcctcgtg atacgcctat ttttataggt taatgtcatg ataataatgg  
5160

tttcttagac gtcagggtggc acttttcggg gaaatgtgcg cggaaaccct atttgtttat  
5220

ttttctaaat acattcaaat atgtatccgc tcatgagaca ataacctga taaatgcttc  
5280

aataatggga ccgactcgc gtccgacggc atgagacgtg acaggatata ttggcgggta  
5340

aactaagtcg ctgtatgtgt ttgtttgaga tctcatgtga gcaaaaaggcc agcaaaaaggc  
5400

ES 2 389 792 A1

caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc ccctgacga  
5460

gcatcacaaa aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata  
5520

ccaggcgttt cccctggaa gctccctcgt gcgctctcct gttccgacce tgccgcttac  
5580

cggatacctg tccgccttcc tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gtcacgctg  
5640

taggtatctc agttcgggtg aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc  
5700

cgttcagccc gaccgctgcg ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccggttaag  
5760

acacgactta tgcacctgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggatgt  
5820

aggcgggtgct acagagttct tgaagtggcg gcctaactac ggctacacta gaagaacagt  
5880

atttggatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga agaagagttg gtagctcttg  
5940

atccggcaaa caaacaccg ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc agcagattac  
6000

gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt tctacggggg ctgacgctca  
6060

gtggaacgaa aactcacgtt aagggatctt ggtcatgaga ttatcaaaaa g gatcttcac  
6120

ctagatcctt ttaaattaa aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat atgtgtaaca  
6180

ttggctctagt gattagaaaa actcatcgag catcaaatga aactgcaatt tattcatatc  
6240

aggattatca ataccatatt tttgaaaag ccgtttctgt aatgaaggag aaaactcacc  
6300

gaggcagttc cataggatgg caagatcctg gtatcggctc gcgattccga ctcgtccaac  
6360

atcaatacaa cctattaatt tcccctcgtc aaaaataagg ttatcaagtg agaaatcacc  
6420

atgagtgacg actgaatccg gtgagaatgg caaaagtta tgcatttctt tccagacttg  
6480

ttcaacagggc cagccattac gctcgtcacc aaaatcactc gcatcaacca aaccggtatt  
6540

cattcgtgat tgcgcctgag cgagtcgaaa tacgcatcg ctgttaaaag gacaattaca  
6600

aacaggaatc gaatgcaacc ggcgcaggaa cactgccagc gcatcaacaa tattttcacc  
6660

tgaatcagga tattcttcta atacctggaa tgctgttttc cctgggatcg cagtggtgag  
6720

## ES 2 389 792 A1

taaccatgca tcatcaggag tacggataaa atgcttgatg gtcggaagag gcataaattc  
6780

cgtcagccag tttagtctga ccatctcadc tgtaacaaca ttggcaacgc tacctttgcc  
6840

atgtttcaga aacaactctg ggcgacggg cttcccatac aatcggtaga ttgtcgcacc  
6900

tgattgcccc acattatcgc gagcccattt ataccatat aaatcagcat ccatggtgga  
6960

atttaatcgc ggccttgagc aagacgtttc cegtgaata tggctcataa cacccttgt  
7020

attactgttt atgtaagcag acagttttat tgttcatgat gatataat tttatcttgtgc  
7080

aatgtaacat cagagatttt gagacacaac gtggccttgt tgaataaatc gaacttttgc  
7140

tgagttgaag gatcagatca cgcactctcc cgacaacgca gaccgttccg tggcaaagca  
7200

aaagttcaaa atcaccaact ggtccaccta caacaaagct ctcacacacc gtggctccct  
7260

cactttctgg ctggatgatg gggcgattca ggcgatcccc atccaacagc cggccgtcga  
7320

gcgggccttt ttatccccgg aagcctgtgg atagagggtta gttatccacg tgaaacccgt  
7380

aatgccccgc aaagccttga ttcacggggc tttccggccc gctccaaaaa ctatccacgt  
7440

gaaatcgcta atcagggtag gtgaaatcgc taatcggagt acgtgaaatc gctaataagg  
7500

tcacgtgaaa tcgctaataca aaaaggcaag tgagaacgct aatagccctt tcagatcaac  
7560

agcttgcaaa caccctcgc tccggcaagt agttacagca agtagtatgt tcaattagct  
7620

tttcaattat gaatatatat atcaattatt ggtcgcctt ggcttgtgga caatgcgcta  
7680

cgcgccaccg ctccgcccgt ggacaaccgc aagcggttgc ccaccgtcga gcgccagcgc  
7740

ctttgccac aaccggcgg cggccgcaa cagatcgttt tataaatttt ttttttgaa  
7800

aaagaaaaag cccgaaaggc ggcaacctct cgggcttctg gatttccgat ccccggaatt  
7860

<210> 41

<211> 7918

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Vector de expresion de la IgA\_2A1 con cadena pesada alfa 1 y  
cadena ligera kappa

# ES 2 389 792 A1

```

<400> 41
tggccacac tagagccaag ctgatctcct ttgccccgga gatcaccatg gacgactttc
60

tctatctcta cgatctagga agaaagtctg acggagaagg tgacgatacc atgttcacca
120

ccgataatga gaagattagc ctcttcaatt tcagaaagaa tgctgacca cagatggtta
180

gagaggccta cgcggcaggt ctgatcaaga cgatctacc gagtaataat ctccaggaga
240

tcaaatacct tccaagaag gttaaagatg cagtcaaaag attcaggact aactgcatca
300

agaacacaga gaaagatata tttctcaaga tcagaagtac tattccagta tggacgattc
360

aaggcttgct tcataaacca aggcaagtaa tagagattgg agtctctaag aaagtagttc
420

ctactgaatc aaaggccatg gagtcaaaaa ttcagatcga ggatctaaca gaactcgccg
480

tgaagactgg cgaacagttc atacagagtc ttttacgact caatgacaag aagaaaatct
540

tcgtcaacat ggtggagcac gacactctcg tctactcaa gaatatcaaa gatacagtct
600

cagaagacca aagggtatt gagacttttc acaaagggt aatatcggga aacctcctcg
660

gattccattg ccagctatc tgtcacttca tcaaaaggac agtagaaaag gaagggtggca
720

cctacaaatg ccatcattgc gataaaggaa aggctatcgt tcaagatgcc tctgccgaca
780

gtggtcccaa agatggaccc ccaccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa gacgttccaa
840

ccaagtcttc aaagcaagtg gattgatgtg atatctccac tgacgtaagg gatgacgcac
900

aatcccacta tccttcgcaa gaccttctct ctatataagg aagttcattt catttggaga
960

ggactccggt atttttacaa caataccaca acaaaacaaa caacaacaa cattacaatt
1020

tactattcta gtcgacctgc aggcggccgc actagtata tcgatgggca cttoctctgt
1080

tttttacta ttcttcttt cttttcttot ccttctcccg tccctccttg ccaggtgca
1140

gctggtgcag tctgcagcag aggtgaaaaa gcccggggag tctctgaaga tctcctgtaa
1200

gggttctgga tacagcttta ccagctactg gatcggctgg gtgcgccaga tgccccggaa
1260

aggcctggag tggatgggga tcactatcc tggtgactct gataccgat acagcccgtc

```



ES 2 389 792 A1

1320

cttccaaggc caggtcacca tctcagccga caagtccatc agcaccgcct acctgcagtg  
1380

gagcagcctg aaggcctcgg acacggccgt gtattactgt gcaagatata ggcggaatac  
1440

ttttgactat tggggccaag gtagcctggg caccgtcgca tccccgacca gccccagggt  
1500

cttcccgcctg agcctctgca gcaccagcc agatgggaac gtggtcacgc cctgcctggg  
1560

ccagggcttc ttccccagg agccactcag tgtgacctgg agcgaagcg gacagggcgt  
1620

gaccgccaga aacttcccac ccagccagga tgccctccggg gacctgtaca ccacgagcag  
1680

ccagctgacc ctgccggcca cacagtgcct agccggcaag tccgtgacat gccacgtgaa  
1740

gcactacacg aatcccagcc aggatgtgac tgtgccctgc ccagttccct caactccacc  
1800

taccccatct cctcaactc cacctacccc atctccctca tgctgccacc cccgactgtc  
1860

actgcaccga ccggcccttg aggacctgct cttaggttca gaagcgaacc tcacgtgcac  
1920

actgaccggc ctgagagatg cctcaggtgt caccttcacc tggacgcctt caagtgggaa  
1980

gagcgctggt caaggaccac ctgagcgtga cctctgtggc tgctacagcg tgtccagtg  
2040

cctgccgggc tgtgccgagc catggaacca tgggaagacc ttcacttgca ctgctgccta  
2100

ccccgagtcc aagacccgc taaccgccac cctctcaaaa tccggaaaca cattccggcc  
2160

cgaggtccac ctgctgccgc cgccgtcgga ggagctggcc ctgaacgagc tgggtgacgct  
2220

gacgtgcctg gcacgtggct tcagcccaa ggatgtgctg gttcgctggc tgcaggggtc  
2280

acaggagctg ccccgogaga agtacctgac ttgggcatcc cggcaggagc ccagccaggg  
2340

caccaccacc ttcgctgtga ccagcatact gcgcgtggca gccgaggact ggaagaagg  
2400

ggacaccttc tcctgcatgg tgggccaaga ggcctgccc ctggccttca cacagaagac  
2460

catcgaccgc ttggcgggta aaccaccca tgtcaatgtg tctgttgtca tggcggaggt  
2520

ggacggcacc tgctacaagg acgaactctg agggaatgga tcttcgatcc cgatcgttca  
2580

aacatttggc aataaagttt cttaagattg aatcctgttg ccggtcttgc gatgattatc

ES 2 389 792 A1

2640

atataatttc tgttgaatta cgttaagcat gtaataatta acatgtaatg catgacgtta  
2700

tttatgagat gggtttttat gattagagtc cgcgaattat acatttaata cgcgatagaa  
2760

aacaaaatat agcgcgcaaa ctaggataaa ttatcgcgcd cgggtgcatc tatgttacta  
2820

gatcgggaat tgccaagcta attcttgaag acgaaagggc ctctgatac gcctatTTTT  
2880

ataggTTaat gtcataataa taatggTTtc ttagacgtca ggtggcactt ttcggggaaa  
2940

tgtgcgCGga acccctatTT gtttattTTT ctaaatacat tcaaataTgt atccgctcat  
3000

gagacaataa ccctgataaa tgcttcaata atgggaccga ctgcCGctcg atgccacact  
3060

agagccaagc tgatctcctt tgccccggag atcaccatgg acgactttct ctatctctac  
3120

gatctaggaa gaaagttcga cggagaaggt gacgatacca tgttcaccac cgataatgag  
3180

aagattagcc tcttcaatTT cagaaagaat gctgaccac agatggTTag agaggcctac  
3240

gcggcaggtc tgatcaagac gatctaccCG agtaataatc tccaggagat caaatacctt  
3300

cccaagaagg ttaaagatgc agtcaaaaga ttcaggacta actgcatcaa gaacacagag  
3360

aaagatatat ttctcaagat cagaagtact attccagtat ggacgattca aggcttgcct  
3420

cataaaccaa ggcaagtaat agagattgga gtctctaaaga aagtagttcc tactgaatca  
3480

aaggccatgg agtcaaaaat tcagatcgag gatctaacag aactcgcCGt gaagactggc  
3540

gaacagttca tacagagtct tttacgactc aatgacaaga agaaaatctt cgtcaacatg  
3600

gtggagcacg acactctcgt ctactccaag aatatcaaag atacagtctc agaagaccaa  
3660

agggctattg agacttttca acaaagggta atatcgggaa acctcctcgg attccattgc  
3720

ccagctatct gtcacttcat caaaaggaca gtagaaaagg aaggTggcac ctacaaatgc  
3780

catcattgcg ataaaggaaa ggctatcgtt caagatgcct ctgCCgacag tggTcccaa  
3840

gatggacccc caccacgag gagcatcgtg gaaaaagaag acgttccaac cacgtcttca  
3900

aagcaagtgg attgatgtga tatctccact gacgtaaggg atgacgcaca atcccactat

ES 2 389 792 A1

3960

ccttcgcaag acccttctct tatataagga agttcatttc atttggagag gactccggta  
4020

tttttacaac aataccacaa caaaacaaac aacaaacaac attacaattt actattctag  
4080

togagatggg cacttctctt gtttttctac tattccttct ttcttttctt ctcttctctc  
4140

cgctcctcct tgcctcttct gagctgactc aggaccctgc tgtgtctgtg gccttgggac  
4200

agacagtcag gatcacatgc caaggagaca gcctcagaag ctattatgca agctgggtacc  
4260

agcagaagcc aggacaggcc cctgtacttg tcatctatgg taaaaacaac cggccctcag  
4320

ggatcccaga ccgattctct ggctccagct caggaaacac agcttccttg accatcactg  
4380

gggctcaggg ggaagatgag gctgactatt actgtaactc ccgggacagc agtggttaacc  
4440

atgatttggg attcggcgga gggaccaagc tgaccgtcct aggtaggact gttgctgctc  
4500

catctgtttt tatttttcca ccatctgatg aacaacttaa atctggaact gcttctgttg  
4560

tttgtcttct taataatttt tatccaagag aagctaaagt tcaatggaaa gttgataatg  
4620

ctcttcaatc tggaaattct caagaatctg ttactgaaca agattctaaa gattctactt  
4680

attctctttc ttctactctt actctttcta aagctgatta tgaaaaacat aaagtttatg  
4740

cttgtgaagt tactcatcaa ggactttctt ctccagttac taaatctttt aatagaggag  
4800

aatgtaaaga tgaactttga gggaatggat cttcgatccc gatcgttcaa acatttggca  
4860

ataaagtttc ttaagattga atctgttgc cggctctgcg atgattatca tataatttct  
4920

gttgaattac gttaagcatg taataattaa catgtaatgc atgacgttat ttatgagatg  
4980

ggtttttatg attagagtcc cgcaattata catttaatac gcgatagaaa acaaaatata  
5040

gcgcgcaaac taggataaat tatcgcgcdc ggtgtcatct atgttactag atcgggaatt  
5100

gccaaagctaa ttcttgaaga cgaaagggcc tcgtgatacg cctattttta taggttaatg  
5160

tcatgataat aatggtttct tagacgtcag gtggcacttt tcggggaaat gtgcgcggaa  
5220

ccctatttg tttatttttc taataacatt caaatatgta tccgctcatg agacaataac

# ES 2 389 792 A1

5280

cctgataaat gcttcaataa tgggaccgac tcgccgtccg accgtctgag acgtgacagg  
5340

atatattggc gggtaaacta agtcgctgta tgtgtttggt tgagatctca tgtgagcaaa  
5400

aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcggtg ctggcgtttt tccataggct  
5460

ccgccccctt gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac  
5520

aggactataa agataccagg cgtttcccc tggaagctcc ctctgctgct ctctgttcc  
5580

gaccctgccg cttaccggat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttc  
5640

tcatagctca cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc gttecgctcca agctgggctg  
5700

tgtgcacgaa cccccgttc agcccagccg ctgcgcctta tccggtaact atcgtcttga  
5760

gtccaacccg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggta acaggattag  
5820

cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag tgggtggccta actacggcta  
5880

cactagaaga acagtatttg gtatctgccc tctgctgaag ccagttacct toggaagaag  
5940

agttggtagc tcttgatccg gcaaacaaac caccgctggt agcggtggtt tttttgtttg  
6000

caagcagcag attacgcgca gaaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga tcttttctac  
6060

ggggctctgac gctcagtggg acgaaaactc acgtaagggt attttgggtca tgagattatc  
6120

aaaaaggatc ttcacctaga tccttttaaa ttaaaaatga agttttaaat caatctaaag  
6180

tatatatgtg taacattggt ctagtgatta gaaaaactca tcgagcatca aatgaaactg  
6240

caatatttcc atatcaggat tatcaatacc atatttttga aaaagccggt tctgtaatga  
6300

aggagaaaaac tcaccgaggg agttccatag gatggcaaga tcctgggtatc ggtctgcatc  
6360

tccgactcgt ccaacatcaa tacaacctat taatttcccc tcgtcaaaaa taaggttatc  
6420

aagtgagaaa tcaccatgag tgacgactga atccggtgag aatggcaaaa gtttatgcat  
6480

ttctttccag acttgttcaa caggccagcc attacgctcg tcatcaaaat cactcgcac  
6540

aaccaaaccg ttattcattc gtgattgccc ctgagcgagt cgaaatcgc gatcgcgtgt

ES 2 389 792 A1

6600

aaaaggacaa ttacaaacag gaatcgaatg caaccggcgc aggaacactg ccagcgcac  
6660

aacaatattt tcacctgaat caggatattc ttctaatacc tggaatgctg ttttcacctg  
6720

gatcgcagtg gtgagtaacc atgcatcatc aggagtacgg ataaaatgct tgatggtcgg  
6780

aagaggcata aattccgtca gccagtttag tctgaccatc tcactctgtaa caacattggc  
6840

aacgctacct ttgccatggt tcagaaacaa ctctggcgca tcgggcttcc catacaatcg  
6900

gtagattgtc gcacctgatt gcccgacatt atcgcgagcc catttatacc catataaatc  
6960

agcatccatg ttggaattta atcgcggcct tgagcaagac gtttcccggt gaatatggct  
7020

cataacaccc cttgtattac tgtttatgta agcagacagt tttattgttc atgatgatat  
7080

atTTTTatct tgtgcaatgt aacatcagag attttgagac acaacgtggc tttgttgaat  
7140

aaatcgaact tttgctgagt tgaaggatca gatcacgcat cttcccgaca acgcagaccg  
7200

ttccgtggca aagcaaaagt tcaaaatcac caactggtcc acctacaaca aagctctcat  
7260

caaccgtggc tccctcactt tctggctgga tgatggggcg attcaggcga tocccatcca  
7320

acagcccccc gtccgagcggg cttttttatc cccggaagcc tgtggataga gggtagttat  
7380

ccacgtgaaa ccgctaatac cccgcaaagc cttgattcac ggggctttcc ggccccgctcc  
7440

aaaaactatc cacgtgaaat cgctaatacag ggtaoctgaa atcgctaata ggagtacgtg  
7500

aaatcgctaa taaggtcacg tgaaatcgct aatcaaaaag gcacgtgaga acgctaatag  
7560

ccctttcaga tcaacagctt gcaaacaccc ctccgctccg caagtagtta cagcaagtag  
7620

tatgttcaat tagcttttca attatgaata tatatatcaa ttattggtcg cccttggtt  
7680

gtggacaatg cgctacgcgc accggctccg cccgtggaca accgcaagcg gttgcccacc  
7740

gtccgagccc agcgcccttg ccacacaacc ggcggccggc cgcaacagat cgttttataa  
7800

atTTTTTTTT ttgaaaaaga aaaagcccga aaggcggcaa cctctcgggc ttctggattt  
7860

ccgatccccg gaattagaga tcttggcagg atatattgtg gtgtaaccgt ctcaggca

ES 2 389 792 A1

7918

<210> 42  
 <211> 7828  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Vector de expresion de la IgA\_2A1 con cadena pesada alfa 2 y  
 cadena ligera lambda  
  
 <400> 42  
 tggccacac tagagccaag ctgatctcct ttgccccgga gatcaccatg gacgactttc  
 60  
 tctatctcta cgatctagga agaaagtctg acggagaagg tgacgatacc atgttcacca  
 120  
 ccgataatga gaagattagc ctcttcaatt tcagaaagaa tgctgacca cagatggtta  
 180  
 gagaggccta cgcggcaggt ctgatcaaga cgatctaccc gagtaataat ctccaggaga  
 240  
 tcaaatacct tccaagaag gttaaagatg cagtcaaaag attcaggact aactgcatca  
 300  
 agaacacaga gaaagatata tttctcaaga tcagaagtac tattccagta tggacgattc  
 360  
 aaggcttgct tcataaacca aggcaagtaa tagagattgg agtctctaag aaagtagttc  
 420  
 ctactgaatc aaaggccatg gagtcaaaaa ttcagatcga ggatctaaca gaactcgccg  
 480  
 tgaagactgg cgaacagttc atacagagtc ttttacgact caatgacaag aagaaaatct  
 540  
 tcgtcaacat ggtggagcac gacactctcg tctactcaa gaatatcaa gatacagtct  
 600  
 cagaagacca aagggtatt gagacttttc aacaaaggt aatatcggga aacctcctcg  
 660  
 gattccattg cccagctatc tgtcacttca tcaaaaggac agtagaaaag gaagggtggca  
 720  
 cctacaaatg ccatcattgc gataaaggaa aggctatcgt tcaagatgcc tctgcogaca  
 780  
 gtggtcccaa agatggaccc ccaccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa gacgttccaa  
 840  
 ccacgtcttc aaagcaagtg gattgatgtg atatctccac tgacgtaagg gatgacgcac  
 900  
 aatcccacta tccttcgcaa gacccttct ctatataagg aagttcattt catttggaga  
 960  
 ggactcoggt atttttacaa caataccaca acaaaacaaa caacaaacaa cattacaatt  
 1020  
 tactattcta gtcgagatgg gcacttctc tgtttttcta ctattccttc tttctttct  
 1080

# ES 2 389 792 A1

tctccttctc ccgtccctcc ttgccaggt gcagctgttg cagtctgcag cagaggtgaa  
1140

aaagcccggg gagtctctga agatctcctg taagggttct ggatacagct ttaccagcta  
1200

ctggatcggc tgggtgcgcc agatgccggg gaaaggcctg gagtggatgg ggatcatcta  
1260

tcttggtgac tctgataccc gatacagccc gtccttccaa ggccaggtea ccatctcagc  
1320

cgacaagtcc atcagcaccg cctacctgca gtggagcagc ctgaaggcct cggacacggc  
1380

cgtgtattac tgtgcaagat ataggcggaa tacttttgac tattggggcc aaggtagcct  
1440

ggtcaccgtc gcatgcatcc ccgaccagcc ccaaggtctt cccgctgagc ctcgacagca  
1500

cccccaaga tgggaacgtg gtcgtcgcac gcctggtcca gggettcttc ccccaggagc  
1560

cactcagtggt gacctggagc gaaagcggac agaacgtgac cgccagaaac ttcccaccta  
1620

gccaggatgc ctccggggac ctgtacacca cgagcagcca gctgaccctg ccggccacac  
1680

agtgccccaga cggcaagtcc gtgacatgcc acgtgaagca ctacacgaat cccagccagg  
1740

atgtgactgt gcctgcccc gttccccac ctccccatg ctgccacccc cgactgtcgc  
1800

tgcaaccgacc ggcctcgag gacctgctct taggttcaga agcgaacctc acgtgcacac  
1860

tgaccggcct gagagatgcc tctggtgcca ccttcacctg gacgccctca agtgggaaga  
1920

gcgctgttca aggaccacct gagcgtgacc tctgtggctg ctacagcgtg tccagtgctc  
1980

tgcttggtg tgcccagcca tggaaacctg gggaaacctt cacctgcact gctgcccacc  
2040

ccgagttgaa gacccccacta accgccaaca tcacaaaatc cggaaacaca ttccggcccc  
2100

aggtccacct gctgccgccg ccgtcggagg agctggcctt gaacgagctg gtgacgctga  
2160

cgtgcctggc acgtggcttc agccccagg atgtgctggt tcgctggctg caggggtcac  
2220

aggagctgcc ccgcgagaag tacctgactt gggcatcccg gcaggagccc agccagggca  
2280

ccaccacctt cgctgtgacc agcatactgc gcgtggcagc cgaggactgg aagaaggggg  
2340

acaccttctc ctgcatggtg ggccacgagg ccctgccgct ggcttcaca cagaagacca  
2400

ES 2 389 792 A1

tcgaccgctt ggcgggtaaa cccacccatg tcaatgtgtc tgttgatcatg ggggaggtgg  
 2460  
 acggcacctg ctatgagggg atggatcttc gatcccgatc gttcaaacat ttggcaataa  
 2520  
 agtttcttaa gattgaatcc tgttgccggg cttgcgatga ttatcatata atttctgttg  
 2580  
 aattacgtta agcatgtaat aattaacatg taatgcatga cgttatttat gagatgggtt  
 2640  
 tttatgatta gagtcccgca attatacatt taatacgcga tagaaaacaa aatatagcgc  
 2700  
 gcaaactagg ataaattatc ggcgdcgggtg tcatctatgt tactagatcg ggaattgcca  
 2760  
 agctaattct tgaagacgaa agggcctcgt gatacgccta tttttatagg ttaatgtcat  
 2820  
 gataataatg gtttcttaga cgtcaggtgg cacttttcgg ggaaatgtgc gcggaacccc  
 2880  
 tatttgttta ttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcgatgagc aataaccctg  
 2940  
 ataaatgctt caataatggg accgactcgc cgtcgatgcc aactagagc caagctgatc  
 3000  
 tcctttgccc eggagatcac catggacgac tttctctatc tctacgatct aggaagaaag  
 3060  
 ttgcagggag aaggtgacga taccatgttc accaccgata atgagaagat tagcctcttc  
 3120  
 aatttcagaa agaatgctga cccacagatg gttagagagg cctacgcggc aggtctgatc  
 3180  
 aagacgatct acccgagtaa taatctccag gagatcaaat accttccaa gaaggttaaa  
 3240  
 gatgcagtca aaagattcag gactaactgc atcaagaaca cagagaaaga tatatttctc  
 3300  
 aagatcagaa gtactattcc agtatggacg attcaaggct tgcttcataa accaaggcaa  
 3360  
 gtaatagaga ttggagtctc taagaaagta gttcctactg aatcaaaggc catggagtca  
 3420  
 aaaattcaga tcgaggatct aacagaactc gccgtgaaga ctggcgaaca gttcatacag  
 3480  
 agtcttttac gactcaatga caagaagaaa atcttcgtca acatgggtga gcacgacact  
 3540  
 ctctctact ccaagaatat caagatata gtctcagaag accaaagggc tattgagact  
 3600  
 tttcaacaaa gggtaatatc gggaaacctc ctcggattcc attgcccagc tatctgtcac  
 3660  
 ttcatacaaaa ggacagtaga aaaggaaggt ggcacctaca aatgccatca ttgcgataaa  
 3720



ES 2 389 792 A1

ggaaaggcta tcgttcaaga tgcctctgcc gacagtggtc ccaaagatgg acccccaccc  
 3780  
 acgaggagca tcgtggaaaa agaagacgtt ccaaccacgt cttcaaagca agtggattga  
 3840  
 tgtgatatct ccactgacgt aagggatgac gcacaatccc actatccttc gcaagaccct  
 3900  
 tcctctatat aaggaagttc atttcatttg gagaggactc cggatattttt acaacaatac  
 3960  
 cacaacaaaa caaacacaaa acaacattac aatttactat tctagtcgag atgggcactt  
 4020  
 cctctgtttt tctactattc cttctttctt ttcttctcct tctcccgtcc ctccctgcct  
 4080  
 cttctgagct gactcaggac cctgctgtgt ctgtggcctt gggacagaca gtcaggatca  
 4140  
 catgcccaagg agacagcctc agaagctatt atgcaagctg gtaccagcag aagccaggac  
 4200  
 aggccctgt acttgctcgc tatggtaaaa acaaccggcc ctccagggatc ccagaccgat  
 4260  
 tctctggctc cagctcagga aacacagctt ccttgaccat cactggggct caggcggaag  
 4320  
 atgaggctga ctattactgt aactcccggg acagcagtgg taaccatgat ttggtattcg  
 4380  
 ggggagggac caagctgacc gtcctaggtg gtcaacaaaa ggccgcccc tctgtcactc  
 4440  
 tgttcccgcc ctccctctgag gagctccaag ccaacaaggc cacactagtg tgtctgatca  
 4500  
 gtgacttcta cccgggagct gtgacagtgg cctggaaggc agatggcagc cccgtcaagg  
 4560  
 cgggagtggg gacaacaaaa ccctccaaac agagcaacaa caagtacgag gccagcagct  
 4620  
 acctgagcct gacgcccagc cagtggaagt cccacagaag ctacagctgc caggtcacgc  
 4680  
 atgaaggag caccgtggag aagacagtgg cccctacaga atgttcatga gggaatggat  
 4740  
 cttcgatccc gatcgttcaa acatttggca ataaagtctt ttaagattga atcctgttgc  
 4800  
 cggctcttgc atgattatca tataatttct gttgaattac gttaagcatg taataattaa  
 4860  
 catgtaatgc atgacgttat ttatgagatg ggtttttatg attagagtcc cgcaattata  
 4920  
 catttaatac gcgatagaaa acaaaatata ggcgcgcaaac taggataaat tatcgcgcddc  
 4980  
 ggtgtcatct atgttactag atcgggaatt gccaaagctaa ttcttgaaga cgaaagggcc  
 5040

ES 2 389 792 A1

tctgtgatacg cctatTTTTTA taggttaatg tcatgataat aatggTTTTct tagacgtcag  
5100

gtggcacttt tCGGGGaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatTTTTc taaatacatt  
5160

caaatatgta tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa tgggaccgac  
5220

tCGccgtccg accgtctgag acgtgacagg atatattggc gggtaaacta agtcgctgta  
5280

tgtgtttggt tgagatctca tgtgagcaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa  
5340

ggcgcggttg ctggcgTTTT tccataggct cgcCCCCct gacgagcatc aaaaaaatcg  
5400

acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac aggactataa agataccagg cgtttcccc  
5460

tggaaagtcc ctCGTgcgct ctCctgttcc gaccctgCCg cttaccggat acctgtccgc  
5520

ctttctccct tCGggaagcg tggcgTTTTc tcatagctca cgctgtaggt atctcagttc  
5580

ggtgtaggtc gttcgcTcca agctgggctg tgtgcacgaa cccccgTtc agcccgaccg  
5640

ctgCGcctta tccggtaaot atcgtcttga gtccaaccCG gtaagacacg acttatcgcc  
5700

actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga  
5760

gttcttgaag tggTggccta actacggcta cactagaaga acagtatttg gtatctgCCg  
5820

tctgctgaag ccagttacct tCGgaagaag agttggtagc tcttgatccg gaaaacaaac  
5880

caccgctggT agcggTggtt tttttgTtg caagcagcag attacgcgca gaaaaaaagg  
5940

atctcaagaa gatcctttga tcttttctac ggggtctgac gctcagTgga acgaaaactc  
6000

acgttaaggg attttggTca tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tccttttaaa  
6060

ttaaaaaatga agttttaaat caatctaaag tatatatgtg taacattggT ctagtgatta  
6120

gaaaaactca tCGagcatca aatgaaactg caatttattc atatcaggat tatcaatacc  
6180

atatttttga aaaagccgTt tctgtaatga aggagaaaac tcaccgaggc agttccatag  
6240

gatggcaaga tcctggTatc ggtctgcgat tccgactcgt ccaacatcaa tacaacctat  
6300

taatttcccc tCGtcaaaaa taaggTtatc aagtgagaaa tcaccatgag tgacgactga  
6360

ES 2 389 792 A1

atccggtgag aatggcaaaa gtttatgcat ttctttccag acttgttcaa caggccagcc  
 6420  
 attacgctcg tcatcaaaat cactcgcatc aaccaaacgg ttattcattc gtgattgccc  
 6480  
 ctgagcgagt cgaaatacgc gatcgctggt aaaaggacaa ttacaaacag gaatcgaatg  
 6540  
 caaccggcgc aggaacactg ccagcgcacg aacaatattt tcacctgaat caggatattc  
 6600  
 ttctaatacc tggaatgctg ttttccctgg gatcgcagtg gtgagtaacc atgcatcatc  
 6660  
 aggagtacgg ataaaatgct tgatggtcgg aagaggcata aattccgtca gccagtttag  
 6720  
 tctgaccatc tcatctgtaa caacattggc aacgctacct ttgccatggt tcagaaacaa  
 6780  
 ctctggcgca tcgggcttcc catacaatcg gtagattgtc gcacctgatt gcccgacatt  
 6840  
 atcgcgagcc catttatacc catataaatc agcatccatg ttggaattta atcgcggcct  
 6900  
 tgagcaagac gtttcccggt gaatatggct cataacaccc cttgtattac tgtttatgta  
 6960  
 agcagacagt tttattgttc atgatgatat atttttatct tgtgcaatgt aacatcagag  
 7020  
 attttgagac acaacgtggc tttgttgaat aaatcgaact tttgctgagt tgaaggatca  
 7080  
 gatcacgcat cttcccgaca acgcagaccg ttccgtggca aagcaaaagt tcaaaatcac  
 7140  
 caactgggtcc acctacaaca aagctctcat caaccgtggc tccctcactt tctggctgga  
 7200  
 tgatggggcg attcaggcga tccccatcca acagcccggc gtcgagcggg cttttttatc  
 7260  
 cccggaagcc tgtggataga gggtagttat ccacgtgaaa ccgctaatgc cccgcaaagc  
 7320  
 cttgattcac ggggctttcc ggcccgtccc aaaaactatc cacgtgaaat cgctaatcag  
 7380  
 ggtacgtgaa atcgctaata ggagtacgtg aaatcgctaa taaggtcacg tgaatcgct  
 7440  
 aatcaaaaag gcacgtgaga acgctaatac ccctttcaga tcaacagctt gcaaacaccc  
 7500  
 ctcgctccgg caagtagtta cagcaagtag tatgttcaat tagcttttca attatgaata  
 7560  
 tatatatcaa ttattggtcg cccttggett gtggacaatg cgctacgcgc accggctccg  
 7620  
 cccgtggaca accgcaagcg gttgccacc gtogagcggc agcgctttg cccacaaccc  
 7680

## ES 2 389 792 A1

ggcggccggc cgcaacagat cgttttataa attttttttt ttgaaaaaga aaaagcccga  
7740

aaggcggcaa cctctcgggc ttctggattt cccgatccccg gaattagaga tcttggcagg  
7800

atatattgtg gtgtaaccgt ctcaggca  
7828

<210> 43

<211> 7843

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Vector de expresion de la IgA\_2A1 con cadena pesada alfa 1 y  
cadena ligera kappa

<400> 43

tggcccacac tagagccaag ctgatctcct ttgccccgga gatcaccatg gacgactttc  
60

tctatctcta cgatctagga agaaagtctg acggagaagg tgacgatacc atgttcacca  
120

ccgataatga gaagattagc ctcttcaatt tcagaaagaa tgctgaccca cagatggtta  
180

gagaggccta cgcggcaggc ctgatcaaga cgatctacc gagtaataat ctccaggaga  
240

tcaataacct tcccaagaag gttaaagatg cagtcaaaag attcaggact aactgcatca  
300

agaacacaga gaaagatata tttctcaaga tcagaagtac tattccagta tggacgattc  
360

aaggcttgct tcataaacca aggcaagtaa tagagattgg agtctctaag aaagtagttc  
420

ctactgaatc aaaggccatg gagtcaaaaa ttcagatcga ggatctaaca gaactcgccg  
480

tgaagactgg cgaacagttc atacagagtc ttttacgact caatgacaag aagaaaatct  
540

tcttcaacat ggtggagcac gacactctcg tctactcaa gaatatcaa gatacagttc  
600

cagaagacca aagggtatt gagacttttc aacaaagggc aatatcgga aacctcctcg  
660

gattccattg cccagctatc tgtcacttca tcaaaaggac agtagaaaag gaaggtggca  
720

cctacaaatg ccatcattgc gataaaggaa aggctatcgt tcaagatgcc tctgccgaca  
780

gtggtcccaa agatggacc ccaccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa gacgttccaa  
840

ccacgtcttc aaagcaagtg gattgatgtg atatctccac tgacgtaagg gatgacgcac  
900

# ES 2 389 792 A1

aatcccacta tccttcgcaa gacccttcct ctatataagg aagttcattt catttggaga  
960

ggactccggg atttttacaa caataccaca acaaaacaaa caacaacaa cattacaatt  
1020

tactattcta gtcgagatgg gcacttcctc tgtttttcta ctattccttc tttcttttct  
1080

tctccttctc ccgtccctcc ttgcccaggg gcagctgttg cagtctgcag cagaggtgaa  
1140

aaagcccggg gagtctctga agatctcctg taagggttct ggatacagct ttaccagcta  
1200

ctggatcggc tgggtgcgcc agatgcccg gaaaggcctg gagtggatgg ggatcatcta  
1260

tctgggtgac tctgataacc gatacagccc gtccttccaa ggccagggtca ccatctcagc  
1320

cgacaagtcc atcagcaccg cctacctgca gtggagcagc ctgaaggcct cggacacggc  
1380

cgtgtattac tgtgcaagat ataggcggaa tacttttgac tattggggcc aaggtagcct  
1440

ggtcaccgtc gcatgcatcc ccgaccagcc ccaaggctct cccgctgagc ctcgacagca  
1500

cccccaaga tgggaacgtg gtcgtcgcat gcctggtcca gggttcttc ccccaggagc  
1560

cactcagtgt gacctggagc gaaagcggac agaacgtgac cgccagaaac tccccaccta  
1620

gccaggatgc ctccggggac ctgtacacca cgagcagcca gctgaccctg ccggccacac  
1680

agtgccaga cggcaagtcc gtgacatgcc acgtgaagca ctacacgaat cccagccagg  
1740

atgtgactgt gcctgcccc gttccccac ctccccatg ctgccacccc cgactgtcgc  
1800

tgcaccgacc ggccctcgag gacctgctct taggttcaga agcgaacctc acgtgcacac  
1860

tgaccggcct gagagatgcc tctgggtgcca ccttcacctg gacgccctca agtgggaaga  
1920

gcgctgttca aggaccacct gagcgtgacc tctgtggctg ctacagcgtg tccagtgtcc  
1980

tgcttggtg tgcccagcca tggaaacctg gggaaacctt cacctgcact gctgcccacc  
2040

ccgagttgaa gaccccacta accgccaaca tcacaaaatc cggaaacaca ttccggcccg  
2100

aggtccacct gctgcgcgcg ccgtcggagg agctggcctt gaaagagctg gtgacgctga  
2160

cgtgcctggc acgtggcttc agccccaagg atgtgctggt tcgctggctg caggggtcac  
2220

ES 2 389 792 A1

aggagctgcc ccgcgagaag tacctgactt gggcatcccg gcaggagccc agccagggca  
2280

ccaccacctt cgctgtgacc agcatactgc gcgtggcagc cgaggactgg aagaaggggg  
2340

acaccttctc ctgcatggtg ggccacgagg ccctgccgct ggccttcaca cagaagacca  
2400

tcgaccgctt ggcgggtaaa cccacccatg tcaatgtgtc tgttgatcatg gcggaggtgg  
2460

acggcacctg ctatgagggg atggatcttc gatcccgatc gttcaaacat ttggcaataa  
2520

agtttcttaa gattgaatcc tgttgccggt cttgcgatga ttatcatata atttctgttg  
2580

aattacgtta agcatgtaat aattaacatg taatgcatga cgttatttat gagatgggtt  
2640

tttatgatta gagtcccgca attatacatt taatagcga tagaaaacaa aatatagcgc  
2700

gcaaactagg ataaattatc gcgdcggtg tcatctatgt tactagatcg ggaattgcc  
2760

agctaattct tgaagacgaa agggcctcgt gatacgccta tttttatagg ttaatgtcat  
2820

gataataatg gtttcttaga cgtcagggtg cacttttcgg ggaaatgtgc gcggaacccc  
2880

tatttgttta ttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg  
2940

ataaatgctt caataatggg accgactcgc cgtcgatgcc aactagagc caagctgatc  
3000

tcctttgccc cggagatcac catggacgac tttctctatc tctacgatct aggaagaaag  
3060

ttcgacggag aaggtgacga taccatgttc accaccgata atgagaagat tagcctcttc  
3120

aatttcagaa agaatgctga cccacagatg gttagagagg cctacgcggc aggtctgatc  
3180

aagacgatct acccgagtaa taatctccag gagatcaaat accttcccaa gaaggttaa  
3240

gatgcagtca aaagattcag gactaactgc atcaagaaca cagagaaaga tatatttctc  
3300

aagatcagaa gtactattcc agtatggacg attcaaggct tgcttcataa accaaggcaa  
3360

gtaatagaga ttggagtctc taagaaagta gttcctactg aatcaaaggc catggagtca  
3420

aaaattcaga tcgaggatct aacagaactc gcggtgaaga ctggcgaaca gttcatacag  
3480

agtcttttac gactcaatga caagaagaaa atcttcgtca acatggtgga gcacgacact  
3540

ES 2 389 792 A1

ctcgtctact ccaagaatat caaagataca gtctcagaag accaaagggc tattgagact  
3600

tttcaacaaa gggtaatatc gggaaacctc ctcggattcc attgcccagc tatctgtcac  
3660

ttcatcaaaa ggacagtaga aaaggaaggt ggcacctaca aatgccatca ttgcgataaa  
3720

ggaaaggcta tcgttcaaga tgcctctgcc gacagtggtc ccaaagatgg acccccaccc  
3780

acgaggagca tcgtggaaaa agaagacggt ccaaccacgt cttcaaagca agtggattga  
3840

tgtgatatct cactgacgt aagggatgac gcacaatccc actatccttc gcaagaccct  
3900

tcctctatat aaggaagttc atttcatttg gagaggactc cggatattttt acaacaatac  
3960

cacaacaaaa caaacacaa acaacattac aatttactat tctagtcgag atgggcactt  
4020

cctctgtttt tctactattc cttctttctt ttcttctcct tctcccgtcc ctcttgcct  
4080

cttctgagct gactcaggac cctgctgtgt ctgtggcctt gggacagaca gtcaggatca  
4140

catgcccaagg agacagcctc agaagctatt atgcaagctg gtaccagcag aagccaggac  
4200

aggcccctgt acttgtcatc tatggtaaaa acaaccggcc ctcagggatc ccagaccgat  
4260

tctctggctc cagctcagga aacacagctt ccttgaccat cactggggct caggcgggaag  
4320

atgaggctga ctattactgt aactcccggg acagcagtgg taaccatgat ttggtattcg  
4380

gctggaggac caagctgacc gtccctaggta ggactgttgc tgctccatct gtttttattt  
4440

ttccaccatc tgatgaacaa cttaaactcg gaactgcttc tgttgtttgt cttcttaata  
4500

atTTTTatcc aagagaagct aaagtcaat ggaaagtga taatgctctt caatctggaa  
4560

attctcaaga atctgttact gaacaagatt ctaaagattc tacttattct ctttcttcta  
4620

ctcttactct ttctaaagct gattatgaaa aacataaagt ttatgcttgt gaagttactc  
4680

atcaaggact ttcttctcca gttactaaat cttttaatag aggagaatgt aaagatgaac  
4740

tttgagggaa tggatcttcg atcccgatcg ttcaaacatt tggcaataaa gtttcttaag  
4800

attgaatcct gttgccggtc ttgcatgat tatcatataa tttctgttga attacgttaa  
4860

ES 2 389 792 A1

gcatgtaata attaacatgt aatgcatgac gttatztatg agatggggtt ttatgattag  
4920

agtcccgcaa ttatacattt aatacgcgat agaaaacaaa atatagcgcg caaactagga  
4980

taaattatcg cgcdcggtgt catctatggt actagatcgg gaattgccaa gctaattctt  
5040

gaagacgaaa gggcctcgtg atacgcctat ttttataggt taatgcatg ataataatgg  
5100

tttcttagac gtcaggtggc acttttcggg gaaatgtgcg cggaaacctt atttgttat  
5160

ttttctaaat acattcaaat atgtatccgc tcatgagaca ataacctga taaatgcttc  
5220

aataatggga ccgactcgcc gtccgaccgt ctgagacgtg acaggatata ttggcgggta  
5280

aactaagtcg ctgtatgtgt ttgtttgaga tctcatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc  
5340

caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc ccctgacga  
5400

gcatcacaaa aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata  
5460

ccaggcgttt cccctggaa gctccctcgt gcgctctcct gttccgacct tgcgccttac  
5520

cggatacctg tccgcctttc tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg  
5580

taggtatctc agttcgggtg aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc  
5640

cgttcagccc gaccgctgcg ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccggtaag  
5700

acacgactta tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggatgt  
5760

aggcgggtgct acagagttct tgaagtggcg gcctaactac ggctacacta gaagaacagt  
5820

atgtggtatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga agaagagttg gtagctcttg  
5880

atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc agcagattac  
5940

gcccagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt tctacggggg ctgacgctca  
6000

gtggaacgaa aactcacggt aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac  
6060

ctagatcctt ttaaattaaa aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat atgtgtaaca  
6120

ttggtctagt gattagaaaa actcatcgag catcaaatga aactgcaatt tattcatatc  
6180



ES 2 389 792 A1

aggattatca ataccatatt ttgaaaaag cggtttctgt aatgaaggag aaaactcacc  
6240

gaggcagttc cataggatgg caagatcctg gtatcggctc gcgattccga ctcgccaac  
6300

atcaatacaa cctattaatt tcccctcgtc aaaaataagg ttatcaagtg agaaatcacc  
6360

atgagtgacg actgaatccg gtgagaatgg caaaagttta tgcatttctt tocagacttg  
6420

ttcaacagggc cagccattac gctcgtcacc aaaatcactc gcatcaacca aaccgttatt  
6480

cattcgtgat tgcgcctgag cgagtcgaaa tacgcgatcg ctgttaaaag gacaattaca  
6540

aacaggaatc gaatgcaacc ggcgcaggaa cactgccagc gcatcaacaa tattttcacc  
6600

tgaatcagga tattcttcta atacctggaa tgctgttttc cctgggatcg cagtggtag  
6660

taaccatgca tcatcaggag tacggataaa atgcttgatg gtcggaagag gcataaatc  
6720

cgtcagccag tttagtctga ccatctcacc tgtaacaaca ttggcaacgc tacctttgcc  
6780

atgtttcaga aacaactctg ggcgatcggg ctcccatatc aatcggtaga ttgtcgcacc  
6840

tgattgcccc acattatcgc gagcccattt ataccatata aatcagcat ccatgttgga  
6900

atttaatcgc ggccttgagc aagacgtttc cggttgaata tggctcataa cccccctgt  
6960

attactgttt atgtaagcag acagttttat tgttcatgat gatataatc tatcttctgc  
7020

aatgtaacat cagagatcct gagacacaac gtggctttgt tgaataaatc gaacttttgc  
7080

tgagttgaag gatcagatca cgcactctcc cgacaacgca gaccgttccg tggcaaagca  
7140

aaagttcaaaa atcaccaact ggtccaccta caacaaagct ctcatcaacc gtggctccct  
7200

cactttctgg ctggatgatg gggcgattca ggcgatcccc atccaacagc cggcgtcga  
7260

gcgggctttt ttatccccgg aagcctgtgg atagagggtg gttatccacg tgaaacctgt  
7320

aatgccccgc aaagccttga ttcacggggc tttccggccc gtcctcaaaa ctatccacgt  
7380

gaaatcgcta atcagggtac gtgaaatcgc taatcggagt acgtgaaatc gctaataagg  
7440

tcacgtgaaa tcgctaataca aaaaggcacg tgagaacgct aatagccctt tcagatcaac  
7500

# ES 2 389 792 A1

agcttgcaaa caccctcgc tccggcaagt agttacagca agtagtatgt tcaattagct  
7560

tttcaattat gaatatatat atcaattatt ggtcgccctt ggcttggtga caatgcgcta  
7620

cgcgccaccgg ctccgcccgt ggacaaccgc aagcgggtgc ccaccgtcga gcgccagcgc  
7680

ctttgcccac aaccggcgg cgggccgcaa cagatcgttt tataaatttt tttttttgaa  
7740

aaagaaaaag cccgaaaggc ggcaacctct cgggcttctg gatttccgat ccccggaatt  
7800

agagatcttg gcaggatata ttgtggtgta accgtctcag gca  
7843

<210> 44

<211> 10197

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Vector de expresion de IgA\_2A1 y Resistencia a kanamicina para plantas

<400> 44

ccactggcat acatgagaat taaggagat acatgagaat taaggagtc acgttatgac  
60

ccccgccgat gacgcgggac aagccgtttt acgtttggaa ctgacagaac cgcaacggtg  
120

aaggagccac tcagccggcg gtttctggag tttaatgagc taagcacata cgtcagaaac  
180

cattattgcy cgttcaaaag tcgcctaagg tcactatcag ctagcaaata tttcttgtca  
240

aaaatgctcc actgacgttc cataaattcc cctcgggtatc caattagagt ctcatattca  
300

ctctcaactc gatcgaggca tgattgaaca agatggattg cacgcagggt ctccggccgc  
360

ttgggtggag aggctattcg gctatgactg ggcacaacag acaatcggct gctctgatgc  
420

cgccgtgttc cggctgtcag cgcaggggcy cccggttctt tttgtcaaga ccgacctgtc  
480

cggtgccctg aatgaactcc aagacgaggc agcgcggcta tcgtggctgg ccacgacggg  
540

cgttccttgc gcagctgtgc tcgacgttgt cactgaagcy ggaagggact ggctgctatt  
600

gggcgaagtg ccggggcagg atctcctgtc atctcacctt gctcctgccg agaaagtatc  
660

catcatggct gatgcaatgc ggcggctgca tacgcttgat ccggctacct gccattcga  
720

ccaccaagcy aaacatcga tcgagcgcgc acgtactcgg atggaagccg gtcttgcga

# ES 2 389 792 A1

780

tcaggatgat ctggacgaag agcatcaggg gctcgcgcca gccgaactgt togccaggct  
840

caaggcgcgg atgcccgcag gcgaggatct cgtcgtgacc cacggcgatg cctgcttgcc  
900

gaatatcatg gtggaaaatg gccgcttttc tggattcatc gactgtggcc ggctgggtgt  
960

ggcggaccgc tadcaggaca tagcgttggc taccctgat attgctgaag agcttggcgg  
1020

cgaatgggct gaccgcttcc tcgtgcttta cggtatcgcc gctcccatt cgcagcgcac  
1080

cgcttctat cgcttcttg acgagttctt ctgagcggga ctctggggtt cggactctag  
1140

ctagagtcaa gcagatcgtt caaacatttg gcaataaagt ttcttaagat tgaatcctgt  
1200

tgcgggtctt gcgatgatta tcatataatt tctggtgaat tacgttaagc atgtaataat  
1260

taacatgtaa tgcacgacgt tatttatgag atgggttttt atgattagag tcccgcatt  
1320

atacatttaa tacgcgatag aaaacaaaat atagcgcgca aactaggata aattatcgcg  
1380

cgcggtgtca tctatgttac tagatcgacc ggcatgcaag ctgataattc aaagatcgac  
1440

cggcatgcaa gctgattgag ggaatggatc ttcgatcccg atcgttcaaa catttgcaa  
1500

taaagtttct taagattgaa tcctgttgcc ggtcttgcca tgattatcat ataatttctg  
1560

ttgaattacg ttaagcatgt aataattaac atgtaatgca tgacgttatt tatgagatgg  
1620

gtttttatga ttagagtccc gcaattatac atttaatacg cgatagaaaa caaaatatag  
1680

cgcgcaaaact aggataaatt atcgcgcocg gtgtcatcta tgttactaga tcgggaattg  
1740

ccaagctaat tcttgaagac gaaagggcct cgtgatacgc ctatTTTTAT aggttaatgt  
1800

catgataata atggtttctt agacgtcagg tggcactttt cggggaaatg tgcgcggaac  
1860

ccctatttgt ttatTTTTCT aaatacatc aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc  
1920

ctgataaatg cttcaataat gggaccgact cgcgacggca tggcccacac tagagccaag  
1980

ctgatctcct ttgccccgga gatcaccatg gacgactttc tctatctcta cgatctagga  
2040

agaaagttcg acggagaagg tgacgatacc atgttcacca ccgataatga gaagattagc

# ES 2 389 792 A1

2100

ctcttcaatt tcagaaagaa tgctgaccca cagatggta gagaggccta cgcggcaggt  
2160

ctgatcaaga cgatctaccc gagtaataat ctccaggaga tcaaatacct tccaagaag  
2220

gttaaagatg cagtcaaaag attcaggact aactgcatca agaacacaga gaaagatata  
2280

tttctcaaga tcagaagtac tattccagta tggacgattc aaggcttgct tcataaacca  
2340

aggcaagtaa tagagattgg agtctctaag aaagtagttc ctactgaatc aaaggccatg  
2400

gagtcaaaaa ttcagatoga ggatctaaca gaactcgccg tgaagactgg cgaacagttc  
2460

atacagagtc ttttacgact caatgacaag aagaaaatct tcgtcaacat ggtggagcac  
2520

gacactctcg tctactccaa gaatatcaaa gatacagtct cagaagacca aagggtatt  
2580

gagacttttc aacaaagggg aatatcgga aacctcctcg gattccattg cccagctatc  
2640

tgtcacttca tcaaaaggac agtagaaaag gaagggtggca cctacaaatg ccatcattgc  
2700

gataaaggaa aggctatcgt tcaagatgcc tctgccgaca gtgggtccca agatggacc  
2760

ccaccacga ggagcatcgt ggaaaaagaa gacgttccaa ccacgtcttc aaagcaagtg  
2820

gattgatgtg atatctccac tgacgtaagg gatgacgcac aatcccacta tccttcgcaa  
2880

gacccttct ctatataagg aagttcattt catttggaaga ggactccggt atttttacaa  
2940

caataccaca acaaaacaaa caacaacaa cattacaatt tactattcta gtcgacctgc  
3000

aggcggccgc actagtgata tcgatgggca cttcctctgt ttttctacta ttcttcttt  
3060

cttttcttct ccttctcccg tccctccttg cccagggtgca gctggtgcag tctgcagcag  
3120

aggtgaaaaa gcccggggag tctctgaaga tctcctgtaa gggttctgga tacagcttta  
3180

ccagctactg gatcggtgg gtgcgccaga tgccccggaa aggctggag tggatgggga  
3240

tcatttatcc tggtgactct gatacccgat acagcccgtc cttccaaggc caggtcacca  
3300

tctcagccga caagtccatc agcaccgcct acctgcagtg gagcagcctg aaggcctcgg  
3360

acacggccgt gtattactgt gcaagatata ggcggaatac ttttgactat tggggccaag

ES 2 389 792 A1

3420

gtagcctggg caccgtcgca tccccgacca gcccgaaggt cttcccgtg agcctctgca  
3480

gcacccagcc agatgggaac gtgggtcatcg cctgcctggg ccagggcttc ttccccagg  
3540

agccactcag tgtgacctgg agcgaaagcg gacagggcgt gaccgccaga aacttcccac  
3600

ccagccagga tgcctccggg gacctgtaca ccacgagcag ccagctgacc ctgccggcca  
3660

cacagtgcct agccggcaag tccgtgacat gccacgtgaa gcactacacg aatcccagcc  
3720

aggatgtgac tgtgccttgc ccagttccct caactccacc taccatctt cctcaactc  
3780

cacctacccc atctccctca tgctgccacc cccgactgtc actgcaccga ccggcccttg  
3840

aggacctgct cttaggttca gaagcgaacc tcacgtgcac actgaccggc ctgagagatg  
3900

cctcaggtgt caccttcacc tggacgccct caagtgggaa gagcgtgtt caaggaccac  
3960

ctgagcgtga cctctgtggc tgctacagcg tgtccagtgt cctgccgggc tgtgccgagc  
4020

cttggaatca tgggaagacc ttcacttgca ctgctgccta ccccagatcc aagaccccgc  
4080

taaccgccac cctctcaaaa tccggaaca cattccggcc cgaggtccac ctgctgccgc  
4140

cgccgtcgga ggagctggcc ctgaacgagc tgggtgacgt gacgtgcctg gcacgtggct  
4200

tcagcccca ggatgtgctg gttcgtggc tgcaggggtc acaggagctg ccccgcgaga  
4260

agtacctgac ttgggcatcc cggcaggagc ccagccaggg caccaccacc ttcgctgtga  
4320

ccagcatact gcgctggca gccgaggact ggaagaaggg ggacaccttc tcctgcatgg  
4380

tgggccacga ggccctgcog ctggccttca cacagaagac catcgaccgc ttggcgggta  
4440

aacccaccca tgtcaatgtg tctgtttgca tggcggaggg ggacggcacc tgctacaagg  
4500

acgaactctg agggaatgga tcttcgatcc cgatcgttca aacatttggc aataaagttt  
4560

cttaagattg aatcctgttg ccggtcttgc gatgattatc atataatttc tgttgaatta  
4620

cgtaagcat gtaataatta acatgtaatg catgacgtta tttatgagat gggtttttat  
4680

gattagagtc ccgcaattat acatttaata cgcgatagaa aacaaaatat agcgcgcaaa

ES 2 389 792 A1

4740

ctaggataaa ttatcgcgcd cgggtgcatc tatgttacta gatcgggaat tgccaagcta  
4800

attcttgaag acgaaagggc ctctgtgatac gcctatTTTT ataggttaat gtcattgataa  
4860

taatggTTTT ttagacgtca ggtggcactt ttcggggaaa tgtgcgcgga acccctattt  
4920

gtttatTTTT ctaaatacat tcaaataatgt atccgctcat gagacaataa ccctgataaa  
4980

tgcttcaata atgggaccga ctccgcgctc atgccacact agagccaagc tgatctcctt  
5040

tgccccggag atcaocattg acgactttct ctatctctac gatctaggaa gaaagttcga  
5100

cggagaaggt gacgatacca tgttcaccac cgataatgag aagattagcc tcttcaattt  
5160

cagaaagaat gctgaccac agatggttag agaggctac gcggcaggtc tgatcaagac  
5220

gatctacccg agtaataatc tccaggagat caaatacctt cccaagaagg ttaaagatgc  
5280

agtcaaaaaga ttcaggacta actgcatcaa gaacacagag aaagatatat ttctcaagat  
5340

cagaagtact attccagtat ggacgattca aggcttgctt cataaaccaa ggcaagtaat  
5400

agagattgga gtctctaaga aagtagttcc tactgaatca aaggccattg agtcaaaaaat  
5460

tcagatcgag gatctaacag aactcgcctg gaagactggc gaacagttca tacagagttc  
5520

tttacgactc aatgacaaga agaaaatctt cgtcaacatg gtggagcacg acactctcgt  
5580

ctactccaag aatatcaaag atacagtctc agaagaccaa agggctattg agacttttca  
5640

acaagggtta atatcgggaa acctcctcgg attccattgc ccagctatct gtcacttcat  
5700

caaaaggaca gtagaaaagg aaggtggcac ctacaaatgc catcattgcg ataaaggaaa  
5760

ggctatcgtt caagatgcct ctgccgacag tgggtccaaa gatggacccc caccacagag  
5820

gagcatcgtg gaaaaagaag acgttccaac cacgtcttca aagcaagtgg attgatgtga  
5880

tatctccact gacgtaaggg atgacgcaca atcccactat ccttcgcaag accttctctc  
5940

tatataagga agttcatttc atttgagag gactccggtta tttttacaac aataccacaa  
6000

caaaacaaac aacaaacaac attacaattt actattctag tcgagatggg cacttctctc

ES 2 389 792 A1

6060

gtttttctac tattccttct ttcttttctt ctctttctcc cgtccctcct tgcctcttct  
6120

gagctgactc aggaccctgc tgtgtctgtg gccttgggac agacagtcag gatcacatgc  
6180

caaggagaca gcctcagaag ctattatgca agctgggtacc agcagaagcc aggacaggcc  
6240

cctgtacttg tcatctatgg taaaaacaac cggccctcag ggatcccaga ccgattctct  
6300

ggctccagct caggaaacac agcttccttg accatcactg gggctcaggc ggaagatgag  
6360

gctgactatt actgtaactc ccgggacagc agtggtaacc atgatttggg attcggcgga  
6420

gggaccaagc tgaccgtcct aggtgggtcaa ccaaaggccg ccccctctgt cactctgttc  
6480

ccgccctcct ctgaggagct ccaagccaac aaggccacac tagtgtgtct gatcagtgac  
6540

ttctaccggg gagctgtgac agtggcctgg aaggcagatg gcagccccgt caaggcggga  
6600

gtggagacaa ccaaaccctc caaacagagc aacaacaagt acgcggccag cagctacctg  
6660

agcctgacgc ccgagcagtg gaagtcccac agaagctaca gctgccaggt cacgcatgaa  
6720

gggagcaccg tggagaagac agtggcccct acagaatggt catgagggaa tggatcttcg  
6780

atccccgatc ttcaaacatt tggcaataaa gtttcttaag attgaatcct gttgccggtc  
6840

ttgcatgat tatcatataa tttctgttga attacgttaa gcatgtaata attaacatgt  
6900

aatgcatgac gttatttatg agatggggtt ttatgattag agtcccgcaa ttatacattt  
6960

aatacgcgat agaaaacaaa atatagcgcg caaactagga taaattatcg cgcdcgggtg  
7020

catctatggt actagatcgg gaattgcca gctaattctt gaagacgaaa gggcctcgtg  
7080

atacgcctat ttttataggt taatgcatg ataataatgg tttcttagac gtcagggtggc  
7140

acttttcggg gaaatgtgcg cggaaaccct atttgtttat ttttctaat acattcaaat  
7200

atgtatccgc tcatgagaca ataaccctga taaatgcttc aataatggga ccgactcgcc  
7260

gtccgaccgt cgatgagaga cctgacagga tatattggcg ggtaaactaa gtcgctgtat  
7320

gtgtttgttt gagatctcat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaaag

# ES 2 389 792 A1

7380

gccgcggttg tggcggtttt ccataggctc egccccctg acgagcatca caaaaatcga  
7440

cgctcaagtc agaggtggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggc gtttccccct  
7500

ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttccg accctgccgc ttaccggata cctgtccgcc  
7560

tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct catagctcac gctgtaggta tctcagttcg  
7620

gtgtaggtcg ttocgtccaa gctgggctgt gtgcaogaac cccccgttca gcccgaccgc  
7680

tgcgccttat ccggtaaacta tcgtcttgag tccaaccogg taagacacga cttatcgcca  
7740

ctggcagcag ccaactggtaa caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag  
7800

ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagaa cagtatttgg tatctgcgct  
7860

ctgctgaagc cagttacctt cggagaaga gttggtagct cttgatccgg caaacaacc  
7920

accgctggta gcggtgggtt ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaagga  
7980

tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggctctgacg ctcaaggaa cgaaaactca  
8040

cgtaagga ttttggctat gagattatca aaaaggatct tcacctagat ctttttaat  
8100

taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt atatatgtgt aacattggtc tagtgattat  
8160

ttgccgacta ccttgggtgat ctgcctttc acgtagtgga caaattctc caactgatct  
8220

gcgcgcgagg ccaagcgatc ttcttcttgt ccaagataag cctgtctagc ttcaagtatg  
8280

acgggctgat actgggcccg caggcgctcc attgcccagt cggcagcgac atccttcggc  
8340

gcgattttgc cggttactgc gctgtaccaa atgcgggaca acgtaagcac tacatttcgc  
8400

tcatcgccag cccagtcggg cggcgagttc catagcgta aggtttcatt tagcgcctca  
8460

aatagatcct gttcaggaac cggatcaaag agttcctccg ccgctggacc taccaaggca  
8520

acgctatggt ctcttgcttt tgcagcaag atagccagat caatgtcgat cgtggctggc  
8580

tcgaagatac ctgcaagaat gtcattggc tgccattctc caaattgcag ttcgcgctta  
8640

gctggataac gccacggaat gatgtcgtog tgcacaacaa tgggtgactc tacagcgcg



ES 2 389 792 A1

8700

agaatctcgc tctctccagg ggaagccgaa gtttccaaaa ggtcgttgat caaagctcgc  
8760

cgcgttgttt catcaagcct tacggtcacc gtaaccagca aatcaatata actgtgtggc  
8820

ttcaggccgc catccactgc ggagccgtac aaatgtacgg ccagcaacgt cggttcgaga  
8880

tggcgctcga tgacgccaac tacctctgat agttgagtcg atacttcggc gatcaaccgt  
8940

tccctcatga tgtttaactt tgttttaggg cgactgccct gctgcgtaac atcgttgctg  
9000

ctccataaca tcaaacatcg acccacggcg taacgcgctt gctgcttggg tgcccgaggg  
9060

atagactgta cccccaaaaa acagtcataa caagccatga aaaccgccac tgcgccgtta  
9120

ccaccgctgc gttcgggtcaa ggttctggac cagttgcgtg agcgcatacg ctacttgcat  
9180

tacagcttac gaaccgaaca ggcttatgtc cactgggttc gtgccttcat ccgtttccac  
9240

ggtgtgcgtc acccgccaac cttgggcagc agcgaagtcg aggcatttct gtccctggctg  
9300

ggaacacccc ttgtattact gtttatgtaa gcagacagtt ttattgttca tgatgatata  
9360

tttttatctt gtgcaatgta acatcagaga ttttgagaca caacgtggct ttgttgaata  
9420

aatogaactt ttgctgagtt gaaggatcag atcacgcata ttcccgacaa cgcagaccgt  
9480

tccgtggcaa agcaaaagtt caaaatcacc aactggtcca cctacaacaa agctctcatc  
9540

aaccgtggct ccctcacttt ctggctggat gatggggcga ttcaggcgat ccccatccaa  
9600

cagcccgccg tcgagcgggc ttttttatcc ccggaagcct gtggatagag ggtagttatc  
9660

cacgtgaaac cgctaatacc ccgcaaagcc ttgattcacg gggctttccg gcccgctcca  
9720

aaaactatcc acgtgaaatc gctaatacagg gtacgtgaaa tcgctaatac gagtacgtga  
9780

aatcgctaata aaggtcacgt gaaatcgcta atcaaaaagg cacgtgagaa cgctaataagc  
9840

cctttcagat caacagcttg caaacacccc tcgctccggc aagtagttac agcaagtagt  
9900

atgttcaatt agcttttcaa ttatgaatat atatatcaat tattggtcgc ccttggcttg  
9960

tggacaatgc gctacgcgca ccggtccgc cgtggacaa ccgcaagcgg ttgccaccg

# ES 2 389 792 A1

10020

tcgagcgcca ggcctttgc ccacaaccg gcggcggcc gcaacagatc gttttataaa  
10080

ttttttttt tgaaaaagaa aaagcccgaa aggcggcaac ctctcgggct tctggatttc  
10140

cgatccccgg aattagagat ctggcagga tatattgtgg tgtaacggtc tcttggc  
10197



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

21 N.º solicitud: 201130613

22 Fecha de presentación de la solicitud: 18.04.2011

32 Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

5 Int. Cl. : **C12N15/66** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WEBER, E. et al., 'A modular cloning system for standardized assembly of multigene constructs', PLOS ONE, 18 Feb 2011, Vol. 6, No. 2, página e16765, ISSN: 1932-6203, Resultados; Figuras 3, 4 y 5.	1-6
A	ENGLER, C. et al., 'Golden Gate Shuffling: A One-Pot DNA Shuffling Method Based on Type IIs Restriction Enzymes', PLoS ONE, 2009, Vol. 4, No. 5, página e5553, ISSN: 1932-6203.	1-13
A	ENGLER, C. et al., 'A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability.', PLOS ONE, 2008, Vol. 3, No. 11, página e3647, ISSN: 1932-6203, todo el documento.	1-13

#### 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  
01.10.2012

Examinador  
J. L. Vizán Arroyo

Página  
1/4

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

C12N

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, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, EMBL-EBI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 01.10.2012

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 7-13	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-6	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 7-13	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

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	WEBER, E. et al., <i>PLoS One</i> , (18-02-2011), 6(2):e16765.	18.02.2011
D02	ENGLER, C. et al., <i>PLoS one</i> , (2009), 4(5): e5553.	2009
D03	ENGLER, C. et al., <i>PLoS One</i> , (2008), 3(11): e3647.	2008

En D1 se describen plásmidos que facilitan el ensamblaje de construcciones multigénicas para su aplicación en un método de clonado modular.

**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**

1. NOVEDAD (Art. 4.1. y Art. 6.1. de la Ley de Patentes) y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).

1.1. Reivindicación independiente 1.

1.1.1. El objeto de la reivindicación 1 consiste en un plásmido de destino pDGB para el ensamblaje *in vitro* de piezas de ADN de doble cadena que comprende básicamente una construcción genética (*cassete*) que permite una selección negativa flanqueada en sus extremos 5' y 3' por sendas secuencias de reconocimiento de dos enzimas de restricción del tipo IIS, dispuestas en orientación invertida una con respecto a la otra. Además, cada enzima de restricción da lugar, en el sitio de corte, a una secuencia de cuatro nucleótidos seleccionada de entre tres posibles (1, 2 o 3, y A, B o C, respectivamente). Sin embargo, plásmidos con dichas características técnicas ya han sido descritos en el documento D1 (cf. D1: Resultados; Figuras 3, 4 y 5). Por consiguiente, el objeto de protección de la reivindicación independiente 1 y el de las reivindicaciones dependientes 2 a 6 se considera que no es nuevo ni tiene actividad inventiva sobre la base del documento D1.

1.2. La presente solicitud no satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes, pues el objeto de las reivindicaciones 1-6 no es nuevo ni tiene actividad inventiva de acuerdo con los Arts. 6.1. y 8.1. de la Ley de Patentes.