

(11) Número de Publicação: **PT 1525320 E**

(51) Classificação Internacional:
C12N 15/85 (2007.10) **C12N 15/90** (2007.10)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2003.07.21	(73) Titular(es): LONZA BIOLOGICS PLC 228 BATH ROAD BERKSHIRE, SLOUGH SL1 4DY GB
(30) Prioridade(s): 2002.07.19 GB 0216648	
(43) Data de publicação do pedido: 2005.04.27	
(45) Data e BPI da concessão: 2008.10.29 016/2009	(72) Inventor(es): ROBERT KALLMEIER GB ROBERT GAY AU
	(74) Mandatário: ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA R DAS FLORES 74 4 AND 1249-235 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **MÉTODO DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM CÉLULAS CHO**

(57) Resumo:

DESCRIÇÃO

"Método de expressão de proteínas recombinantes em células CHO"

ANTECEDENTES DO INVENTO

O presente invento refere-se à utilização do promotor de mCMV para estimular a taxa de transfecção de um vector de expressão em mamífero em células CHO.

O sistema de expressão em mamífero de células de ovário de *hamster* chinês (CHO) é amplamente utilizado na produção de proteínas recombinantes. Aparte de linhas celulares linfóides tais como linhas celulares de hibridoma, é um dos poucos tipos de células que permite uma cultura simples e eficiente de lotes de células animais em suspensão de elevada densidade. Para além disso, permitem rendimentos de produto muito elevados e são comparativamente robustas a *stress* metabólicos enquanto que as células linfóides são mais difíceis de cultivar à escala industrial. Dado o considerável custo de produção, é da maior importância maximizar o rendimento de proteína recombinante por ciclo de biorreactor. A escolha da composição do meio de cultura e o desenho e a operação do biorreactor são parâmetros que têm impacto no rendimento e pode ser bastante complexo optimizá-los. Mais previsivelmente, aumentos na força ou na actividade de transcrição do promotor de que controla a expressão da proteína produto aumentam o rendimento. Aumentos crescentes ao nível de uma célula traduzir-se-ão em melhorias consideráveis do rendimento do produto em cultura em lotes de elevada densidade ou alimentadas em lotes apresentando expressão génica de fase estacionária a densidades celulares no intervalo de 10^6 a 10^7 células/ml.

O problema técnico subjacente ao presente invento é proporcionar meios para aumentar a eficiência de transfecção de células CHO através de vectores de expressão em mamífero.

De acordo com o presente invento este problema técnico é resolvido através da utilização do promotor de mCMV para aumentar a taxa de transfecção em células CHO, de preferência

quando se utiliza um vector de expressão compreendendo pelo menos uma primeira unidade de transcrição para um gene de um produto, primeira unidade esta que dá origem a uma proteína produto após expressão numa célula hospedeira e primeira unidade de transcrição esta que está ainda sob o controlo do promotor de citomegalovírus de ratinho (promotor de mCMV), e compreendendo ainda uma segunda unidade de transcrição compreendendo um gene marcador da glutamina-sintetase (GS). Pode também ser possível transfectar a primeira e segunda unidade de expressão em vectores diferentes ou como fragmentos génicos isolados ancorando unidades de expressão individuais. Mais, pode ser possível transfectar uma célula CHO que seja já recombinante e expresse GS com uma primeira unidade de transcrição ancorando mCMV. De acordo com o presente invento, "aumento da taxa de transfecção" é definido através da comparação da taxa de transfecção na presença do promotor de mCMV e do vector de expressão de acordo com o presente invento com a taxa de transfecção do mesmo vector de expressão e da célula hospedeira sob condições idênticas de transfecção e de cultura das células, excepto que no vector de expressão o promotor de mCMV é substituído pela construção de estimulador/promotor de hCMV-primeiro intrão tal como definido em US 5658759. Esta construção de promotor de MIE hCMV-intrão, para um dado gene de um produto idêntico, serve como padrão para a determinação do efeito reivindicado de maiores taxas de transfecção. De preferência, a utilização do promotor de mCMV resulta numa taxa de transfecção pelo menos 10 vezes maior.

O citomegalovírus de murídeo (mCMV) é um membro do grupo altamente diverso de herpesvírus. Mesmo entre os citomegalovírus de diferentes espécies hospedeiras pode haver uma ampla variação. Por exemplo, o mCMV difere consideravelmente do citomegalovírus humano (hCMV) em relação às propriedades biológicas, à organização do gene inicial imediato (IE) e à sequência nucleotídica global. O genoma de 235 kpb de mCMV também não possui as características das grandes repetições interna e terminal do hCMV. Assim, não existem formas isoméricas do genoma de mCMV (Ebeling, A. et al., *J. Virol.* 47: 421-433, 1983; Mercer, J.A. et al., *Virology* 129: 94-106, 1983). De acordo com o presente invento, é possível empregar a região promotora correspondendo essencialmente a um grande fragmento *Pst*I de aprox. 2,1 kb

descrito em US 4968615 ou qualquer fragmento funcional deste. Numa concretização mais preferida, o fragmento do promotor de mCMV empregue compreende o local de início da transcrição (+0) e prolonga-se para montante até cerca da posição -500. Verificou-se que tal fragmento promove uma expressão mais forte que uma cassete promotora que se prolonga 800 pb mais para montante para além da posição -500. Numa concretização mais preferida, é empregue uma região promotora central que se prolonga do local de início da transcrição para montante mas até ao local de restrição *XhoI* cerca da posição -150 desde o local de início da transcrição natural ou mesmo prolongando-se mas até à posição -100 a montante do local de início da transcrição natural. Claro que o local de início da transcrição pode ser modificado para compreender um local de restrição adequado para inserção do gene do produto recombinante.

De acordo com o presente invento, é também possível que a primeira unidade de transcrição que está sob o controlo do promotor de mCMV ancore pelo menos uma sequência de intrão. Tal medida é bem conhecida a arte para estabilização de transcritos de ARN e para promoção de uma síntese proteica eficiente a partir do ARNm correspondente. Para uma síntese proteica eficiente sem ter relação com o efeito reivindicado na taxa de transfecção, não é no entanto aconselhável incluir o primeiro intrão natural de mCMV na construção do promotor de mCMV. Em contraste com a situação com o promotor de hCMV (cf. US 5591639), verificou-se que tal primeiro intrão natural de mCMV diminui a expressão de um gene recombinante a partir de mCMV e é portanto excluído noutra concretização preferida.

De acordo com uma concretização preferida o vector compreende uma porção de um *locus* do gene de IgG 2A de murídeo que aumenta a actividade do promotor de mCMV.

A sequência de ADN do *locus* do gene da imunoglobulina gama 2A de murídeo (IgG 2A) foi originalmente considerada em WO 95/17516 para utilizar como sequência de direccionamento genómico para criação de linhas de células B linfóides estavelmente recombinantes que mostram elevada expressão do produto do gene recombinante. Os linfócitos B ou as células do plasma expressam normalmente níveis extremamente elevados de

ARN de imunoglobulina a partir do locus da cadeia pesada de Ig, provavelmente devido à actividade do estimulador/factor de transcrição específico do tipo celular e à estrutura aberta da cromatina. A sequência do gene da imunoglobulina gama 2A de murídeo preferida do presente invento é a mesma que a sequência direccionadora utilizada em WO 95/17516. É um fragmento genómico *Bam*HI de 5,1 kb que inclui toda a região de codificação da Ig gama 2A de murídeo excepto a parte mais a 5' do exão CH1 (Yamawaki-Kataoka, Y. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79: 2623-2627, 1982; Hall, B. *et al.*, *Molecular Immunology* 26: 819-826, 1989; Yamawaki-Kataoka, Y. *et al.*, *Nucleic Acid Research* 9: 1365-1381, 1981). De acordo com o presente invento, a promoção da recombinação homóloga dirigida ao local não é a propriedade relevante da sequência do gene da imunoglobulina gama 2A (IgG 2A). Assim, qualquer variante de sequência da referida sequência do gene de Ig 2A ou fragmento da sequência ou fragmento da sequência variante que seja funcional ou capaz de aumentar a expressão do gene do produto recombinante a partir do promotor, de preferência a partir de um promotor de hCMV tal como exposto abaixo, sob a condição de expressão transiente ou estável em células CHO está também englobada pelo presente invento. Tais variantes "funcionais" englobam, p. ex., inserções, deleções ou mutações pontuais de bases e podem ser geradas através de métodos bem conhecidos na arte, p. ex., através de PCR dirigida por iniciadores, PCR "tendente ao erro", remontagem por PCR designada de "baralhamento genético" de fragmentos de ADN sobreponíveis ou através de mutagénesis aleatória *in vivo* de clones bacterianos seguida de transfecção de bibliotecas e selecção funcional em células CHO. Por exemplo, a mutagénesis aleatória pode ser conseguida através de químicos alquilantes ou de irradiações de UV tal como descrito em Miller, J., "Experiments in Molecular Genetics", Cold Spring Harbor Laboratory 1972. Opcionalmente, pode ser utilizada uma estirpe mutadora natural de uma bactéria hospedeira.

De preferência, tal sequência variante ou fragmento de sequência é pelo menos 65%, de preferência 75%, de maior preferência 90% homóloga na sequência de ADN com a parte correspondente do locus do gene da imunoglobulina gama 2A de murídeo natural. Por exemplo, é possível inserir um local de restrição *Sal*I no local *Sal*I presente 39 pb a montante do exão

2 membranas (M2) para proporcionar um local único para linearização dentro da sequência da imunoglobulina 2A de murídeo; tal variante de sequência foi originalmente considerada para direccionamento de recombinação específica do local, mas pode também ser empregue no contexto do presente invento.

Um "promotor" é definido como uma sequência de ADN que dirige a ARN-polimerase para se ligar ao ADN e iniciar a síntese de ARN. De acordo com o presente invento, é um promotor que é activo em células CHO. Um tal promotor é, de preferência, um promotor forte.

Um gene do produto recombinante de acordo com o presente invento é o da proteína produto que se pensa expressar e colher em elevada quantidade. Pode ser uma proteína qualquer de interesse, p. ex. proteínas terapêuticas tais como interleucinas ou enzimas ou subunidades de proteínas multiméricas tais como anticorpos ou fragmentos destes. O gene do produto recombinante pode incluir uma porção da sequência de codificação de uma sequência sinal que permita a secreção do polipéptido uma vez expresso a partir da célula hospedeira produtora. Noutra concretização preferida do presente invento, a proteína produto é uma proteína segregada. De maior preferência, a primeira proteína ou produto é um anticorpo ou anticorpo modificado ou um fragmento deste, de maior preferência é um anticorpo imunoglobulina G (IgG).

Numa concretização preferida do presente invento a transfecção é uma infecção transiente.

Uma transfecção transiente caracteriza-se pela não aplicação de qualquer pressão selectiva a um marcador de selecção do vector. Um banco ou lote de células originárias de uma transfecção transiente é uma população celular reunida que compreende células que tomaram e expressam o ADN estranho e de células que não o tomaram. As células que expressam a cassette de expressão estranha não integraram habitualmente ainda o ADN transfectado no seu genoma e tendem a perder o ADN estranho e a crescerem mais que as células transfectadas da população após cultura do banco de células transfectadas transientemente. Por essa razão a expressão é mais forte no

período imediatamente após a transfecção e diminui com o tempo. De preferência, uma transfectante transiente de acordo com o presente invento é entendido como uma célula que é mantida em cultura celular na ausência de pressão selectiva até um tempo de 90 horas após a transfecção.

Noutra concretização preferida do presente invento a transfecção é uma transfecção estável. A transfecção estável significa que o ADN estranho recentemente introduzido está a ficar incorporado no ADN genómico, habitualmente através de acontecimentos aleatórios de recombinação não homóloga; no caso de uma sequência de vector, a transfecção estável de acordo com o presente invento pode resultar em perda de partes da sequência do vector não directamente relacionadas com a expressão do gene do produto recombinante, tal como p. ex. regiões de controlo do número de cópias bacterianas tornadas supérfluas após integração genómica. Uma célula hospedeira transfectada integrou pelo menos uma parte ou partes diferentes do vector de expressão no genoma. De igual modo, a transfecção de células CHO com dois ou vários fragmentos de ADN dando origem pelo menos *in vivo* a equivalentes funcionais dos elementos essenciais do vector de expressão do presente invento, nomeadamente o gene do produto sob controlo do promotor de mCMV e a sequência de IgG 2A desejada, estão contidos na definição de tais células hospedeiras transfectadas. A montagem *in vivo* de sequências de ADN funcionais após transfecção do ADN fragmentado é descrita p. ex. em WO 99/53046. É possível que tal integração estável dê origem, após exposição a mais pressão selectiva para amplificação génica, a minicromossomas duplos em células CHO. Isto está compreendido no presente significado de "estável". Após integração genómica aleatória do vector de expressão em CHO, a presença da sequência direccionadora aumenta a actividade do promotor para expressão da proteína produto recombinante. Tal efeito não foi observado nem podia ser antecipado após direccionamento homólogo de genes em linhas de células B maduras de murídeo incluindo linhas celulares de plasmacitoma/mieloma; aí, a sequência direccionadora de IgG 2A serviu meramente para aumentar a frequência de integrantes homólogos de elevado rendimento uma vez que se provou que o locus de IgG 2A era um "ponto crítico" recombinatório. Tal como anteriormente referido, a cromatina da região genómica da

imunoglobulina está num estado aberto altamente activo em linhas de células B adequadamente atingidas.

Os "vectores de expressão" são aqui definidos como sequências de ADN que são necessárias para a transcrição e a tradução dos seus ARNm numa linha de células hospedeiras de mamífero apropriada após transfecção com o vector. Um vector de expressão adequadamente construído deve habitualmente conter: pelo menos um marcador expressável seleccionável em células animais, um número limitado de locais de restrição úteis para inserção da cassette de expressão para o gene do produto recombinante sob controlo de uma região promotora a montante. Quando utilizados em particular apenas para expressão transiente/epissómica, podem compreender ainda uma origem de replicação tal como uma origem do Vírus de Eppstein Barr (EBV) ou do vírus SV40 para replicação autónoma/manutenção epissómica em células hospedeiras eucarióticas mas podem ser desprovidos de um marcador seleccionável. Os vectores de expressão são p. ex., mas não se limitam a, fragmentos de ADN lineares, fragmentos de ADN englobando sequências direccionadoras nucleares ou são especialmente optimizados para interacção com reagentes de transfecção, vírus animais ou plasmídeos adequados que podem ser transportados e produzidos em bactérias.

De acordo com o presente invento o vector de expressão em mamífero compreende um marcador de selecção GS expressável (Bebbington *et al.*, "High-level expression of a recombinant antibody from myeloma cells using a glutamine synthetase gene as an amplifiable selectable marker", *Bio/Technology* 10: 169-175, 1992; Cockett *et al.*, "High level expression of tissue inhibitor of metalloproteinases in Chinese Hamster Ovary (CHO) cells using Glutamine synthetase gene amplification", *Bio/Technology* 8: 662-667, 1990). O sistema GS é um de apenas dois sistemas que são de particular importância para a produção de proteínas terapêuticas. Em comparação com o sistema da di-hidrofolato-redutase (DHFR), o sistema GS oferece uma grande vantagem temporal durante o desenvolvimento porque frequentemente podem ser criadas linhas celulares altamente produtivas a partir do transfectante inicial evitando assim a necessidade de múltiplos ciclos de selecção na presença de concentrações crescentes de agente selectivo

para se alcançar amplificação génica (Brown *et al.*, "Process development for the production of recombinant antibodies using the glutamine synthetase (GS) system", *Cytotechnology* 9: 231-236, 1992). Claro que de modo equivalente a uma segunda unidade de transcrição para expressão do gene marcador, uma unidade de expressão pode utilizar uma cassette de expressão monocistrónica tanto para o gene do produto como para o gene marcador através do emprego p. ex. de locais internos de entrada no ribossoma tal como é rotineiramente empregue na arte. Vice-versa, claro que a sequência de "ponto crítico" de IgG 2 A do presente invento e a cassette de expressão para a proteína produto compreendendo uma cassette promotora e/ou marcadora não são necessários para funcionar em *cis* num único vector de expressão; os elementos podem bem ser transportados em vectores co-transfectados separados ou fragmentos de ADN que podem então ser cromossomicamente integrados num único local concatamérico de integração.

Linhas celulares de ovário de *hamster* chinês (CHO) adequadas podem ser, p. ex., CHO K1 (ATCC CCL-61), CHO pro3-, CHO DG44, CHO P12 ou a linha celular CHO dhfr- DUK-BII (Chassin *et al.*, *PNAS* 77, 4216-4220, 1980).

Deve notar-se que uma célula hospedeira transfectada com a sequência de ADN ou o vector do presente invento deve ser entendida como sendo uma linha celular transientemente ou estavelmente transfectada. Qualquer técnica de transfecção tal como as bem conhecidas na arte, p. ex., electroporação, precipitação em fosfato de Ca, transfecção de DEAE-dextrano, lipofecção, pode ser empregue de acordo com o presente invento se apropriado para um dado tipo de célula hospedeira. Em ensaios de expressão transiente que ocorrem vulgarmente 20-50 horas após a transfecção, os vectores transfectados são mantidos como elementos epissómicos e não estão ainda integrados no genoma.

Exemplos de métodos de transfecção adequados para células CHO estão descritos em Cockett *et al.*, "High level expression of tissue inhibitor of metalloproteinases in Chinese Hamster Ovary (CHO) cells using Glutamine synthetase gene amplification", *Bio/Technology* 8: 662-667, 1990. É possível empregar p. ex. precipitação clássica em fosfato de cálcio ou

técnicas mais modernas de lipofecção. A taxa de transfecção é rotineiramente definida como o número de células positivamente transfectadas (transfecção transiente) ou clones (transfecção estável após o período de selecção) obtido a partir de um banco de células sujeito a transfecção. O suposto efeito do presente objecto do presente invento pode ser observado, p. ex., através da transfecção de células CHO-K1 através de lipofecção (qualquer reagente comercial e protocolo do fabricante) com os plasmídeos de SEQ ID NO:3 (pEE 12.4 hCMV-GFP + promotor inicial de SV40 /ADNc de GS) ou SEQ ID NO:4 (pEE 12.4 mCMV-GFP + promotor inicial de SV40/ADNc de GS). As células transfectadas podem ser criadas em qualquer meio de cultura convencional. O meio de cultura pode ser um meio suplementado com soro fetal ou livre de soro tal como foi definido acima. De preferência, o meio de cultura de células é um meio suplementado com soro, de preferência ainda, um meio de cultura de células que tenha sido suplementado com pelo menos 1% (v/v) de soro fetal, de maior preferência com pelo menos 5% (v/v) de soro fetal tal como soro fetal de vitelo ou soro fetal bovino. Noutra concretização preferida, o método de transfecção realizado é electroporação.

Os meios e métodos de cultura adequados para linhas celulares de mamífero são bem conhecidos na arte, tal como descrito por exemplo em US 5633162. Exemplos de meios de cultura celular padrão para balões de laboratório ou cultura celular de baixa densidade e a ser adaptados às necessidades de tipos celulares particulares são por exemplo: Meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Morre, G., "The Journal of the American Medical Association", 199, pág. 519 f. 1967), meio L-15 (Leibovitz, A. et al., *Amer. J. of Hygiene* 78, 1p.173 ff, 1963), Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), Meio Essencial mínimo de Eagle (MEM), meio F12 de Ham (Ham, R. et al., *Proc. Natl. Acad. Sc.* 53, pág. 288 f. 1965) ou DMEM modificado por Iscoves sem albumina, transferrina e lecitina (Iscoves et al., *J. Exp. Med.* 1, pág. 923 f., 1978). Por exemplo, os meios F10 ou F12 de Ham foram especialmente desenhados para a cultura de células CHO. Outros meios especialmente adaptados a cultura de células CHO estão descritos em EP-481791. Sabe-se que tais meios de cultura podem ser suplementados com soro fetal bovino (FBS, também chamado de soro fetal de vitelo FCS), o último proporcionando

uma fonte natural de uma plethora de hormonas e factores de crescimento. A cultura celular de células de mamífero é actualmente uma operação de rotina bem descrita nos livros de texto e manuais científicos, está coberta em detalhe p. ex. em R. Ian Fresney, "Culture of Animal cells", um manual, 4ª edição, Wiley-Liss/N.Y., 2000.

De preferência, o meio de cultura celular de acordo com o presente invento é desprovido de soro fetal de vitelo (FCS ou FBS), que é então designado "livre de soro". As células em meio livre de soro requerem geralmente insulina e transferrina num meio livre de soro para um crescimento óptimo. A transferrina pode pelo menos parcialmente ser substituída por agentes quelantes não peptídicos ou sideróforos tais como tropolona tal como descrito em WO 94/02592 ou níveis crescentes de uma fonte de ferro inorgânico favoravelmente em conjunto com antioxidantes tais como vitamina C. A maioria das linhas celulares requer um ou mais factores de crescimento sintéticos (compreendendo polipéptidos recombinantes), incluindo p. ex. factor de crescimento epidérmico (EGF), factor de crescimento de fibroblastos (FGF), factores de crescimento semelhantes a insulina I e II (IGFI, IGFII), etc. Outras classes de factores que podem ser necessárias incluem: prostaglandinas, proteínas de transporte e de ligação (p. ex., ceruloplasmina, lipoproteínas de elevada e baixa densidade, albumina de soro bovino (BSA)), hormonas, incluindo hormonas esteróides e ácidos gordos. Os testes do factor polipeptídico são melhor executados passo-a-passo testando novos factores polipeptídicos na presença dos que se verificou serem estimuladores do crescimento. Esses factores de crescimento são sintéticos ou recombinantes. Existem várias abordagens metodológicas bem conhecidas na cultura de células animais, sendo um exemplo descrito no seguinte. O passo inicial é obter condições em que as células sobreviverão e/ou crescerão lentamente durante 3-6 dias após a transferência de meio de cultura suplementado com soro. Na maioria dos tipos celulares, isto é pelo menos em parte função da densidade do inóculo. Uma vez encontrada a hormona/factor de crescimento/suplemento polipeptídico óptimos, a densidade do inóculo necessária para sobrevivência diminuirá. Numa concretização mais preferida, o meio de cultura é livre de proteína, isto é livre tanto de soro fetal como de suplementos de factores de crescimento

proteicos individuais ou outras proteínas tais como transferrina recombinante.

Após expressão e colheita da proteína produto recombinante pode ser aplicado um processamento a jusante convencional. Opcionalmente pode ser empregue um meio de cultura de crescimento de elevada densidade. Tal meio de crescimento de elevada densidade pode habitualmente ser suplementado com nutrientes tais como todos os aminoácidos, fontes energéticas tais como glicose no intervalo dado acima, sais inorgânicos, vitaminas, elementos vestigiais (definidos como compostos inorgânicos habitualmente presentes em concentrações finais no intervalo micromolar), tampões, os quatro nucleósidos ou os seus nucleótidos correspondentes, antioxidantes tais como Glutathione (reduzida), Vitamina C e outros componentes tais como lípidos membranares importantes, p. ex. colesterol ou fosfatidilcolina ou precursores lipídicos, p. ex. colina ou inositol. Um meio de elevada densidade será enriquecido na maioria ou em todos estes compostos e, excepto quanto aos sais inorgânicos com base nos quais a osmolaridade do meio essencialmente isotónico é regulada, compreendê-los-á em quantidades superiores (fortificado) às dos meios padrão acima mencionados tal como se pode deduzir a partir de GB2251249 em comparação com RPMI 1640. De preferência, um meio de cultura de elevada densidade é equilibradamente fortificado por todos os aminoácidos excepto o Triptofano estarem num excesso de mais de 75 mg/l de meio de cultura. De preferência, em conjunto com o requisito geral de aminoácidos, a Glutamina e/ou a Asparagina estão num excesso de 1 g/l, de preferência de 2 g/l de meio de cultura de elevada densidade. No contexto do presente invento, a cultura de células de elevada densidade é definida como uma população de células animais possuindo temporariamente uma densidade de células viáveis de pelo menos ou num excesso de 10^5 células/ml, de preferência de pelo menos ou num excesso de 10^6 células/ml, e em que a população foi continuamente criada a partir de uma única célula ou inóculo de densidade de células viáveis inferior num meio de cultura celular num volume de cultura constante ou crescente.

Noutra concretização preferida, é utilizada uma cultura alimentada em lotes. Este é um sistema de cultura em que pelo

menos a Glutamina, opcionalmente com um ou mais outros aminoácidos, de preferência glicina, é dada à cultura celular tal como descrito em GB2251249 para manutenção da sua concentração no meio, para além do controlo da concentração de glicose através da alimentação em separado. De maior preferência, o fornecimento de glutamina e opcionalmente um ou vários outros aminoácidos é combinado com fornecimento de uma ou mais fontes energéticas tais como glicose à cultura celular tal como descrito em EP-229809-A. A alimentação é habitualmente iniciada 25-60 horas após o início da cultura; por exemplo, é útil iniciar a alimentação quando as células alcançaram uma densidade de cerca de 10^6 células/ml. É bem conhecido na arte que em células animais em cultura, a "glutaminólise" (McKeehan *et al.*, "Glutaminolysis in animal cells", em: "Carbohydrate Metabolism in Cultured Cells", ed. M.J. Morgan, Plenum Press, New York, pág. 11-150) se pode tornar uma fonte importante de energia durante a fase de crescimento. O fornecimento total de glutamina e/ou asparagina (para substituição de glutamina por asparagina, ver Kurano, N. *et al.*, *J. Biotechnology* 15: 113-128, 1990) está habitualmente no intervalo de 0,5 a 10 g por l, de preferência de cerca de 1 a 2 g por l volume de cultura; outros aminoácidos que podem estar presentes na alimentação estão a 10 a 300 mg de alimentação total por litro de cultura, em particular glicina, lisina, arginina, valina, isoleucina e leucina são habitualmente fornecidos em quantidades superiores de pelo menos 150 a 200 mg em comparação com os outros aminoácidos. A alimentação pode ser dada como uma adição única ou como uma alimentação continuamente bombeada, de preferência a alimentação é bombeada quase continuamente para o biorreactor. Claro que o pH é cuidadosamente controlado durante a cultura alimentada em lotes num biorreactor a um pH aproximadamente fisiológico óptimo para uma dada linha celular através da adição de uma base ou tampão. Quando a glicose é utilizada como fonte energética a glicose total fornecida é habitualmente de 1 a 10, de preferência de 3 a 6 gramas por litro da cultura. Para além da inclusão de aminoácidos, a alimentação compreende de preferência uma quantidade baixa de colina no intervalo de 5 a 20 mg por litro de cultura. De maior preferência, tal alimentação de colina é combinada com suplementação de etanolamina essencialmente tal como descrito em US 6048728, em particular em combinação com fornecimento de

glutamina. Claro que após a utilização do sistema marcador GS, quantidades menores de glutamina serão necessárias em comparação com um sistema de expressão não GS uma vez que a acumulação de glutamina em excesso para além da adição da produzida endogenamente dará origem à produção de amónia e concomitante toxicidade. Para GS, a glutamina no meio ou fornecida é principalmente substituída por seus equivalentes e/ou precursores, isto é asparagina e/ou glutamato.

EXPERIÊNCIAS

Experiência 1

Expressão transiente e estável de vector de GFP compreendendo a sequência de "ponto crítico" em células CHO-K1

Células CHO-K1 (ATCC CCL-61) foram adaptadas e cultivadas em meio de cultura de células normal GMEM -S (Gibco, UK) com FCS a 10%. - Para selecção de GS, o meio tem de ser completamente livre de glutamina tal como exposto na tabela 1 abaixo; isto necessita a utilização de FCS dialisado. - Toda a cultura foi realizada em balão de agitação a 36,5°C com agitação orbital a 125 rpm. Foi utilizada lipofectina (Superfectin™, Gibco, UK) para transfecção e a fluorescência verde do banco transfectante foi medida num FACS com excitação a 488 nm. Para cada construção de vector GS/GFP, a transfecção foi realizada independentemente cinco vezes, sendo todos os dados a média de cinco bancos analisados independentemente. Começando com transfectantes transientes 48 h após a transfecção, os 10% de células com o registo de expressão mais elevado do banco de células viáveis na contagem de células vs. o diagrama de fluorescência foram seleccionados para determinar a fluorescência média (Fig. 1). A população de células viáveis foi pré-seleccionada através da activação no diagrama de dispersão directa vs. lateral.

Para a criação de transfectantes estáveis, o marcador GS foi seleccionado 24 horas após a transfecção através de suplementação do meio livre de glutamina com 25 µM de MSX (metionina-sulfoximina, Crockett et al., *ibid.*) e continuação da cultura de células com separação regular das culturas durante 26 dias. Note-se o impacto dos níveis médios de outros

aminoácidos na potência de MSX para selecção, ver Bebbington *et al.*, US 5827739. A análise de fluorescência foi então efectuada novamente tal como delineado acima (Fig. 2).

As células não transfectadas serviram como controlo negativo. O vector do "ponto crítico" (pEE 15.1 "hCMV + ponto crítico") dirigindo a expressão de GFP sob controlo do promotor de hCMV compreendendo o primeiro intrão completo de CMV é dado em SEQ ID NO:1 e é essencialmente o vector pEE 15.1 mostrado na Fig. 3 no qual a sequência de GFP foi inserida no local de restrição *EcoRI* no poliligante. pEE 12.4 "hCMV" correspondendo a SEQ ID NO:3 é idêntico a pEE 15.1 "hCMV + ponto crítico" excepto que não compreende o fragmento *BamHI* de 5,1 kb ancorando a sequência de IgG 2A. pEE 12.4 serviu como vector de controlo. Outro vector de controlo pEE 12.4 "hCMV(Kozak-)" foi gerado através da mutação da sequência de Kozak do local de clonagem coincidindo com o local de início da tradução (GCCGCCACCATGG) numa sequência de Kozak funcional com uma mudança de enquadramento (ACCATGGTCCATGG) que através de mutagénesse dirigida por iniciadores (Sambrook *et al.*, "Molecular cloning", Cold Spring Harbor 1983), atenua a Kozak original e o local de início da tradução. O vector de SEQ ID NO:1 foi ainda modificado para suprimir a região moduladora de 400 pb da porção estimuladora de hCMV, suprimindo os elementos estimuladores a montante de -750 desde o local de início da transcrição, dando origem a pEE 15.1 "hCMV(mod-)/ADNc de GS". Através da permuta da cassette de ADNc de GS de pEE 15.1 (v. Fig. 3) pelo minigene de GS de pEE 14.4 "hCMV(mod-)/GFP", correspondendo a SEQ ID NO:2, foi criado o vector pEE 15.1 "hCMV(mod-)/minigene de GS". Assim todas as células transfectadas ancoravam um vector plasmídico compreendendo a sequência de codificação de GFP. O minigene de GS contém um único primeiro intrão do gene de GS e cerca de 1 kb do ADN flanqueador a 3' sob o controlo do promotor tardio de SV40; crê-se que a parte 3' do ADN genómico de GS cause um maior número de cópias do ADN do vector e assim de GS em células transfectadas (ver US4770359, Bebbington *et al.*). Enquanto todos os vectores de hCMV empregues no presente estudo expressam o gene marcador de GS a partir da sua sequência de ADNc, a utilização do minigene de GS foi incluída como outro controlo para excluir potenciais efeitos do número de cópias de GS e do nível de expressão.

Para a criação e análise de expressão de células CHO estavelmente transfectadas, as transfecções foram efectuadas com o vector do ponto crítico linearizado, vector pEE 15.1 "hCMV + ponto crítico". O plasmídeo linearizado com *SalI* foi cortado na porção da sequência compreendendo IgG 2A, as extremidades livres do ADN estimulam potencialmente a recombinação com regiões genómicas que partilham um certo grau de homologia com as porções de ADN flanqueador, testando potenciais efeitos direccionadores da IgG 2A de murídeo em células de *hamster* CHO. *PvuI* corta no gene marcador da lactamase bacteriana e por essa razão pode promover apenas recombinação heteróloga aleatória. De facto, a fluorescência média foi superior nos transfectantes linearizados com *PvuI* mostrando tanto alguma influência da linearização do vector bem como que o direccionar dos *loci* de imunoglobulina em células CHO pode não contar para o efeito do presente invento. Adicionalmente, o efeito da maior actividade do promotor foi consistentemente observado em populações de células transfectadas, correspondendo perfeitamente com a força relativa das construções de vector individuais. Claramente, a integração genómica não está envolvida neste estágio inicial de transfecção.

A Fig. 3 mostra o vector pEE 15.1 de aproximadamente 12830 pb. Uma descrição detalhada do marcador GS e da cassette de expressão hCMV-p/intrão pode ser verificada em US 5827739 e US 5591639. pEE 15.1 é uma concretização possível de um vector de expressão de acordo com o presente invento, excepto que a sequência de ADN codificando para a proteína produto recombinante não foi ainda inserida no local do poliligante. A sequência completa de 13535 pb da construção pEE15.1 ancorando GFP é dada em SEQ ID NO:1. Aí, a sequência de codificação de GFP foi inserida enquadrada no local de restrição *EcoRI* centrado na posição 12814; a introdução do local de restrição único ancorando o codão de início ATG e a optimização do ambiente da sequência de Kozak do codão de início estão descritas em detalhe em US 5591639. Assim, a expressão da proteína GFP está sob o controlo do promotor do gene inicial imediato principal de hCMV (hCMV-MIE ou hCMV para abreviar) imediatamente após o primeiro intrão do gene hCMV-MIE seguido do local *NcoI* (v. US 5591639). A poliadenilação é assegurada pelo local poli-A de SV40 mais a jusante do local de inserção

do poliligante. pEE 15.1 ancora ainda uma sequência de ADNc codificando para a glutamina-sintetase (GS) de *hamster* que está sob controlo do promotor inicial de SV40 e é seguida de um intrão de SV40 + sequência poli-A. O locus do gene de IgG 2A ou a sequência do "ponto crítico" (as caixas estriadas CH1, H1, CH2, CH3, M1, M2 significam região constante da cadeia pesada, charneira, âncora de membrana) é o fragmento *Bam*HI de 5,1 kb do locus de IgG 2A de murídeo já descrito em WO 9517516 e as referências aí citadas. São mostrados os locais de restrição únicos *Pvu*I e *Sal*I.

Experiência 2

Electroporação de células CHO com a construção de mCMV p12.4-GFP (SEQ ID NO:4)

Células CHO-K1 aderentes (ATCC CCL-61) foram cultivadas em meio DMEM de Iscoves essencialmente tal como descrito em EP-481791 compreendendo Glutamina a 2 mM que foi ainda suplementado com FCS a 10%. Opcionalmente, o meio G-MEM exposto na tabela 1 e compreendendo ainda 2 mM de Glutamina pode ser utilizado antes da selecção do marcador GS tal como na experiência 1. As células foram desprendidas, sedimentadas e ressuspensas duas vezes em meio livre de soro, finalmente a uma densidade de $5,3 \times 10^6$ células/ml. Por 750 μ l de lote de electroporação, foi electroporado um total de 4×10^6 células. A electroporação foi realizada tal como descrito em "Methods in Molecular Biology", ed. J.A. Nickoloff ed., Humana Press, 1995, Vol. 48/Cap. 8; "Animal cell electroporation and electrofusion protocols". pág. 12.4. O ADN do vector mCMV-GFP (SEQ ID NO:4) foi linearizado. Foram adicionados 50 μ l (20 μ g) de ADN a 750 μ l de células em cuvetes de electroporação e electroporados - 300 Volts/750 μ Fd - esperando um tempo de electroporação de cerca de 12-14 ms. Após a electroporação foi transferido um volume de 800 μ l de células para 25 ml de meio de cultura Glasgow-MEM modificado (GMEM, Gibco) para selecção GS (compreendendo soro fetal a 10% mas sem glutamina, para detalhes ver tabela 1) num balão T75. Dividir em 2 balões T75 movendo 12,9 ml para uma segundo balão e incubando de um dia para o outro a 37°C em CO₂ a 10%.

No dia seguinte foram adicionados 37,5 ml de meio de cultura GMEM de selecção GS suplementado com FBS a 10% + 33,3 μ M de MSX (metionina-sulfoximina). Assim MSX foi finalmente ~25 μ M. Os transfectantes foram contados após outra

incubação durante 26 dias através de contagem de colónias por balão. Após inspecção microscópica num microscópio invertido padrão para inspecção de balões de cultura, as colónias positivas iluminaram-se brilhantemente em luz verde e puderam ser facilmente contadas.

A construção de mCMV de SEQ ID NO:4 produziu até 20 vezes mais *foci* que as células que foram transfectadas em paralelo com a construção de hCMV de SEQ ID NO:3. As construções de vector diferiam apenas nos elementos promotores de CMV dirigindo a expressão de GFP, as restantes partes dos vectores eram idênticas (incluindo o marcador GS; a cassette de ADNC do marcador GS de p12.4). Se as células fossem diluídas em placas de 96 poços imediatamente após a transfecção, surgiam muitas mais colónias de células transfectadas com mCMV (>400 colónias) que de células transfectadas com hCMV (cerca de 45 colónias).

TABELA 1: Meio para selecção GS

A. Soluções de Reserva

-
1. Água bidestilada autoclavada em alíquotas de 400 ml
 2. Glasgow-MEM 10× (GMEM) sem glutamina (GIBCO: 042-2541 em UK). Armazenar a 4°C.
 3. Bicarbonato de sódio a 7,5% (GIBCO: 043-05080 em UK; 670-5080 em US). Armazenar a 4°C.
 4. Aminoácidos não essenciais (AANE) 100× (GIBCO: 043-01140 em UK; 320-1140 em US). Armazenar a 4°C.
 5. Glutamato + Asparagina (G+A) 100×: adicionar 600 mg de ácido glutâmico e 600 mg de asparaginas (Sigma). Perfazer até 100 ml em água destilada e esterilizada através da passagem através de um filtro estéril de 2 µm (Nalgene). Armazenar a 4°C.
 6. Piruvato de sódio 100 mM (GIBCO:043-01360 em UK; 320-1360 em US)
 7. Nucleósidos 50×:

35 mg adenosina
35 mg guanosina
35 mg citidina
35 mg uridina
12 mg timidina

 (cada um de Sigma). Perfazer com água até 100 ml, esterilizar por filtração e armazenar a -20°C em alíquotas de 10 ml.
 8. FCS dialisado (GIBCO: 014-06300). Inactivar pelo calor a 56°C durante 30 min e armazenar a -20°C. É essencial utilizar FCS dialisado quando se utiliza selecção GS.
 9. Penicilina-estreptomicina a 5000 unidades/ml (P/S: GIBCO: 043-05070 em UK; 600-5070 em US).
 10. L.MSX 100 mM (Sigma): preparar uma solução de 18 mg/ml em PBS. Esterilizar por filtração e armazenar a -20°C.

B. Preparação do Meio

Adicionar o seguinte na ordem dada utilizando uma técnica asséptica para fazer o meio GMEM-S

1.	Água	400 ml
2.	GMEM 10×	50 ml
3.	Bicarbonato de sódio	18,1 ml
4.	AANE	5 ml
5.	G + A	5 ml
6.	Piruvato de sódio	5 ml
7.	Nucleósidos	10 ml
8.	FCS dialisado	50 ml
9.	Penicilina-estreptomicina	5 ml

GMEM-S contém os aminoácidos não essenciais, alanina, aspartato, glicina, prolina e serina (100 μM), glutamato e asparaginas (500 μM) e adenosina, guanosina, citidina e uridina (30 μM) e timidina (10 μM).

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Lonza Biologics plc.

<120> Método de expressão de proteína recombinante em células CHO

<130> Lip30+31

<140> NA 25/01

<141> 2002-07-.

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 6679

<212> ADN

<213> *Hamster* sp.

<220>

<221> misc_feature

<223> Seq. ID. No. 4: vector plasmídico circular p12.4 curto mCMV-GFP GS /clone 3

<400> 1

gaattcattg atcataatca gccataccac atttgtagag gttttacttg ctttaaaaa	60
cctccacac ctcccctga acctgaaaca taaatgaat gcaattggtg ttgttaactt	120
gtttattgca gcttataatg gttacaaata aagcaatagc atcacaatt tcacaaataa	180
agcatttttt tcaactgcatt ctagtgtgg tttgtccaaa ctcatcaatg tatcttatca	240
tgtctggcgg ccgcgacctg caggcgcaga actggtaggt atggaagatc cctcgagatc	300
cattgtgctg gcggtaggcg agcagcgctt gcctgaagct gcgggcattc ccagtcagaa	360
atgagcgcca gtcgtcgctg gctctcgca ccgaagtgct atgattctcc gccagcatgg	420
cttcggccag tgcgtcgagc agcggcggct tgttcctgaa gtgccagtaa agcggcggt	480
gctgaacccc caaccgttcc gccagtttgc gtgctgctcag accgtctacg ccgacctcgt	540

tcaacaggtc	cagggcggca	cggatcactg	tattcggctg	caactttgtc	atgcttgaca	600
ctttatcact	gataaacata	atatgtccac	caacttatca	gtgataaaga	atccgcgcca	660
gcacaatgga	tctcaggtc	gagggatctc	tagaggatcc	atattcgcgg	gcatcaccgg	720
cgccacaggt	gcggttgctg	gcgctatat	cgccgacatc	accgatgggg	aagatcgggc	780
tcgccacttc	gggetcatga	gcgcttgttt	cggcgtgggt	atggtggcag	gccccgtggc	840
cgggggactg	ttgggcgcca	tctccttgca	tgaccattc	cttgcgccgg	cggtgctcaa	900
cggcctcaac	ctactactgg	gctgcttcct	aatgcaggag	tcgcataagg	gagagcgtcg	960
acctcgggcc	gcgttgctgg	cgtttttcca	taggctccgc	ccccctgacg	agcatcacia	1020
aaatcgacgc	tcaagtcaga	ggtggcgaaa	cccgcagga	ctataaagat	accaggcggt	1080
tccccctgga	agctccctcg	tgcgctctcc	tgttccgacc	ctgccgctta	ccggatacct	1140
gtccgccttt	ctcccttcgg	gaagcgtggc	gcttttctcat	agctcacgct	gtaggtatct	1200
cagttcggtg	taggtcgttc	gctccaagct	gggctgtgtg	cacgaacccc	ccgttcagcc	1260
cgaccgctgc	gccttatccg	gtaactatcg	tcttgagtcc	aaccggtaa	gacacgactt	1320
atgccactg	gcagcagcca	ctggtaacag	gattagcaga	gcgaggtatg	taggcggtgc	1380
tacagagttc	ttgaagtggg	ggcctaacta	cggctacact	agaagaacag	tatttggtat	1440
ctgcgctctg	ctgaagccag	ttaccttcgg	aaaaagagtt	ggtagctctt	gatccggcaa	1500
acaaccacc	gctggtagcg	gtggtttttt	tgtttgcaag	cagcagatta	cgcgagaaa	1560
aaaaggatct	caagaagatc	ctttgatctt	ttctacgggg	tctgacgctc	agtggaacga	1620
aaactcacgt	taagggattt	tggtcatgag	attatcaaaa	aggatcttca	cctagatcct	1680
tttaaattaa	aatgaagtt	ttaaataaat	ctaaagtata	tatgagtaaa	cttggcttga	1740
cagttaccaa	tgcttaata	gtgaggcacc	tatctcagcg	atctgtctat	ttcgttcac	1800
catagttgcc	tgactccccg	tcgtgtagat	aactacgata	cgggagggct	taccatctgg	1860
ccccagtgct	gcaatgatac	cgcgagaccc	acgctcaccg	gctccagatt	tatcagcaat	1920
aaaccagcca	gccggaaggg	ccgagcgag	aagtggctct	gcaactttat	ccgcctccat	1980
ccagtctatt	aattgttgcc	gggaagctag	agtaagtagt	tcgccagtta	atagtttgcg	2040
caacgttggt	gccattgcta	caggcatcgt	ggtgtcacgc	tcgtcgtttg	gtatggcttc	2100
attcagctcc	ggttcccaac	gatcaaggcg	agttacatga	tccccatgt	tgtgcaaaaa	2160
agcggtagc	tccttcggtc	ctccgatcgt	tgtcagaagt	aagttggccg	cagtgttatc	2220
actcatgggt	atggcagcac	tgcataatc	tcttactgtc	atgccatccg	taagatgctt	2280
ttctgtgact	ggtgagtact	caaccaagtc	attctgagaa	tagtgtatgc	ggcgaccgag	2340
ttgctcttgc	ccggcgtaaa	tacgggataa	taccgcgcca	catagcagaa	ctttaaaggt	2400
gctcatcatt	ggaaaacggt	cttcggggcg	aaaactctca	aggatcttac	cgctgttgag	2460
atccagttcg	atgtaacca	ctcgtgcacc	caactgatct	tcagcatctt	ttactttcac	2520
cagcgtttct	gggtgagcaa	aaacaggaag	gcaaaatgcc	gcaaaaaagg	gaataagggc	2580

gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt cctttttcaa tattattgaa gcatttatca	2640
gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg	2700
ggttcgcgcg acatttcccc gaaaagtgcc acctgacgtc taagaaacca ttattatcat	2760
gacattaacc tataaaaaata ggcgtatcac gaggccctga tggctctttg cggcaccat	2820
cgttcgtaat gttccgtggc accgaggaca accctcaaga gaaaatgtaa tcacactggc	2880
tcaccttcgg gtgggccttt ctgctttat aaggagacac tttatgttta agaaggttg	2940
taaattcctt gcggctttg cagccaagct agatccgget gtggaatgtg tgtcagttag	3000
ggtgtggaat gtccccaggc tccccagcag gcagaagtat gcaaagcatg catctcaatt	3060
agtcagcaac caggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt atgcaaagca	3120
tgcatctcaa ttagtcagca accatagtc cgcacctaac tccgcccac cgcacctaa	3180
ctccgccag ttccgccat tctccgccc atggtctgact aattttttt atttatgag	3240
aggccgaggc cgcctcggcc tctgagctat tccagaagta gtgaggaggc ttttttgag	3300
gcctaggctt ttgcaaaaag ctagcttggg gccaccgctc agagcacctt ccacatggc	3360
cacctcagca agttcccact tgaacaaaa catcaagcaa atgtacttgt gcctgcccc	3420
gggtgagaaa gtccaagcca tgtatatctg ggttgatggt actggagaag gactgcgctg	3480
caaaaccgac accctggact gtgagcccaa gtgtgtagaa gagttacctg agtggattt	3540
tgatggctct agtaccttct agtctgaggg ctccaacagt gacatgtatc tcagccctgt	3600
tgcatgttt cgggaccct tccgagaga tccaacaag ctggtgttct gtgaagttt	3660
caagtacaac cgggaagcctg cagagaccaa ttaaggcac tctgttaaac ggataatgga	3720
catggtgagc aaccagcacc cctggtttgg aatggaacag gagtatactc tgatgggaac	3780
agatgggac ccttttggtt ggccttccaa tggctttcct gggcccaag gtccgtatta	3840
ctgtggtgtg ggcgcagaca aagcctatgg cagggatatc gtggaggctc actaccgac	3900
ctgcttgat gctgggttca agattacagg acaaatgct gaggctatgc ctgcccagtg	3960
ggaactccaa ataggaccct gtgaaggaat ccgcatggga gatcatctct gggtgccccg	4020
tttcatcttg catcgagtat gtgaagactt tgggtaata gcaacctttg accccaagcc	4080
cattcctggg aactggaatg gtgcaggctg ccataccaac ttagcacca aggccatgcg	4140
ggaggagaat ggtctgaagc acatcgagga ggccatcgag aaactaagca agcggcaccg	4200
gtaccacatt cgagcctacg atcccaaggg ggcctggac aatgcccgtg gtctgactgg	4260
gttccacgaa acgtccaaca tcaacgactt ttctgctggt gtcgccaatc gcagtgccag	4320
catccgactt ccccgactg tccgcccagga gaagaaagg tttttgag accgcgccc	4380
ctctgccaat tgtgacctt ttgcagtgac agaagccatc gtccgacat gccttctcaa	4440
tgagactggc gacgagccct tccaatacaa aaactaatta gactttgagt gatcttgagc	4500
ctttcctagt tcatcccacc ccgcccaga gagatctttg tgaaggaaacc ttacttctgt	4560
ggtgtgacat aattggacaa actacctaca gagatttaaa gctctaaggt aaatataaaa	4620

ttttaagtg tataatgtgt taaactactg attctaattg tttgtgtatt ttagattcca	4680
acctatggaa ctgatgaatg ggagcagtg tggaaatgcct ttaatgagga aaacctgttt	4740
tgctcagaag aaatgccatc tagtgatgat gaggctactg ctgactctca acattctact	4800
cctccaaaa agaagagaaa ggtagaagac cccaaggact ttccttcaga attgctaagt	4860
tttttgagtc atgctgtggt tagtaataga actcttgctt gctttgctat ttacaccaca	4920
aaggaaaaag ctgcaactgct atacaagaaa attatggaaa aatattctgt aacctttata	4980
agtaggcata acagttataa tcataacata ctgttttttc ttactccaca caggcataga	5040
gtgtctgcta ttaataacta tgctcaaaaa ttgtgtacct ttagcttttt aatttgtaaa	5100
ggggttaata aggaatattt gatgtatagt gccttgacta gagatcataa tcagccatac	5160
cacatttcta gaggtttttac ttgcttttaa aaacctcca cacctcccc tgaacctgaa	5220
acataaaatg aatgcaattg ttgttgtaa cttgtttatt gcagcttata atggttacia	5280
ataaagcaat agcatcacia atttcacaaa taaagcattt ttttcaactg attctagttg	5340
tggtttgtcc aaactcatca atgtatctta tcatgtctgg atctctagct tcgtgtcaag	5400
gacggtgagg cgcgcctact gagtcattag ggactttcca atgggttttg cccagtacat	5460
aaggtaata ggggtgaatc aacaggaaa tcccattgga gccaaagtaca ctgagtcaat	5520
agggactttc cattgggttt tgcccagtac aaaaggtaaa taggggtgta gtcaatgggt	5580
ttttccatt attggcacgt acataaggtc aataggggtg agtcattggg tttttccagc	5640
caatttaatt aaaacgccat gtactttccc accattgacg tcaatgggct attgaaacta	5700
atgcaactg acctttaaac ggtactttcc catagctgat taatgggaaa gtaccgttct	5760
cgagccaata cacgtcaatg ggaagtgaag gggcagcaa aacgtaacac cgccccggt	5820
ttcccctgga aattccatat tggcacgcat tctattggct gagctgcgtt ctacgtgggt	5880
ataagaggcg cgaccagcgt cggtaaccgt gcagctctcg gtctgaccac cgtagaacgc	5940
agaagcttgc cgccaccatg gtgagcaagc agatcctgaa gaacaccggc ctgcaggaga	6000
tcatgagctt caagggtgaa ctggagggcg tggtaacaa ccacgtgttc accatggagg	6060
gctgcccga gggcaacatc ctgttcggca accagctggt gcagatccgc gtgaccaagg	6120
gccccccct gcccttcgcc ttcgacatcc tgagccccgc cttccagtac ggcaaccgca	6180
ccttcaccaa gtaccccgag gacatcagcg acttcttcat ccagagcttc cccgccggct	6240
tcgtgtacga ggcaccctg cgtacgagg acggcggcct ggtggagatc cgcagcgaca	6300
tcaacctgat cgaggagatg ttcgtgtacc gcgtggagta caagggccgc aacttcccc	6360
acgacggccc cgtgatgaag aagaccatca ccggcctgca gccagcttc gaggtggtgt	6420
acatgaacga cggcgtgctg gtgggccaag tgatcctggt gtaccgcctg aacagcggca	6480
agttctacag ctgccacatg cgcaccctga tgaagagcaa gggcgtggtg aaggacttcc	6540
ccgagtacca cttcatccag caccgcctgg agaagaccta cgtggaggac ggcggcttcg	6600
tggagcagca cgagaccgcc atcggccagc tgaccagcct gggcaagccc ctgggcagcc	6660
tgcacgagtg ggtgtaata	6679

<210> 2

<211> 8251

<212> ADN

<213> *Hamster* sp.

<220>

<221> misc_feature

<223> Seq. ID. No. 3: vector plasmidico circular p12.4 hCMVp-GFP GS
/clone 13

<400> 2

```
gaattcattg atcataatca gccataccac atttgtagag gttttacttg ctttaaaaaa    60
cctcccacac ctccccctga acctgaaaca taaatgaat gcaattgttg ttgttaactt    120
gtttattgca gcttataatg gttacaaata aagcaatagc atcacaatt tcacaaataa    180
agcatttttt tctactgatt ctagtgtggg tttgtccaaa ctcatcaatg tatcttatca    240
tgtctggcgg ccgcgacctg caggcgcaga actggtagggt atggaagatc cctcgagatc    300
cattgtgctg gcggtaggcg agcagcgcct gcctgaagct gcgggcattc ccagtcagaa    360
atgagcgcca gtcgctgctg gctctcggca ccgaagtgct atgattctcc gccagcatgg    420
cttcggccag tgcgctgagc agcgcccgtc tgttcctgaa gtgccagtaa agcgccggct    480
gctgaacccc caaccgttcc gccagtttgc gtgctgctcag accgtctacg ccgacctcgt    540
tcaacaggtc cagggcggca cggatcactg tattcggctg caactttgtc atgcttgaca    600
ctttatcact gataaacata atatgtccac caacttatca gtgataaaga atccgcgcca    660
gcacaatgga tctcgaggtc gagggatctc tagaggatcc atattcgcgg gcatcaccgg    720
cgccacaggt gcggttgctg gcgcctatat cgccgacatc accgatgggg aagatcgggc    780
tcgccacttc gggctcatga gcgcttgttt cggcgtgggt atggtggcag gccccgtggc    840
cgggggactg ttgggcgcca tctccttgca tgcaccattc cttgcccggg cgggtgctcaa    900
cggcctcaac ctactactgg gctgcttcct aatgcaggag tcgcataagg gagagcgtcg    960
acctcgggcc gcgttgctgg cgtttttcca taggctccgc ccccctgacg agcatcacia  1020
aaatcgagc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcgtt  1080
tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta ccggataacct  1140
gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct  1200
cagttcgggt taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc  1260
cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aaccggtaa gacacgactt  1320
atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcgggtgc  1380
```

tacagagttc	ttgaagtggt	ggcctaacta	cggctacact	agaagaacag	tatttggtat	1440
ctgcgctctg	ctgaagccag	ttaccttcgg	aaaaagagtt	ggtagctctt	gatccggcaa	1500
acaaaccacc	gctggtagcg	gtggtttttt	tgtttgcaag	cagcagatta	cgcgagaaa	1560
aaaaggatct	caagaagatc	ctttgatctt	ttctacgggg	tctgacgctc	agtggaacga	1620
aaactcacgt	taagggatth	tggtcatgag	attatcaaaa	aggatcttca	cctagatcct	1680
tttaaattaa	aatgaagtt	ttaaataaat	ctaaagtata	tatgagtaaa	cttggctctga	1740
cagttaccaa	tgcttaatac	gtgaggcacc	tatctcagcg	atctgtctat	ttcgttcac	1800
catagttgcc	tgactccccg	tcgtgtagat	aactacgata	cgggagggct	taccatctgg	1860
ccccagtget	gcaatgatac	cgcgagacc	acgctcaccg	gctccagatt	tatcagcaat	1920
aaaccagcca	gccggaaggg	ccgagcgag	aagtggctct	gcaactttat	ccgcctccat	1980
ccagtctatt	aattggtgcc	gggaagctag	agtaagtagt	tcgccagtta	atagtttgcg	2040
caacgttggt	gccattgcta	caggcatcgt	ggtgtcacgc	tcgtcgtttg	gtatggcttc	2100
attcagctcc	ggttccaac	gatcaaggcg	agttacatga	tccccatgt	tgtgcaaaaa	2160
agcggtagc	tccttcggtc	ctccgatcgt	gtcagaagt	aagtggccg	cagtgttatc	2220
actcarggtt	atggcagcac	tgcataattc	tcttactgtc	atgccatccg	taagatgctt	2280
ttctgtgact	ggtgagtact	caaccaagtc	attctgagaa	tagtgtatgc	ggcgaccgag	2340
ttgctcttgc	ccggcgtaaa	tacgggataa	taccgcgcca	catagcagaa	ctttaaagt	2400
gctcatcatt	ggaaaacggt	cttcggggcg	aaaactctca	aggatcttac	cgctgttgag	2460
atccagttcg	atgtaacca	ctcgtgcacc	caactgatct	tcagcatctt	ttactttcac	2520
cagcgtttct	gggtgagcaa	aaacaggaag	gcaaaatgcc	gcaaaaaagg	gaataagggc	2580
gacacggaaa	tgttgaatac	tcatactctt	cctttttcaa	tattattgaa	gcatttatca	2640
gggttattgt	ctcatgagcg	gatacatatt	tgaatgtatt	tagaaaaata	aacaaatagg	2700
ggttccgccc	acatttcccc	gaaaagtgcc	acctgacgtc	taagaaacca	ttattatcat	2760
gacattaacc	tataaaaata	ggcgtatcac	gaggccctga	tggtctttg	cggcacccat	2820
cgttcgtaat	gttccgtggc	accgaggaca	accctcaaga	gaaaatgtaa	tcacactggc	2880
tcaccttcgg	gtgggccttt	ctgcgtttat	aaggagacac	tttatgttta	agaaggttgg	2940
taaattcctt	gctgctttgg	cagccaagct	agatccggct	gtggaatgtg	tgtagtttag	3000
ggtgtggaaa	gtccccaggc	tccccagcag	gcagaagtat	gcaaagcatg	catctcaatt	3060
agtcagcaac	caggtgtgga	aagtccccag	gctccccagc	aggcagaagt	atgcaaagca	3120
tgcatctcaa	ttagtcagca	accatagtcc	cgcccctaac	tccgccatc	ccgccctaa	3180
ctccgccag	ttccgcccat	tctccgcccc	atggctgact	aattttttt	atztatgag	3240
aggccgaggc	cgctcggcc	tctgagctat	tccagaagta	gtgaggaggc	ttttttggag	3300
gcctaggctt	ttgcaaaaag	ctagcttggg	gccaccgctc	agagcacctt	ccacatggc	3360
cacctcagca	agttcccact	tgaacaaaaa	catcaagcaa	atgtacttgt	gcctgcccc	3420

gggtgagaaa	gtccaagcca	tgtatatctg	ggttgatggt	actggagaag	gactgcgctg	3480
caaaacccgc	accctggact	gtgagcccaa	gtgtgtagaa	gagttacctg	agtggaattt	3540
tgatggctct	agtacctttc	agtctgaggg	ctccaacagt	gacatgtatc	tcagccctgt	3600
tgccatgttt	cgggacccct	tccgcagaga	tccaacaag	ctggtgttct	gtgaagtttt	3660
caagtacaac	cggaagcctg	cagagaccaa	tttaaggcac	tcgtgtaaac	ggataatgga	3720
catggtgagc	aaccagcacc	cctggtttgg	aatggaacag	gagtatactc	tgatgggaac	3780
agatgggcac	ccttttggtt	ggccttccaa	tggctttcct	gggccccaa	gtccgtatta	3840
ctgtggtgtg	ggcgagaca	aagcctatgg	cagggatatac	gtggaggctc	actaccgcgc	3900
ctgcttgat	gctggggta	agattacagg	aacaatgct	gaggtcatgc	ctgccagtg	3960
ggaactcaa	ataggaccct	gtgaaggaat	ccgcatggga	gatcatctct	gggtggccc	4020
tttcatcttg	catcgagtat	gtgaagactt	tggggtaata	gcaacctttg	acccaagcc	4080
cattctctgg	aactggaatg	gtgcaggctg	ccataccaac	tttagacca	aggccatgcg	4140
ggaggagaat	ggtctgaagc	acatcgagga	ggccatcgag	aaactaagca	agcggcaccg	4200
gtaccacatt	cgagcctacg	atccccaggg	ggcctggac	aatgcccgtg	gtctgactgg	4260
gttccacgaa	acgtccaaca	tcaacgactt	ttctgctggg	gtcgccaatc	gcagtgccag	4320
catccgcatt	ccccggactg	tcggccagga	gaagaaaggt	tactttgaag	accgcgccc	4380
ctctgccaat	tgtgacccct	ttgcagtac	agaagccatc	gtccgcacat	gccttctcaa	4440
tgagactggc	gacgagccct	tccaatacaa	aaactaatta	gactttgagt	gatcttgagc	4500
ctttcctagt	tcatcccacc	ccgccccaga	gagatctttg	tgaaggaacc	ttacttctgt	4560
ggtgtgacat	aattggacaa	actacctaca	gagatttaaa	gctctaaggt	aaatataaaa	4620
tttttaagtg	tataatgtgt	taaactactg	attctaattg	tttgtgtatt	ttagattcca	4680
acctatggaa	ctgatgaatg	ggagcagtgg	tggaatgcct	ttaatgagga	aaacctgttt	4740
tgctcagaag	aaatgccatc	tagtgatgat	gaggctactg	ctgactctca	acattctact	4800
cctccaaaaa	agaagagaaa	ggtagaagac	cccaaggact	ttccttcaga	attgctaagt	4860
tttttgagtc	atgctgtggt	tagtaataga	actcttgctt	gctttgctat	ttacaccaca	4920
aaggaaaaag	ctgcactgct	atacaagaaa	attatggaaa	aatattctgt	aacctttata	4980
agtaggcata	acagttataa	tcataacata	ctgttttttc	ttactccaca	caggcataga	5040
gtgtctgcta	ttaataacta	tgtcaaaaa	ttgtgtacct	ttagcttttt	aatttgtaa	5100
ggggtaata	aggaatattt	gatgtatagt	gccttgacta	gagatcataa	tcagccatac	5160
cacatttgta	gaggttttac	ttgcttttaa	aaacctcca	cacctcccc	tgaacctgaa	5220
acataaaatg	aatgcaattg	ttgttgtaa	cttgtttatt	gcagcttata	atggttacia	5280
ataaagcaat	agcatcacia	atctcaciaa	taaagcattt	tttctactgc	attctagttg	5340
tggtttgtcc	aaactcatca	atgtatctta	tcatgtctgg	atctagcttc	gtgtcaagga	5400
cggtgactgc	agtgaataat	aaaatgtgtg	ttgtccgaa	atacgcgttt	tgagatttct	5460

gtcgcgact	aaattcatgt	cgcgcgatag	tggtgtttat	cgccgataga	gatggcgata	5520
ttgaaaaat	cgatatttga	aaatatggca	tattgaaaat	gtcgcgcatg	tgagtttctg	5580
tgtaactgat	atcgccatth	ttccaaaagt	gatttttggg	catagcgat	atctggcgat	5640
agcgcttata	tcgtttacgg	gggatggcga	tagacgactt	tggtgacttg	ggcgattctg	5700
tgtgtcgcaa	atatcgcatg	ttcgatatag	gtgacagacg	atatgaggct	atatcgccga	5760
tagaggcgac	atcaagctgg	cacatggcca	atgcatatcg	atctatacat	tgaatcaata	5820
ttggccatta	gccatattat	tcatttggtta	tatagcataa	atcaatattg	gctattggcc	5880
attgcatacg	ttgtatccat	atcataatat	gtacatttat	attggctcat	gtccaacatt	5940
accgccatgt	tgacattgat	tattgactag	ttattaatag	taatcaatta	cggggtcatt	6000
agttcatagc	ccatatatgg	agttccgcgt	tacataactt	acggtaaattg	gcccgcctgg	6060
ctgaccgccc	aacgaccccc	gcccattgac	gtcaataatg	acgtatgttc	ccatagtaac	6120
gccaataggg	actttccatt	gacgtcaatg	ggtggagtat	ttacggtaaa	ctgccactt	6180
ggcagtacat	caagtgtatc	atatgccaa	tacgccccct	attgacgtca	atgacggtaa	6240
atggcccgcc	tgccattatg	cccagtcacat	gaccttatgg	gactttccta	cttggcagta	6300
catctacgta	ttagtcatcg	ctattaccat	ggtgatgcgg	ttttggcagt	acatcaatgg	6360
gcgtggatag	cggtttgact	cacggggatt	tccaagtctc	cacccattg	acgtcaatgg	6420
gagtttgttt	tgccacaaa	atcaacggga	ctttccaaa	tgctgtaaca	actccgcccc	6480
attgacgcaa	atgggcggta	ggcgtgtacg	gtgggaggtc	tatataagca	gagctcgttt	6540
agtgaaccgt	cagatcgctt	ggagacgcca	tccacgctgt	tttgacctcc	atagaagaca	6600
ccgggaccga	tccagcctcc	gcccgggga	acgggtcatt	ggaacgcgga	ttccccgtgc	6660
caagagtac	gtaagtaccg	cctatagagt	ctataggccc	acccccttg	cttcttatgc	6720
atgctatact	gtttttggct	tgggtcttat	acacccccgc	ttcctcatgt	tataggtgat	6780
ggtatagctt	agcctatagg	tgtgggttat	tgaccattat	tgaccactcc	cctattgggtg	6840
acgatacttt	ccattactaa	tccataacat	ggctctttgc	cacaactctc	tttattggct	6900
atatgccaat	acactgtcct	tcagagactg	acacggactc	tgtattttta	caggatgggg	6960
tctcatttat	tatttaciaa	ttcacatata	caacaccacc	gtccccagtg	cccgcagttt	7020
ttattaaaca	taacgtggga	tctccacgcg	aatctcgggt	acgtgttccg	gacatgggct	7080
cttctccggt	agcggcggag	cttctacatc	cgagccctgc	tcccattgeet	ccagegactc	7140
atggtcgctc	ggcagctcct	tgctcctaac	agtggaggcc	agacttaggc	acagcacgat	7200
gcccaccacc	accagtgtgc	cgcacaaggc	cgtggcggta	gggtatgtgt	ctgaaaatga	7260
gctcggggag	cggtcttgca	ccgctgacgc	atthtgaaga	cttaaggcag	cggcagaaga	7320
agatgcaggc	agctgagttg	ttgtgttctg	ataagagtca	gaggtaactc	ccgttgcggt	7380
gctgttaacg	gtggagggca	gtgtagtctg	agcagtactc	gthtctgccg	cgcgcgccac	7440
cagacataat	agctgacaga	ctaacagact	gttcctttcc	atgggtcttt	tctgcagtca	7500

ccgtccttga cacgaagcct gccgccaacca tggtagagcaa gcagatcctg aagaacaccg	7560
gcctgcagga gatcatgagc ttcaagggtga acctggaggg cgtggtgaac aaccacgtgt	7620
tcacccatgga gggctgcggc aagggcaaca tcctgttcgg caaccagctg gtgcagatcc	7680
gcgtgaccaa gggcgcccc ctgcccttcg ccttcgacat cctgagcccc gccttcagct	7740
acggcaaccg caccttcacc aagtaccccc aggacatcag cgacttcttc atccagagct	7800
tccccgccgg ctctgtgtac gagcgacccc tgcgctacga ggacggcggc ctggtggaga	7860
tccgcagcga catcaacctg atcgaggaga tgttcgtgta ccgcgtggag tacaagggcc	7920
gcaacttccc caacgacggc cccgtgatga agaagaccat caccggcctg cagcccagct	7980
tcgaggtggt gtacatgaac gacggcgtgc tggtagggcca ggtgatcctg gtgtaccgcc	8040
tgaacagcgg caagttctac agctgccaca tgcgaccct gatgaagagc aagggcgtgg	8100
tgaaggactt ccccgagtac cacttcatcc agcaccgcct ggagaagacc tacgtggagg	8160
acggcggcct cgtggagcag cacgagaccg ccatcgcca gctgaccagc ctgggcaagc	8220
ccctgggcag cctgcacgag tgggtgtaat a	8251

<210> 3

<211> 10369

<212> ADN

<213> *Hamster* sp.

<220>

<221> misc_feature

<223> Seq. ID. No. 2: vector plasmídico circular p 14.4
DeltaModulator (mod-) hCMVp-GFP minigene de GS /clone 6

<400> 3

gaattcattg atcataatca gccataccac atttgtagag gttttacttg ctttaaaaaa	60
cctccacac ctccccctga acctgaaaca taaatgaat gcaattggtg ttgttaactt	120
gtttattgca gcttataatg gttacaaata aagcaatagc atcaciaaatt tcacaaataa	180
agcatttttt tcaactgcatt ctagtgtggt tttgtccaaa ctcatcaatg tatcttatca	240
tgtctggcgg ccgcgacctg caggcgaga actggtaggt atggaagatc cctcgagatc	300
cattgtgctg gcggtagcgg agcagcgctt gcctgaagct gcgggcattc ccagtcagaa	360
atgagcgcca gtcgctcgtc gctctcggca ccgaagtgct atgattctcc gccagcatgg	420
cttcggccag tgcgctgagc agcgcccgtt tgttctgaa gtgccagtaa agcgccggct	480
gctgaacccc caaccgttcc gccagtttgc gtgtcgtcag accgtctacg ccgacctcgt	540
tcaacaggtc cagggcggca cggatcactg tattcggctg caactttgtc atgcttgaca	600

ctttatcact	gataaacata	atatgtccac	caacttatca	gtgataaaga	atccgcgcca	660
gcacaatgga	tctcgaggtc	gagggatctc	tagaggatcc	atattcgcgg	gcatcaccgg	720
cgccacaggt	gcggttgctg	gcgctatat	cgccgacatc	accgatgggg	aagatcgggc	780
tcgccacttc	gggctcatga	gcgcttgttt	cggcgtgggt	atggtggcag	gccccgtggc	840
cgggggactg	ttgggcgcca	tctccttgca	tgaccattc	cttgccggcg	cggtgctcaa	900
cggcctcaac	ctactactgg	gctgcttcct	aatgcaggag	tcgcataagg	gagagcgtcg	960
acctcgggcc	gcgttgctgg	cgtttttcca	taggctccgc	ccccctgacg	agcatcacia	1020
aaatcgacgc	tcaagtcaga	ggtggcgaaa	cccgcagga	ctataaagat	accaggcggt	1080
tccccctgga	agctccctcg	tgcgctctcc	tgttccgacc	ctgccgctta	ccggatacct	1140
gtccgccttt	ctcccttcgg	gaagcgtggc	gctttctcat	agctcacgct	gtaggtatct	1200
cagttcggtg	taggtcgttc	gctccaagct	gggtgtgtg	cacgaacccc	ccgttcagcc	1260
cgaccgctgc	gccttatccg	gtaactatcg	tcttgagtcc	aacccggtaa	gacacgactt	1320
atgccactg	gcagcagcca	ctggtaacag	gattagcaga	gcgaggatg	taggcgggtc	1380
tacagagttc	ttgaagtgg	ggcctaacta	cggctacact	agaagaacag	tatttggtat	1440
ctgcgctctg	ctgaagccag	ttaccttcgg	aaaagagtt	ggtagctctt	gatccggcaa	1500
acaaccacc	gctggtagcg	gtggtttttt	tgtttgcaag	cagcagatta	cgcgagaaa	1560
aaaaggatct	caagaagatc	ctttgatctt	ttctacgggg	tctgacgctc	agtggaacga	1620
aaactcacgt	taagggattt	tggtcatgag	attatcaaaa	aggatcttca	cctagatcct	1680
tttaaattaa	aaatgaagtt	ttaaataaat	ctaaagtata	tatgagtaaa	cttggctctga	1740
cagttaccaa	tgcttaatca	gtgaggcacc	tatctcagcg	atctgtctat	ttcgttcatc	1800
catagttgcc	tgactccccg	tcgtgtagat	aactacgata	cgggagggct	taccatctgg	1860
ccccagtgtc	gcaatgatac	cgcgagaccc	acgctcaccg	gctccagatt	tatcagcaat	1920
aaaccagcca	gccggaaggg	ccgagcgag	aagtggctct	gcaactttat	ccgcctccat	1980
ccagtctatt	aattggtgcc	gggaagctag	agtaagtagt	tcgccagtta	atagtttgcg	2040
caacgttggt	gccattgcta	caggcacgtc	ggtgtcacgc	tcgtcgtttg	gtatggcttc	2100
attcagctcc	ggttcccaac	gatcaaggcg	agttacatga	tccccatgt	tgtgcaaaaa	2160
agcggttagc	tccttcggtc	ctccgatcgt	tgtcagaagt	aagttggccg	cagtgttatc	2220
actcatggtt	atggcagcac	tgcataattc	tcttactgtc	atgccatccg	taagatgctt	2280
ttctgtgact	ggtgagtact	caaccaagtc	attctgagaa	tagtgtatgc	ggcgaccgag	2340
ttgctcttgc	ccggcgtcaa	tacgggataa	taccgcgcca	catagcagaa	ctttaaaggt	2400
gctcatcatt	ggaaaacgtt	cttcggggcg	aaaactctca	aggatcttac	cgctgttgag	2460
atccagttcg	atgtaacca	ctcgtgcacc	caactgatct	tcagcatctt	ttactttcac	2520
cagcgtttct	gggtgagcaa	aaacaggaag	gcaaaatgcc	gcaaaaaagg	gaataagggc	2580
gacacggaaa	tgttgaatac	tcatactctt	cctttttcaa	tattattgaa	gcatttatca	2640

gggttattgt	ctcatgagcg	gatacatatt	tgaatgtatt	tagaaaaata	aacaaatagg	2700
ggttccgcgc	acatttcccc	gaaaagtgcc	acctgacgtc	taagaaacca	ttattatcat	2760
gacattaacc	tataaaaata	ggcgtatcac	gaggccctga	tggctctttg	cggcacccat	2820
cgttcgtaat	gttccgtggc	accgaggaca	accctcaaga	gaaaatgtaa	tcacactggc	2880
tcaccttcgg	gtgggccttt	ctgcgtttat	aaggagacac	tttatgttta	agaaggttgg	2940
taaattcctt	gcggcttttg	cagccaagct	agatccagct	ttttgcaaaa	gcctaggcct	3000
ccaaaaaagc	ctcctcacta	cttctggaat	agctcagagg	ccgaggcggc	ctcggcctct	3060
gcataaataa	aaaaaattag	tcagccatgg	ggcggagaat	gggcggaact	gggcggagtt	3120
aggggcggga	tgggcggagt	taggggcggg	actatggttg	ctgactaatt	gagatgcatg	3180
ctttgcatac	ttctgcctgc	tggggagcct	ggggactttc	cacacctggt	tgctgactaa	3240
ttgagatgca	tgctttgcat	acttctgcct	gctggggagc	ctggggactt	tccacacctt	3300
aactgacaca	cattccacag	ggaagctagc	ttggaattaa	ttccccgcc	ccttccaata	3360
caaaaactaa	ttagactttg	agtgatcttg	agcctttcct	agtttttcta	ttggaagggc	3420
tcgtgccag	tctcattgag	aaggcatgtg	cgacgatgg	cttctgtcac	tgcaaagggg	3480
tcacaattgg	cagaggggcg	gcggtcttca	aagtaacctt	tcttctcctg	ccgagccgag	3540
aatgggagta	gagccgactg	cttgattccc	acaccaatct	cctcgccgct	ctcacttcgc	3600
ctcgttctcg	tggctcgtgg	ccctgtccac	cccgtccatc	atccccgccg	ccaccgctca	3660
gagcaccttc	caccatggcc	acctcagcaa	gttcccactt	gaacaaaaac	atcaagcaaa	3720
tgtacttgtg	cctgccccag	ggtgagaaag	tccaagccat	gtatatctgg	gttgatggta	3780
ctggagaagg	actgcgctgc	aaaacccgca	ccctggactg	tgagcccaag	tgtgtagaag	3840
agttacctga	gtggaatitt	gatggctcta	gtacctttca	gtctgagggc	tccaacagtg	3900
acatgatctt	cagccctggt	gccatgtttc	gggacccttt	ccgcagagat	cccaacaagc	3960
tggtgttctg	tgaagttttc	aagtacaacc	ggaagcctgc	agagaccaat	ttaaggcact	4020
cggtgaaacg	gataatggac	atggtgagca	accagcacc	ctggtttggg	atggaacagg	4080
agtatactct	gatgggaaca	gatgggcacc	cttttggttg	gccttccaat	ggctttcctg	4140
ggccccaaag	tccgtattac	tgtggtgtgg	gcgcagacaa	agcctatggc	agggatatcg	4200
tggaggctca	ctaccgcgcc	tgcttgtatg	ctggggtaa	gattacagga	acaaatgctg	4260
aggtcatgcc	tgcccagtgg	gaactccaaa	taggaccctg	tgaaggaatc	cgcatgggag	4320
atcatctctg	ggtggcccgt	ttcatcttgc	atcgagtatg	tgaagacttt	ggggtaatag	4380
caacctttga	ccccaaagccc	attcctggga	actggaatgg	tgaggctgc	cataccaact	4440
ttagcaccaa	ggccatgcgg	gaggagaatg	gtctgaagta	agtagctccc	tctggacat	4500
ctttattctc	atggggtgga	aggcctttgt	gttagggttg	ggaaaagttg	gacttctcac	4560
aaactacatg	ccatgctctt	cgtgtttgtc	ataagcctat	cgttttgtac	ccgttggaga	4620
agtgacagta	ctctaggaat	agaattacag	ctgtgatatg	ggaaagttgt	cacgtaggtt	4680

caagcattta aaggtcttta gtaagaacta aatacacata caagcaagtg ggtgacttaa	4740
ttcttactga tgggaagagg ccagtgatgg gggcttccc atccaaaaga taattggtat	4800
tacatgttga ggactggctt gaagcacttg agacataggt cacaaggcag acacagcctg	4860
catcaagtat ttattggttt cttatggaac tcatgcctgc tcctgccctt gaaggacagg	4920
tttctagtga caaggtcaga ccctcacctt tactgcttcc accaggcaca tcgaggaggc	4980
catcgagaaa ctaagcaagc ggcaccggtt ccacattcga gcctacgatc ccaagggggg	5040
gctggacaat gcccgtggtc tgactgggtt ccacgaaacg tccaacatca acgacttttc	5100
tgctgggtgc gccaatcgca gtgccagcat ccgattccc cggactgtcg gccaggagaa	5160
gaaaggttac ttgaagacc gccgcccctc tgccaattgt gaccctttg cagtgcaga	5220
agccatcgtc cgcacatgcc ttctcaatga gactggcgac gagcccttcc aatacaaaaa	5280
ctaattagac tttagtgat cttgagcctt tcctagttca tgccacccc cccagctgt	5340
ctcattgtaa ctcaaaggat ggaatatcaa cggctttttt attcctcgtg cccagttaat	5400
ccttgctttt attggtcaga atagaggagt caagttctta atgcctatac accaacctca	5460
tttcttttct atttagcttt ctacgtgggg gtgggggggg tagggagggg taggcgaagg	5520
gaacgtaacc acatgcttca tctcatcagg aatgccatgt ccagtaggca gagctgccac	5580
agagtgggtg tatttgtgga ggaggacttt ttcttcagga cagttaaag agcaggcca	5640
ctgcttgat tgacaattcc cctataggta gagagcttgc tagttcttca ggtaaaccaa	5700
ctttctattc caaatggaag ttaggtgagg agtagtgag gagttaatgc cctccatgaa	5760
gacagctcag tgtatcacct gagacagatg ggtagcccta ctgtaaaaga aggaaaagtt	5820
atctctgggt cctccattta taacacaaag cagtagtatt tttatattta aatgtaaaaa	5880
caaaagttat atatatgata tgtggatata tgtgtatttc taattcagaa accatcctag	5940
ttactgggtt tgccaagttt gaagagcttg gtaacaaga aaggatctct tgagtagagg	6000
tggggggtgca gtaccaggaa aggtggttat ctggggctca gcgctttatt actatgtggg	6060
gtttcccctg cccactctgc aggagcagat gctggacagg tagcagggtg ggacaccagt	6120
gcttgccacc acctgtccct gtgcttaggc taagatgcat atgtatccac acagagttag	6180
caggatggag ttggctggtc aacttgaaca ttgttactga taggggtggg tggggtttat	6240
tttttgggtg gactagcatg tcaactaaagc aggccttttg atatattaaa tttttaaag	6300
caaaacaagt tcagctttta atcaacttg tagggtttct aactttacag aattgcctgt	6360
ttgtttcagt gtctccatcc actttgctct tggaggaacg gaggacaggc agacctggag	6420
ttaaaacatt tgtcattttg tgtcatagtg tctactttct cccagcagaa tattcctttc	6480
cttcttagga gtccatgga gttttgtttt tgtttttttt ctattacgat aaacataccc	6540
cacctccatt ctggcttgcc ctgctgttct ctggttgttt gtgtgctgtc cgcagcaggc	6600
tgctgtggt tttctcttgc catgacgact tctaattgcc atgtacagta tgttcagtta	6660
gataactcct cattgtaaac agactgtaac tgccagagca gcgcttataa atcaacctaa	6720

catttataag	atctcctctt	gacttgtttc	tttgtggttg	ggggaggaag	aaaaaaaaa	6780
gcgtgcagta	tttttttggt	ccttcatttc	ctatcaaaag	aaaggggagt	ggttctgttt	6840
tgtttactcg	caaaataagc	tagcttatct	attggctttt	cttttttttt	ttttttttaa	6900
acgggctttt	tcttgtagct	ataatttggg	gtaagggtg	agagttttta	tagttttttg	6960
agacagggtc	ttgggtgata	cccttggtcg	gcttgtagct	aactatgtag	actgggctag	7020
cctttaactt	gcagttctgc	tttcaattag	ggtttataca	tttagtcttg	gcaattccta	7080
gttccacggt	taatctcttt	acatttcaaa	gcagtgttat	ctgaagagtt	caggcgacga	7140
gtcaattcaa	tagagttaca	caaaaaccta	aaaacaagt	tttaaatacc	aagttatggt	7200
ggcctggcca	ctttcacag	ctgtccacaa	ctcaatgtga	caaggctaca	aattggatat	7260
actagaattt	cctgggtgatt	tggaaccctt	gcttcatttc	ccggaaccag	ggcttttggt	7320
gacagtccta	gcttatcaga	ttatttaaaa	cagttactct	tcctgccctt	cttctgaga	7380
cctttgtcca	gctgccatga	gccatctaca	cagtacttgc	ttccctggtg	aagtcaactga	7440
aggcacatca	gcccagaca	taaaggcttg	tcccggattc	actagcctgg	tgaacttggt	7500
gttctctgat	gtttgtcct	gtttgttgt	gatttagtct	caaatttccc	agcctggttt	7560
gaaaatctgg	gctcccagcc	ttcaataagg	aggactacag	atatgtacga	ctgagccttg	7620
attccagcct	catgtttata	cgctctgtct	cagctccctg	aaggttccag	ttgaaactc	7680
aataatccag	gggtcagaaa	gtcttgatct	tatcccaca	gtatggcacc	aagcctggct	7740
gagccttctg	acttagtctg	ccctgttgct	atttaagcac	ttttcttcac	taggctaaaa	7800
ataaaaggag	cttcctcctt	tgccatggcg	ctgtgcatga	taggaaaagg	tagctatcta	7860
ctagcatatt	aactccactg	ttttgtctt	gtgtgtttg	tttttgagga	agggctctcaa	7920
ctgtgtatcc	ctggctggcc	tggccggatc	tagcttctgt	tcaaggacgg	tgagggcgcg	7980
caatattggc	tattggccat	tgcatatggt	gtatccatat	cataatatgt	acatttatat	8040
tggtctatgt	ccaacattac	cgccatggtg	acattgatta	ttgactagtt	attaatagta	8100
atcaattacg	gggtcattag	ttcatagccc	atatatggag	ttccgcgta	cataacttac	8160
ggtaaatggc	cgctctggct	gaccgcccac	cgacccccgc	ccattgacgt	caataatgac	8220
gtatgttccc	atagtaacgc	caatagggac	tttcattga	cgtcaatggg	tggagtattt	8280
acggtaaaact	gcccacttgg	cagtacatca	agtgtatcat	atgccaaagta	cgccccctat	8340
tgacgtcaat	gacggtaaat	ggccccctg	gcattatgcc	cagtacatga	ccttatggga	8400
ctttcctact	tggcagtaca	tctacgtatt	agtcacgct	attacatgg	tgatgctggt	8460
ttggcagtac	atcaatgggc	gtggatagcg	gtttgactca	cggggatttc	caagtctcca	8520
ccccattgac	gtcaatggga	gtttgttttg	gcacccaaat	caacgggact	ttccaaaatg	8580
tcgtaacaac	tccgccccat	tgacgcaaat	ggcggtagg	cgtgtacggt	gggaggtcta	8640
tataagcaga	gctcgtttag	tgaaccgtca	gatcgcttgg	agacgccatc	cacgtgtttt	8700
tgacctccat	agaagacacc	gggaccgatc	cagcctccgc	ggccgggaac	ggtgcattgg	8760

```

aacgcggatt ccccgTGCCA agagtGACGT aagtaccGCC tatagagtct ataggcccac 8820
ccccTGGCT tcttatGcat gctatactgt tttTGGCTG gggTctatac acccccGctt 8880
cctcatGtta taggtgatgg tatagcttag cctataggTg tgggttattg accattattg 8940
accactCCCC tattggTgac gatactttcc attactaatc cataacatgg ctctttGcca 9000
caactctctt tattggctat atGCCaatac actgtccttc agagactgac acggactctg 9060
-----
tatttttaca ggatggggTc tcatttatta tttacaaatt cacatataca acaccaccgt 9120
ccccagTgCC cgcagTtttt attaaacata acgtgggacT tccacgcgaa tctcgggtac 9180
gtgttccgga catgggctct tctccggtag cggcggagct tctacatccg agccctgctc 9240
ccatgcctcc agcgactcat ggtcgtcgg cagctccttg ctccctaacag tggaggccag 9300
acttaggcac agcacgatgc ccaccaccac cagtgtgccg cacaaggccg tggcggtagg 9360
gtatgtgtct gaaaatgagc tcggggagcg ggcttgacc gctgacgcat ttggaagact 9420
taaggcagcg gcagaagaag atgcaggcag ctgagttggt gtgttctgat aagagtcaga 9480
ggtaactccc gttgcggTgc tgtaacggT ggagggcagT gtagtctgag cagtactcgt 9540
tgctgccgcg cgcgccacca gacataatag ctgacagact aacagactgt tcctttccat 9600
gggtcttttc tgcagtcacc gtccttgaca cgaagcttgC cgccaccatg gtgagcaagc 9660
agatcctgaa gaacaccggc ctgcaggaga tcatgagctt caaggtgaac ctggagggcg 9720
tggTgaacaa ccacgtgttc accatggagg gctcgggcaa gggcaacatc ctgttcggca 9780
accagctggt gcagatccgc gtgaccaagg gcgccccct gcccttcgcc ttcgacatcc 9840
tgagccccgc cttccagtac ggcaaccgca cctcaccaa gtaccccgag gacatcagcg 9900
acttcttcat ccagagcttc cccgccggct tcgtgtacga gcgcaccctg cgctacgagg 9960
acggcggcct ggtggagatc cgcagcgaca tcaacctgat cgaggagatg ttcgtgtacc 10020
gcgtggagta caagggccgc aacttccccA acgacggccc cgtgatgaag aagaccatca 10080
ccggcctgca gcccagcttc gaggtggtgt acatgaacga cggcgtgctg gtgggccagg 10140
tgatcctggt gtaccgcctg aacagcggca agttctacag ctgccacatg cgcaccctga 10200
tgaagagcaa gggcgtggtg aaggacttcc ccgagtacca cttcatccag caccgcctgg 10260
agaagaccta cgtggaggac ggcggcttcg tggagcagca cgagaccgcc atcgcccage 10320
tgaccagcct gggcaagccc ctgggcagcc tgcacgagtg ggtgtaata 10369

```

<210> 4

<211> 13535

<212> ADN

<213> *Hamster* sp.

<220>

<221> misc_feature

<223> Seq. ID. No. 1: vector plasmídico circular de direccionamento ao ponto crítico pEE 15.1 hCMVp-GFP GS + IgG 2A /clone 11

<400> 4

gaattcattg atcataatca gccataccac atttgtagag gttttacttg ctttaaaaaa	60
cctcccacac ctccccctga acctgaaaca taaaatgaat gcaattgttg ttgttaactt	120
gtttattgca gcttataatg gttacaaata aagcaatagc atcacaaatt tcacaaataa	180
agcatttttt tcaactgcatt ctagtgtggt tttgtccaaa ctcatcaatg tatcttatca	240
tgtctggcgg ccgcgacctg caggcgaga actggtaggt atggaagatc cctcgagatc	300
cattgtgctg gcggtaggcg agcagcgcct gcctgaagct gcgggcattc ccagtcaaaa	360
atgagcgcca gtcgctgctg gctctcggca ccgaagtgt atgattctcc gccagcatgg	420
cttcggccag tgcgctgagc agcgcctcgt tgttcctgaa gtgccagtaa agcgcctcgt	480
gctgaacccc caaccgttcc gccagtttgc gtgtcgtcag accgtctacg ccgacctcgt	540
tcaacaggtc tagggcggca cggatcactg tattcggctg caactttgtc atgcttgaca	600
ctttatcact gataaacata atatgtccac caacttatca gtgataaaga atccgcgcca	660
gcacaatgga tctcgaggtc gagggatctc tagaggatcc atattcgcga atatgccggc	720
atcaccggcg ccacagggtc ggttgctggc gcctatatcg ccgacatcac cgatggggaa	780
gatcgggctc gccacttcgg gctcatgagc gcttgtttcg gcgtgggtat ggtggcaggc	840
ccgtggccgg gggactgttg ggcgccatct ccttgcagtc accattcctt gcggcggcgg	900
tgctcaacgg cctcaaccta ctactgggct gcttccta atgcaggatcg cataaggag	960
agcgtcgagt cctccgtgtt cgaagcgatc cctgtccagt ggtgtgcaca cttcccagc	1020
tgctctgag tctgacctct acaccctcag cagctcagtg actgtaacct cgagcacctg	1080
gcccagccag tccatcacct gcaatgtggc ccaccggca agcagcacca aggtggacaa	1140
<hr/>	
gaaaattggt gaggaaaaca aggggagtag aggttcacaa gtgattagtc taaggcctta	1200
gcctagctag accagccagg atcagcagcc atcaccaaaa atgggaactt ggcccagaag	1260
agaaggagat actgactgtg actccctctt ggaaacttct aactatgacc acctacctc	1320
aaggatcatg tctcttagga tagatgtcct tggatcattc caggatcctc ctgacctaa	1380
gccataccca gggacaaagt ccctggtttg gtgccttttc tcttcaaac ttgagtaacc	1440
cccagccttc tctctgcaga gccagaggg cccacaatca agccctgtcc tccatgcaaa	1500
tgcccaggta agtcaactaga ccagagctcc acccgggaga atggttaagt ctgtaaacat	1560
ccctgcaact gaggataagc catgtacaga tccatttcca tctctcctca tcagcaccta	1620
acctcttggg tggaccatcc gtcttcatct tccctccaaa gatcaaggat gtactcatga	1680
tctccctgag ccccatagtc acatgtgtgg tgggtgatgt gagcgaggat gaccagatg	1740
tccagatcag ctggtttgtg aacaacgtgg aagtacacac agctcagaca caaacccata	1800
gagaggattt caacagtact ctccgggtgg tcagtgcctt cccatccag caccaggact	1860

ggatgagtgg caaggagttc aatgcaagg tcaacaacaa agacctcca gcgcccacg	1920
agagaacccat ctcaaaacc aaagtgaga gctgcagcct gactgcatgg gggctgggat	1980
gggcataaagg ataaaggtct gtgtggacag cttctgctt cagccatgac ctttgtgtat	2040
gtttctaccc tcacagggtc agtaagagct ccacaggtat atgtcttgcc tccaccagaa	2100
gaagagatga ctaagaaaca ggtcactctg acctgcatgg tcacagactt catgcctgaa	2160
gacatttacg tggagtggac caacaacggg aaaacagagc taaactacaa gaacactgaa	2220
ccagtcctgg actctgatgg ttcttacttc atgtacagca agctgagagt ggaaaagaag	2280
aactgggtgg aaagaaatag ctactcctgt tcagtgggtcc acgagggctc gcacaatcac	2340
cacacgacta agagcttctc ccggactccg ggtaaatgag ctcagcacc acaaaactct	2400
caggtccaaa gagacacca cactcatctc catgcttccc ttgtataaat aaagcaccca	2460
ccaatgcctg ggaccatgta aaactgtcct ggttctttcc aaggatata gcatagctca	2520
caggctgata tttctggcca gggttggagg acagccttgt ctataggaag agaatgaggt	2580
ttttgcaactg caggactcag agctcattag ttatcctgcc ttggagtgtt ggggcttggc	2640
tttaggcagt gccttttctc tgccttcta cgaaccagca gctgccatac atagagataa	2700
tcctaggaag cctcaaatgg agaaggacac aaaccacct ccctcaggct gttcctctat	2760
cccggcccca cttctttacc taggggtttc tctgagtcta ttgtggagt acacatggcc	2820
aggggcattc cagagaccct tgtcatccat aactcaact caggcagctt tgcacaaaca	2880
aagtctgcac acccatacag atggctcact cttgcctgtg ccatgtagg ctgaggcaca	2940
tggtcttgc tgcaccaagg gagggactat tagatagcca cactcatgct gaatcctggc	3000
ccattcaaat tagcctgctg aacaccatcc agtccatata gcacatgtat ccacatgcac	3060
gtgtgcacaa aacgcattta atacaactgg acaacaattc tgtgccctgc acagcaccta	3120
tatccagcaa tgtatcacca tacacacgac caaaaaaatt caatgccac gtttctgcca	3180
tcacaaacag acacatcttt cctctctgtg gccactgcat tatatgctca acacaagacc	3240
tctgaagcca gatccatctc tggcacctcg gggctatgct tcaaccac atgaattatg	3300
caaaccatag ccataatggt ctgaatcact tcacactggg atgttccca gttcaggcaa	3360
gacgagccac aggctctgct gatgactgaa ggacagcaaa gggctcagtc agctgtatag	3420
ccactgttga cctgggtcac aggcctgct gacctccac cttctcctgt actgaaggaa	3480
tgaaagatga gacaagcata gagggcactt gaataatcca ggtcactctg aggtccacc	3540
aaggcattat tggactcagg tgggaagctg agactggtgt cccagaggga aaggaaggaa	3600
agcaggcccc ggggagggct tgcctgcca gtcaggctgg agatctctc tctgaatcca	3660
tgcagacatg tctgcctcac agggaatctc tcccagcacc aacctgttg ggacaaacac	3720
tgactgtcct ctctgttcag ggctagacct ggatgatgct tgtgctgagg cccaggacgg	3780
ggagctggac ggcctctgga cgaccatcac catcttcatc agcctcttc tgctcagcgt	3840
gtgctacagc gcctctgtca cactcttcaa ggttggcact gtctccacc ctctgctgtg	3900

atggctacac	tgaccacaaa	atgtcctctc	actcctcccc	agatgtagta	ggacgttact	3960
ttgctgcccc	tactctgtcc	cacacacat	ttcctccatt	ccctgagcca	tcccacattg	4020
ttctatgtga	ctccacattg	tgteccatac	agtctgccct	tctgtctctc	tggtgtctct	4080
gcgatgacct	gatactgtct	tatgagacca	aacctccttg	cattccacac	tagccttcat	4140
gaggttcaat	gctgtcttac	acacaatccc	ctcagcctca	ccatggctca	aggtactctg	4200
tgagctatcc	tcataaccatc	tccacctcaa	ctcccacaat	atctccactc	tgacccctcc	4260
catacccagt	ctcctacctg	tatgaaggga	attgaaggag	agacaggtcg	acctctgtct	4320
ttcccacaga	ttggagggtc	tgagcatggg	cytggctctc	gactttctct	cacttcccca	4380
caggtaaagt	ggatcttctc	ctctgtggg	gagctgaagc	agacgatctc	ccctgactac	4440
agaaacatga	ttgggcaggg	agcctaggcc	acttctctg	ggatcagaag	agcttcctag	4500
gccctgcaga	agcccatcca	tcctactgtg	cagcctaaca	gggaggccac	actctagccc	4560
tatgactctc	tgatcagaac	tcccattggtc	tcctctttgg	aggaccacgt	gcagtgcagg	4620
ctttgccag	acctaaacac	ttccacagca	gtcgcagat	atctaactac	tccggaccag	4680
aagaaccatc	tccttccaaa	ccagcactag	ggatctgaga	tctcagaatg	tttgccctag	4740
aagagctgga	aatccaggct	tcctgtgttc	tgctacaagg	acatcagcct	ggatttgacc	4800
tggaccacac	atcttcatct	aatgagttt	tccacaaagg	acacgtttca	gatccttgaa	4860
tgagacctct	acatggaaga	ccagagtcac	tatacccaaa	ggtcactctg	tatccttgca	4920
ccagctatac	tggacagctt	ccttctggt	acttcagtga	ccctggctga	ggaaaggatc	4980
tgtgacctca	actgtttgga	gagcctctgg	aagatgtagt	cttctcttcc	tgctaccacc	5040
aacatgctgg	atctcagatg	cagaatccaa	tccacagaca	ccactgacca	cacaacctga	5100
agacaaggcc	attgccacct	ccacagagat	gccatccaca	ctctgtggag	aaataaggag	5160
tgctttgtgc	agcctctgca	aagctctggc	agggattaga	gtatacacac	tgagtactga	5220
ctaggtgacc	aggcagaaaa	acctccagga	gaaggaacaa	tgggggagag	atgtgaacag	5280
atagttagaa	aaagcatggt	gtcacaggtc	tgctctgtgg	actgatttcc	agattggacc	5340
acctacagca	gaaaccatcg	gttgacgtgg	caatctagga	ggaccaacct	ggaataggag	5400
ggctgtctgtg	gtcaatggag	agtagacctg	tatctatctc	tccactgcct	cttatgacca	5460
ataagaagcc	agagtctcca	gacagaaaga	aagaaagaaa	gaaagaaaga	aagaaagaaa	5520
gaaagagaga	gagagagaga	gagagagaga	gaggaaggaa	ggaagggaag	aaggaaggaa	5580
ggaagggaag	aggaggagga	ggaggaggag	gaggaggaga	gagagagaga	gagagagaga	5640
gagagagaga	gagcaccagc	ttttctgtga	ctggaaggaa	atgcttagag	agcttggatc	5700
tttaaagctt	cttttttcta	gagaccatga	atgtctttgt	tctctctctc	tctctctctc	5760
tctctctctc	tctctctctc	tctctctgtg	tgtgtgtgtg	tgtgtgtgtg	tgtgtgtgtg	5820
tgcatgcacg	ctattgtttt	ggcatttgaa	acaataaaac	attcttttaa	tattctgtat	5880
ctcatgggtc	cccttctgtg	tggatcagcc	ctaacacca	ggaacagggg	acaataaaca	5940

gaccacagcc atgtacagcc ttctacctcc cttctggttc tgacctcca gaggtccctc	6000
agtgggcccc tcacagctgg gtttcttccc tggcagtgcc accaagagct caggcacctc	6060
tgagctggag gctgtcctga tgccataggc aggctatgga gcagagatga tgaccacggt	6120
ggactccagg tgagccaggc aaagcctccc atgccagaag agaagcgtgt ggtactcact	6180
ggcctcgggc tgctacggat tcagcaaaga gcatggatcg cttcgaagcc tccaagctcg	6240
acctcggggc gcgttgctgg cgtttttcca taggtcccgc cccctgacg agcatcacia	6300
aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcgtt	6360
tccccctgga agtcctctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta cgggatacct	6420
gtccgccttt ctcctctcgg gaagcgtggc gctttctcaa tgctcacgct gtaggtatct	6480
cagttcggtg taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc	6540
cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aaccggtaa gacacgactt	6600
atgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggatg taggcggtgc	6660
tacagagttc ttgaagtggg ggcctaacta cggctacact agaaggacag tatttggtat	6720
ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa	6780
acaaccacc gctggtagcg gtgggttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa	6840
aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaacga	6900
aaactcacgt taagggattt tggatcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct	6960
tttaaattaa aaatgaagtt ttaaataaat ctaaagtata tatgagtaaa cttggtctga	7020
cagttaccaa tgcttaataca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttcgttcatc	7080
catagttgcc tgactccccg tctgttagat aactacgata cgggagggct taccatctgg	7140
ccccagtgct gcaatgatac cgcgagaccc acgctcaccg gctccagatt taccagcaat	7200
aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgcag aagtggctct gcaactttat ccgcctccat	7260
ccagttctatt aattgttgcc gggagctag agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg	7320
caacgttggt gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc	7380
atccagctcc ggttccaac gatcaaggcg agttacatga tccccatgt tgtgcaaaaa	7440
agcggttagc tccttcggtc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg cagtgttatc	7500
actcatgggt atggcagcac tgcataatc tcttactgtc atgccatccg taagatgctt	7560
ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag	7620
ttgctcttgc ccggcgtcaa cacgggataa taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt	7680
gctcatcatt ggaaaacgtt cttcggggcg aaaactctca aggatcttac cgctgttgag	7740
atccagttcg atgtaaccca ctcggtgcacc caactgatct tcagcatctt ttactttcac	7800
cagcgtttct gggtagcaaa aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc	7860
gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt ctttttcaa tattattgaa gcatttatca	7920
gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg	7980

ggttccgcgc	acatttcccc	gaaaagtgcc	acctgacgtc	taagaaacca	ttattatcat	8040
gacattaacc	tataaaaata	ggcgtatcac	gaggccctga	tggctctttg	cggcaccat	8100
cgttcgaat	gttccgtggc	accgaggaca	accctcaaga	gaaaatgtaa	tcacactggc	8160
tcaccttcgg	gtgggccttt	ctgcgtttat	aaggagacac	tttatgttta	agaaggttg	8220
taaatttcct	gcggccttgg	cagccaagct	agagatccgg	ctgtggaatg	tgtgtcagtt	8280
agggtgtgga	aagtccccag	gctccccagc	aggcagaagt	atgcaaagca	tgcatctcaa	8340
ttagtcatca	accaggtgtg	gaaagtcccc	aggctcccc	gcaggcagaa	gtatgcaaag	8400
catgcatctc	aattagtcag	caaccatagt	cccgccctta	actccgccca	tcccgccct	8460
aactccgccc	agttccgccc	attctccgcc	ccatggctga	ctaatttttt	ttatttatgc	8520
agaggccgag	gccgcctcgg	cctctgagct	attccagaag	tagtgaggag	gcttttttgg	8580
aggcctaggc	ttttgcaaaa	agctagcttg	ggccaccgc	tcagagcacc	ttccaccatg	8640
gccacctcag	caagttccca	cttgaacaaa	aacatcaagc	aaatgtactt	gtgcctgccc	8700
cagggtgaga	aagtccaagc	catgtatata	tgggttgatg	gtactggaga	aggactgcgc	8760
tgcaaaacc	gcaccctgga	ctgtgagccc	aagtgtgtag	aagagttacc	tgagtggaat	8820
tttgatggct	ctagtacctt	tcagtctgag	ggctccaaca	gtgacatgta	tctcagccct	8880
gttgccatgt	ttcgggacct	cttccgcaga	gatcccaaca	agctggtgtt	ctgtgaagtt	8940
ttcaagtaca	accggaagcc	tgcaagagacc	aatttaaggc	actcgtgtaa	acggataatg	9000
gacatggtga	gcaaccagca	cccctggttt	ggaatggaac	aggagtatac	tctgatggga	9060
acagatgggc	acccttttgg	ttggccttcc	aatggctttc	ctgggcccc	aggtccgtat	9120
tactgtggtg	tgggcgcaga	caaagcctat	ggcagggata	tcgtggaggc	tactaccgc	9180
gcctgcttgt	atgtggggt	caagattaca	ggaacaaatg	ctgaggtcat	gcctgccag	9240
tgggaactcc	aaataggacc	ctgtgaagga	atccgcatgg	gagatcatct	ctgggtggcc	9300
cytttcatct	tgcatcgagt	atgtgaagac	tttggggtaa	tagcaacctt	tgacccaag	9360
cccattcctg	ggaactggaa	tgggtgcaggc	tgccatacca	actttagcac	caaggccatg	9420
cgggaggaga	atggtctgaa	gcacatcgag	gaggccatcg	agaaactaag	caagcggcac	9480
cgttaccaca	ttcagacct	cgatcccaag	gggggcctgg	acaatgccc	tggtctgact	9540
gggttccacg	aaacgtccaa	catcaacgac	ttttctgctg	gtgtcgccaa	tcgcagtgcc	9600
agcatccgca	ttccccggac	tgtcggccag	gagaagaaag	gttactttga	agaccgcggc	9660
ccctctgcca	attgtgacct	ctttgcagtg	acagaagcca	tcgtccgcac	atgccttctc	9720
aatgagactg	gcgacgagcc	cttccaatac	aaaaactaat	tagactttga	gtgatcttga	9780
gcctttccta	gttcatccca	ccccgcccca	gagagatctt	tgtgaaggaa	ccttacttct	9840
gtggtgtgac	ataattggac	aaactaccta	cagagattta	aagctctaag	gtaaatataa	9900
aatttttaag	tgataatgt	gttaaactac	tgattcta	tgtttgtgta	ttttagattc	9960
caacctatgg	aactgatgaa	tgggagcagt	ggtggaatgc	ctttaatgag	gaaaacctgt	10020

tttgcctcaga	agaaatgcc	tctagtgatg	atgaggctac	tgctgactct	caacattcta	10080
ctcctccaaa	aaagaagaga	aaggtagaag	acccaagga	cttccttca	gaattgctaa	10140
gttttttgag	tcatgctgtg	tttagtaata	gaactcttgc	ttgctttgct	atttacacca	10200
caaaggaaaa	agctgcactg	ctatacaaga	aaattatgga	aaaatattct	gtaaccttta	10260
taagtaggca	taacagttat	aatcataaca	tactgttttt	tcttactcca	cacaggcata	10320
gagtgtctgc	tattaataac	tatgctcaaa	aattgtgtac	cttttagctt	ttaatttgta	10380
aaggggttaa	taaggaatat	ttgatgtata	gtgccttgac	tagagatcat	aatcagccat	10440
accacatttg	tagaggtttt	acttgcttta	aaaaacctcc	cacacctccc	cctgaacctg	10500
aaacataaaa	tgaatgcaat	tggtgtgttt	aacttgttta	ttgcagctta	taatggttac	10560
aaataaagca	atagcatcac	aaatttcaca	aataaagcat	tttttccact	gcattctagt	10620
tgtggtttgt	ccaaactcat	caatgtatct	tatcatgtct	ggatctctag	cttcgtgtca	10680
aggacggtga	ctgcagtga	taataaaatg	tygttttgc	cgaaatacgc	gttttgagat	10740
ttctgtcgcc	gactaaattc	atgtcgcgcy	atagtgggtg	ttatcgccga	tagagatggc	10800
gatattggaa	aaatcgatat	ttgaaaatat	ggcatattga	aaatgtcgcc	gatgtgagtt	10860
tctgtgtaac	tgatatcgcc	atttttccaa	aagtgatttt	tgggcatacg	cgatatctgg	10920
cgatagcgct	tatatcgttt	acgggggatg	gcgatagacg	actttggtga	cttgggcat	10980
tctgtgtgtc	gcaaatatcg	cagtttcgat	ataggtgaca	gacgatatga	ggctatatcg	11040
ccgatagagg	cgacatcaag	ctggcacatg	gccaatgcat	atcgatctat	acattgaatc	11100
aatattggcc	attagccata	ttattcattg	gttatatagc	ataaatcaat	attggctatt	11160
ggccattgca	tacgttgtat	ccatatcata	atatgtacat	ttatattggc	tcatgtccaa	11220
cattaccgcc	atgttgacat	tgattattga	ctagttatta	atagtaatca	attacggggt	11280
cattagttca	tagcccatat	atggagttcc	gcgttacata	acttacggta	aatggcccgc	11340
ctggctgacc	gccaacgac	ccccgcccat	tgacgtcaat	aatgacgtat	gttcccatag	11400
taacgccaat	agggactttc	cattgacgtc	aatgggtgga	gtatttacgg	taaactgccc	11460
acttggcagt	acatcaagtg	tatcatatgc	caagtacgcc	ccctattgac	gtcaatgacg	11520
gtaaattggc	cgctggcat	tatgccagtt	acatgacctt	atgggacttt	cctacttggc	11580
agtacatcta	cgattatgtc	atcgctatta	ccatgggtgat	gcggttttgg	cagtacatca	11640
atgggcgtgg	atagcggttt	gactcacggg	gatttccaag	tctccacccc	attgacgtca	11700
atgggagttt	gttttggcac	caaaatcaac	gggactttcc	aaaatgtcgt	aacaactccg	11760
ccccattgac	gcaaatgggc	ggtaggcgtg	tacgggtgga	ggtctatata	agcagagctc	11820
gtttagttaa	ccgtcagatc	gcctggagac	gccatccacg	ctgttttgac	ctccatagaa	11880
gacaccggga	ccgatccagc	ctccgcgccc	gggaacggtg	cattggaacg	cggattcccc	11940
gtgccaaagag	tgacgtaagt	accgcctata	gagtctatag	gcccaccccc	ttggcttctt	12000
atgcatgcta	tactgttttt	ggcttggggt	ctatacacc	ccgttctctc	atggtatagg	12060

tgatggtata gcttagccta taggtgtggg ttattgacca ttattgacca ctcccctatt 12120
ggtgacgata ctttccatta ctaatccata acatggctct ttgccacaac tctctttatt 12180
ggctatatgc caatacactg tccttcagag actgacacgg actctgtatt tttacaggat 12240
ggggtctcat ttattattta caaattcaca tatacaacac caccgtcccc agtgcccgca 12300
gtttttatta aacataacgt gggatctcca cgcgaatctc gggtagctgt tccggacatg 12360
ggctcttctc cggtagcggc ggagcttcta catccgagcc ctgctcccat gcctccagcg 12420
actcatggtc gctcggcagc tccttgctcc taacagtgga ggccagactt aggcacagca 12480
cgatgccac caccaccagt gtgccgcaca aggccgtggc ggtagggat gtgtctgaaa 12540
atgagctcgg ggagcgggct tgcaccgctg acgcatttgg aagacttaag gcagcggcag 12600
aagaagatgc aggcagctga gttgtgtgt tctgataaga gtcagaggta actcccgtt 12660
cgggtctggt aacggtggag ggcagtgtag tctgagcagt actcgttgct gccgcgcgcg 12720
ccaccagaca taatagctga cagactaaca gactgttctt ttccatgggt cttttctgca 12780
gtcaccgtcc ttgacacgaa gcttgccgcc accatgggtga gcaagcagat cctgaagaac 12840
accggcctgc aggagatcat gagcttcaag gtgaacctgg agggcgtggg gaacaaccac 12900
gtgttcacca tggagggctg cggcaagggc aacatcctgt tcggcaacca gctggtgcag 12960
atccgcgtga ccaagggcgc ccccctgcc ttgccttcg acatcctgag cccgccttc 13020
cagtacggca accgcacctt caccaagtac cccgaggaca tcagcgactt cttcatccag 13080
agcttccccg ccggcttcgt gtacgagcgc accctgcgct acgaggacgg cggcctggtg 13140
gagatccgca gcgacatcaa cctgatcgag gagatgttcg tgtaccgctg ggagtacaag 13200
ggccgcaact tccccaacga cggccccgtg atgaagaaga ccatcaccgg cctgcagccc 13260
agcttcgagg tgggtgacat gaacgacggc gtgctggtgg gccaggtgat cctggtgtac 13320
cgctgaaca gcggcaagtt ctacagctgc cacatgcgca ccctgatgaa gagcaagggc 13380
gtggtgaagg acttccccga gtaccacttc atccagcacc gcctggagaa gacctacgtg 13440
gaggacggcg gcttcgtgga gcagcacgag accgccatcg cccagctgac cagcctgggc 13500
aagccccctg gcagcctgca cgagtgggtg taata 13535

Lisboa, 2009-01-13

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização do promotor de mCMV para aumento da taxa de transfecção de um vector de expressão de mamífero em células CHO.

2. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o promotor de mCMV está contido no vector de expressão em mamífero que compreende pelo menos uma primeira unidade de transcrição para o gene do produto, unidade de transcrição esta que está sob o controlo do promotor de mCMV, e uma segunda unidade de transcrição compreendendo um gene marcador da glutamina-sintetase (GS).

3. Utilização de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizada por** o promotor de mCMV compreender o local de início da transcrição natural (+0) e se prolongar para montante até à posição -500.

4. Utilização de acordo com a reivindicação 3, **caracterizada por** o promotor de mCMV se prolongar até ao local de restrição XhoI natural.

5. Utilização de acordo com a reivindicação 3, **caracterizada por** o local de início da transcrição ser modificado para compreender um local de restrição adequado para inserção de um produto génico recombinante.

6. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 5, **caracterizada por** o promotor de mCMV não possuir na primeira unidade de transcrição o primeiro intrão natural do promotor de mCMV.

7. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizada por** o vector compreender uma porção do *locus* do gene de IgG 2A de murídeo, porção esta que estimula a actividade do promotor de mCMV.

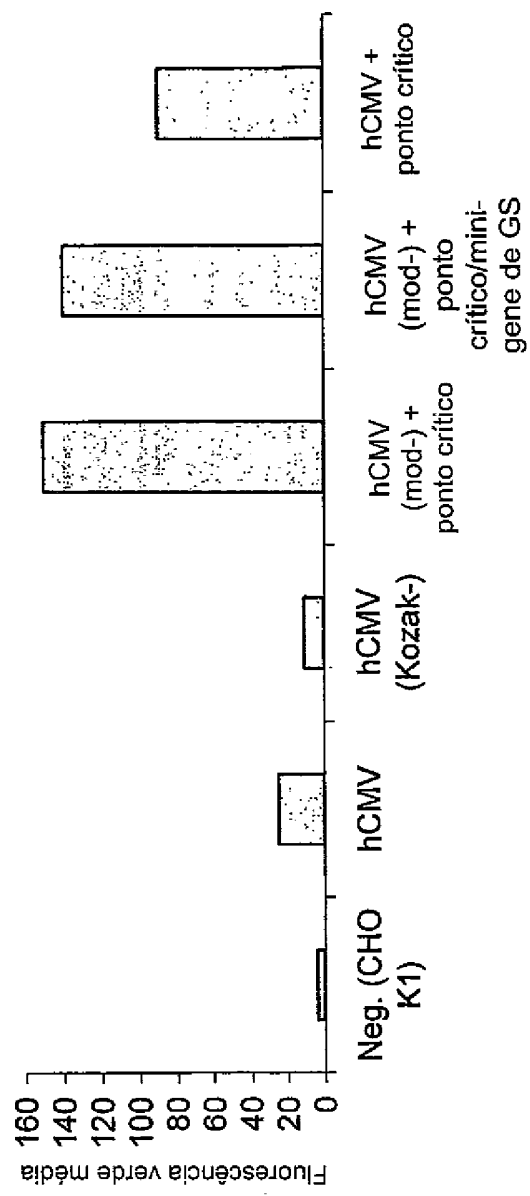
Lisboa, 2009-01-13

RESUMO

"Método de expressão de proteínas recombinantes em células CHO"

Método de expressão de proteínas recombinantes em células CHO, através da utilização de um vector de expressão compreendendo o *locus* do gene da IgG 2A de murídeo.

Fig. 1 - Transientes de CHO



Construções de vetor

Fig. 2 - Estáveis de CHO

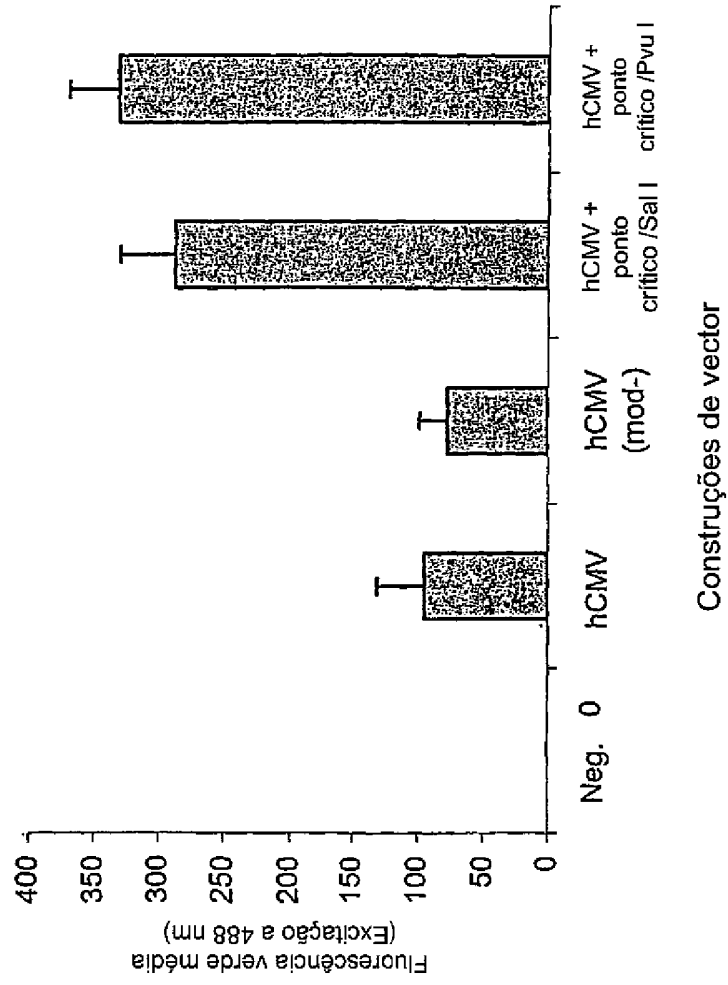


Fig. 3

