



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 314 248**

51 Int. Cl.:
C12N 15/85 (2006.01)
C12N 15/90 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03765075 .1**
96 Fecha de presentación : **21.07.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1525320**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.04.2005**

54 Título: **Método de expresión de una proteína recombinante en células CHO.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2009

73 Titular/es: **Lonza Biologics plc.**
228 Bath Road
Berkshire, Slough SL1 4DY, GB

72 Inventor/es: **Kallmeier, Robert y**
Gay, Robert

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 314 248 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método de expresión de una proteína recombinante en células CHO.

5 La presente invención se refiere al uso del promotor de mCMV para potenciar la tasa de transfección de un vector de expresión de mamífero en células CHO.

10 El sistema de expresión de mamífero de células de ovario de hámster chino (CHO) se usa ampliamente en la producción de proteína recombinante. Aparte de estirpes celulares linfoides tales como estirpes celulares de hibridoma, es uno de los pocos tipos celulares que permite un cultivo discontinuo de células animales en suspensión de alta densidad sencillo y eficaz. Además, permite rendimientos de producto muy altos y es comparativamente robusto ante tensiones metabólicas, mientras que las células linfoides son más difíciles de cultivar a escala industrial. Dado el considerable coste de producción, es de la mayor importancia maximizar el rendimiento de la proteína recombinante por proceso de biorreactor. La elección de la composición del medio de cultivo y el diseño y operación del biorreactor son parámetros que influyen en el rendimiento y pueden ser bastante complejos de optimizar. Más predeciblemente, los aumentos de potencia o actividad transcripcional del promotor que controla la expresión de la proteína producto potencian el rendimiento. Los aumentos incrementales al nivel de célula individual se traducirán en mejoras considerables de rendimiento de producto en cultivo discontinuo o semicontinuo de alta densidad que muestra una expresión génica en fase estacionaria a densidades celulares en el intervalo de 10^6 a 10^7 células/ml.

20 El problema técnico subyacente a la presente invención es proporcionar los medios para potenciar la eficacia de la transfección de células CHO por vectores de expresión de mamífero.

25 Según la presente invención, se resuelve este problema técnico mediante el uso del promotor de mCMV para potenciar la tasa de transfección en células CHO, preferiblemente cuando se usa un vector de expresión que comprende al menos una primera unidad de transcripción para un gen producto, dando lugar dicha primera unidad a proteína producto tras expresión en una célula hospedadora y estando adicionalmente dicha primera unidad de transcripción bajo el control del promotor de citomegalovirus de ratón (promotor de mCMV), y que comprende adicionalmente una segunda unidad de transcripción que comprende un gen marcador de glutamina sintetasa (GS). También puede ser posible transfectar la primera y segunda unidades de expresión portadas en diferentes vectores, o en forma de fragmentos génicos aislados que albergan unidades de expresión individuales. Adicionalmente, puede ser posible transfectar una célula CHO que es ya recombinante y expresa GS con una primera unidad de transcripción que alberga mCMV. Según la presente invención, "potenciar la tasa de transfección" se define comparando la tasa de transfección en presencia del promotor de mCMV y el vector de expresión según la presente invención con la tasa de transfección del mismo vector de expresión y célula hospedadora en condiciones de transfección y cultivo celular idénticas, excepto porque en el vector de expresión se sustituye el promotor de mCMV por la construcción potenciador/promotor de hCMV-primer intrón como se define en el documento US 5.658.759. Esta construcción hCMV-intrón MIE-promotor, para un gen producto idéntico dado, sirve como patrón para determinar el efecto reivindicado de tasas de transfección potenciadas. Preferiblemente, el uso de promotor de mCMV da como resultado una tasa de transfección potenciada al menos 10 veces.

45 El citomegalovirus de murino (mCMV) es un miembro del grupo altamente diverso de los herpesvirus. Incluso entre los citomegalovirus de diferentes especies hospedadoras, puede haber una amplia variación. Por ejemplo, el mCMV difiere considerablemente del citomegalovirus humano (hCMV) con respecto a las propiedades biológicas, organización génica temprana inmediata (IE) y secuencia nucleotídica global. El genoma de 235 kpb de mCMV carece también de las características de repetición interna y terminal grandes del hCMV. En consecuencia, no existen formas isoméricas del genoma de mCMV (Ebeling, A. *et al.* (1983), *J. Virol.* 47, 421-433; Mercer, J.A. *et al.* (1983), *Virology* 129, 94-106). Según la presente invención, es posible emplear la región promotora esencialmente correspondiente a un fragmento PstI grande de aprox. 2,1 kb descrito en el documento US 4.968.615 o cualquier fragmento funcional del mismo. En una realización más preferida, el fragmento del promotor de mCMV empleado comprende el sitio de inicio de la transcripción (+0) y se extiende cadena arriba hasta aproximadamente la posición -500. Se ha encontrado que dicho fragmento promueve una expresión más fuerte que un módulo promotor que se extiende 800 pb cadena arriba más allá de la posición -500. En la realización más preferida, se emplea una región promotora núcleo que se extiende desde el sitio de inicio de la transcripción cadena arriba sólo hasta el sitio de restricción XhoI aproximadamente en la posición -150 a partir del sitio de inicio de la transcripción natural, o incluso se extiende sólo hasta la posición -100 cadena arriba desde el sitio de inicio de la transcripción natural. No hace falta decir que el sitio de inicio de la transcripción podría modificarse por ingeniería genética para comprender un sitio de restricción adecuado para la inserción del gen producto recombinante.

60 Según la presente invención, es también posible que la primera unidad de transcripción que está bajo el control del promotor de mCMV albergue al menos una secuencia de intrón. Dicha medida es bien conocida en la técnica para estabilizar transcritos de ARN y para promover una síntesis de proteína eficaz a partir del ARNm correspondiente. Para una síntesis de proteína eficaz sin tener en cuenta el efecto reivindicado sobre la tasa de transfección, no es sin embargo aconsejable incluir el primer intrón natural de mCMV en la construcción de promotor de mCMV. En contraposición con la situación con el promotor de hCMV (véase el documento US 5.591.639), se encontró que dicho primer intrón natural de mCMV reducía la expresión de un gen recombinante del promotor de mCMV, y por lo tanto se excluye en una realización preferida adicional.

ES 2 314 248 T3

Según una realización preferida, el vector comprende una porción del locus génico de IgG 2A de múrido, potenciando dicha porción la actividad del promotor de mCMV.

La secuencia de ADN del locus génico de inmunoglobulina gamma 2A de múrido (IgG 2A) se ha ideado originalmente en el documento WO 95/17516 para uso como secuencia de modificación dirigida genómica para generar estirpes de células B linfoides recombinantes estables que muestran una alta expresión del producto génico recombinante. Los linfocitos B o células plasmáticas expresan normalmente niveles extremadamente altos de ARN de inmunoglobulina del locus de cadena pesada de Ig, probablemente debido a la actividad de potenciador/factor de transcripción específica del tipo celular y a la estructura de cromatina abierta. La secuencia del gen de inmunoglobulina gamma 2A de múrido preferida de la presente invención es la misma que la secuencia de modificación dirigida usada en el documento WO 95/17516. Es un fragmento genómico BamHI de 5,1 kb que incluye toda la región de codificación de Ig gamma 2A de múrido excepto la parte más 5' del exón CH1 (Yamawaki-Kataoka, Y. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1982) 79: 2623-2627; Hall, B. *et al.*, "Molecular Immunology" (1989) 26: 819-826; Yamawaki-Kataoka, Y. *et al.*, *Nucleic Acids Research* (1981) 9: 1365-1381). Según la presente invención, la promoción de la recombinación homóloga dirigida a sitio no es la propiedad relevante de la secuencia del gen de inmunoglobulina gamma 2A (IgG 2A). En consecuencia, cualquier variante de secuencia de dicha secuencia del gen de IgG 2A o fragmento de secuencia o fragmento de secuencia variante que sea funcional o capaz de potenciar la expresión del gen producto recombinante a partir del promotor, preferiblemente a partir de un promotor de hCMV como se expone a continuación, tanto en condiciones de expresión transitoria como estable en células CHO, está también comprendida en la presente invención.

Dichas variantes "funcionales" comprenden, por ejemplo, inserciones o deleciones de bases o mutaciones puntuales y se generan mediante métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante PCR dirigida por cebador, PCR "propensa a errores", "transposición genética" denominada reensamblaje por PCR de fragmentos de ADN superpuestos o mutagénesis aleatoria *in vivo* de clones bacterianos seguido de transfección de colección y selección funcional en células CHO. Por ejemplo, la mutagénesis aleatoria puede conseguirse mediante productos químicos alquilantes o irradiaciones con UV como se describe en Miller, J. "Experiments in Molecular Genetics", Cold Spring Harbor Laboratory, 1972). Opcionalmente, puede usarse una cepa mutante natural de una bacteria hospedadora.

Preferiblemente, dicha secuencia variante o fragmento de secuencia es al menos un 65%, más preferiblemente un 75%, lo más preferiblemente un 90% homóloga en la secuencia de ADN con la parte correspondiente del locus del gen de inmunoglobulina gamma 2A de múrido natural. Por ejemplo, es posible insertar un sitio de restricción Sall en el sitio StuI de origen natural presente 39 pb cadena arriba del exón de membrana 2 (M2), proporcionando un único sitio para linealización dentro de la secuencia de inmunoglobulina gamma 2A de múrido; dicha variante de secuencia se ideó originalmente para modificación dirigida por recombinación específica de sitio, pero puede emplearse también en el contexto de la presente invención.

Un "promotor" se define como una secuencia de ADN que dirige a la ARN polimerasa a unirse a ADN e inicia la síntesis de ARN. Según la presente invención, es un promotor que es activo en células CHO. Dicho promotor es preferiblemente un promotor fuerte.

Un gen producto recombinante según la presente invención es la proteína producto que se busca expresar y recoger en altas cantidades. Puede ser cualquier proteína de interés, por ejemplo, proteínas terapéuticas tales como interleucinas o enzimas o subunidades de proteínas multiméricas tales como anticuerpos o fragmentos de los mismos. El gen producto recombinante puede incluir una secuencia señal que codifica una porción de secuencia que permite la secreción del polipéptido una vez expresado por la célula productora hospedadora. En una realización preferida adicional de la presente invención, la proteína producto es una proteína secretada. Más preferiblemente, la primera proteína o proteína producto es un anticuerpo o anticuerpo modificado por ingeniería genética o un fragmento del mismo, lo más preferiblemente es un anticuerpo de inmunoglobulina G (IgG).

En una realización preferida de la invención, la transfección es una transfección transitoria.

Una transfección transitoria se caracteriza por la no aplicación de ninguna presión de selección para un marcador de selección portado por vector. Un conjunto o lote de células originado por una transfección transitoria es una población de células agrupadas que comprende células que han incorporado y expresan y células que no han incorporado el ADN extraño. Las células que expresan el módulo de expresión extraño habitualmente no han integrado el ADN transfectado en su genoma todavía, y tienden a perder el ADN extraño y a sobrecrecer las células transfectadas en la población tras cultivo del conjunto de células transfectadas transitoriamente. Por lo tanto, la expresión es más fuerte en el periodo inmediatamente después de la transfección y se reduce con el tiempo. Preferiblemente, un transfectante transitorio según la presente invención se entiende como una célula que se mantiene en cultivo celular en ausencia de presión de selección hasta un tiempo de 90 horas después de la transfección.

En otra realización preferida de la invención, la transfección es una transfección estable. Transfección estable significa que el ADN extraño recién introducido se incorpora al ADN genómico, habitualmente mediante eventos de recombinación no homóloga aleatorios; en el caso de una secuencia de vector, la transfección estable según la presente invención puede dar como resultado la pérdida de partes de la secuencia del vector no directamente relacionadas con la expresión del gen producto recombinante tales como, por ejemplo, regiones de control del número de copias bacterianas convertidas en superfluas tras la integración genómica. Una célula hospedadora transfectada ha integrado

al menos una parte o partes diferentes del vector de expresión en el genoma. Igualmente, está incluida en la definición de dichas células hospedadoras transfectadas la transfección de células CHO con dos o varios fragmentos de ADN que dan lugar al menos a equivalentes funcionales *in vivo* de los elementos esenciales del vector de expresión de la invención, a saber el gen producto bajo el control del promotor de mCMV y la secuencia de IgG 2A de punto caliente. Se describe el ensamblaje *in vivo* de secuencias de ADN funcionales después de la transfección de ADN fragmentado, por ejemplo, en el documento WO 99/53046. Es posible que dicha integración estable dé lugar, tras exposición a presión de selección adicional para amplificación génica, a cromosomas diminutos dobles en células CHO. Esto está comprendido en el presente significado de “estable”. Tras la integración genómica aleatoria del vector de expresión en CHO, la presencia de la secuencia de modificación dirigida potencia la actividad promotora para la expresión de la proteína producto recombinante. Dicho efecto no se ha observado ni podría haberse previsto tras la modificación génica dirigida homóloga en estirpes de células B de murido maduras, incluyendo estirpes celulares de plasmacitoma/mieloma; allí, la secuencia de modificación dirigida de IgG 2A servía solamente para aumentar la frecuencia de integrantes homólogos de alto rendimiento, puesto que el locus de IgG 2A probó ser un “sitio caliente” abierto altamente activo en las estirpes de células B de modificación dirigida adecuada.

Se definen “vectores de expresión” en la presente memoria como secuencias de ADN que son necesarias para la transcripción y la traducción de sus ARNm en una estirpe celular hospedadora de mamífero apropiada después de transfección con vector. Un vector de expresión construido apropiadamente debería contener habitualmente: al menos un marcador expresable seleccionable en células animales y un número limitado de sitios de restricción útiles para la inserción del módulo de expresión del gen producto recombinante bajo el control de una región promotora cadena arriba. Cuando se usa en particular sólo para expresión transitoria/episódica, puede comprender adicionalmente un origen de replicación tal como el origen del virus de Epstein Barr (EBV) o el virus SV40 para replicación autónoma/mantenimiento episómico en células hospedadoras eucarióticas, pero puede estar desprovisto de un marcador seleccionable. Son vectores de expresión, por ejemplo pero sin limitación, fragmentos de ADN lineal, fragmentos de ADN que comprenden secuencias de modificación dirigida nuclear o están especialmente optimizados para interacción con reactivos de transfección, virus animales o plásmidos adecuados que pueden insertarse en lanzadera y producirse en bacterias.

Según la presente invención, el vector de expresión de mamífero comprende un marcador de selección de GS expresable (Bebbington *et al.*, 1992, “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; Cockett *et al.*, 1990, “High level expression of tissue inhibitor of metalloproteinases in Chinese Hamster Ovary (CHO) cells using Glutamine synthetase gene amplification”, *Bio/Technology* 8: 662-667). El sistema de GS es uno de los dos únicos sistemas que son de importancia particular para la producción de proteínas terapéuticas. En comparación con el sistema de dihidrofolato reductasa (DHFR), el sistema de GS ofrece una gran ventaja de tiempo durante el desarrollo debido a que a menudo pueden crearse estirpes celulares altamente productivas a partir del transfectante inicial, evitando así la necesidad de múltiples rondas de selección en presencia de concentraciones crecientes de agente selectivo para conseguir la amplificación génica (Brown *et al.*, 1992, “Process development for the production of recombinant antibodies using the glutamine synthetase (GS) system”, *Cytotechnology* 9:231-236). No hace falta decir que, equivalentemente a una segunda unidad de transcripción para la expresión del gen marcador, una unidad de expresión podría usar un módulo de expresión monocistrónico tanto para el gen producto como para el gen marcador empleando, por ejemplo, sitios de entrada a ribosoma internos como se emplean rutinariamente en la técnica. A la inversa, no hace falta decir que la secuencia de IgG 2A de sitio caliente de la presente invención y el módulo de expresión de la proteína producto que comprende un módulo promotor y/o marcador no necesitan funcionar en cis en un solo vector de expresión; los elementos pueden portarse bien en vectores cotransfectados separados o fragmentos de ADN que pueden integrarse cromosómicamente entonces en un solo sitio de integración concatémico.

Las estirpes celulares de ovario de hámster chino (CHO) adecuadas pueden ser, por ejemplo, CHO K1 (ATCC CCL-61), CHO pro3-, CHO DG44, CHO P12 o la estirpe celular CHO dhfr- DUK-BII (Chassin *et al.*, *PNAS* 77, 1980, 4216-4220).

Ha de observarse que una célula hospedadora transfectada con la secuencia de ADN o vector de la presente invención ha de considerarse que es una estirpe celular transfectada transitoria o establemente. Puede emplearse según la presente invención cualquier técnica de transfección, tales como las bien conocidas en la técnica, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano o lipofección, si es apropiado para un tipo de célula hospedadora dado. En los ensayos de expresión transitoria que tienen lugar habitualmente aproximadamente 20-50 horas después de la transfección, se mantienen los vectores transfectados como elementos episómicos y no se integran todavía en el genoma.

Se describen ejemplos de métodos de transfección adecuados para células CHO en Cockett *et al.*, 1990, “High level expression of tissue inhibitor of metalloproteinases in Chinese Hamster Ovary (CHO) cells using Glutamine synthetase gene amplification”, *Bio/Technology* 8: 662-667. Es posible emplear, por ejemplo, precipitación con fosfato de calcio clásica o técnicas de lipofección más modernas. La tasa de transfección se define rutinariamente como el número de células transfectadas positivamente (transfección transitoria) o clones (transfección estable después del periodo de selección) obtenidas a partir de un conjunto de células sometidas a una transfección. El efecto pretendido del presente objeto de la invención puede observarse, por ejemplo, transfectando células CHO-K1 mediante lipofección (cualquier reactivo comercial y protocolo del fabricante) con los plásmidos de SEC ID N° 3 (pEE 12.4 hCMV-GFP + promotor

ES 2 314 248 T3

temprano de SV40/ADNc de GS) o SEC ID N° 4 (pEE 12.4 mCMV-GFP + promotor temprano de SV40/ADNc de GS). Las células transfectadas pueden cultivarse en cualquier medio de cultivo convencional. El medio de cultivo puede ser un medio suplementado con suero fetal o exento de suero como se ha definido anteriormente. Preferiblemente, el medio de cultivo celular es un medio suplementado con suero, más preferiblemente un medio de cultivo celular que se ha suplementado con al menos un 1% (v/v) de suero fetal, lo más preferiblemente con al menos un 5% (v/v) de suero fetal tal como suero fetal de ternero o suero fetal bovino. En otra realización preferida, el método de transfección llevado a cabo es electroporación.

Los medios y métodos de cultivo adecuados para estirpes celulares de mamífero son bien conocidos en la técnica, como se describen en el documento US 5633162 por ejemplo. Son ejemplos de medios de cultivo celular estándar para matraz de laboratorio o cultivo celular de baja densidad y que se adaptan a las necesidades de los tipos celulares particulares, por ejemplo: medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Morre, G., *The Journal of the American Medical Association*, 199, p.519 y siguientes, 1967), medio L-15 (Leibovitz, A. *et al.*, *Amer. J. of Hygiene*, 78, 1p.173 y siguientes, 1963), medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), medio esencial mínimo de Eagle (MEM), medio F12 de Ham (Ham, R. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sc.* 53, p288 y siguientes, 1965) o DMEM modificado por Iscoves que carece de albúmina, transferrina y lecitina (Iscoves *et al.*, *J. Exp. Med.* 1, p. 923 y siguientes, 1978). Por ejemplo, los medios F10 o F12 de Ham se diseñaron especialmente para el cultivo de células CHO. Se describen otros medios adaptados especialmente para el cultivo de CHO en el documento EP-481.791. Es conocido que dichos medios de cultivo pueden suplementarse con suero fetal bovino (FBS, también denominado suero fetal de ternero FCS), proporcionando este último una fuente natural de una multitud de hormonas y factores de crecimiento. El cultivo celular de células de mamífero, que es actualmente una operación rutinaria bien descrita en libros de texto y manuales científicos, está cubierto con detalle, por ejemplo, en R. Ian Fresney, "Culture of Animal cells, a manual", 4ª edición, Wiley-Liss/N.Y., 2000.

Preferiblemente, el medio de cultivo celular según la presente invención está desprovisto de suero fetal de ternero (FCS o FBS), denominándose entonces "exento de suero". Las células en medio exento de suero requieren generalmente insulina y transferrina en medio exento de suero para un crecimiento óptimo. La transferrina puede sustituirse al menos parcialmente por agentes quelantes no peptídicos o sideróforos tales como tropolona como se describe en el documento WO 94/02592 o niveles aumentados de una fuente de hierro inorgánico, favorablemente en combinación con antioxidantes tales como vitamina C. La mayoría de las estirpes celulares requieren uno o más factores de crecimiento sintéticos (que comprenden polipéptidos recombinantes) incluyendo, por ejemplo, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factores de crecimiento similares a insulina I y II (IGFI, IGFII), etc. Otras clases de factores que pueden ser necesarios incluyen: prostaglandinas, proteínas de transporte y unión (por ejemplo, ceruloplasmina, lipoproteínas de alta y baja densidad, seroalbúmina bovina (BSA)), hormonas, incluyendo hormonas esteroideas, y ácidos grasos. El ensayo de factor polipeptídico se realiza mejor en un ensayo por etapas de factores polipeptídicos nuevos en presencia de aquellos que se han encontrado estimulantes del crecimiento. Esos factores de crecimiento son sintéticos o recombinantes. Existen varios enfoques metodológicos bien conocidos del cultivo celular animal, describiéndose un ejemplo a continuación. La etapa inicial es obtener las condiciones en las que las células sobrevivirán y/o crecerán lentamente durante 3-6 días después de transferencia desde medio de cultivo suplementado con suero. En la mayoría de los tipos celulares, esto es al menos en parte una función de la densidad del inóculo. Una vez se encuentra el suplemento de hormona/factor de crecimiento/polipéptido óptimo, se reducirá la densidad del inóculo necesaria para la supervivencia. En una realización más preferida, el medio de cultivo celular está exento de proteína, es decir, exento tanto de suero fetal y suplementos de factor de crecimiento proteicos individuales como de otras proteínas tales como transferrina recombinante.

Después de la expresión y recogida de la proteína producto recombinante, puede aplicarse un procesamiento cadena abajo convencional. Opcionalmente, puede emplearse un medio de cultivo de crecimiento de alta densidad. Dichos medios de cultivo de crecimiento de alta densidad pueden suplementarse habitualmente con nutrientes tales como todos los aminoácidos, fuentes de energía tales como glucosa en el intervalo dado anteriormente, sales inorgánicas, vitaminas, oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos presentes habitualmente a concentraciones finales en el intervalo micromolar), tampones, los cuatro nucleósidos o sus correspondientes nucleótidos, antioxidantes tales como glutatión (reducido), vitamina C y otros componentes tales como lípidos de membrana importantes, por ejemplo, colesterol o fosfatidilcolina o precursores lipídicos, por ejemplo, colina o inositol. Se enriquecerá un medio de alta densidad con la mayoría o todos estos compuestos y, excepto por los basados en sales inorgánicas, en los que se basa la regulación de la osmolaridad del medio esencialmente isotónico, los comprenderá en mayores cantidades (fortificados) que los medios estándar anteriormente mencionados como pueden realizarse a partir del documento GB 2.251.249 en comparación con RPMI 1640. Preferiblemente, un medio de cultivo de alta densidad está fortificado equilibradamente cuando todos los aminoácidos, excepto el triptófano, están a más de 75 mg/l de medio de cultivo. Preferiblemente, junto con el requisito genérico de aminoácidos, la glutamina y/o asparagina están a más de 1 g/l, más preferiblemente a más de 2 g/l del medio de cultivo de alta densidad. En el contexto de la presente invención, se define cultivo celular de alta densidad como una población de células animales que tienen temporalmente una densidad de células viables de al menos, o de más de, 10^5 células/ml, preferiblemente de al menos o de más de 10^6 células/ml, y cuya población ha crecido continuamente a partir de una sola célula o inóculo de densidad de células viables menor en un volumen de cultivo celular constante o creciente.

En una realización preferida adicional, se usa un cultivo semicontinuo. Este es un sistema de cultivo en el que al menos la glutamina, opcionalmente con uno o varios de otros aminoácidos, preferiblemente la glicina, se alimenta al cultivo celular como se describe en el documento GB 2.251.249 para mantener su concentración en el medio, aparte

de controlar la concentración de glucosa mediante alimentación separada. Más preferiblemente, la alimentación de glutamina y opcionalmente uno o varios de otros aminoácidos se combina con la alimentación de una o más fuentes de energía tales como glucosa al medio de cultivo celular como se describe en el documento EP-229.809-A. La alimentación se inicia habitualmente 25-60 horas después del inicio del cultivo; por ejemplo, es útil empezar la alimentación cuando las células han alcanzado una densidad de aproximadamente 10^6 células/ml. Es bien conocido en la técnica que, en células animales cultivadas, la “glutaminólisis” (McKeehan *et al.*, 1984, “Glutaminolysis in animal cells”, en: “Carbohydrate Metabolism in Cultured Cells”, ed. M.J. Morgan, Plenum Press, Nueva York, pág. 11-150) puede convertirse en una fuente importante de energía durante la fase de crecimiento. La alimentación total de glutamina y/o asparagina (para la sustitución de glutamina por asparagina véase Kurano, N. *et al.*, 1990, *J. Biotechnology* 15, 113-128) está habitualmente en el intervalo de 0,5 a 10 g por l, preferiblemente de 1 a 2 g por l de volumen de cultivo; otros aminoácidos que pueden estar presentes en la alimentación están de 10 a 300 mg de alimentación total por litro de cultivo. En particular, glicina, lisina, arginina, valina, isoleucina y leucina se alimentan habitualmente a mayores cantidades de al menos 150 a 200 mg en comparación con los demás aminoácidos. La alimentación puede añadirse como una adición puntual o en forma de una alimentación bombeada continuamente, preferiblemente la alimentación se bombea casi continuamente al biorreactor. No hace falta decir que el pH se controla cuidadosamente durante el cultivo semicontinuo en un biorreactor a un pH aproximadamente fisiológico óptimo para una estirpe celular dada mediante la adición de base o tampón. Cuando se usa glucosa como fuente de energía, la alimentación de glucosa total es habitualmente de 1 a 10, preferiblemente de 3 a 6 gramos por litro de cultivo. Aparte de la inclusión de aminoácidos, la alimentación comprende preferiblemente una baja cantidad de colina en el intervalo de 5 a 20 mg por litro de cultivo. Más preferiblemente, dicha alimentación de colina se combina con un suplemento de etanolamina esencialmente como se describe en el documento US 6.048.728, en particular en combinación con alimentación de glutamina. No hace falta decir que, tras el uso del sistema marcador de GS, se requerirán menores cantidades de glutamina en comparación con un sistema de expresión no de GS, puesto que la acumulación de glutamina excesiva además de la producida endógenamente daría lugar a la producción de amoniaco y a la toxicidad concomitante. Para la GS, la glutamina en el medio o alimentación se sustituye en su mayor parte por sus equivalentes y/o precursores, es decir asparagina y/o glutamato.

Experimentos

Experimento 1

Expresión transitoria y estable de vector GFP que comprende la secuencia de sitio caliente en células CHO-K1

Se adaptaron células CHO-K1 (ATCC CCL-61) y se cultivaron en medio de cultivo celular normal GMEM-S (Gibco, R.U.) con 10% de FCS. Para selección por GS, el medio debe estar completamente exento de glutamina como se expone en la tabla 1 siguiente; esto requiere el uso de FCS dializado. Se llevó a cabo todo el cultivo en matraz agitado a 36,5°C con agitación orbital a 125 rpm. Se usó lipofectina (Superfectin™, Gibco, R.U.) para la transfección y se midió la fluorescencia verde del conjunto transfectante en FACS con excitación a 488 nm. Para cada construcción de vector GS/GFP, se llevó a cabo la transfección independientemente cinco veces, siendo todos los datos la media de cinco conjuntos analizados independientemente. Partiendo de transfectantes transitorios 48 horas después de la transfección, se seleccionó el 10% de células de mayor expresión del conjunto celular viable en el diagrama de recuento celular frente a fluorescencia para determinar la fluorescencia media (Fig. 1). La población de células viables se ha preseleccionado mediante clasificación en el diagrama de dispersión frontal frente a lateral.

Para generar transfectantes estables, se seleccionó el marcador de GS 24 horas después de la transfección suplementando el medio exento de glutamina con MSX 25 μ M (metionina sulfoximina, Crockett *et al.*, *ibid.*) y continuando el cultivo celular con divisiones regulares de los cultivos durante 26 días. Obsérvese el impacto de los niveles medios de otros aminoácidos sobre la potencia de MSX para selección, véase Bebbington *et al.*, documento US 5.827.739. Se realizó entonces un análisis de fluorescencia de nuevo como se exhibe anteriormente (Fig. 2).

Sirvieron como control negativo células no transfectadas. Se da en la SEC ID N° 1 el vector de punto caliente (pEE 15.1 “hCMV + punto caliente”) que impulsa la expresión de GFP bajo el control del promotor de hCMV que comprende el primer intrón completo de CMV, y es esencialmente el vector pEE 15.1 mostrado en la Fig. 3 en el que se insertó la secuencia de GFP en el sitio de restricción EcoRI en el poliengarce. El pEE 12.4 “hCMV” correspondiente a la SEC ID N° 3 es idéntico al pEE 15.1 “hCMV + punto caliente”, excepto porque no comprende el fragmento BamHI de 5,1 kb que alberga la secuencia de IgG 2A. El pEE 12.4 sirvió como control de vector. Se generó un control de vector adicional pEE 12.4 “hCMV(Kozak-)” mutando la secuencia Kozak del sitio de clonación coincidente con el sitio de inicio de la traducción (GCCGCCACCATGG) a una secuencia Kozak funcional de fase desplazada (ACCATGGTCCATGG) mediante mutagénesis dirigida por cebador (Sambrook *et al.*, “Molecular cloning”, Cold Spring Harbor 1983), atenuando la Kozak y el sitio de inicio de la traducción originales. Se modificó adicionalmente por ingeniería genética el vector de SEC ID N° 1 para eliminar la región moduladora de 400 pb de la porción potenciadora de hCMV, eliminando los elementos potenciadores cadena arriba de -750 desde el sitio de inicio de la transcripción, dando lugar a pEE 15.1 “hCMV(mod-)/ADNc de GS”. Mediante el intercambio del módulo de ADNc de GS de pEE 15.1 (véase la Fig. 3) por el minigén de GS de pEE 14.4 “hCMV(mod-)/GFP”, correspondiente a la SEC ID N° 2, se creó el vector pEE 15.1 “hCMV(mod-)/minigén de GS”. Por tanto, todas las células transfectadas albergaban un vector plasmídico que comprendía la secuencia de codificación de GFP. El minigén de GS tiene un único primer intrón del gen GS y aproximadamente 1 kb de ADN 3'-flanqueante bajo el control del promotor tardío de SV40; la parte 3' del ADN de GS genómico se cree que causa un mayor número de copias de ADN de vector y por tanto de GS en las células

transfectadas (véase el documento US 4.770.359, Bebbington *et al.*). Aunque todos los vectores de hCMV empleados en el presente estudio expresan el gen marcador de GS a partir de su secuencia de ADNc, el uso del minigén de GS se incluyó como un control adicional para excluir efectos potenciales del número de copias y del nivel de expresión de GS.

5

Para el análisis de la generación y la expresión de células CHO transfectadas establemente, se realizaron transfecciones con el vector de punto caliente linealizado vector pEE 15.1 “hCMV+ punto caliente”. Se cortó el plásmido linealizado con Sall en la porción de secuencia que comprende IgG 2A, estimulando potencialmente los extremos de ADN libres la recombinación con regiones genómicas que comparten un cierto grado de homología con las porciones de ADN flanqueantes, ensayando los efectos de modificación dirigida potenciales de IgG 2A de murido en células CHO de hámster. La PvuI corta en el gen marcador de lactamasa bacteriano, y por lo tanto podría promover sólo una recombinación aleatoria heteróloga. Es más, la fluorescencia media era mayor en los transfectantes linealizados con PvuI, mostrando tanto cierta influencia de la linealización de vector como que la modificación dirigida de loci de inmunoglobulina en células CHO no puede dar cuenta del efecto de la presente invención. Además, el efecto de actividad promotora potenciada se observaba consistentemente en poblaciones celulares transfectadas transitoriamente, correlacionándose bien con la potencia relativa de las construcciones de vector individual. Claramente, la integración genómica no está implicada en esta etapa temprana de la transfección.

La Fig. 3 muestra el vector pEE 15.1 de aproximadamente 12.830 pb. Puede encontrarse una descripción detallada del marcador de GS y del módulo de expresión hCMV-p/intrón en los documentos US 5.827.739 y US 5.591.639. El pEE 15.1 es una posible realización de un vector de expresión según la presente invención, excepto porque la secuencia de ADN que codifica la proteína producto recombinante no se ha insertado todavía en el sitio de poliengarce. Se da en la SEC ID N° 1 la secuencia completa de 13.535 pb de la construcción pEE15.1 que alberga GFP. En ella, se insertó la secuencia de codificación de GFP en fase en el sitio de restricción EcoRI centrado en la posición de base 12.814; se describe con detalle la introducción del sitio de restricción único que alberga el codón de inicio ATG y la optimización del entorno de la secuencia Kozak del codón de inicio en el documento US 5.591.639. Por tanto, la expresión de la proteína GFP está bajo el control del promotor del gen temprano inmediato principal de hCMV (hCMV-MIE o hCMV para acortar) seguido inmediatamente por el primer intrón del gen hCMV-MIE, seguido por el sitio Nco I (véase el documento US 5.591.639). Se asegura la poliadenilación por el sitio poliA de SV40 más cadena abajo del sitio de inserción del poliengarce. El pEE 15.1 alberga adicionalmente una secuencia de ADNc que codifica la glutamina sintetasa (GS) de hámster, que está bajo el control del promotor temprano de SV 40 y es seguido por una secuencia de intrón de SV40 + poliA. El locus del gen de IgG 2A o secuencia de “punto caliente” (los cuadros sombreados CH1, Hi, CH2, CH3, M1, M2 representan la región constante de cadena pesada, membrana y anclaje a membrana) es el fragmento BamHI de 5,1 kb del locus de IgG 2A de murido ya descrito en el documento WO 9.517.516 y las referencias citadas en el mismo. Se muestran los sitios de restricción únicos Pvu Iy Sall.

Experimento 2

Electroporación de células CHO con la construcción p12.4-GFP de mCMV (SEC ID N° 4)

40

Se cultivaron células CHO-K1 adheridas (ATCC CCL-61) en medio DMEM de Iscoves esencialmente como se describe en el documento EP-481.791 que comprende glutamina 2 mM, que se suplementó adicionalmente con 10% de FCS. Opcionalmente, pudieron usarse el medio G-MEM indicado en la tabla 1 y que comprende adicionalmente glutamina 2 mM antes de la selección con el marcador de GS como en el experimento 1. Se desprendieron las células, se sedimentaron y se resuspendieron dos veces en medio exento de suero, a una densidad final de $5,3 \times 10^6$ células/ml. Se electroporaron por $750 \mu\text{l}$ de lote de electroporación un total de 4×10^6 células. Se llevó a cabo la electroporación como se describe en “Methods in Molecular Biology”, ed. J.A. Nickoloff ed., Humana Press 1995, Vol. 48/Cap. 8: “Animal cell electroporation and electrofusion protocols”. Se linealizó el ADN del vector p12.4 mCMV-GFP (secuencia ID N° 4). Se añadieron $50 \mu\text{l}$ ($20 \mu\text{g}$) de ADN a $750 \mu\text{l}$ de células en cubeta de electroporación y se electroporaron a $300 \text{ V}/750 \mu\text{F}$, esperando un tiempo de electroporación de aproximadamente 12-14 ms. Después de la electroporación, se transfirieron $800 \mu\text{l}$ de volumen de células a 25 ml de medio de cultivo Glasgow-MEM modificado (GMEM, Gibco) para selección por GS (que comprende 10% de suero fetal pero no glutamina, para los detalles véase la tabla 1) en un matraz T75. Se dividen en 2 matraces T75 transfiriendo 12,9 ml a un segundo matraz e incubando durante una noche a 37°C en 10% de CO_2 .

55

El día siguiente, se añadieron 37,5 ml de medio de cultivo GMEM de selección por GS suplementado con 10% de FBS + MSX $33,3 \mu\text{M}$ (metionina sulfoximina). Por tanto, la MSX era finalmente de $\sim 25 \mu\text{M}$. Se contaron los transfectantes después de incubación adicional durante 26 días mediante recuento de colonias por matraz. Tras inspección microscópica en un microscopio invertido estándar para inspección de los matraces de cultivo, se iluminaron brillantemente con luz verde las colonias positivas y pudieron contarse fácilmente.

60

La construcción de mCMV de SEC ID N° 4 proporcionaba hasta 20 veces más focos que las células que se transfectaron en paralelo con la construcción de hCMV de SEC ID N° 3. Las construcciones de vector diferían sólo en los elementos promotores de CMV que impulsan la expresión de GFP, siendo idénticas las partes de vector restantes de los vectores (incluyendo el marcador de GS; ADNc de módulo marcador de GS de p12.4). Si se diluían las células en placas de 96 pocillos inmediatamente después de la transfección, surgían muchas más colonias de células transfectadas con mCMV (>400 colonias) que de células transfectadas con hCMV (aproximadamente 45 colonias).

65

ES 2 314 248 T3

TABLA I

Medio para selección por GS

- 5 A. Disoluciones madre
-
- 10 1. Agua doblemente destilada sometida a autoclave en
alícuotas de 400 ml
- 15 2. 10 x Glasgow-MEM (GMEM) sin glutamina (GIBCO: 042-
2541 en R.U.). Almacenar a 4°C.
- 20 3. Bicarbonato de sodio al 7,5% (GIBCO: 043-05080 en
R.U.; 670-5080 en EE.UU.). Almacenar a 4°C.
- 25 4. 100 x aminoácidos no esenciales (AANE) (GIBCO: 043-
01140 en R.U.; 320-1140 en EE.UU.). Almacenar a
4°C.
- 30 5. 100 x glutamato + asparagina (G + A): añadir 600 mg
de ácido glutámico y 600 mg de asparaginas (Sigma).
Completar hasta 100 ml con agua destilada y
esterilizar pasando a través de un filtro estéril
35 de 2 µm (Nalgene). Almacenar a 4°C.
- 40 6. Piruvato de sodio 100 mM (GIBCO: 043-01360 en R.U.;
320-1360 en EE.UU.)
- 45 7. 50 x nucleósidos:
35 mg de adenosina
35 mg de guanosina
35 mg de citidina
35 mg de uridina
50 12 mg de timidina
(cada una de Sigma). Completar hasta 100 ml con
55 agua, esterilizar por filtración y almacenar a -
20°C en alícuotas de 10 ml.
- 60 8. FCS dializado (GIBCO: 014-06300). Termoinactivar a
56°C durante 30 min y almacenar a -20°C. Es
esencial usar FCS dializado cuando se usa selección
65 por GS.
9. Penicilina-estreptomicina a 5000 unidades/ml (P/S:

ES 2 314 248 T3

GIBCO: 043-05070 en R.U.; 600-5070 en EE.UU.).

10. L.MSX 100 mM (Sigma): preparar una disolución 18
5 mg/ml en PBS. Esterilizar por filtración y
almacenar a -20°C.

10 B. Preparación de medio

Añadir lo siguiente en el orden dado usando técnicas
asépticas para preparar el medio GMEM-S

15	1.	Agua	400 ml
	2.	10 x GMEM	50 ml
20	3.	Bicarbonato de sodio	18,1 ml
	4.	AANE	5 ml
	5.	G + A	5 ml
25	6.	Piruvato de sodio	5 ml
	7.	Nucleósidos	10 ml
30	8.	FCS dializado	50 ml
	9.	Penicilina-estreptomicina	5 ml

35 El GMEM-S contiene aminoácidos no esenciales, alanina, aspartato, glicina, prolina y serina (100 μ M), glutamato y asparaginas (500 μ M) y adenosina, guanosina, citidina y uridina (30 μ M), y timidina (10 μ M).

REIVINDICACIONES

5 1. Uso del promotor de mCMV para potenciar la tasa de transfección de un vector de expresión de mamífero en células CHO.

10 2. Uso según la reivindicación 1, en el que el promotor de mCMV está contenido en el vector de expresión de mamífero que comprende al menos una primera unidad de transcripción del gen producto, estando dicha unidad de transcripción bajo el control del promotor de mCMV, y una segunda unidad de transcripción que comprende un gen marcador de glutamina sintetasa (GS).

15 3. Uso según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque el promotor de mCMV comprende el sitio de inicio de la transcripción natural (+0) y se extiende cadena arriba hasta la posición -500.

20 4. Uso según la reivindicación 3, **caracterizado** porque el promotor de mCMV se extiende hasta el sitio de restricción XhoI natural.

25 5. Uso según la reivindicación 3, **caracterizado** porque el sitio de inicio de la transcripción está modificado por ingeniería genética para comprender un sitio de restricción adecuado para la inserción de un producto génico recombinante.

30 6. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, **caracterizado** porque el promotor de mCMV en la primera unidad de transcripción carece del primer intrón natural del promotor de mCMV.

35 7. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado** porque el vector comprende una porción del locus del gen de IgG 2A de murino, potenciando dicha porción la actividad del promotor de mCMV.

40

45

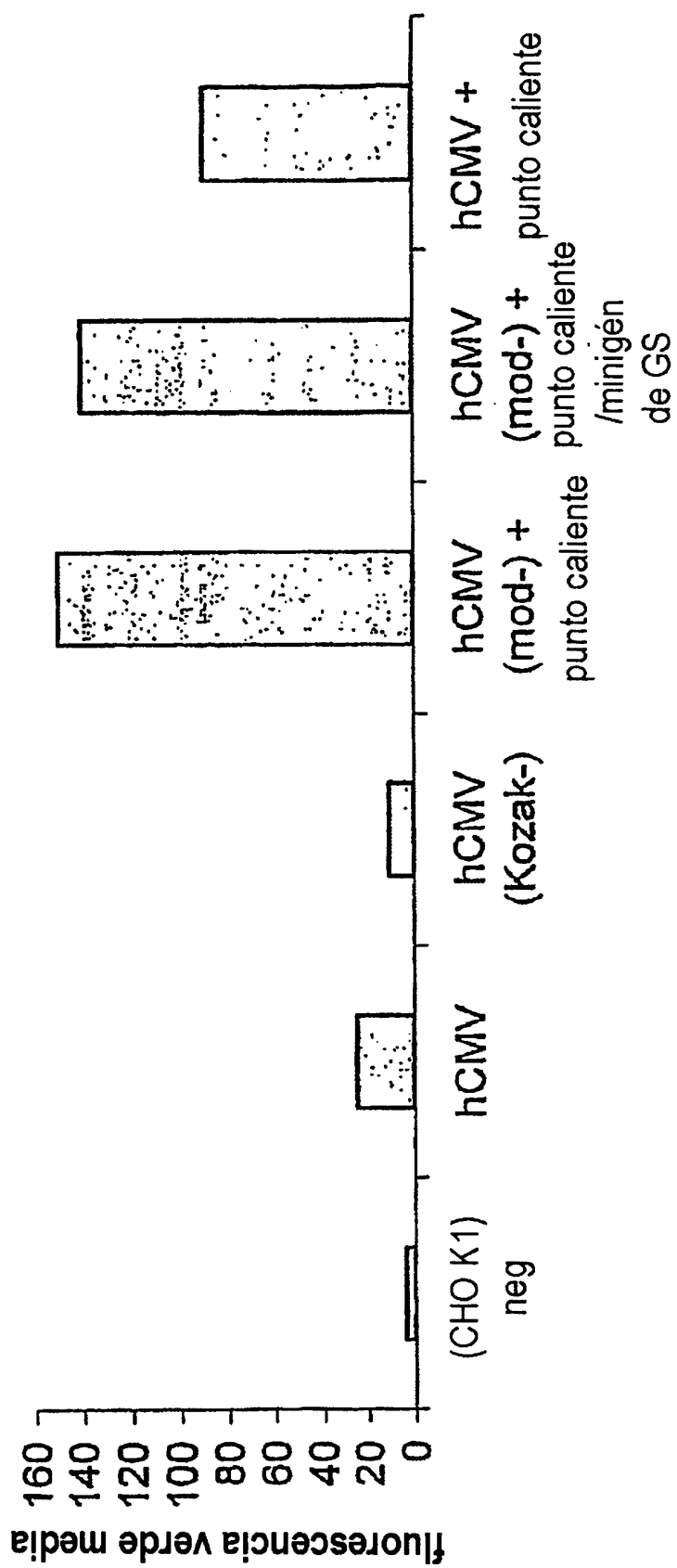
50

55

60

65

Fig. 1 - Transitorios en CHO



construcciones de vector

Fig. 2 - Estables en CHO

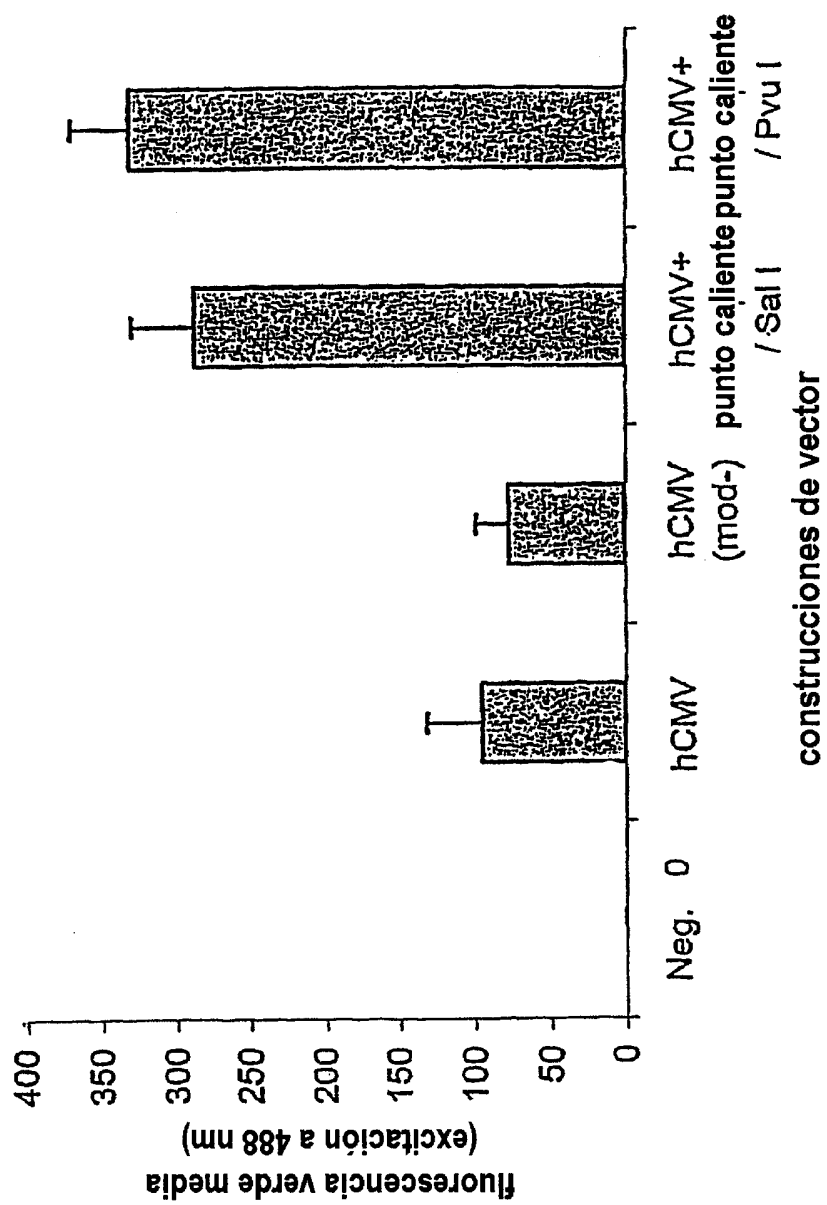
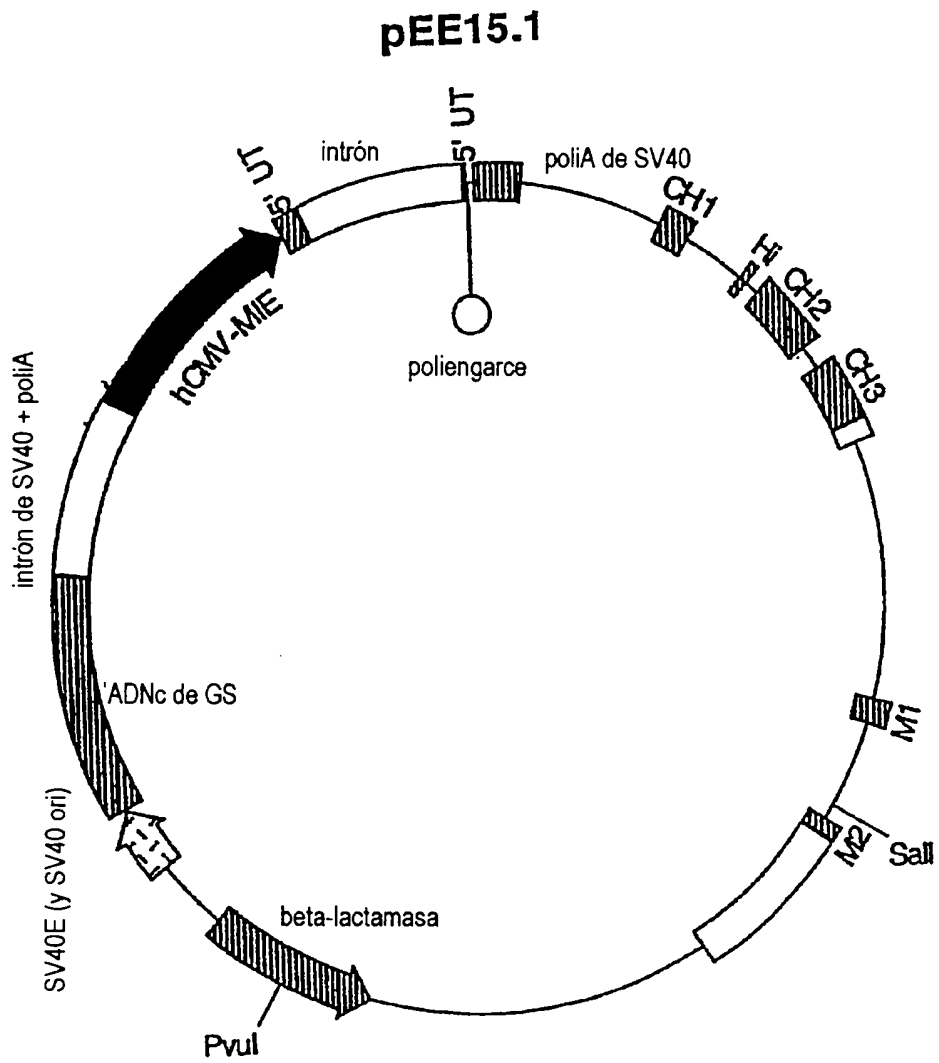


Fig. 3



ES 2 314 248 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Lonza Biologics plc.
<120> Método de expresión de proteína recombinante en células CHO
5 <130> Lip30+31
<140> NA 25/01
<141> 07-2002
10 <160> 4
<170> PatentIn versión 3.1
<210> 1
<211> 6679
15 <212> ADN
<213> *Hamster sp.*
<220>
20 <221> misc_feature
<223> SEC ID N° 4: plásmido circular de GS vector p12.4 corto mCMV-GFP /clon 3

<400> 1

25 **gaattcattg atcataatca gccataccac atttgtagag gttttacttg ctttaaaaaa 60**
 cctcccacac ctccccctga acctgaaaca taaaatgaat gcaattgttg ttgttaactt 120
30 **gtttattgca gcttataatg gttacaaata aagcaatagc atcacaaatt tcacaaataa 180**
 agcatttttt tcaactgcatt ctagtgtggtg tttgtccaaa ctcatcaatg tatcttatca 240
 tgtctggcgg ccgcgacctg caggcgcaga actggtaggt atggaagatc cctcgagatc 300
35 **cattgtgctg gcggtaggcg agcagcgcct gcctgaagct gcgggcattc ccagtcagaa 360**
 atgagcgcca gtcgtcgctg gctctcggca ccgaagtgct atgattctcc gccagcatgg 420
40 **cttcggccag tgcgtcgagc agcggccgct tgttcctgaa gtgccagtaa agcggccgct 480**
 gctgaacccc caaccgttcc gccagtttgc gtgtcgtcag accgtctacg ccgacctcgt 540

45

50

55

60

65

ES 2 314 248 T3

	tcaacaggtc	Cagggcggca	cggatcactg	tattcggctg	caactttgtc	atgcttgaca	600
	ctttatcact	gataaacata	atatgtccac	caacttatca	gtgataaaga	atccgcgcca	660
5	gcacaatgga	tctcgaggtc	gagggatctc	tagaggatcc	atattcgcgg	gcatcaccgg	720
	cgccacaggt	gcggttgctg	gcgctatat	cgccgacatc	accgatgggg	aagatcgggc	780
10	tcgccacttc	gggctcatga	gcgcttgttt	cggcgtgggt	atggtggcag	gccccgtggc	840
	cgggggactg	ttgggcgcca	tctccttgca	tgcaccattc	cttgcggcgg	cggtgctcaa	900
	cggcctcaac	ctactactgg	gctgcttcct	aatgcaggag	tcgcataagg	gagagcgctg	960
15	acctcggggc	gcgttgctgg	cgtttttcca	taggctccgc	ccccctgacg	agcatcacia	1020
	aaatcgacgc	tcaagtcaga	ggtggcgaaa	cccgcagga	ctataaagat	accaggcggt	1080
20	tccccctgga	agetccctcg	tgcgctctcc	tgttccgacc	ctgccgctta	ccggatacct	1140
	gtccgccttt	ctcccttcgg	gaagcggtggc	gctttctcat	agctcacgct	gtaggtatct	1200
	cagttcggtg	taggtcgttc	gctccaagct	gggctgtgtg	cacgaacccc	ccgttcagcc	1260
25	cgaccgctgc	gccttatccg	gtaactatcg	tcttgagtc	aaccggtaa	gacacgactt	1320
	atcgccactg	gcagcagcca	ctggtaacag	gattagcaga	gcgaggtatg	taggcggtgc	1380
30	tacagagttc	ttgaagtgg	ggcctaacta	cggctacact	agaagaacag	tatttggtat	1440
	ctgcgctctg	ctgaagccag	ttaccttcgg	aaaaagagtt	ggtagctctt	gatccggcaa	1500
	acaaaccacc	gctggtagcg	gtggtttttt	tgtttgcaag	cagcagatta	cgcgcagaaa	1560
35	aaaaggatct	caagaagatc	ctttgatctt	ttctacgggg	tctgacgctc	agtggaacga	1620
	aaactcacgt	taagggattt	tggtcatgag	attatcaaaa	aggatcttca	cctagatcct	1680
40	tttaaattaa	aaatgaagtt	ttaaatcaat	ctaaagtata	tatgagtaaa	cttgggtctga	1740
	cagttaccaa	tgcttaatca	gtgaggcacc	tatctcagcg	atctgtctat	ttcgttcatc	1800
	catagttgcc	tgactccccg	tcgtgtagat	aactacgata	cgggagggct	taccatctgg	1860
45	ccccagtgct	gcaatgatac	cgcgagaccc	acgctcaccg	gctccagatt	tatcagcaat	1920
	aaaccagcca	gccggaaggg	ccgagcgcag	aagtggctct	gcaactttat	ccgcctccat	1980
	ccagtctatt	aattgttgcc	gggaagctag	agtaagtagt	tcgccagtta	atagtttgcg	2040
50	caacgttggt	gccattgcta	caggcatcgt	ggtgtcacgc	tcgtcgtttg	gtatggcttc	2100
	attcagctcc	ggttcccaac	gatcaaggcg	agttacatga	tccccatgt	tgtgcaaaaa	2160
55	agcggttagc	tccttcggtc	ctccgatcgt	tgtcagaagt	aagttggccg	cagtgttatc	2220
	actcatgggt	atggcagcac	tgcataattc	tcttactgtc	atgccatccg	taagatgctt	2280
	ttctgtgact	ggtgagtact	caaccaagtc	attctgagaa	tagtgtatgc	ggcgaccgag	2340
60	ttgctcttgc	ccggcgtaaa	tacgggataa	taccgcgcca	catagcagaa	ctttaaagt	2400
	gctcatcatt	ggaaaacggt	cttcggggcg	aaaactctca	aggatcttac	cgctgttgag	2460
65	atccagttcg	atgtaacca	ctcgtgcacc	caactgatct	tcagcatctt	ttactttcac	2520
	cagcgtttct	gggtgagcaa	aaacaggaag	gcaaaatgcc	gcaaaaaagg	gaataagggc	2580

ES 2 314 248 T3

gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt ctttttcaa tattattgaa gcatttatca 2640
 5 gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg 2700
 ggttccgcgc acatttcccc gaaaagtgcc acctgacgtc taagaaacca ttattatcat 2760
 gacattaacc tataaaaaata ggcgtatcac gaggccctga tggctctttg cggcaccat 2820
 10 cgttcgtaat gttccgtggc accgaggaca accctcaaga gaaaatgtaa tcacactggc 2880
 tcaccttcgg gtgggccttt ctgctttat aaggagacac tttatgttta agaaggttgg 2940
 taaattcctt gcggctttgg cagccaagct agatccgct gtggaatgtg tgtcagttag 3000
 15 ggtgtggaat gtccccaggc tccccagcag gcagaagtat gcaaagcatg catctcaatt 3060
 agtcagcaac caggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt atgcaaagca 3120
 20 tgcattctca ttagtcagca accatagtcc cgccccaac tccgcccac ccgccccaa 3180
 ctccgcccag ttccgcccac tctccgcccc atggctgact aatttttttt atttatgcag 3240
 aggccgaggc cgcctcggcc tctgagctat tccagaagta gtgaggaggc ttttttggag 3300
 25 gcctaggctt ttgcaaaaag ctagcttggg gccaccgctc agagcacctt ccaccatggc 3360
 cacctcagca agttcccact tgaacaaaaa catcaagcaa atgtacttgt gcctgccccca 3420
 30 ggggtgagaaa gtccaagcca tgtatatctg ggttgatggt actggagaag gactgcgctg 3480
 caaaacccgc accctggact gtgagcccaa gtgtgtagaa gagttacctg agtggaaatt 3540
 tgatggctct agtacctttc agtctgagg ctccaacagt gacatgtatc tcagcccctgt 3600
 35 tgccatgttt cgggaccctt tccgcagaga tcccaacaag ctgggtgtct gtgaagtitt 3660
 caagtacaac cggaagcctg cagagaccaa ttaaggcac tcgtgtaaac ggataatgga 3720
 catggtgagc aaccagcacc cctggtttgg aatggaacag gagtatactc tgatgggaaac 3780
 40 agatgggcac ctttttgggt ggccttccaa tggctttcct gggccccaaag gtccgtatta 3840
 ctgtgggtgt ggcgcagaca aagcctatgg cagggatatac gtggaggctc actaccgcg 3900
 45 ctgcttgat gctgggttca agattacagg aacaaatgct gaggtcatgc ctgcccagtg 3960
 ggaactccaa ataggacct gtgaaggaat ccgcatggga gatcatctct gggtgccccg 4020
 tttcatcttg catcgagtat gtgaagactt tggggaata gcaaccttg accccaagcc 4080
 50 cattcctggg aactggaatg gtgcaggctg ccataccaac ttagcacca aggccatgag 4140
 ggaggagaat ggtctgaagc acatcgagga ggccatcgag aaactaagca agcggcaccg 4200
 55 gtaccacatt cgagcctacg atccaaggg gggcctggac aatgcccgtg gtctgactgg 4260
 gttccacgaa acgtccaaca tcaacgactt ttctgctggt gtcgccaatc gcagtccag 4320
 catccgcat ccccgactg tcggccagga gaagaaaggt tactttgaag accgcggccc 4380
 60 ctctgccaat tgtgacctt ttgagtgac agaagccatc gtccgcacat gccttctcaa 4440
 tgagactggc gacgagccct tccaatacaa aaactaatta gactttgagt gatcttgagc 4500
 ctttctagt tcatcccacc ccgccccaga gagatctttg tgaaggaacc ttactttctgt 4560
 65 ggtgtgacat aattggacaa actacctaca gagatttaa gctctaaggt aaatataaaa 4620

ES 2 314 248 T3

tttttaagtg tataatgtgt taaactactg attctaattg tttgtgtatt ttagattcca 4680
 acctatggaa ctgatgaatg ggagcagtgg tggaatgcct ttaatgagga aaacctgttt 4740
 5 tgctcagaag aaatgccatc tagtgatgat gaggctactg ctgactctca acattctact 4800
 cctccaaaaa agaagagaaa ggtagaagac cccaaggact ttccttcaga attgctaagt 4860
 10 tttttgagtc atgctgtgtt tagtaataga actcttgctt gctttgctat ttacaccaca 4920
 aaggaaaaag ctgcactgct atacaagaaa attatggaaa aatattctgt aacctttata 4980
 agtaggcata acagttataa tcataacata ctgttttttc ttactccaca caggcataga 5040
 15 gtgtctgcta ttaataacta tgctcaaaaa ttgtgtacct ttagcttttt aatttgtaaa 5100
 ggggttaata aggaatattt gatgtatagt gccttgacta gagatcataa tcagccatac 5160
 cacatttgta gaggttttac ttgctttaaa aaacctcca cacctcccc tgaacctgaa 5220
 20 acataaaatg aatgcaatg ttgttgttaa ctgttttatt gcagcttata atggttacaa 5280
 ataaagcaat agcatcaca atttcacaaa taaagcattt ttttactgc attctagttg 5340
 25 tggtttgtcc aaactcatca atgtatctta tcatgtctgg atctctagct tcgtgtcaag 5400
 gacggtgagg cgcgctact gagtcattag ggactttcca atgggttttg cccagtacat 5460
 aaggtaata ggggtgaatc aacaggaag tccattgga gccaagtaca ctgagtcaat 5520
 30 agggactttc cattgggttt tgcccagtac aaaaggtaaa taggggggta gtcaatgggt 5580
 ttttccatt attggcacgt acataaggtc aataggggtg agtcattggg ttttccagc 5640
 caatttaatt aaaacgcat gtactttccc accattgacg tcaatgggct attgaaacta 5700
 35 atgcaacgtg accttraaac ggtactttcc catagctgat taatgggaaa gtaccgttct 5760
 cgagccaata cacgtcaatg ggaagtgaaa gggcagcaa aacgtaacac cgccccggtt 5820
 40 ttccccgga aattccatat tggcacgat tctattggct gagctgcgtt ctacgtgggt 5880
 ataagaggcg cgaccagct cggtaccgtc gcagtcttcg gtctgaccac cgtagaacgc 5940
 agaagcttgc cgccaccatg gtgagcaagc agatcctgaa gaacaccggc ctgcaggaga 6000
 45 tcatgagctt caaggtgaac ctggagggcg tgggtaaaa ccacgtgttc accatggagg 6060
 gctgcggcaa gggcaacatc ctgttcggca accagctggt gcagatccgc gtgaccaagg 6120
 gcgccccct gcccttcgcc ttgcacatcc tgagccccgc cttccagtac ggcaaccgca 6180
 50 cttcaccaa gtaccccag gacatcagcg acttcttcat ccagagcttc cccgccggct 6240
 tcgtgtacga gcgcaccctg cgctacgagg acggcggcct ggtggagatc cgcagcgaca 6300
 55 tcaacctgat cgaggagatg ttcgtgtacc gcgtggagta caagggccgc aacttcccca 6360
 acgacggccc cgtgatgaag aagaccatca cggcctgca gccagcttc gaggtggtgt 6420
 acatgaacga cggcgtgctg gtgggccagg tgatcctggt gtaccgctg aacagcggca 6480
 60 agttctacag ctgccacatg cgcaccctga tgaagagcaa gggcgtgggt aaggacttcc 6540
 ccgagtacca cttcatccag caccgcctgg agaagacctt cgtggaggac ggcggcttcg 6600
 65 tggagcagca cgagaccgcc atcgcccagc tgaccagcct gggcaagccc ctgggcagcc 6660
 tgcacgagtg ggtgtaata 6679

ES 2 314 248 T3

<210> 2
 <211> 8251
 <212> ADN
 5 <213> *Hamster sp.*
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <223> SEC ID N° 3: plásmido circular de GS vector p12.4 hCMVp-GFP /clon 13
 <400> 2

```

    gaattcattg atcataatca gccataccac atttgtagag gttttacttg ctttaaaaaa    60
  15  cctcccacac ctccccctga acctgaaaca taaaatgaat gcaattgttg ttgttaactt    120
     gtttattgca gcttataatg gttacaaata aagcaatagc atcacaatt tcacaaataa    180
  20  agcatttttt tcaactgcatt ctagtgtggt tttgtccaaa ctcatcaatg tatcttatca    240
     tgtctggcgg ccgcgacctg caggcgcaga actggtaggt atggaagatc cctcgagatc    300
     cattgtgctg gcggtaggcg agcagcgctt gcctgaagct gcgggcattc ccagtcagaa    360
  25  atgagcgcca gtcgtcgtcg gctctcggca ccgaagtgct atgattctcc gccagcatgg    420
     cttcggccag tgcgtcgtcg agcggcccgt tgttcctgaa gtgccagtaa agcggccgct    480
     gctgaacccc caaccgttcc gccagtttgc gtgtcgtcag accgtctacg ccgacctcgt    540
  30  tcaacaggtc cagggcgcca cggatcactg tattcggctg caactttgtc atgcttgaca    600
     ctttatcact gataaacata atatgtccac caacttatca gtgataaaga atccgcgcca    660
  35  gcacaatgga tctcgaggtc gagggatctc tagaggatcc atattcgcgg gcatcaccgg    720
     cgccacaggt gcggttgctg gcgcctatat cgccgacatc accgatgggg aagatcgggc    780
     tcgccacttc gggctcatga gcgcttgttt cggcgtgggt atggtggcag gccccgtggc    840
  40  cgggggactg ttgggcgcca tctccttgca tgcaccattc cttgcggcgg cggtgctcaa    900
     cggcctcaac ctactactgg gctgcttcct aatgcaggag tcgcataagg gagagcgtcg    960
  45  acctcggggc gcgttgctgg cgtttttcca taggctccgc cccctgacg agcatcacia   1020
     aatcgcacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcgtt   1080
     tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta ccggatacct   1140
  50  gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct   1200
     cagttcggtg taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc   1260
  55  cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aaccggtaa gacacgactt   1320
     atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcggtgc   1380
  
```

60

65

ES 2 314 248 T3

tacagagttc ttgaagtggg ggcctaacta cggctacact agaagaacag tatttggtat 1440
 ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa 1500
 5 acaaacacc gctggtagcg gtgggttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa 1560
 aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaacga 1620
 aaactcacgt taagggattt tggatcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct 1680
 10 tttaaattaa aatgaagtt ttaaatcaat ctaaagtata tatgagtaaa cttggctctga 1740
 cagttaccaa tgcttaatca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttcgttcatc 1800
 15 catagttgcc tgactccccg tctgttagat aactacgata cgggagggct taccatctgg 1860
 cccagtgct gcaatgatac cgcgagacc acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat 1920
 aaaccagcca gccggaagg cgcgagcag aagtggctc gcaactttat ccgcctccat 1980
 20 ccagtctatt aattgttgcc gggaaagctag agtaagtagt tccagctta atagtttgcg 2040
 caacgttggt gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc tctcgtttg gtatggcttc 2100
 attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga tccccatgt tgtgcaaaaa 2160
 25 agcggtagc tccttcggtc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg cagtgttadc 2220
 actcatggtt atggcagcac tgcataattc tcttactgtc atgccatccg taagatgctt 2280
 30 ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag 2340
 ttgctcttgc ccggcgtcaa tacgggataa taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt 2400
 gctcatcatt ggaaaacggt cttcggggcg aaaactctca aggatcttac cgctgttgag 2460
 35 atccagttcg atgtaacca ctctgtcacc caactgatct tcagcatctt ttactttcac 2520
 cagcgtttct gggtgagcaa aacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaagg gaataagggc 2580
 40 gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt cttttttcaa tattattgaa gcatttatca 2640
 gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg 2700
 ggttccgcgc acatttcccc gaaaagtgcc acctgacgtc taagaaacca ttattatcat 2760
 45 gacattaacc tataaaaata ggcgtatcac gaggccctga tggctctttg cggcacccat 2820
 cgttcgtaat gttccgtggc accgaggaca acctcaaga gaaaatgtaa tcacactggc 2880
 50 tcaccttcgg gtgggccttt ctgcgtttat aaggagacac tttatgttta agaaggttgg 2940
 taaattcctt gcggctttgg cagccaagct agatccggct gtggaatgtg tgcagttag 3000
 ggtgtggaaa gtcccaggc tcccagcag gcagaagtat gcaaagcatg catctcaatt 3060
 55 agtcagcaac caggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt atgcaaagca 3120
 tgcactctca ttagtcagca accatagtcc cgcccctaac tccgcccate ccgcccctaa 3180
 ctccgcccag ttccgcccac tctccgcccc atggctgact aatttttttt atttatgagc 3240
 60 aggccgaggc cgcctcggcc tctgagctat tccagaagta gtgaggaggc ttttttgag 3300
 gcctaggctt ttgcaaaaag ctagcttggg gccaccgctc agagcacctt ccaccatggc 3360
 65 cacctcagca agttcccact tgaacaaaaa catcaagcaa atgtacttgt gcctgcccc 3420

ES 2 314 248 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

gggtgagaaa gtccaagcca tgtatatctg ggttgatggg actggagaag gactgcgctg 3480
 caaaacccgc accctggact gtgagcccaa gtgtgtagaa gagttacctg agtggaaatt 3540
 tgatggctct agtacctttc agtctgaggg ctccaacagt gacatgtatc tcagccctgr 3600
 tgccatgttt cgggaccctt tccgcagaga tccaacaag ctgggtttct gtgaagtitt 3660
 caagtacaac cggaaGCctg cagagaccaa ttttaaggcac tcgtgtaaac ggataatgga 3720
 catggtgagc aaccagcacc cctggtttg aatggaacag gagtatactc tgatgggaac 3780
 agatgggcac ccttttggtt ggccttccaa tggctttcct gggcccaag gtcctgatta 3840
 ctgtgggtg ggcgcagaca aagcctatgg cagggatatc gtggaggctc actaccgcg 3900
 ctgcttgtat gctggggTca agattacagg acaaatgct gaggtcatgc ctgccagtg 3960
 ggaactccaa ataggaccct gtgaaggaat ccgcatggga gatcatctct gggTggcccg 4020
 tttcatcttg catcgagtat gtgaagactt tggggtaata gcaacctttg accccaagcc 4080
 cattcctggg aactggaatg gtgcaggctg ccataccaac tttagcacca aggccatgcg 4140
 ggaggagaat ggtctgaagc acatcgagga ggccatcgag aaactaagca agcggcaccg 4200
 gtaccacatt cgagcctacg atccaaggg ggcctggac aatgcccgtg gtctgactgg 4260
 gttccacgaa acgtccaaca tcaacgactt ttctgctggT gtcgccaatc gcagtgccag 4320
 catccgcatc ccccggactg tcggccagga gaagaaaggt tactttgaag accgcgcccc 4380
 ctctgccaat tgtgaccctt ttgcagtgc agaagccatc gtccgcacat gccttctcaa 4440
 tgagactggc gacgagccct tccaatacaa aaactaatta gactttgagt gatcttgagc 4500
 ctttcctagt tcatcccacc ccgccccaga gagatctttg tgaaggaacc ttacttctgt 4560
 ggtgtgacat aattggacaa actacctaca gagatttaa 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 ctgtttttt tttactccaca caggcataga 5040
 gtgtctgcta ttaataacta tgctcaaaaa ttgtgtacct ttagcttttt aatttgtaaa 5100
 ggggttaata aggaatattt gatgtatagt gccttgacta gagatcataa tcagccatac 5160
 cacatttgta gaggttttac ttgcttttaa aaacctcca cacctcccc tgaacctgaa 5220
 acataaaatg aatgcaattg ttgttgtaa cttgtttatt gcagcttata atggttacia 5280
 ataaagcaat agcatcacia atttcacia taaagcattt ttttactgc attctagttg 5340
 tggtttgtcc aaactcatca atgtatctta tcatgtctgg atctagcttc gtgtcaagga 5400
 cggtgactgc agtgaataat aaaatgtgtg tttgtccgaa atacgcgttt tgagatttct 5460

ES 2 314 248 T3

5 gtcgccgact aaattcatgt cgcgcgatag tgggtgtttat cgccgataga gatggcgata 5520
 ttggaaaaat cgatatttga aaatatggca tattgaaaat gtcgccgatg tgagtttctg 5580
 10 tgtaactgat atcgccattt ttcdaaaagt gatttttggg catacgcgat atctggcgat 5640
 agcgcttata tcgtttacgg gggatggcga tagacgactt tggtgacttg ggcgattctg 5700
 tgtgtcgcga atatcgcagt ttcgatatag gtgacagacg atatgaggct atatgccga 5760
 tagaggcgac atcaagctgg cacatggcca atgcatatcg atctatacat tgaatcaata 5820
 ttggcatta gccatattat tcattgggta tatagcataa atcaatattg gctattggcc 5880
 15 attgcatacg ttgtatccat atcataatat gtacatttat attggctcat gtccaacatt 5940
 accgccatgt tgacattgat tattgactag ttattaatag taatcaatta cggggtcatt 6000
 agttcatagc ccatatatgg agttccgcgt tacataactt acggtaaagtg gcccgcctgg 6060
 20 ctgaccgcc aacgaccccc gccattgac gtcaataatg acgtatgttc ccatagtaac 6120
 gccaataggg actttccatt gacgtcaatg ggtggagtat ttacggtaaa ctgccactt 6180
 25 ggcagtacat caagtgtatc atatgccaaag tacgccccct attgacgtca atgacggtaa 6240
 atggcccgcc tggcattatg cccagtacat gaccttatgg gactttccta cttggcagta 6300
 catctacgta ttagtcatcg ctattaccat ggtgatgcgg ttttggcagt acatcaatgg 6360
 30 gcgtggatag cggtttgact cacggggatt tccaagtctc cacccttg acgtcaatgg 6420
 gagtttgttt tggcaccaaa atcaacggga ctttccaaa tgtcgtaaca actccgcccc 6480
 35 attgacgcaa atgggcggta ggcgtgtacg gtgggaggtc tatataagca gagctcgttt 6540
 agtgaaccgt cagatcgctt ggagacgcca tccacgctgt tttgacctc atagaagaca 6600
 ccgggaccga tccagcctcc gcggccggga acggtgcatt ggaacgcgga tccccgtgc 6660
 40 caagagtgac gtaagtaccg cctatagagt ctataggccc acccccttg cttcttatgc 6720
 atgctatact gtttttggct tggggtctat acacccccgc ttctcatgt tataggatgat 6780
 ggtatagctt agcctatagg tgtgggttat tgaccattat tgaccactcc cctattgggtg 6840
 45 acgatacttt ccattactaa tccataacat ggctctttgc cacaactctc tttattggct 6900
 atatgccaat aactgtcct tcagagactg acacggactc tgtattttta caggatgggg 6960
 50 tctcatttat tatttacaaa ttcacatata caacaccacc gtccccagtg cccgcagttt 7020
 ttattaaaca taactgtggga tctccacgcg aatctcgggt acgtgttccg gacatgggct 7080
 55 cttctccggt agcggcggag cttctacatc cgagccctgc tcccatgcct ccagcgactc 7140
 atggtcgcctc ggcagctcct tgctcctaac agtggaggcc agacttaggc acagcacgat 7200
 gccaccacc accagtgtgc cgcacaaggc cgtggcggta gggatgtgt ctgaaaatga 7260
 60 gctcggggag cgggcttga ccgctgacgc atttggaaga cttaaggcag cggcagaaga 7320
 agatgcaggc agctgagttg ttgtgttctg ataagagtca gaggtaactc ccgttgcggt 7380
 gctgttaacg gtggagggca gtgtagtctg agcagtactc gttgctgccg cgcgcgccac 7440
 65 cagacataat agctgacaga ctaacagact gttcctttcc atgggtcttt tctgcagtca 7500

ES 2 314 248 T3

ccgtccttga cacgaagctt gccgccacca tggtagagcaa gcagatcctg aagaacaccg 7560
 gcctgcagga gatcatgagc ttcaaggatga acctggaggg cgtggtgaac aaccacgtgt 7620
 5 tcacatgga gggctgcggc aagggcaaca tcctgttcgg caaccagctg gtgcagatcc 7680
 gcgtgaccaa gggcgcccc ctgcccttcg ccttcgacat cctgagcccc gccttccagt 7740
 acggcaaccg caccttcacc aagtaccccc aggacatcag cgacttcttc atccagagct 7800
 10 tccccgccgg cttcgtgtac gagcgcaccc tgcgctacga ggacggcggc ctggtggaga 7860
 tccgcagcga catcaacctg atcgaggaga tgttcgtgta ccgctgaggag tacaagggcc 7920
 15 gcaacttccc caacgacggc cccgtgatga agaagaccat caccggcctg cagcccagct 7980
 tcgaggtggt gtacatgaac gacggcgtgc tggtagggcca ggtgatcctg gtgtaccgcc 8040
 tgaacagcgg caagttctac agctgccaca tgcgcaccct gatgaagagc aagggcgtgg 8100
 20 tgaaggactt ccccgagtac cacttcatcc agcaccgcct ggagaagacc tacgtggagg 8160
 acggcggctt cgtggagcag cacgagaccg ccatcgcca gctgaccagc ctgggcaagc 8220
 25 ccctgggcag cctgcacgag tgggtgtaat a 8251

<210> 3

<211> 10369

30 <212> ADN

<213> *Hamster sp.*

<220>

<221> misc_feature

35 <223> SEC ID N° 2: plásmido circular minigén de GS-vector p 14.4 DeltaModulator (mod-) hCMVp-GFP/clon 6

<400> 3

40 gaattcattg atcataatca gccataccac atttgtagag gtttacttg ctttaaaaaa 60
 cctccacac ctccccctga acctgaaaca taaaatgaat gcaattgttg ttgttaactt 120
 45 gtttattgca gcttataatg gttacaaata aagcaatagc atcacaatt tcacaaataa 180
 agcattttt tactgcatt ctagtgtgg tttgtccaaa ctcatcaatg tatcttatca 240
 tgtctggcgg ccgcgacctg caggcgcaga actggtagg atggaagatc cctcgagatc 300
 50 cattgtgctg gcggtaggcg agcagcgctt gcctgaagct gcgggcattc ccagtcagaa 360
 atgagcgcca gtcgtcgtcg gctctcggca ccgaagtgct atgattctcc gccagcatgg 420
 55 cttcggccag tgcgtcgagc agcggcggct tgttcctgaa gtgccagtaa agcggcggct 480
 gctgaacccc caaccgttcc gccagtttgc gtgtcgtcag accgtctacg ccgacctcgt 540
 tcaacaggtc cagggcggca cggatcactg tattcggctg caactttgtc atgcttgaca 600

60

65

ES 2 314 248 T3

ctttatcact gataaacata atatgtccac caacttatca gtgataaaga atccgcgcca 660
 gcacaatgga tctcgaggtc gagggatctc tagaggatcc atattcgcgg gcatcaccgg 720
 5 cgccacaggt gcggttgctg ggccttatat cgccgacatc accgatgggg aagatcggggc 780
 tcgccacttc gggctcatga ggccttggtt cggcgtgggt atggtggcag gccccgtggc 840
 cgggggactg ttgggcgcca tctccttgca tgcaccattc cttgcggcgg cggtgctcaa 900
 10 cggcctcaac ctactactgg gctgcttcct aatgcaggag tcgcataagg gagagcgtcg 960
 acctcggggc gcgttgctgg cgtttttcca taggctccgc ccccctgacg agcatcacia 1020
 15 aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcga aa cccgacagga ctataaagat accaggcgtt 1080
 tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta ccggatacct 1140
 gtccgccttt ctccccctcg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct 1200
 20 cagttcgggtg taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc 1260
 cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aaccggtaa gacacgactt 1320
 atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcggtgc 1380
 25 tacagagttc ttgaagtggg ggcctaacta cggctacact agaagaacag tatttgggat 1440
 ctgcgctctg ctgaagccag ttacctcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa 1500
 30 acaaacacc gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa 1560
 aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaacga 1620
 aaactcacgt taagggattt tggctcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct 1680
 35 tttaaattaa aaatgaagtt ttaaataat ctaaagtata tatgagtaaa cttgggtctga 1740
 cagttaccaa tgcttaataca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttcggtcatc 1800
 catagttgcc tgactccccg tcgtgtagat aactacgata cgggagggct taccatctgg 1860
 40 ccccagtget gcaatgatac cgcgagacce acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat 1920
 aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgcag aagtggctct gcaactttat ccgctccat 1980
 45 ccagtctatt aattgttgcc ggggaagctag agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg 2040
 caacgttggt gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc 2100
 attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga tccccatgt tgtgcaaaaa 2160
 50 agcggttagc tccttcgggc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg cagtgttatc 2220
 actcatgggt atggcagcac tgcataattc tcttactgtc atgccatccg taagatgctt 2280
 55 ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgatgc ggcgaccgag 2340
 ttgctcttgc ccggcgtcaa tacgggataa taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt 2400
 gctcatcatt ggaaaacggt cttcggggcg aaaactctca aggatcttac cgctgttgag 2460
 60 atccagttcg atgtaaccca ctctgtcacc caactgatct tcagcatctt ttactttcac 2520
 cagcgtttct gggtgagcaa aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc 2580
 65 gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt ctttttcaa tattattgaa gcatttatca 2640

ES 2 314 248 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg 2700
 ggttccgcgc acatttcccc gaaaagtgcc acctgacgtc taagaaacca ttattatcat 2760
 gacattaacc tataaaaaata ggcgtatcac gaggccctga tggctcttg cggcacccat 2820
 cgttcgtaat gttccgtggc accgaggaca accctcaaga gaaaatgtaa tcacactggc 2880
 tcaccttcgg gtgggccttt ctgcttttat aaggagacac tttatgttta agaaggttgg 2940
 taaattcctt gcggctttgg cagccaagct agatccagct tttgcaaaa gcctaggcct 3000
 ccaaaaaagc ctccactacta cttctggaat agctcagagg ccgaggcggc ctcggcctct 3060
 gcataaataa aaaaaattag tcagccatgg ggcggagaat gggcggaaact gggcggagtt 3120
 aggggcgggg tggcgagggt tagggcggg actatggttg ctgactaatt gagatgcatg 3180
 ctttgatac ttctgcctgc tggggagcct ggggactttc cacacctggt tgctgactaa 3240
 ttgagatgca tgctttgcat acttctgcct gctggggagc ctggggactt tccacaccct 3300
 aactgacaca cattccacag ggaagctagc ttggaattaa tccccgcc cctccaata 3360
 caaaaactaa ttagactttg agtgatcttg agcctttcct agtttttga ttggaagggc 3420
 tcgtcgccag tctcattgag aaggcatgtg cggacgatgg cttctgtcac tgcaaagggg 3480
 tcacaattgg cagaggggcg gcggtcttca aagtaacctt tcttctctg ccgagccgag 3540
 aatgggagta gagccgactg cttgattccc acaccaatct cctcgccgct ctcacttcgc 3600
 ctcgttctcg tggctcgtgg ccctgtccac cccgtccatc atcccgccg ccaccgctca 3660
 gagcaccttc caccatggcc acctcagcaa gttcccactt gaacaaaaac atcaagcaaa 3720
 tgtacttgtg cctgccccag ggtgagaaag tccaagccat gtatatctgg gttgatggta 3780
 ctggagaagg actgcgctgc aaaaccgcga ccctggactg tgagccaag tgtgtagaag 3840
 agttacctga gtggaatfff gatggctcta gtaccttca gtctgagggc tccaacagtg 3900
 acatgtatct cagccctggt gccatgtttc gggaccctt ccgagagat cccaacaagc 3960
 tgggttctg tgaagttttc aagtacaacc ggaagcctgc agagaccaat ttaaggcact 4020
 cgtgtaaacg gataatggac atggtgagca accagcacc ctggtttgga atggaacagg 4080
 agtatactct gatgggaaca gatgggcacc cttttggttg gccttccaat ggctttcctg 4140
 ggcccaagg tccgtattac tgtggtgtgg gcgcagaaa agcctatggc agggatatcg 4200
 tggaggctca ctaccgcgcc tgcttgatg ctggggtcaa gattacagga acaaatgctg 4260
 aggtcatgcc tgcccagtgg gaactccaaa taggacctg tgaaggaatc cgcatgggag 4320
 atcatctctg ggtggcccgt tcatcttgc atcgagtatg tgaagacttt ggggtaatag 4380
 caacctttga cccaagccc attcctggga actggaatgg tgcaggctgc cataccaact 4440
 ttagaccaaa ggccatgcgg gaggagaatg gtctgaagta agtagctccc tctggaccat 4500
 ctttattctc atggggtgga aggcctttgt gttagggttg ggaaaagttg gacttctcac 4560
 aaactacatg ccatgctctt cgtgtttgtc ataagcctat cgttttgtac ccggtggaga 4620
 agtgacagta ctctaggaat agaattacag ctgtgatatg ggaaagttgt cacgtaggtt 4680

ES 2 314 248 T3

caagcattta aaggctcttta gtaagaacta aatacacata caagcaagtg ggtgacttaa 4740
 ttcttactga tgggaagagg ccagtgatgg gggcttccc atccaaaaga taattggtat 4800
 5 tacatggtga ggactggtct gaagcacttg agacataggt cacaaggcag acacagcctg 4860
 catcaagtat ttattggitt cttatggaac tcatgcctgc tcctgccctt gaaggacagg 4920
 10 tttctagtga caaggtcaga ccctcacctt tactgcttcc accaggcaca tcgaggaggc 4980
 catcgagaaa ctaagcaagc ggcaccggtg ccacattcga gcctacgatc ccaagggggg 5040
 gctggacaat gcccgtaggc tgactgggtt ccacgaaacg tccaacatca acgacttttc 5100
 15 tgctgggtgc gccaatcgca gtgccagcat ccgcattccc cggactgtcg gccaggagaa 5160
 gaaaggttac tttgaagacc gccgcccctc tgccaattgt gaccctttg cagtgcaga 5220
 agccatcgtc cgcacatgcc ttctcaatga gactggcgac gagcccttcc aatacaaaaa 5280
 20 ctaattagac tttgagtgat cttgagcctt tcctagtcca tgccaccccg cccagctgt 5340
 ctcatgtaa ctcaaaggat ggaatatcaa cggctttttt attcctcgtg cccagttaat 5400
 25 ccttgctttt attggtcaga atagaggagt caagttctta atgcctatac accaacctca 5460
 tttcttttct atttagcttt ctacgtgggg gtgggagggg tagggagggg taggcgaagg 5520
 gaacgtaacc acatgcttca tctcatcagg aatgccatgt ccagtaggca gagctgccac 5580
 30 agagtgggtg tatttggtga ggaggacttt ttcttcagga cagttaaag agcaggtcca 5640
 ctgcttgat tgacaattcc cctataggta gagagcttgc tagttctca ggtaaaccaa 5700
 35 ctttctattc caaatggaag ttaggtgagg agtagtgagg gagttaatgc cctccatgaa 5760
 gacagctcag tgtatcacct gagacagatg ggtagcccta ctgtaaaaga aggaaaagtt 5820
 atttctgggt cctccattta taacacaaag cagtagtatt tttatattta aatgtaaaaa 5880
 40 caaaagttat atatatgata tgtggatata tgtgtatttc taattcagaa accatcctag 5940
 ttactgggtt tgccaagttt gaagagcttg gtaacaaga aaggatctct tgagtagagg 6000
 45 tgggggtgca gtaccaggaa aggtggttat ctggggctca gcgcttatt actatgtggg 6060
 gtttcccctg cccactctgc aggagcagat gctggacagg tagcagggtg ggacaccagt 6120
 gcttgccacc acctgtccct gtgcttaggc taagatgcat atgtatccac acagagttag 6180
 50 caggatggag ttggctggtc aacttgaaca ttggtactga taggggtggg tggggtttat 6240
 tttttgggtg gactagcatg tcaactaaagc aggccttttg atatattaaa ttttttaaag 6300
 55 caaaacaagt tcagctttta atcaactttg tagggtttct aactttacag aattgcctgt 6360
 ttgtttcagt gtctccatcc actttgctct tggaggaacg gaggacaggc agacctggag 6420
 ttaaaacatt tgtcattttg tgtcatagtg tctactttct cccagcagaa tattcctttc 6480
 60 cttcttagga gtcctatgga gttttgttt tgttttttt ctattacgat aaacataccc 6540
 cacctccatt ctggcttgcc ctgctgttct ctggtgttt gtgtgctgtc cgcagcaggc 6600
 65 tgctgtggt tttctcttgc catgacgact tctaattgcc atgtacagta tgttcagtta 6660
 gataactcct cattgtaaac agactgtaac tgccagagca gcgcttataa atcaacctaa 6720

ES 2 314 248 T3

catttataag atttcctcct gacttgtttc tttgtggttg ggggaggaag aaaaaaaaaa 6780
 gcgtgcagta ttttttggtt ccttcatttc ctatcaaaag aaaggggagt ggttctgttt 6840
 5 tgtttactcg caaaataagc tagcttatct attggctttt cttttttttt ttttttttaa 6900
 acgggctttt tcttgtacct ataatttggg gtaagggtg agagttttta tagttttttg 6960
 agacaggggc ttgggtgtata cccttggtg gcctggagct aactatgtag actgggctag 7020
 10 cctttaactt gcagttctgc tttcaattag ggtttataca tttagtcttg gcaattccta 7080
 gttccacggt taatctcttt acatttcaaa gcagtgttat ctgaagagtt caggcgcaga 7140
 15 gtcaattcaa tagagttaca caaaaaccta aaaaacaagt tttaaatacc aagttatggt 7200
 ggcttgcca cttttcacag ctgtccacaa ctcaatgtga caaggctaca aattggatat 7260
 actagaattt cctggtgatt tggaaacctt gcttcatttc ccggaaccag ggcttttggg 7320
 20 gacagtccta gcttatcaga ttatttataaa cagttactct tcttgcctt cttctgaga 7380
 cttttgtcca gctgccatga gccatctaca cagtacttgc ttccctgttg aagtactga 7440
 aggcacatca gcccaagaca taaaggcttg tcccggattc actagcctgg tgaacttgtg 7500
 25 gttctctgat gttttgtcct gttttgttgt gatttagtct caaatttccc agcctggttt 7560
 gaaaatctgg gctcccagcc ttcaataagg aggactacag atatgtacga ctgagccttg 7620
 30 attccagcct catgtttata cgtctgtgct cagctccctg aaggttccag tttgaaactc 7680
 aataatccag gggtcagaaa gtcttgatct tatcccaca gtatggcacc aagcctggct 7740
 gagccttctg acttagtctg ccctgttgct atttaagcac ttttcttcac taggctaaaa 7800
 35 ataaaaggag cttcctcctt tgccatggcg ctgtgcatga taggaaaagg tagctatcta 7860
 ctagcatatt aactccactg tttttgcttt gtgtgtttgg tttttgagga agggctctcaa 7920
 40 ctgtgtatcc ctggctggcc tggccggatc tagcttctgt tcaaggacgg tgaggcgcg 7980
 caatattggc tattggccat tgcatacgtt gtatccatat cataatatgt acatttatat 8040
 tggctcatgt ccaacattac cgccatgttg acattgatta ttgactagtt attaatagta 8100
 45 atcaattacg gggtcattag ttcatagccc atatatggag ttccgcgta cataacttac 8160
 ggtaaatggc ccgcctggct gaccgcccaa cgacccccgc ccattgacgt caataatgac 8220
 50 gtatgttccc atagtaacgc caatagggac tttccattga cgtcaatggg tggagtattt 8280
 acggtaaacg gcccaacttg cagtacatca agtgtatcat atgccaagta cgccccctat 8340
 tgacgtcaat gacggtaaat ggccccctg gcattatgcc cagtacatga ccttatggga 8400
 55 ctttctact tggcagtaca tctacgtatt agtcatcgct attaccatgg tgatgcggtt 8460
 ttggcagtac atcaatgggc gtggatagcg gttgactca cggggatttc caagtctcca 8520
 cccattgac gtcaatggga gtttgttttg gcacaaaat caacgggact ttccaaaatg 8580
 60 tcgtaacaac tccgccccat tgacgcaaat gggcggtagg cgtgtacggt gggaggtcta 8640
 tataagcaga gctcgtttag tgaaccgtca gatcgcctgg agacgccatc cacgctgttt 8700
 65 tgacctccat agaagacacc gggaccgatc cagcctccgc ggccgggaac ggtgcattgg 8760

ES 2 314 248 T3

aacgcggatt ccccgTGCCA agagtGACGt aagtaccGCC tatagagtCT ataggccCAC 8820
 ccccttggCT tcttatGcat gctatactGt ttttggctTg gggTctataC acccccGctt 8880
 5 cctcatGtTa taggtgatGg tatagcttag cctataggTg tgggttattG accattattG 8940
 accactCCCC tattggTgac gatactttCC attactaATC cataacatGg ctctttGcca 9000
 caactctctt tattggctat atGCCaataC actGtccttC agagactGac acggactctG 9060
 10 tatttttaca ggatggggTc tcatttatta tttacaaatt cacatataCa acaccaccGt 9120
 ccccaGtGcc cGcagttttt attaaacata acgtgggacT tccacGcgaa tctcgggtac 9180
 15 gtgttccGga catgggctct tctccggtag cggcggagct tctacatccG agccctGctc 9240
 ccatGcctcc agcGactcat ggtcGctcGg cagctccttG ctCctaacag tggaggccag 9300
 acttagGcac agcacgatGc ccaccaccac cagtgtGccG cacaaggccG tggcggtagg 9360
 20 gtatgtgtct gaaaatgagc tcggggagcG ggcttGcacc gctgacGcat ttggaagact 9420
 taaggcagcG gcagaagaag atgcaggcag ctgagttgtt gtgttctgat aagagtcaga 9480
 ggtaactccc gttGcggTgC tgGtaacggT ggagggcagT gtagtctgag cagtactcGt 9540
 25 tgctGccGcg cGcGccacca gacataatag ctgacagact aacagactgt tcctttccat 9600
 gggTcttttC tgCagtcacc gtccttGaca cgaagcttGc cGccaccatG gtgagcaagc 9660
 30 agatcctGaa gaacaccggc ctGcaggaga tcatgagctt caaggtgaac ctggagggcG 9720
 tggTgaacaa ccacgtgttC accatggagg gctGcggcaa gggcaacatc ctgttcggca 9780
 accagctggT gcagatccGc gtgaccaagg gcGccccct gcccttcGcc ttcGacatcc 9840
 35 tgagccccGc ctccagTac ggcaaccGca cttcaccaa gtacccccgag gacatcagcG 9900
 acttcttcat ccagagcttC cccGccggct tcgtgtacga gcGcacctG cgctacgagg 9960
 40 acggcggcct ggtggagatc cGcagcGaca tcaacctgat cGaggagatG ttcgtgtacc 10020
 gcgtggagTa caaggGCCGc aacttccccA acgacggccc cgtgatgaag aagaccatca 10080
 ccggcctGca gcccagcttC gaggtggTgt acatgaacGa cggcgtGctG gtgggCCagg 10140
 45 tgatcctggT gtaccGctG aacagcggca agttctacag ctGccacatG cGcaccctGa 10200
 tgaagagcaa gggcgtggTg aaggacttcc ccgagtacca ctcatccag caccGcctgg 10260
 50 agaagacctA cgtggaggac ggcggcttcG tggagcagca cGagaccGcc atcGccccagc 10320
 tgaccagcct gggcaagccc ctgggcagcc tGcacgagTg ggtgtaata 10369

55 <210> 4

<211> 13535

<212> ADN

<213> *Hamster sp.*

60 <220>

<221> misc_feature

<223> SEC ID N° 1: plásmido circular de GS + vector remodelación dirigida de punto caliente de IgG 2A pEE 15.1 hCMVp-GFP/clon 11

65

ES 2 314 248 T3

<400> 4

	gaattcattg atcataatca gccataccac atttgtagag gttttacttg ctttaaaaaa	60
5	cctccacac ctccccctga acctgaaaca taaaatgaat gcaattggtg ttgttaactt	120
	gtttattgca gcttataatg gttacaaata aagcaatagc atcacaatt tcacaaataa	180
	agcatttttt tcaactgcatt ctagtgtggt tttgtccaaa ctcatcaatg tatcttatca	240
10	tgtctggcgg ccgcgacctg caggcgcaga actggtaggt atggaagatc cctcgagatc	300
	cattgtgctg gcggtaggcg agcagcgcct gcctgaagct gcgggcattc ccagtcagaa	360
15	atgagcgcca gtcgtcgctg gctctcggca ccgaagtgct atgattctcc gccagcatgg	420
	cttcggccag tgcgtcgagc agcgcgccgt tgttcctgaa gtgccagtaa agcgcggct	480
	gctgaaccct caaccgttcc gccagtttgc gtgtcgtcag accgtctacg ccgacctcgt	540
20	tcaacaggtc tagggcggca cggatcactg tattcggctg caactttgtc atgcttgaca	600
	ctttatcact gataaacata atatgtccac caacttatca gtgataaaga atccgcgcca	660
	gcacaatgga tctcgaggtc gagggatctc tagaggatcc atattcgca atatgccggc	720
25	atcaccggcg ccacaggtgc ggttgctggc gcctatatcg ccgacatcac cgatggggaa	780
	gatcgggctc gccacttcgg gctcatgagc gcttgtttcg gcgtgggtat ggtggcaggc	840
30	ccgtggccgg gggactgttg ggcgccatct ccttgcatgc accattcctt gcggcggcgg	900
	tgctcaacgg cctcaacctt ctactgggct gcttcctaat gcaggagtcg cataaggag	960
	agcgtcgagt cctccgtggt cgaagcgatc cctgtccagt ggtgtgcaca cttcccagc	1020
35	tgctctgag tctgacctct acaccctcag cagctcagtg actgtaacct cgagcacctg	1080
	gcccagccag tccatcacct gcaatgtggc ccaccggca agcagcacca aggtggacaa	1140
40	gaaaattggt gaggaaaaa aggggagtag aggttcacaa gtgattagtc taaggcctta	1200
	gcctagctag accagccagg atcagcagcc atcaccaaaa atgggaaactt ggcccagaag	1260
	agaaggagat actgactgtg actecctctt ggaaacttct aactatgacc acctacctt	1320
45	aaggatcatga tcctctagga tagatgtcct tggatcattc caggatcatc ctgacctag	1380
	gccataccca gggacaaagt ccctggtttg gtgccttttc tcctcaaac ttgagtaacc	1440
	cccagccttc tctctgcaga gccagaggg cccacaatca agccctgtcc tccatgcaaa	1500
50	tgcccaggta agtcaactaga ccagagctcc acccgggaga atggttaagt ctgtaaacad	1560
	ccctgcacta gaggataagc catgtacaga tccatttcca tctctcctca tcagcaccta	1620
55	acctcttggg tggaccatcc gtcttcatct tccctccaaa gatcaaggat gtactcatga	1680
	tctccctgag ccccatagtc acatgtgtgg tgggtggatgt gagcgaggat gaccagatg	1740
	tccagatcag ctggtttgtg aacaacgtgg aagtacacac agctcagaca caaacccata	1800
60	gagaggattt caacagtact ctccgggtgg tcagtgcctt ccccatccag caccaggact	1860

65

ES 2 314 248 T3

ggatgagtgg caaggagttc aaatgcaagg tcaacaacaa agacctccca gcgcccacg 1920
 agagaaccat ctcaaaaccc aaaggtgaga gctgcagcct gactgcatgg gggctgggat 1980
 5 gggcataagg ataaaggctt gtgtggacag ccttctgctt cagccatgac ctttgtgtat 2040
 gtttctaccc tcacagggtc agtaagagct ccacaggat atgtcttgcc tccaccagaa 2100
 gaagagatga ctaagaaaca ggtcactctg acctgcatgg tcacagactt catgcctgaa 2160
 10 gacatttacg tggagtggac caacaacggg aaaacagagc taaactacaa gaacactgaa 2220
 ccagtcctgg actctgatgg ttcttacttc atgtacagca agctgagagt ggaaaagaag 2280
 15 aactgggtgg aaagaaatag ctactcctgt tcagtggctc acgagggctc gcacaatcac 2340
 cacacgacta agagcttctc cggactccg ggtaaagag ctcagcacc acaaaactct 2400
 caggtecaaa gagacaccca cactcatctc catgcttccc ttgtataaat aaagcaccca 2460
 20 ccaatgcctg ggaccatgta aaactgtcct ggttcttccc aaggataga gcatagctca 2520
 caggctgata tttctggcca gggttggagg acagccttgt ctataggaag agaatgaggt 2580
 ttttgactg caggactcag agctcattag ttatctgccc ttggagtgtt ggggcttggc 2640
 25 ttttaggcagt gccttttctt tgccttctta cgaaccagca gctgccatac atagagataa 2700
 tcctaggaag cctcaaatgg agaaggacac aaaccacct ccctcaggct gttcctctat 2760
 30 cccggcccca ctcttttacc taggggttct tctgagtcta ttgtggagt acacatggcc 2820
 aggggcattc cagagaccct tgtcatccat aactcaact caggcagctt tgcaaaaca 2880
 aagtctgcac acccatacag atggctcact ctgacctgtg ccatgtaggg ctgaggcaca 2940
 35 tggctcttgc tgccccaagg gagggactat tagatagcca cactcatgct gaatcctggc 3000
 ccattcaaat tagcctgctg aacaccatcc agtccatata gcacatgtat ccacatgcac 3060
 40 gtgtgcacaa aacgcattta atacactggg acaacaattc tgtgccctgc acagcaccta 3120
 tatccagcaa tgtatcacca tacacacgac caaaaaaatt caatgccac gtttctgcca 3180
 tcacaaacag acacatcttt cctctctgtg gccactgcat tatatgctca acacaagacc 3240
 45 tctgaagcca gatccatctc tggcacctcg gggcatgct tcaacccac atgaattatg 3300
 caaacatag ccataatggt ctgaatcact tcacactggg atgttcccaa gttcaggcaa 3360
 50 gacgagccac aggctctgct gatgactgaa ggacagcaaa gggtcagtcc agctgtatag 3420
 cactgttga cctgggtcac aggcctgct gaccctccac ctctcctgt actgaaggaa 3480
 tgaaagatga gacaagcata gagggcactt gaataatcca ggtcactctg aggtccacc 3540
 55 aaggcattat tggactcagg tgggaagctg agactggtgt cccagagggg aaggaaggaa 3600
 agcaggcccc ggggagggtc tgctgtcca gtcaggctgg agatctctcc tctgaatcca 3660
 60 tgcagacatg tctgcctcac aggaatctc tcccagcacc aaccatgttg ggacaaacac 3720
 tgactgtcct ctctgttcag ggctagacct ggatgatgtc tgtgctgagg cccaggacgg 3780
 ggagctggac ggcctctgga cgaccatcac catcttcatc agcctcttcc tgctcagcgt 3840
 65 gtgctacagc gcctctgtca cactcttcaa ggttggcact gtctcccacc ctctgctgtg 3900

ES 2 314 248 T3

atggctacac tgaccacaaa atgtcctctc actcctcccc agatgtagta ggacgttact 3960
 ttgtgcccc tactctgtcc cacacacatc ttcctccatt ccctgagcca tcccacattg 4020
 5 ttctatgtga ctccacattg tgtcccatac agtctgccct tctgtctctc tggctgtcct 4080
 gcgtgatcct gatactgtct tatgagacca aacctccttg cattccacac tagccttcat 4140
 gaggttcaat gctgtcttac acacaatccc ctgagcctca ccatggctca aggtactctg 4200
 10 tgagctatcc tcataccatc tccacctcaa ctcccacaat atctccactc tgacccctcc 4260
 catacccagt ctctacctg tatgaaggga attgaaggag agacaggtcg acctctgtct 4320
 15 tccccacaga ttggaggggc tgagcatggg cgtggctctc gactttctct cacttccccca 4380
 caggtaaagt ggatcttctc ctctgtggtg gagctgaagc agacgatctc ccctgactac 4440
 agaaacatga ttgggcaggg agcctaggcc acttcctctg ggatcagaag agcttcctag 4500
 20 gccctgcaga agcccatcca tcctactgtg cagcctaaca gggaggccac actctagccc 4560
 tatgactctc tgatcagaac tcccattggc tcctctttgg aggaccacgt gcagtgcagg 4620
 ctttgcccag acctaaacac tcccacagca gtcgccagat atctaactac tccggaccag 4680
 25 aagaaccatc tccttccaaa ccagcactag ggatctgaga tctcagaatg tttgcctaag 4740
 aagagctgga aatccaggct tcctgtgttc tgctacaagg acatcagcct ggatttgacc 4800
 30 tggaccacac attttcatct aaatgagttt tccacaaagg acacgtttca gatccttgaa 4860
 tgagacctct acatggaaga ccagagtcac tatacccaaa ggtcactctg tctccttgca 4920
 ccagctatac tggacagctt ccttcctggc acttcagtga ccctggctga ggaaaggatc 4980
 35 tgtgacctca actgtttgga gagcctctgg aagatgtagt cttctcttcc tgctaccacc 5040
 aacatgctgg atctcagatg cagaatccaa tccacagaca cactgacca cacaacctga 5100
 40 agacaaggcc attgccacct ccacagagat gccatccaca ctctgtggag aaataaggag 5160
 tgctttgtgc agcctctgca aagctctggc agggattaga gtatacacac tgagtactga 5220
 ctaggtgacc aggcagaaaa acctccagga gaaggaacaa tgggggagag atgtgaacag 5280
 45 atagttagaa aaagcatggt gtcacaggtc tgctctgtgg actgatttcc agattggacc 5340
 acctacagca gaaaccatcg gttgcagtgg caatctagga ggaccaacct ggaataggag 5400
 50 ggctgctgtg gtcaatggag agtagacctg tatctatttc tccactgcct cttatgacca 5460
 ataagaagcc agagtctcca gacagaaaga aagaaagaaa gaaagaaaga aagaaagaaa 5520
 gaaagagaga gagagagaga gagagagaga gaggaaggaa ggaaggaagg aaggaaggaa 5580
 55 ggaaggaagg aggaggagga ggaggaggag gaggaggaga gagagagaga gagagagaga 5640
 gagagagaga gagcaccagc ttttctgtga ctggaaggaa atgcttagag agcttgatc 5700
 60 tttaaagctt ctttttcta gagacatga atgtcttgt tctctctctc tctctctctc 5760
 tctctctctc tctctctctc tctctctgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgctg 5820
 tgcattgcag ctattgtttt ggcatttgaa acaataaaaac attcttttaa tattctgtat 5880
 65 ctcatggttc ccctctgtg tggatcagcc ctaacaccca ggaacagggg acaataaaca 5940

ES 2 314 248 T3

gaccacagcc atgtacagcc ttctacctcc cttctggttc tgacctcca gaggtccctc 6000
 agtgggcccc tcacagctgg gtttcttccc tggcagtgcc accaagagct caggcacctc 6060
 5 tgagctggag gctgtcctga tgccataggc aggctatgga gcagagatga tgaccacggt 6120
 ggactccagg tgagccaggc aaagcctccc atgccagaag agaagcgtgt ggtactcact 6180
 10 ggccctcgggc tgctacggat tcagcaaaga gcatggatcg cttcgaagcc tccaagctcg 6240
 acctcggggc gcgttgctgg cgtttttcca taggctccgc ccccctgacg agcatcacia 6300
 aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaag cccgacagga ctataaagat accaggcgtt 6360
 15 tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta cgggatacct 6420
 gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcaa tgctcacgct gtaggtatct 6480
 cagttcggtg taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc 6540
 20 cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aaccggtaa gacacgactt 6600
 atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcggtgc 6660
 25 tacagagttc ttgaagtggg ggcctaacta cggctacact agaaggacag tatttggtat 6720
 ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa 6780
 acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa 6840
 30 aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaacga 6900
 aaactcacgt taagggattt tggctatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct 6960
 35 tttaaattaa aaatgaagtt ttaaataat ctaaagtata tatgagtaaa cttggtctga 7020
 cagttaccaaa tgcttaatca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttcgttcac 7080
 catagttgcc tgactccccg tcgtgtagat aactacgata cgggagggct taccatctgg 7140
 40 ccccagtgct gcaatgatac cgcgagacc acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat 7200
 aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgcag aagtggctct gcaactttat ccgcctccat 7260
 ccagtctatt aattgttgcc ggggaagctag agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg 7320
 45 caacgttggt gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc 7380
 attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga tccccatgt tgtgcaaaaa 7440
 50 agcggttagc tccttcggtc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg cagtgttatc 7500
 actcatgggt atggcagcac tgcataattc tcttactgtc atgccatccg taagatgctt 7560
 ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag 7620
 55 ttgctcttgc ccggcgtcaa cacgggataa taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt 7680
 gctcatcatt ggaaaacggt cttcggggcg aaaactctca aggatcttac cgctgttgag 7740
 atccagttcg atgtaaccca ctctgtcacc caactgatct tcagcatctt ttactttcac 7800
 cagcgtttct gggtgagcaa aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc 7860
 gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt ctttttcaa tattattgaa gcatttatca 7920
 65 gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg 7980

ES 2 314 248 T3

gggtccgcgc acatttcccc gaaaagtgcc acctgacgtc taagaaacca ttattatcat 8040
 gacattaacc tataaaaaata ggcgtatcac gaggccctga tggctctttg cggcaccat 8100
 5 cgttcgtaat gttccgtggc accgaggaca accctcaaga gaaaatgtaa tcacactggc 8160
 tcaccttcgg gtgggccttt ctgctttat aaggagacac tttatgtta agaaggttgg 8220
 taaattcctt gcggctttgg cagccaagct agagatccgg ctgtggaatg tgtgtcagtt 8280
 10 aggggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt atgcaaagca tgcactctcaa 8340
 ttagtcagca accaggtgtg gaaagtcccc aggctcccca gcaggcagaa gtatgcaaag 8400
 15 catgcatctc aattagtcag caaccatagt cccgccccta actccgcca tcccgccct 8460
 aactccgccc agttccgccc attctccgcc ccatggctga ctaatttttt ttatttatgc 8520
 agaggccgag gccgcctcgg cctctgagct attccagaag tagtgaggag gcttttttgg 8580
 20 aggcctaggc ttttgcaaaa agctagcttg gggccaccgc tcagagcacc ttccaccatg 8640
 gccacctcag caagttccca cttgaacaaa aacatcaagc aaatgtactt gtgcctgccc 8700
 25 cagggtgaga aagtccaagc catgtatctc tgggttgatg gtactggaga aggactgcgc 8760
 tgcaaaacc gcaccctgga ctgtgagccc aagtgtgtag aagagttacc tgagtggaa 8820
 tttgatggct ctagtacctt tcagtctgag ggctccaaca gtgacatgta tctcagccct 8880
 30 gttgccatgt ttcgggacct cttccgcaga gatcccaaca agctggtgtt ctgtgaagtt 8940
 ttcaagtaca accggaagcc tgcagagacc aatttaaggc actcgtgtaa acggataatg 9000
 35 gacatggtga gcaaccagca cccctggttt ggaatggaac aggagtatac tctgatggga 9060
 acagatgggc acccttttgg ttggccttcc aatggctttc ctgggccccca aggtccgtat 9120
 tactgtggtg tgggcgcaga caaagcctat ggcagggata tcgtggaggc tcaactaccgc 9180
 40 gcctgcttgt atgctggggt caagattaca ggaacaaatg ctgaggtcat gcctgcccag 9240
 tgggaactcc aaataggacc ctgtgaagga atccgcatgg gagatcatct ctgggtggcc 9300
 cgtttcatct tgcactcgagt atgtgaagac tttggggtaa tagcaacctt tgaccccaag 9360
 45 cccattcctg ggaactggaa tgggtgcaggc tgccatacca actttagcac caaggccatg 9420
 cgggaggaga atggtctgaa gcacatcgag gaggccatcg agaaactaag caagcggcac 9480
 50 cggtaccaca ttcgagccta cgatcccaag gggggcctgg acaatgcccg tggctgact 9540
 gggttccacg aaacgtccaa catcaacgac ttttctgctg gtgtcgcaa tcgcagtgcc 9600
 agcatccgca ttccccgac tgtcggccag gagaagaaag gttactttga agaccgcggc 9660
 55 ccctctgcca attgtgacct ctttgagtg acagaagcca tcgtccgcac atgccttctc 9720
 aatgagactg gcgacgagcc cttccaatac aaaaactaat tagactttga gtgatcttga 9780
 60 gccttccta gttcatccca ccccgcccc gagagatctt tgtgaaggaa ccttacttct 9840
 gtggtgtgac ataattggac aaactaccta cagagattta aagctctaag gtaaataata 9900
 aatttttaag tgtataatgt gttaaacctac tgattctaata tgtttgtgta ttttagattc 9960
 65 caacctatgg aactgatgaa tgggagcagt ggtggaatgc cttaatgag gaaaacctgt 10020

ES 2 314 248 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

ttgctcaga agaaatgcca tctagtgatg atgaggctac tgctgactct caacattcta 10080
 ctctccaaa aaagaagaga aaggtagaag accccaagga ctttccttca 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 aartgtgtac ctttagcttt ttaatttgta 10380
 aaggggttaa taaggaatat ttgatgtata gtgccttgac tagagatcat aatcagccat 10440
 accacatttg tagaggtttt acttgcttta aaaaacctcc cacacctccc cctgaacctg 10500
 aaacataaaa tgaatgcaat tgttggtggt aacttgttta ttgcagctta taatggttac 10560
 aaataaagca atagcatcac aaatttcaca aataaagcat ttttttact gcattctagt 10620
 tgtggtttgt ccaaactcat caatgtatct tatcatgtct ggatctctag cttcgtgtca 10680
 aggacggtga ctgcagtgaa taataaaatg tgtgtttgtc cgaaatacgc gttttgagat 10740
 ttctgtcgcc gactaaattc atgtcgcgcg atagtgggtg ttatcgccga tagagatggc 10800
 gatattggaa aaatcgatat ttgaaaatat ggcatattga aaatgtcgcc gatgtgagtt 10860
 tctgtgtaac tgatatcgcc atttttccaa aagtgatttt tgggcatacg cgatatctgg 10920
 cgatagcgct tatatcgttt acgggggatg gcgatagacg actttggtga cttgggcgat 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 tagccatata atggagtcc gcgttacata acttacggta aatggcccgc 11340
 ctggctgacc gcccaacgac ccccgccat tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag 11400
 taacgccaat agggactttc cattgacgtc aatgggtgga gtatttacgg taaactgccc 11460
 acttggcagt acatcaagtg tatcatatgc caagtacgcc ccctattgac gtcaatgacg 11520
 gtaaattggcc cgcctggcat tatgcccagt acatgacctt atgggacttt cctacttggc 11580
 agtacatcta cgtattagtc atcgctatta ccatggtgat gcggttttgg cagtacatca 11640
 atgggcgtgg atagcggttt gactcacggg gatttccaag tctccacccc attgacgtca 11700
 atgggagttt gttttggcac caaaatcaac gggactttcc aaaatgtcgt aacaactccg 11760
 ccccatgac gcaaatgggc ggtaggcgtg tacgggtggga ggtctatata agcagagctc 11820
 gtttagtgaa cgcgcagatc gcctggagac gccatccacg ctgttttgac ctccatagaa 11880
 gacaccggga ccgatccagc ctccgcgcc gggaacggtg cattggaacg cggattcccc 11940
 gtgccaagag tgacgtaagt accgcctata gagtctatag gcccaacccc ttggcttctt 12000
 atgcatgcta tactgttttt ggcttggggt ctatacacc cgccttctc atgttatagg 12060

ES 2 314 248 T3

5 tgatggata gcttagccta taggtgtggg ttattgacca ttattgacca ctcccctatt 12120
 ggtgacgata ctttccatta ctaatccata acatggctct ttgccacaac tctctttatt 12180
 10 ggctatatgc caatacactg tccttcagag actgacacgg actctgtatt ttacaggat 12240
 ggggctcat ttattattta caaattcaca tatacaacac caccgtcccc agtgcccgca 12300
 gtttttatta aacataacgt gggatctcca cgcgaatctc gggtagctgt tccggacatg 12360
 15 ggctcttctc cggtagcggc ggagcttcta catccgagcc ctgctcccat gcctccagcg 12420
 actcatggtc gctcggcagc tccttgctcc taacagtgga ggccagactt aggacagca 12480
 20 cgatgccac caccaccagt gtgccgaca aggccgtggc ggtagggat gtgtctgaaa 12540
 atgagctcgg ggagcgggct tgcaccgctg acgcatttg aagacttaag gcagcggcag 12600
 aagaagatgc aggcagctga gttgttgtgt tctgataaga gtcagaggta actcccgttg 12660
 25 cgggtctgtt aacgggtggag ggcagtgtag tctgagcagt actcgttgct gccgcgcgcg 12720
 ccaccagaca taatagctga cagactaaca gactgttctt ttccatgggt cttttctgca 12780
 gtcaccgtcc ttgacacgaa gcttgccgcc accatgggtga gcaagcagat cctgaagaac 12840
 30 accggcctgc aggagatcat gagcttcaag gtgaacctgg agggcgtggt gaacaaccac 12900
 gtgttcacca tggagggctg cggcaagggc aacatcctgt tcggcaacca gctggtgcag 12960
 atccgcgtga ccaagggcgc ccccctgccc ttcgccttcg acatcctgag ccccgcttc 13020
 cagtacggca accgcacctt caccaagtac cccgaggaca tcagcgactt cttcatccag 13080
 35 agcttccccg ccggcttcgt gtacgagcgc accctgcgct acgaggacgg cggcctggtg 13140
 gagatccgca gcgacatcaa cctgatcgag gagatgttcg tgtaccgcgt ggagtacaag 13200
 ggccgcaact tccccaacga cggccccgtg atgaagaaga ccatcaccgg cctgcagccc 13260
 40 agcttcgagg tgggtgtacat gaacgacggc gtgctggtgg gccaggtgat cctggtgtac 13320
 cgcctgaaca gcggcaagtt ctacagctgc cacatgcgca ccctgatgaa gagcaagggc 13380
 gtggtgaagg acttccccga gtaccacttc atccagcacc gcctggagaa gacctacgtg 13440
 45 gaggacggcg gcttcgtgga gcagcacgag accgccatcg cccagctgac cagcctgggc 13500
 aagcccctgg gcagcctgca cgagtgggtg taata 13535

50

55

60

65