



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 061**

51 Int. Cl.:
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/79 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07833373 .9**
96 Fecha de presentación : **16.10.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2087118**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.08.2009**

54 Título: **Un vector y una línea celular de expresión novedosos para la producción en masa de una proteína recombinante y un proceso de producción de proteína recombinante usando los mismos.**

30 Prioridad: **16.10.2006 KR 20060100507**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.10.2011

73 Titular/es: **HANMI HOLDINGS Co., Ltd**
No 45, Bangi-dong
Songpa-gu, Seoul 138-828, KR

72 Inventor/es: **Choi, In Young;**
Kim, Chang Hwan;
Lee, Hyun Ji;
Park, Seong Hee;
Kwon, Se Chang y
Lee, Gwan Sun

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

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

Un vector y una línea celular de expresión novedosos para la producción en masa de una proteína recombinante y un proceso de producción de proteína recombinante usando los mismos

Campo técnico

[0001] La presente invención se refiere a un vector para la producción en masa de una proteína recombinante, a una línea celular de expresión para producir la proteína recombinante y a un procedimiento de producción y purificación de la proteína recombinante usando la línea celular. Más particularmente, la presente invención se refiere a un vector capaz de potenciar en gran medida la eficacia de la amplificación génica al debilitar artificialmente un promotor del gen de dihidrofolato reductasa, que es una secuencia de control transcripcional del gen, a una línea celular animal transformada con el vector y a un procedimiento de expresión de una proteína de interés usando la línea celular animal y purificando solo una forma altamente glucosilada de la proteína.

Antecedentes de la técnica

[0002] Se han usado una variedad de vectores y hospedadoras para la producción en masa de proteínas recombinantes. Se ha usado ampliamente *E. coli*, pero tiene una utilidad limitada en la producción de proteínas que necesitan glucosilarse o tienen estructuras complicadas. Estos problemas pueden superarse usando células animales, células de levadura, animales transformados, plantas transformadas y similares.

[0003] La levadura es ventajosa en la producción en masa de proteínas, pero es bien conocido que la glucosilación de levadura es diferente de la glucosilación humana y que es por tanto altamente inmunogénica (Hermeling y col., *Pharm. Res.* 21(6): 897-903 (2004)). No se han comercializado animales transformados debido a la dificultad en el cuidado y el mantenimiento de los animales y a la potencial contaminación con patógenos microbiológicos.

[0004] El uso de líneas celulares animales está gravado por el alto coste de la producción de proteína y el tiempo y los gastos requeridos para el establecimiento de una línea celular, pero se usa muy comúnmente para la producción de proteína recombinante porque este sistema produce proteína recombinante de forma muy similar a la observada en células humanas y posibilita una producción y mantenimiento de proteína estables. Sin embargo, cuando se transforman para la producción de proteína recombinante, la mayoría de líneas celulares animales exhiben bajos niveles de expresión y por tanto no se han usado todavía para realizar una producción de alto rendimiento. La amplificación génica es la estrategia que se usa rutinariamente para superar los problemas asociados a los sistemas de expresión de células animales. Los dos sistemas de amplificación usados ampliamente son amplificación basada en dihidrofolato reductasa (DHFR) y amplificación basada en glutamina sintetasa, pudiendo ambas aumentar considerablemente el rendimiento de proteína recombinante de las líneas celulares animales. A pesar de su ventaja de mejorar la producción de proteína, los sistemas de amplificación génica tienen los inconvenientes de que requieren múltiples ciclos de amplificación génica para usar altas concentraciones de metotrexato (de aquí en adelante, designado simplemente como "MTX"), que consumen tiempo, y el subcultivo a largo plazo de líneas celulares conduce a una pérdida génica y una expresión inestable.

[0005] Se han realizado muchos intentos por superar los inconvenientes de los sistemas de amplificación génica. Por ejemplo, la patente coreana de número de registro 0162021 emplea un gen de DHFR que se sitúa bajo el control de un promotor de SV40 parcialmente eliminado. La patente coreana de número de registro 0493703 describe la introducción de una mutación en un promotor de citomegalovirus (CMV) de modo que se altere la afinidad de la proteína de unión a ADN metilada por su secuencia de reconocimiento en el promotor. La patente coreana de número de registro 0184778 emplea la región 5' no codificante de una proteína de unión (Bip) a la cadena pesada de inmunoglobulina como sitio de entrada interno de ribosoma (IRES) para poner un gen de DHFR bajo el control no de un promotor independiente, sino de una secuencia de control de la transcripción de una proteína recombinante de interés.

[0006] La patente coreana de número de registro 0162021 estaba dirigida al control de la actividad del promotor de SV40 eliminando de 128 a 270 nucleótidos. Sin embargo, no es conocido exactamente el papel de la secuencia eliminada, y no se menciona el papel de la secuencia restante. En particular, debido a que esta patente no muestra que la amplificación génica no aumenta más a concentraciones de MTX mayores de 20 nM en condiciones que no contengan un control, no proporciona apoyo alguno al cambio de la actividad del promotor de DHFR y a la expresión optimizada a baja concentración de MTX. La patente coreana de número de registro 0493703 pretendía conseguir una amplificación génica eficaz modificando la secuencia de reconocimiento de proteína de unión a ADN metilada en el promotor de CMV, pero el efecto de amplificación sobre la expresión es menor que en otros procedimientos. En la patente coreana de número de registro 0184778, la expresión dependiente de IRES, realizada en lugar del uso de un promotor independiente, permite la amplificación génica meramente a niveles de MTX tan bajos como de varios micromoles (μ M) y un aumento de expresión de aproximadamente 30 veces. Por tanto, la amplificación del gen de DHFR no puede predecirse a partir de la modificación de un promotor genérico, y la aplicación de un promotor modificado se determinará solo cuando la amplificación génica se efectúe usando

sustancialmente varias clases de promotores.

[0007] La eritropoyetina humana (EPO), que se ilustra como un ejemplo de proteínas recombinantes de la presente invención, es una glucoproteína de aproximadamente 34 kDa, pero la masa molecular de la cadena peptídica (EPO no glucosilada) es solo de aproximadamente 18 kDa. La EPO se sintetiza en el riñón en respuesta a anemia, hipoxia o hemorragia, y estimula la producción de eritrocitos y mantiene la hemostasia. La EPO está presente en aproximadamente 10 a 20 mUI/ml en adultos, y la disfunción renal produce una anemia grave (Jacobson, y col., *Nature*, 179: 633-634 (1957)). Por tanto, la EPO se ha usado como agente terapéutico para insuficiencia renal crónica y anemia causada por diversos factores. En el pasado, la EPO se recogía del plasma sanguíneo de animales, o de la sangre u orina de pacientes con anemia aplásica, que producen EPO a niveles mayores que las personas sanas, pero la EPO se obtiene en forma inestable y con bajo rendimiento. La EPO urinaria de personas sanas se obtiene a bajas concentraciones, y requiere una gran purificación porque la orina contiene un inhibidor de la actividad de la EPO (véanse las patentes de EE.UU. n° 4.397.840, 4.303.650 y 3.865.810). Puesto que es difícil obtener grandes cantidades de EPO de alta pureza a partir de la sangre o la orina, se han desarrollado procedimientos de preparación de EPO usando técnicas de recombinación genética. Sin embargo, puesto que se requiere glucosilación para la actividad *in vivo* de la EPO, cuando se clona y expresa un gen de EPO en *E. coli* o levadura, la EPO no está glucosilada en su forma nativa, y por tanto no exhibe su actividad biológica. Por ello, el uso de una línea celular animal recombinante es esencialmente necesario para la producción de EPO. En el caso de usar una línea celular animal recombinante, la EPO se produce habitualmente basándose en un sistema de amplificación génica de DHFR (Malik y col., *DNA and Cell Bio.*, 6: 453-459 (1992)).

Descripción de la invención

Problema técnico

[0008] Basándose en un estudio previo realizado por Michel Fromm y Paul Berg (*J. Mol. Appl. Genet.* 1983. 2(1): 127-135), que sugería que seis secuencias repetidas ricas en GC en una región promotora ligada a un gen estructural de DHFR son importantes para la actividad transcripcional del promotor, los inventores de esta solicitud construyeron un vector de expresión para células animales que es más eficaz en la amplificación y expresión génica eliminando secuencialmente las secuencias ricas en GC, conduciendo así a la presente invención.

Solución técnica

[0009] Es por lo tanto un objeto de la presente invención proporcionar un vector de expresión que sea más eficaz en la amplificación génica para la producción de una proteína recombinante en células animales.

[0010] Es otro objeto de la presente invención proporcionar una línea celular animal transformada con el vector de expresión.

[0011] Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar un procedimiento de producción en masa de una proteína recombinante usando la línea celular animal.

Breve descripción de los dibujos

[0012] La FIG. 1 representa esquemáticamente un proceso de construcción de los vectores de expresión X1GC/dhfr, X3GC/dhfr y X6GC/dhfr, que contienen secuencias ricas en GC completas o truncadas secuencialmente;

[0013] la FIG. 2 representa esquemáticamente un proceso de construcción de un vector de expresión X0GC/dhfr del que se han eliminado todas las seis secuencias ricas en GC;

[0014] la FIG. 3 representa esquemáticamente un proceso de clonación de un gen gEPO en los vectores de expresión de las FIG. 1 y 2;

[0015] las FIG. 4 a 7 muestran los resultados del análisis ELISA de los niveles de expresión de EPO de líneas celulares transformadas cada una con un vector de expresión según la presente invención;

[0016] la FIG. 8 muestra los resultados de la transferencia Western para los niveles de expresión de un gen de DHFR amplificado;

[0017] la FIG. 9 muestra los resultados del análisis ELISA indirecto para los niveles de expresión de EPO humana en especímenes de sobrenadante que se recogieron nueve veces durante el cultivo a gran escala de un clon monocelular X0GC/GEP09647(DXB11), que se selecciona en el ejemplo 6;

[0018] la FIG. 10 muestra los resultados de los análisis de PAGE-SDS y transferencia Western de EPO recombinante purificada en el ejemplo 8;

[0019] la FIG. 11 muestra los resultados del enfoque isoelectrico de la EPO recombinante purificada en el

ejemplo 4; y

[0020] la FIG. 12 muestra los resultados del enfoque isoelectrico de EPO expresada cultivando X1GC/GEPO9629(DG44) y X0GC/GEP09603(DG44), que están completamente asimilados a una condición exenta de suero.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

[0021] Para lograr los objetos anteriores, la presente invención proporciona un vector de expresión para una línea celular animal que comprende un promotor del gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) del que se han eliminado algunas secuencias repetidas ricas en GC.

[0022] Como se describe anteriormente, se ha usado ampliamente un sistema de amplificación génica basado en DHFR para inducir un alto nivel de expresión de proteínas recombinantes en células animales, pero es problemático que no garantice la estabilización de la línea celular y que consuma tiempo y sea caro debido al uso a largo plazo de un inhibidor de DHFR a alta concentración. Los presentes inventores encontraron que un vector de expresión que alberga un gen DHFR, que está situado bajo el control de un promotor de DHFR truncado del que se han eliminado parcial o completamente las secuencias repetidas ricas en GC, es capaz de inducir la expresión del gen de DHFR y/o un gen recombinante de interés portado por el mismo, a una mayor eficacia y en menor tiempo incluso a una menor concentración de inhibidor de DHFR.

[0023] Como se usa en la presente memoria, el término "secuencias repetidas ricas en GC" designa las secuencias CCGCCC repetidas que están contenidas en un promotor de DHFR, que es una secuencia de control transcripcional de DHFR. Cuando las secuencias repetidas se vuelven parcial o totalmente inactivas mediante una delección u otras mutaciones, se minimiza la expresión de DHFR. Cuando se añade un inhibidor de DHFR en un estado en que se mantiene la expresión de DHFR a niveles mínimos, las células amplifican un mayor número de genes de DHFR para su supervivencia y, también, se amplifica y por tanto se expresa a altos niveles un gen recombinante de interés portado por un vector de expresión que alberga el gen de DHFR.

[0024] Por tanto, en un aspecto detallado de la presente invención se proporciona un módulo de expresión inducible para expresión a alto nivel que comprende una secuencia nucleotídica que codifica un gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) que contiene un promotor del que se han eliminado una o más secuencias CCGCCC repetidas. El módulo de alta expresión inducible comprende preferiblemente un promotor de DHFR que contiene menos de seis secuencias CCGCCC repetidas, más preferiblemente un promotor de DHFR que contiene menos de tres secuencias CCGCCC repetidas, particularmente preferiblemente un promotor de DHFR que contiene cero o una secuencias CCGCCC repetidas, y más particularmente un promotor de DHFR del que se han eliminado todas las secuencias CCGCCC repetidas.

[0025] La eliminación de las secuencias CCGCCC repetidas puede conseguirse mediante sustitución, delección o similares de nucleótidos según una técnica de recombinación genética ampliamente conocida en la materia. En la práctica de la presente invención, se eliminan parcial o totalmente las secuencias ricas en GC del promotor mediante la delección parcial o completa de una secuencia nucleotídica que contiene las secuencias CCGCCC.

[0026] En otro aspecto, la presente invención proporciona un vector de expresión que comprende el módulo de alta expresión inducible.

[0027] Como se usa en la presente memoria, el término "vector" significa un vehículo para introducir un gen de interés en una célula hospedadora para expresar el gen. Los vectores útiles en la presente invención incluyen vectores plasmídicos, vectores cosmídicos, vectores de bacteriófagos y vectores víricos tales como vectores adenovíricos, vectores retrovíricos y vectores víricos adenoasociados. Se prefieren los vectores plasmídicos.

[0028] Preferiblemente, el vector de expresión puede incluir adicionalmente un gen que codifica una proteína recombinante de interés. La proteína recombinante de interés puede expresarse a altos niveles expresando el vector de expresión.

[0029] La proteína recombinante de interés incluye típicamente polipéptidos fisiológicamente activos. Dichos polipéptidos fisiológicamente activos incluyen una variedad de proteínas tales como hormonas, citocinas, interleucinas, proteínas de unión a interleucina, enzimas, anticuerpos, factores de crecimiento, factores reguladores de la transcripción, factores de coagulación, vacunas, proteínas estructurales, proteínas o receptores de ligando, antígenos de superficie celular, antagonistas de receptor y derivados y análogos de los mismos.

[0030] Los ejemplos no limitantes detallados de polipéptidos fisiológicamente activos incluyen hormona de crecimiento humana, interferones y receptores de interferón, factores estimulantes de colonia, interleucinas, eritropoyetina, insulina, angiotensina, factor de crecimiento óseo, factor de linfocitos B, factor de linfocitos T, factores de crecimiento nervioso, antígenos de superficie celular, anticuerpos monoclonales y antígenos de vacuna derivados

de virus.

[0031] Los especialistas en la materia seleccionarán fácilmente una proteína recombinante capaz de aplicarse a un sistema de amplificación génica basado en DHFR usando la tecnología actual. En la práctica preferida de la presente invención, la proteína recombinante es eritropoyetina humana.

[0032] La proteína recombinante de interés puede expresarse bajo el control del promotor del gen de DHFR o bajo el control de un promotor independiente. Preferiblemente, la proteína recombinante de interés puede situarse bajo el control de un promotor independiente. Dichos promotores incluyen aquellos ampliamente conocidos en la materia, y los ejemplos no limitantes de dichos promotores incluyen promotor de citomegalovirus (CMV), promotor de LTR, promotor de EF α , promotor de SV40 y promotor de TK. Los especialistas en la materia seleccionarán fácilmente cualquiera del grupo constituido por los promotores anteriormente mencionados.

[0033] El vector de expresión de la presente invención, que se proporciona para inducir una alta expresión de un gen de interés en células animales, puede incluir preferiblemente además un gen de resistencia para células animales, que se usa como marcador seleccionable para la expresión permanente del gen en células animales. Los ejemplos no limitantes de dichos genes de resistencia para células animales incluyen aquellos usados comúnmente en la materia, tales como el gen de resistencia a neomicina, el gen de resistencia a zeomicina, el gen de resistencia de higromicina y el gen de resistencia a blastomicina.

[0034] También el vector de expresión de la presente invención puede incluir adicionalmente, pero sin limitación, elementos constituyentes genéricos de un vector, tales como un origen de replicación y una señal de poliadenilación y otros elementos de control transcripcional.

[0035] En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una línea celular transformada con el vector de expresión.

[0036] En un aspecto detallado, la presente invención proporciona líneas celulares de *E. coli* que se transforman con un vector de expresión que alberga un módulo de alta expresión inducible que contiene una secuencia CCGCCC repetida en el promotor de DHFR y otro módulo de alta expresión inducible que no contiene ninguna secuencia CCGCCC. Se depositaron los transformantes de *E. coli* en una autoridad depositaria internacional, el KCTC (Korean Collection for Type Cultures; Genetic Resources Center, Korean Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Yusong-ku, Taejeon, Corea) el 2 de octubre de 2006 y se les asignaron los números de acceso KCTC 10991 BP y KCTC 10992 BP, respectivamente. Para inducir la alta expresión de una proteína recombinante de interés, pueden usarse líneas celulares de *E. coli* para construir un vector de expresión que incluya adicionalmente un gen que codifica la proteína recombinante de interés mediante un procedimiento de clonación en el vector de expresión que contiene el módulo de alta expresión inducible, aislado de las líneas celulares, usando una técnica de recombinación génica.

[0037] En otro aspecto detallado, la presente invención proporciona una línea celular transformada con el vector de expresión que incluye adicionalmente un gen que codifica una proteína recombinante de interés.

[0038] En un aspecto preferido, la proteína recombinante de interés tiene que expresarse en células animales. Con respecto al fin de la presente invención, los ejemplos de células animales adecuadas para uso en la presente invención incluyen, pero sin limitación, células de carcinoma de ovario de hámster chino (CHO), células de riñón de mono (COS7), células NSO, células SP2/0, células W138, células de riñón de hámster recién nacido (BHK), células MDCK, células de mieloma, células HuT 78 y células 293. Los especialistas en la materia pueden seleccionar fácilmente una línea celular animal adecuada para uso en el sistema de amplificación basado en DHFR según la presente invención.

[0039] En la práctica, se usaron células CHO. Se usó detalladamente una línea celular de carcinoma de ovario de hámster chino deficiente en dihidrofolato reductasa (DHFR) (CHO/dhfr-). Es decir, se transformaron células CHO deficientes en DHFR con un vector de expresión que porta un gen que codifica eritropoyetina humana recombinante según la presente invención. En las células CHO transformadas, se encontró que el gen se amplificaba a un número suficiente de copias incluso a una concentración de metotrexato menor de 100 nM, e incluso menor de 50 nM, que era preferible. Por tanto, la presente invención proporciona dicha línea celular animal. Se depositaron los transformantes de CHO, que se describirán con detalle en los ejemplos, en el KCTC (Genetic Resources Center, KRIBB, Yusong-ku, Taejeon, Corea) el 2 de octubre de 2006, y se les asignaron los números de acceso KCTC 10993BP, KCTC 10994BP y KCTC 10995BP.

[0040] En aún otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de producción de una proteína recombinante que comprende transformar una línea celular animal con el vector de expresión para células animales según la presente invención, que incluye un gen que codifica dihidrofolato reductasa (DHFR), que contiene un promotor del que se han eliminado parcial o totalmente las secuencias ricas en GC y un gen que codifica la proteína recombinante; y cultivar la línea celular animal transformada.

[0041] En la presente invención, "transformación" en células animales incluye cualquier procedimiento mediante el que los ácidos nucleicos puedan introducirse en organismos, células, tejidos u órganos y, como es conocido en la materia, puede efectuarse seleccionando técnicas estándar adecuadas según las líneas celulares animales. Las células de mamífero que no tienen paredes celulares pueden transformarse usando precipitación con fosfato de calcio (Graham y col., 1978, *Virology*, 52: 456-457). Se describen los procedimientos y rasgos generales para la transformación en células hospedadoras de mamífero en la patente de EE.UU. nº 4.399.216. Detalladamente, se introdujo un vector que expresa una proteína recombinante en células CHO usando lipofectamina. Las células animales pueden cultivarse en un medio adecuado y en condiciones de cultivo adecuadas, que son conocidas en la materia. Las condiciones de cultivo pueden ajustarse fácilmente por los especialistas en la materia para ser adecuadas para las líneas celulares animales seleccionadas. El cultivo puede efectuarse en una suspensión o en estado adherente según los rasgos de crecimiento de las células según cualquiera de cultivo discontinuo, cultivo discontinuo en lecho y cultivo continuo. El medio usado para el cultivo debería satisfacer los requisitos de crecimiento de las líneas celulares específicas.

[0042] El medio usado en el cultivo celular animal contiene una variedad de fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno y oligoelementos. Los ejemplos de fuentes de carbono disponibles incluyen carbohidratos tales como glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, almidón y celulosa; grasas tales como aceite de soja, aceite de girasol, aceite de ricino y aceite de coco; ácidos grasos tales como ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico; alcoholes tales como glicerol y etanol y ácidos orgánicos tales como ácido acético. Estas fuentes de carbono pueden usarse individualmente o en combinaciones de dos o más. Los ejemplos de fuentes de nitrógeno disponibles incluyen fuentes de nitrógeno orgánicas tales como peptona, extracto de levadura, extracto de carne, extracto de malta, licor de maceración del maíz (CSL) y suero de soja, y fuentes de nitrógeno inorgánicas tales como urea, sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio. Estas fuentes de nitrógeno pueden usarse individualmente o en combinaciones de dos o más. El medio puede incluir adicionalmente aminoácidos, vitaminas, precursores adecuados y similares.

[0043] También el medio puede complementarse con un inhibidor de DHFR, tal como metotrexato. Esto es debido a que, como se describe anteriormente, la presente invención se dirige a establecer eficazmente en un tiempo corto un sistema mediante el que se amplifica un gen de DHFR portado en un vector y se selecciona transformando células animales deficientes en DHFR con un vector de expresión según la presente invención, y dosificando a las células un inhibidor de DHFR para amplificar un gen recombinante.

[0044] En una realización preferida, se usa preferiblemente un inhibidor de DHFR a una concentración lo más baja posible durante un corto periodo de tiempo con respecto a la estabilidad de las líneas celulares y al coste de producción. Es decir, el uso de un inhibidor de DHFR a baja concentración asegura la producción en masa estable de una proteína de interés y acorta el tiempo necesario para el desarrollo de una línea celular de expresión. Detalladamente, la presente invención proporciona un procedimiento de producción de una proteína recombinante mediante la transformación de células CHO deficientes en DHFR con el vector de expresión de proteína recombinante y dosificando las células con metotrexato menos de 100 nM, y preferiblemente metotrexato menos de 50 nM.

[0045] Cuando se produce eritropoyetina en la línea celular anteriormente mencionada, el procedimiento puede incluir adicionalmente purificar a gran escala eritropoyetina que tiene un alto contenido de ácido siálico, lo que confiere una actividad biológica potenciada a la eritropoyetina.

[0046] En una realización de la presente invención, se volvieron inactivas las secuencias ricas en GC contenidas en el promotor de DHFR de modo que se minimizara la expresión de DHFR, y se amplificó entonces el gen de DHFR mediante la adición de un inhibidor de DHFR. Se sometieron las células transformadas en que ocurre la amplificación génica a dilución limitante para obtener poblaciones clonales derivadas de células individuales. Se cultivaron los clones monocelulares así obtenidos en un medio exento de suero a gran escala para producir eritropoyetina humana recombinante. Basándose en el hecho de que la eritropoyetina (EPO) que tiene un alto contenido de ácido siálico eluye a una concentración salina baja y que la EPO que tiene un bajo contenido de ácido siálico eluye a una concentración salina alta, se aplicó la EPO producida en una columna y se eluyó de la columna con un gradiente salino creciente. Se encontró que la actividad de la EPO purificada, que tenía un alto contenido de ácido siálico, estaba intacta.

Modo de la invención

[0047] Puede obtenerse una mejor comprensión de la presente invención mediante los siguientes ejemplos, que se exponen para ilustrar, pero no se consideran como límites de la presente invención.

[0048] EJEMPLO 1: Construcción de vectores de expresión que contienen secuencias ricas en GC completas o truncadas

[0049] Se prepararon módulos de expresión del gen de DHFR de modo que se situara el gen de DHFR bajo el control de un promotor truncado del que se han eliminado algunas secuencias repetidas ricas en GC como sigue.

Para amplificar un gen de DHFR, se llevó a cabo una PCR usando un plásmido pSV2-dhfr (ATCC nº 37146) con un par de cebadores: el cebador dhfr-01 que tiene un sitio SmaI (5'-GCG CCC GGG ATG GTT CGA CCA TTG AAC TGC-3') y el cebador dhfr-02 que tiene un sitio BstBI (5'-CAC TTA GAA CCT GTT AGT CTT TCT TCT CGT AGA C-3'). Se sometió a electroforesis un producto de PCR de aproximadamente 200 pb en un gel de agarosa al 1% y se purificó usando un kit de extracción en gel (QIAGEN, nº de cat. 28706). Se clonó el fragmento de ADN en un vector pDRIVE (Qiagen) y se sometió a secuenciación de ADN. La secuenciación de ADN reveló que el gen de DHFR amplificado no tenía errores. Se digirió entonces el plásmido pDRIVE-dhfr con SmaI y BstBI para escindir el gen de DHFR y se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1,5%. Se purificó un fragmento del gen de DHFR de aproximadamente 200 pb usando un kit de extracción en gel (QIAGEN, nº de cat. 28706) y se insertó en pcDNA 3.1 (Invitrogen), que se había predigerido con las mismas enzimas de restricción. Usando el plásmido pcDNA3.1-dhfr resultante como molde, se efectuó una PCR en un estado en que se usaron cebadores que tenían un sitio BamHI y eran complementarios de diferentes secuencias repetidas ricas en GC, x 1GC (5'-TCA GGA TCC ATT CTC CGC CCC ATG GCT GAC TAA-3'), x 3GC (5'-CAT GGA TCC TAA CTC CGC CCA GTT CCG CCC ATT CT-3') y x 6GC (5'-CAT GGA TCC CAT AGT CCC GCC CCT AAC TCC GCC C-3') y un cebador que tenía un sitio BamHI y era complementario de una secuencia señal de poliadenilación ligada estructuralmente con el gen de DHFR BISVpAR (5'-TCA GGA TCC CAG ACA TGA TAA GAT ACA TTG ATG -3') para obtener dos módulos génicos que contienen secuencias ricas en GC parcialmente truncadas y un módulo génico que contiene secuencias ricas en GC completas. Se insertaron entonces los módulos génicos en pcDNA 3.1 (Invitrogen), que se había predigerido con BglII. Se seleccionaron clones que tienen la misma orientación que el promotor de CMV del vector usando cartografía de restricción, obteniéndose así los plásmidos X1GC/dhfr, X3GC/dhfr y X6GC/dhfr. Se obtuvo un gen de eritropoyetina a partir de ADN genómico humano y se clonó en cada uno de los plásmidos. Además, como control, se construyó como sigue un vector de expresión que contiene un promotor de DHFR del que se habían eliminado todas las secuencias ricas en GC.

[0050] Para obtener un gen de DHFR y una secuencia de poliadenilación vírica de SV40, se sintetizaron los cebadores que contienen un sitio BamHI, X0GC (5'-CGA TGG ATC CGA CAT GAT AAG ATA CAT TGA T-3') y X0GCRR (5'-CGT TGG ATC CAC AGC TCA GGG CTG CGA TTT C-3'). Se llevó a cabo la PCR usando pSV2-dhfr como molde con los cebadores. Se obtuvo un producto de 1,5 kb, que se extiende desde la secuencia de poliadenilación vírica de SV40 hasta la región 5' no codificante del gen de DHFR. Se sometió a electroforesis el fragmento de ADN amplificado en gel de agarosa al 1%, se purificó usando un kit de extracción en gel (QIAGEN, nº de cat. 28706) y se insertó en pcDNA 3.1 (Invitrogen), que se había predigerido con BglII. Se seleccionó un clon en que el gen de DHFR tenía la orientación opuesta a la del promotor de CMV usando cartografía de restricción. Se digirió el sitio de multiclonación del vector con NdeI y DraIII para eliminar algunos sitios de reconocimiento de enzima de restricción, se insertó el fragmento génico escindido en pRcCMV (Invitrogen) y se predigirió con las mismas enzimas de restricción, obteniendo así el vector X0GC/dhfr.

[0051] Los procedimientos de clonación se muestran esquemáticamente en las FIG. 1 y 2.

[0052] **EJEMPLO 2:** Clonación del gen cepo

[0053] Se digirió un plásmido pCI-neo/gEPO con XhoI y EcoRI, se rellenó con el fragmento Klenow de una ADN polimerasa I en sus extremos cohesivos para generar extremos romos y se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,7%. Se purificó un fragmento de ADN de aproximadamente 2,2 kb, correspondiente al gen de EPO humano genómico, usando un kit de extracción en gel (QIAGEN, nº de cat. 28706). Se digirió un vector pRcCMV (Invitrogen) con EcoRV y se purificó usando un kit de purificación (QIAGEN, nº de cat. 28106). Se ligó el gen de EPO genómico en el sitio EcoRV del vector. Se seleccionó un clon en que el gen de EPO tenía la misma orientación que el promotor de CMV usando cartografía de restricción. Se digirieron los vectores X0GC/dhfr, x1GC/dhfr, x3GC/dhfr y x6GC/dhfr preparados en el ejemplo 1 con BamHI y XhoI, se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 0,7% y se purificaron usando un kit de extracción en gel (QIAGEN, nº de cat. 28706). Según el mismo procedimiento, se purificó el fragmento del gen de EPO genómico, clonado en pRcCMV, y se insertó en los sitios BamHI/XhoI del sitio de multiclonación de los vectores x0GC/dhfr, x1GC/dhfr, x3GC/dhfr y x6GC/dhfr. Se confirmó que los vectores así obtenidos no tenían errores mediante secuenciación de ADN, y se designaron X0GC/GEPO, X1GC/GEPO, X3GC/GEPO y X6GC/GEPO, respectivamente. Se muestra esquemáticamente el procedimiento de clonación en la FIG. 3 y se muestra cada secuencia nucleotídica final en la lista de secuencias acompañante.

[0054] **EJEMPLO 3:** Transformación de células CHO deficientes en DHFR

[0055] Se subcultivaron células CHO deficientes en DHFR (cepas CHO/DXB11 y CHO/DG44) en medio DMEM/F12 (Welgene, nº de cat. LM002-04) complementado con 10% de suero bovino fetal (Welgene, nº de cat. S101-01) y 1% de penicilina-estreptomina (Gibco, nº de cat. 15140-122) en una incubadora con 5% de CO₂ a 37°C. Para transformar las células CHO deficientes en DHFR con los plásmidos X0GC/GEPO, X1GC/GEPO, X3GC/GEPO y X6GC/GEPO, se sembraron 1 x 10⁶ células en discos de cultivo de 6 cm, se cultivaron durante 24 horas en incubadora con 5% de CO₂ a 37°C y se lavaron con medio Opti-MEM (Gibco, nº de cat. 31985-070) dos veces. Se mezcló 1 ml de reactivo Lipofectamine™ (Invitrogen, nº de cat. 18324-020) con 10 µg de cada ADN plasmídico en 1 ml de Opti-MEM y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 20 min. Se depositaron los complejos de ADN-lipofectamina en las células CHO deficientes en DHFR preparadas y se cultivaron las células durante 18 h en una

incubadora con 5% de CO₂ a 37°C. Se intercambió entonces el medio por medio DMEM/F12 complementado con 10% de FBS y 1% de penicilina-estreptomicina y se cultivaron adicionalmente las células durante 48 horas. Para seleccionar las células transformadas, se trataron las células con tripsina-EDTA al 0,5% (Gibco., n° de cat. 15400-054), se recogieron mediante centrifugación y se sembraron en un matraz de cultivo T25 que contenía medio de selección α -MEM (Welgene, n° de cat. LM008-02), complementado con 10% de FBS dializado (Welgene) y 1% de penicilina-estreptomicina y geneticina 800 μ g/ml (Mediatech, n° de cat. 61-234 RG). Se dejaron crecer las células en una incubadora con 5% de CO₂ a 37°C hasta que alcanzaron más de un 90% de confluencia. Se continuó la selección de células transformadas usando la misma concentración de geneticina y en las mismas condiciones de cultivo. Cuando se eliminó un número mayor de secuencias repetidas ricas en GC, se seleccionaron las células transformadas más rápidamente. No se observó una diferencia significativa entre las cepas de CHO deficientes en DHFR.

[0056] EJEMPLO 4: Selección de líneas celulares recombinantes y amplificación del gen de EPO

Para aumentar los niveles de expresión de EPO en las células transformadas (cepa CHO/DXB 11 o cepa CHO/DG44) seleccionadas usando geneticina, se sembraron 2×10^4 células en una placa de 24 pocillos que contenía el mismo medio de selección que se describe anteriormente, complementado con metotrexato 20 nM (MTX, Sigma, n° de cat. M-8407), y se cultivaron durante dos semanas en una incubadora con 5% de CO₂ a 37°C. Para seleccionar las células transformadas que expresan EPO a altos niveles, cuando las células alcanzaron un 100% de confluencia, se lavaron con PBS (Welgene, n° de cat. LB 001-02) dos veces y se añadieron 200 μ l de un medio de producción de EPO, CHO-A-SFM (Gibco, n° de cat. 05-5072EF), a cada pocillo. Después de cultivar las células durante 24 horas, se recogieron los sobrenadantes de cultivo y se analizaron usando un kit EPO ELISA (R&D Systems, n° de cat. DEP00). Además, se cultivaron las células transformadas durante dos semanas en el medio de selección complementado con MTX 30 nM, y se midieron los niveles de expresión de EPO de las células transformadas usando un kit ELISA (ensayo de inmunosorción ligado a enzima) (R&D Systems, n° de cat. DEP00). Como se muestra en las FIG. 4 a 7, los plásmidos X0GC/GEPO y X1GC/GEPO exhibieron los niveles de expresión de EPO mayores a las mismas concentraciones de MTX, seguidos por X3GC/GEPO y X6GC/GEPO. Estos resultados indican que la eliminación de un mayor número de secuencias repetidas ricas en GC aumenta la amplificación génica a la misma concentración de MTX. Además, se encontró que X0GC/GEPO, del que se eliminaron todas las secuencias repetidas ricas en GC, era eficaz en la amplificación génica. Por tanto, se encontró que la amplificación génica se maximizaba cuando las secuencias repetidas ricas en GC estaban presentes en un número mínimo. Además, cuando la concentración de MTX se aumentaba a 40 nM a 60 nM en el medio de selección para determinar la concentración de MTX que maximizaba la expresión génica, no se observó un aumento significativo de la expresión génica o del contenido de isómero ácido. Basándose en estos resultados, se sometieron dos cepas de CHO transformadas con X0GC/GEPO y X1GC/GEPO a dilución limitante, como se describe en el ejemplo 6.

[0058] EJEMPLO 5: Evaluación de la amplificación génica de DHFR

Se lavaron las células transformadas obtenidas en el ejemplo 4 con D-PBS una vez, se separaron de un matraz de cultivo usando tripsina-EDTA y se centrifugaron durante 3 min a 1.000 rpm. Se lavaron las células recogidas con D-PBS una vez y se contaron usando un hemacitómetro (Incyto). Después de centrifugar 3×10^6 células, se suspendió el sedimento celular en 1,5 ml de tampón de lisis celular (PBS, EDTA 5 mM, 1% de NP-40), se desestabilizó a 4°C durante 30 min y se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 min obteniéndose el sobrenadante.

Se mezclaron 20 μ l de cada lisado celular, y un lisado celular de CHO/dhfr- como control negativo, con 10 μ l de tampón de muestra, se hirvieron a 100°C durante 5 min y se cargaron en un gel de PAGE-SDS al 12,5%. Como control positivo, se mezclaron 20 ng a 100 ng de dihidrofolato reductasa (Sigma, n° de cat. D6566) con el tampón de muestra y se cargaron en el gel de PAGE-SDS. Se sometió el gel a electroforesis a 30 mA. Se dispuso entonces el gel en una membrana de PVDF y se situó entre dos papeles de filtro Whatman 3M. Se transfirieron las proteínas a la membrana de PVDF durante 1 hora a 90 mA usando una unidad de transferencia Hoefer Semi-Phor Semi-Dry. Se sondeó entonces la transferencia con anticuerpo de ratón anti-DHFR (diluido 1:500, BD Biosciences, n° de cat. 610697) en 10 ml de TBS-T que contiene leche desnatada al 0,5% durante 1 h con agitación suave. Se lavó la transferencia con TBS-T 5 veces durante 10 min cada vez, y se incubó con anticuerpo anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (diluido 1:3000, Amersham Biosciences, n° de cat. RPN2108) en 10 ml de TBS-T que contiene leche desnatada al 0,5% durante 1 h con agitación suave. Después de lavar la transferencia con TBS-T 5 veces durante 10 min cada vez, se mezclaron los reactivos de detección 1 y 2 de un sistema de análisis de transferencia Western ECL (Amersham Biosciences, n° de cat. RPN2108) a una relación 1:1, se añadieron a la transferencia y se dejaron reaccionar durante 1 min. Se expuso la transferencia a una película de rayos X y se reveló la película. Se muestran los resultados de la transferencia Western en la FIG. 9. Como se muestra en la FIG. 9, las células transformadas exhibían una expresión génica de DHFR aumentada. Las células transformadas con X0GC/GEPO y X1GC/GEPO exhibían mayor expresión de DHFR a la misma densidad celular.

[0061] EJEMPLO 6: Aislamiento y selección de clones monocelulares

Se transfirieron células transformadas con X0GC/GEPO y X1GC/GEPO, que se encontró que tenían la

mayor expresión de EPO en el ejemplo 4, a placas de cultivo de 6 pocillos. Para aislar clones monocelulares, se efectuó una dilución limitante para alcanzar una densidad de 0,5 células por pocillo de una placa de 96 pocillos usando el medio de selección complementado con metotrexato, y se sembraron las células en la placa. Se incubó la placa de 96 pocillos durante aproximadamente dos o tres semanas en una incubadora con 5% de CO₂ a 37°C. Se seleccionaron los pocillos que contienen colonias individuales y se transfirieron las colonias individuales a placas de 24 pocillos y se dejaron crecer. Se midieron los niveles de expresión de EPO usando ELISA indirecta como se describe en el ejemplo 4.

[0063] Finalmente, se aislaron como clones monocelulares los clones X0GC/GEP09647(DXB11), X1GC/GEP09629(DG44) y X0GC/GEP09603, que mostraron altos niveles de expresión y una alta relación de isómero ácido respecto a los dímeros de enfoque isoeléctrico, y se ensayaron entonces los niveles de expresión y patrones diméricos de enfoque isoeléctrico.

[0064] Se encontró que el clon X0GC/GEP09647(DXB11) tenía un nivel de expresión de aproximadamente 80 µg/10⁶ células/día. Estos resultados indican que X0GC/GEPO o X1GC/GEPO posibilitan el establecimiento de una línea celular de alta expresión solo mediante una amplificación génica de dos etapas, facilitando así el establecimiento de un clon monocelular para la producción de proteína con cultivo de bajo pase.

[0065] **EJEMPLO 7: Cultivo a gran escala de clones monocelulares**

[0066] Para la producción en masa de EPO humana, se subcultivó el clon X0GC/GEPO9647(DXB 11), entre los clones monocelulares seleccionados en el ejemplo 6, en un matraz T-175 y se propagó por etapas hasta 120 matraces T-175. Se sembraron 8 Cell Factories (Nunc, n° de cat. 170009) con aproximadamente 2,5 X 10⁸ células por Cell Factory y se incubaron en una incubadora con 5% de CO₂ a 37°C durante aproximadamente 48 h. Después de lavar cada Cell Factory con 1 l de tampón fosfato dos veces, se realimentaron las células con 1 l de medio de producción en masa de EPO CHO-A-SFM (Gibco, n° de fórmula 05-5072EF), complementado con butirato de sodio 0,3 mM (Sigma, n° de cat. B-5887) y se cultivaron en una incubadora con 5% de CO₂ a 33°C. Se recogieron los sobrenadantes de cultivo que contenían EPO expresada nueve veces cada dos días. Se eliminaron los sólidos en suspensión incluyendo desechos celulares de los sobrenadantes de cultivo usando una centrífuga y un filtro de 0,2 µm. Se ensayaron entonces los niveles de expresión de EPO en los sobrenadantes de cultivo usando ELISA indirecto y el contenido de dímero de enfoque isoeléctrico ácido usando el enfoque isoeléctrico. Como se muestra en la FIG. 10, se encontró que el clon expresaba EPO a un alto nivel de 40-50 mg/l incluso en cultivo a gran escala. Se encontró que la EPO expresada tenía un alto contenido de los isómeros n° 6 a 8, que son indicativos de un alto contenido de ácido siálico, a pesar de no haberse sometido a un proceso de purificación.

[0067] **EJEMPLO 8: Aislamiento y purificación de EPO humana que tiene un alto contenido de ácido siálico**

[0068] Se centrifugaron los sobrenadantes celulares preparados en el ejemplo 7 a 7.000 rpm usando una centrífuga Beckman XL-90 equipada con un rotor JLA-8.1000 para eliminar las sustancias en suspensión. Se recuperó el sobrenadante de centrifugación y se pasó a través de un filtro de 0,2 µm y entonces a través de una membrana de ultrafiltración para concentrarlo a 1/10 de volumen. Se mezcló el concentrado con un volumen igual de fosfato de sodio 20 mM (pH 7,4) y se cargó en una columna Blue FF (Amersham), que se había preequilibrado con fosfato de sodio 20 mM (pH 7,4). Se lavó la columna con 5 volúmenes de columna de fosfato de sodio 20 mM (pH 7,4). Se eluyó la EPO de la columna con dos volúmenes de columna de un gradiente lineal de tampón B (fosfato de sodio 20 mM, pH 7,4) más NaCl 2 M.

[0069] Se combinaron las fracciones principales que contienen EPO, se desalaron en una columna Sephadex G-25 en fosfato de sodio 20 mM, pH 5,4, y se cargaron en una columna SP HP (Amersham), preequilibrada con fosfato de sodio 20 mM, pH 5,4. Se lavó la columna con 5 volúmenes de columna de fosfato de sodio 20 mM, pH 5,4. Se eluyó la EPO de la columna con 12 volúmenes de columna de un gradiente lineal de tampón B (fosfato de sodio 20 mM, pH 7,4) más NaCl 1 M. Basándose en el hecho de que la EPO que tiene un alto contenido de ácido siálico se eluye a una baja concentración salina, y que la EPO que tiene un bajo contenido de ácido siálico se eluye a una alta concentración salina, se excluyeron las fracciones eluidas con altas concentraciones salinas, que dan cuenta de un 30% de las fracciones totales, y se recogieron las fracciones restantes. Se combinaron las fracciones de EPO purificada usando la columna SP HP, se desalaron en una columna Sephadex G25 en Tris 10 mM, pH 7,5, y se cargaron en una columna Source 15 Q (Amersham), preequilibrada con Tris 10 mM, pH 7,5. Se eluyó la EPO de la columna con 6 volúmenes de columna de un gradiente lineal de tampón B (Tris 10 mM, pH 7,5) más NaCl 0,25 M. Se recogieron más de 15 fracciones que contenían EPO. Se analizó la distribución de isómeros cargados en cada fracción usando PAGE-SDS, enfoque isoeléctrico y electroforesis en zona capilar (CZE). Se combinaron finalmente las fracciones que contienen EPO que tiene 10 restos de ácido siálico y no contienen impurezas con las fracciones de alta salinidad. Mediante el procedimiento de purificación, se produjo EPO humana recombinante que contenía más de 10 moles de ácido siálico a un rendimiento de aproximadamente 20 µg/ml.

[0070] **EJEMPLO 9: Evaluación de las propiedades de la EPO**

[0071] 1) PAGE-SDS y transferencia Western

[0072] Se sometió a electroforesis la EPO recombinante purificada en el ejemplo 8 en dos geles de PAGE-SDS al 12%. Se tiñó un gel con azul brillante de Coomassie y se destiñó. Se puso el otro gel en una membrana de PVDF (Roche) usando una unidad de transferencia Semi-Dry. Se sondeó entonces la transferencia con un anticuerpo anti-EPO humana (diluido 1:5.000, R & D Systems, nº de cat. AB-286-NA). Se lavó la transferencia y se incubó con anticuerpo de conejo anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Amersham, nº de cat. NA934V). Se lavó suficientemente la transferencia con Tween 20 al 0,5% en tampón fosfato y se trató con los reactivos de detección de transferencia Western Amersham ECL (nº de cat. RPN2108). Se expuso la transferencia a una película en sala oscura y se reveló la película usando un revelador automático. Se encontró que eran EPO bandas en el gel de PAGE-SDS, y resultaron bandas de EPO de diferentes tamaños por el grado de glucosilación de la EPO (véase la FIG. 10).

[0073] 2) Enfoque isoelectrico (IEF)

[0074] Se mezclaron el concentrado de sobrenadante de cultivo y la EPO recombinante purificada en el ejemplo 4 con un tampón de muestra (Invitrogen, nº de cat. LC5371) a una relación 1:1, y se cargaron en un gel de enfoque isoelectrico (Invitrogen, nº de cat. EC6655B) junto con hEPO recombinante BRP (European Pharmacopoeia Commission, nº de cat. E1515000) y un marcador estándar de IEF. Se inició el enfoque isoelectrico a un voltaje bajo y se llevó a cabo entonces a un voltaje alto. Se fijó el gel de IEF con una disolución fijadora que contenía 12% de TCA y 3% de ácido sulfosalicílico durante 30 min con agitación suave, y se tiñó con azul brillante de Coomassie R250 (Amresco, nº de cat. 6104-59-2). Se observó EPO a los puntos isoelectricos de la misma (véase la FIG. 11).

[0075] 3) Evaluación de la valoración y actividad usando células TF-1

[0076] Se cultivaron células TF-1 (ATCC, nº de cat. CRL-2003) en RPMI 1640 (Welgene, nº de cat. LM 011-03) complementado con 10% de FBS, β -mercaptoetanol 10 μ M, transferrina 20 μ g/ml y GM-CSF 12 ng/ml, y se recogieron mediante centrifugación a 1.000 rpm durante 5 min. Se lavaron entonces las células TF-1 con tampón fosfato dos veces, y se lavaron una vez con un medio de ensayo que contenía 2% de FBS, transferrina 100 μ g/ml, suero bovino exento de proteasa 2 mg/ml y 1% de penicilina-estreptomycin. Se añadieron 50 μ l del medio de ensayo a cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Se añadieron 25 μ l de una muestra y un patrón a un primer pocillo y se diluyó en serie tres veces hasta una concentración final de 1 μ g/ml. Se añadieron las células TF-1, lavadas con el medio de ensayo, a cada pocillo a una densidad de $2 \times 10^4/50 \mu$ l/pocillo. Después de incubar la placa en una incubadora con 5% de CO₂ a 37°C durante aproximadamente 72 h, se añadieron 20 μ l de reactivo CellTiter One Solution (Promega, nº de cat. G4102) a cada pocillo. Se incubó la placa en una incubadora con 5% de CO₂ a 37°C durante 4 h para el desarrollo del color. Después de agitar bien la placa, se midió la absorbancia a 490 nm usando un lector ELISA (Molecular Dynamics). No se observó una diferencia notable entre la actividad de la EPO recombinante expresada por X0GC/GEPO y la de la forma patrón.

[0077] **EJEMPLO 10:** Adaptación de clones monocelulares a medio exento de suero

[0078] Se cultivaron cepas X1GC/GEPO9629(DG44) y X0GC/GEPO9603(DG44) para alcanzar más de un 90% de confluencia en dos matraces T-175 que contenían medio de selección, α -MEM (Welgene, nº de cat. LM008-02) completado con 10% de suero bovino fetal dializado, 1% de penicilina-estreptomycin y geneticina 800 μ g/ml (Mediatech, nº de cat. 61-234 RG). Se separaron las células con 0,5% de tripsina (Gibco, nº de cat. 15400-054) y se centrifugaron. Se suspendió el sedimento celular en medio EX-CELL CD CHO de JRH (nº de cat. 14360) complementado con glutamina 8 mM. Se dispuso la suspensión celular en medio exento de suero en un matraz T-175 y se sometió a cultivo estacionario en una incubadora de CO₂. Después de 3 días, se recogieron las células en suspensión mediante centrifugación y se transfirieron a un matraz T-25, seguido de cultivo estacionario. Después de 9 días, se recogieron de nuevo las células en suspensión y se ensayaron el número de células, la velocidad de crecimiento y la viabilidad. Se repitió este procedimiento hasta que ocurrió la división celular en aproximadamente 24 horas y la viabilidad celular alcanzó más de un 80%. Para determinar los patrones de expresión de las células X0GC/GEPO9603(DG44) y X1GC/GEPO9629(DG44) asimiladas completamente a la condición sin suero, se inocularon $1,0 \times 10^5$ células/ml en un matraz de agitación de 500 ml (Bellco) que contenía 200 ml de medio de cultivo y se cultivaron con agitación a 50 rpm. Después de 7 días, se intercambiaron 100 ml del medio por medio reciente y se cultivaron las células a 33°C. Se recogieron los sobrenadantes de cultivo a intervalos de 24 h y se ensayó el contenido de isómero ácido de la EPO expresada. Como se muestra en la FIG. 12, las células X0GC/GEPO9603(DG44) y X1GC/GEPO9629(DG44), completamente asimiladas a una condición exenta de suero, exhibían perfiles de enfoque isoelectrico similares a los de la EPO convencional producida en una Cell Factory.

60 Aplicabilidad industrial

[0079] Como se describe a continuación en la presente memoria, la presente invención proporciona vectores que contienen un promotor de DHFR del que se han eliminado parcial o totalmente secuencias ricas en GC y líneas celulares transformadas con los vectores. Los vectores posibilitan la selección de una línea celular productora de EPO humana en menos tiempo usando una concentración menor de inhibidor de DHFR, acortando así el tiempo necesario para establecer una línea celular que produce altos niveles de EPO. Además, las líneas celulares son

capaces de producir en masa una proteína recombinante con alto rendimiento. Por tanto, la presente invención es capaz de mejorar más eficazmente un sistema de amplificación génica, que es una estrategia para producir una proteína deseada en células animales.

- 5 <110> Hanni Pharm Co., Ltd.
 <120> Un vector y una línea celular de expresión novedosos para la producción en masa de una proteína recombinante y un proceso para producir proteína recombinante usando los mismos
 <160> 18
 <170> Kopatent In 1.71
 10 <210> 1
 <211> 9227
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> vector X0GC/GEPO
 <400> 1

```

gacggat cgg gagat cgcac at gat aagat acat igat ga gt tt ggacaa accacaact a      60
gaat gcagt g aaaaaaat gc ttt at tt gt g aaat tt gt ga t gct at t gct tt at tt gt aa      120
ccat t at aag ct gcaat aaa caagt t aaca acaacaat t g cat t cat t tt at gt tt cagg      180
tt caggggga ggt gt gggag gt t t t t t aaa gcaagt aaaa cct ct acaaa t gt ggt at gg      240
ct gat t at ga t ct ct agt ca aggcact at a cat caaat at t cct t at t aa cccct tt aca      300
aat t aaaaag ct aaaggt ac acaat t t t g agcat agt t a tt aat agcag acact ct at g      360
cct gt gt gga gt aagaaaaa acagt at gt t at gat t at aa ct gt t at gcc t act t at aaa      420
gggt t acagaa t at t t t t cca t aat t t t ct t gt at agcagt gcagct t t t cct t t gt ggt      480
gt aat agca aagcaagcaa gagt t ct at t act aaacaca gcat gact ca aaaaact t ag      540
caat t ct gaa ggaaagt cct t ggggt ct t c t acct t t ct c t t ct t t t t g gaggagt aga      600
at gt t gagag t cagcagt ag cct cat cat c act agat ggc at t t ct t ct g agcaaaacag      660
gt t t t cct ca t t aaaggcat t ccaccact g ct cccat t ca t cagt t ccat aggt t ggaat      720
ct aaaa t aca caaacaat t a gaat cagt ag t t t aacacat t at acact t a aaaa t t t at      780
at t t acct t a gagct t t aaa t ct ct gt agg t agt t t gt cc aat t at gt ca caccacagaa      840
gt aaggt t cc t t cacaaga t ccaaagcca gcaaaagt cc cat ggt ct t a t aaaaat gca      900
t agct t t agg aggggagcag agaact t gaa agcat ct t cc t gt t agt ct t t ct t ct cgt a      960
gact t caaac t t at act t ga t gcc t t t t c ct cct ggacc t cagagagga cgcct ggg t a      1020
t t ct gggaga agt t t at at t t ccccaaat c aat t t ct ggg aaaaacgt gt cact t t caaa      1080
t t cct gcat g at cct t gt ca caaagagt ct gaggt ggcct ggt t gat t ca t ggct t cct g      1140
gt aaacagaa ct gcct ccga ct at ccaaac cat gt ct act t t act t gcca at t cgggt t g      1200
t t caata agt ct t aaggcat cat ccaaact t t ggcaaga aaat gagct c ct cgt ggt gg      1260
t t ct t t gagi t ct ct act ga gaact at at t aat t ct gt cc t t t aaaggt c gat t ct t ct c      1320
aggaat ggag aaccaggt t t t cct acctat aat caccaga t t ct gt t t ac ct t cact ga      1380
agaggt t gt g gt cat t ct t t ggaagt act t gaact cgt t c ct gagcggag gccaggg t ag      1440
gt ct ccgt t c t t gccaat cc ccat at t t t g ggacacggcg acgat gcagt t caat ggt cg      1500

```

aacat gat g gcagcgggga taaaat cct a ccagcct t ca cgc aggat t gccgt caagi	1560
ttggcgcgaa atcgcagccc t gacgt gt gg at ct cccgat cccct at ggt gcact ct cag	1620
tacaat ct gc t ct gat gccg cat agt t aag ccagt at ct g ct cccct gct t gt gt gt t gga	1680
ggt cgcgt gag t agt gcgcga gcaaaat t t a agct acaaca aggcaaggct t gaccgacaa	1740
ttgcat gaag aat ct gct t a ggggt aggcg t t t t gccgt g ct t cgcgat g t acggggccag	1800
at at acgcgt t gacat t gat t at t gact ag t t at t aat ag t aat caat t a cgggggt cat t	1860
agt t cat agc ccat at at gg agt t ccgcgt t acat aact t acgggt aat g gcccgcct gg	1920
ct gaccgccc aacgaccccc gcccat t gac gt caat aat g acgt at gt t c ccat agt aac	1980
gccaat aggg act t t ccat t gacgt caat g ggt ggagt at t t acgggt aaa ct gccact t	2040
ggcagt acat caagt gt at c at at gccaaag t acgccccct at t gacgt ca at gacgggt aa	2100
at ggccccgc t ggcat t at g ccaggt acat gacct t at gg gact t t cct a ct t ggcaat a	2160
cat ct acgt a t t agt cat cg ct at t accat ggt gat gccg t t t t ggcaat acat caat gg	2220
gcgt ggat ag cgggt t gact cacggggat t t ccaagt t c caccocat t g acgt caat gg	2280
gagtt t gt t t t ggccacaaa at caacggga ct t t ccaaaa t gt cgt aaca act ccgcccc	2340
at t gacgaa at gggcgggt a ggcgt gt acg gt gggagggt c t at at aagca gagct ct ct g	2400
gct aact aga gaaccact g ct t act ggct t at cgaaat t aat acgact c act at aggga	2460
gacccaagct t ggt accgag ct cggat cca ct agt aacgg ccgccagt gt gct ggaat t c	2520
tgcagat t cg aggt cgacgg t at cgat aag ct t ccaagcg cggagat ggg ggt gcacgggt	2580
gagt act cgc gggct gggcg ct cccgcccc cccgggt ccc t gt t t gagcg gggat t t agc	2640
gccccggct a t t ggccagga ggt ggt ggg t t caaggacc ggcgact t gt caaggacccc	2700
ggaaggggga ggggggt ggg gcagcct cca cgt gccagcg gggact t ggg ggagt cct t g	2760
gggt ggcaaa aaacct gacc t gt gaagggt acacagt t t g ggggt t gagg ggaagaaggt	2820
t t ggggt t c t gct gt gcca gt ggagagga agct gat aag ct gat aacct gggcgt gga	2880
gccaccact t at ct gccaga ggggaagcct ct gt cacacc aggal t gaag t t t ggccgga	2940
gaagt ggat g ct ggt agct g ggggt ggggt gt gcacacgg cagcaggat t gaat gaaggc	3000
caggagggca gcacct gact gct t gcat gg t t ggggacag gaaggacgag ct ggggcaga	3060
gacgt gggga t gaaggaagc t gt cct t cca cagccaccct t ct cct ccc cgcct gact c	3120
t cagcct ggc t at ct gt t ct agaat gt cct gcct ggct gt ggc t t ct cct gt cct gct g	3180
t cgt cct c t t gggcct ccc agt cct gggc gccccaccac gcci cat ct g t gacagccga	3240
gt cct ggaga ggt acct ct t ggaggccaag gaggccgaga at at cacggt gagaccct t	3300
ccccagcaca t t ccacagaa ct cacgct ca gggct t cagg gaact cct cc cagat ccagg	3360
aacct ggcac t t ggt t t agg gt ggagt t gg gaagct agac act gcccccc t acat aagaa	3420
t aagt ct ggt gggcccaaac cat acct gga aact aggcaa ggagcaaagc cagcagat cc	3480
t acggcct gt gggccagggc cagagcct t c agggaccct t gact ccccg gct gt gt gca	3540

t t t c a g a c g g g c t g t g c t g a a c a c t g c a g c t t g a a t g a g a a t a t c a c t g t c c c a g a c a c c	3600
a a a g t t a a t t t c t a t g c c t g g a a g a g g a t g g a g g t g a g t t c c t t t t t t t t t t t t t t c c t	3660
t t c t t t t g g a g a a t c i c a t t t g c g a g c c t g a t t t t g g a t g a a a g g g a g a a t g a t c g a g g g	3720
a a a g g t a a a a t g g a g c a g c a g a t g a g g c t g c c t g g g c g c a g a g g c t c a c g t c i a t a a t	3780
c c c a g g c t g a g a t g g c c g a g a t g g g a g a a t t g c t t g a g c c c t g g a g t t t c a g a c c a a c c t	3840
a g g c a g c a t a g t g a g a t c c c c c a t c t c t a c a a a c a t t t a a a a a a t t a g t c a g g t g a a g t	3900
g g t g c a t g g t g g t a g t c c c a g a t a t t t g g a a g g c t g a g g c g g g a g g a t c g c t t g a g c c c a	3960
g g a a t t t g a g g c t g c a g t g a g t g a g c t g i g a t c a c a c c a c t g c a c t c c a g c c t c a g t g a c a g a g	4020
t g a g g c c c t g t c t c a a a a a a g a a a g a a a a a g a a a a a t a a t g a g g g c t g t a t g g a a t a c	4080
a t t c a t t a t t c a t t c a c t c a c t c a c t c a c t c a t t c a t t c a t t c a t t c a t t c a a c a a g t c t	4140
t a t t g c a t a c c t t c t g t t t g c t c a g c t t g g t g c t t g g g g c t g c t g a g g g g c a g g a g g g a g	4200
a g g g t g a c a t g g g t c a g c t g a c t c c c a g a g t c c a c t c c c t g t a g g t c g g g c a g c a g g c c g	4260
t a g a a g t c t g g c a g g g c c t g g c c c t g c t g t c g g a a g c t g t c c t g c g g g g c c a g g c c c t g t	4320
t g g t c a a c t c t t c c c a g c c g t g g g a g c c c c t g c a g c t g c a t g t g g a t a a a g c c g t c a g t g	4380
g c c t t c g c a g c c t c a c c a c t c t g c t t c g g g c t c t g g g a g c c a g g t g a g t a g g a g c g g a c	4440
a c t t c t g c t t g c c c t t t c t g t a a g a a g g g g a g a a g g g t c t t g c t a a g g a g t a c a g g a a c t	4500
g t c c g t a t t c c t t c c c t t t c t g t g t g g c a c t g c a g c g a c c t c c t g t t t t c t c c t t g g c a g a a	4560
g g a a g c c a t c t c c c c t c c a g a t g c g g c c t c a g c t g c t c c a c t c c g a a c a a t c a c t g c t g a	4620
c a c t t t c g c a a a c t c t t c c g a g t c t a c t c c a a t t t c c t c c g g g g a a a g c t g a a g c t g t a	4680
c a c a g g g g a g g c c t g c a g g a c a g g g g a c a g a t g a c c a g c t t g a t a t c g a a t t a t c c a t c a	4740
c a c t g g c g g c c g c t c g a g c a t g c a t c t a g a g g g c c c a t t c t a t a g t g t c a c c t a a a t g c	4800
t a g a g c t c g c t g a t c a g c c t c g a c t g t g c c t t c t a g t t g c c a g c c a t c t g t t g t t t g c c c	4860
c t c c c c g t g c c t t c c t t g a c c c t g g a a g g t g c c a c t c c c a c t g t c c t t t c c t a a t a a a a	4920
t g a g g a a a t t g c a t c g c a t t g t c t g a g t a g g t g t c a t t c t a t t c t g g g g g t g g g g t g g g	4980
g c a g g a c a g c a a g g g g g a g g a t t g g g a a g a c a a t a g c a g g c a t g c t g g g g a t g c g g t g g g	5040
c t c t a t g g c t t c t g a g g c g g a a a g a a c c a g c t g g g g c t c t a g g g g g t a t c c c a c g c g c c	5100
c t g t a g c g g c g c a t t a a g c g c g g c g g g t g t g g t g g t a c g c g c a g c g t g a c c g t a c a c t	5160
t g c c a g c g c c c t a g c g c c c g c t c c t t t c g c t t t c t t c c c t t c c t t t c t c g c c a c g t t c g c	5220
c g g c t t t c c c c g t c a a g c t c t a a a t c g g g g g c t c c c t t t a g g g t t c c g a t t t a g t g c t t t	5280
a c g g c a c c t c g a c c c c a a a a a a c t t g a t t a g g g t g a t g g t t c a c g t a g t g g g c a t c g c c	5340
c t g a t a g a c g g t t t t t c g c c c t t t g a c g t t g g a g t c c a c g t t c t t t a a t a g t g g a c t c t t	5400
g t t c c a a a c t g g a a c a a c a c t c a a c c c t a t c t c g g t c t a t t c t t t g a t t t a t a a g g g a t	5460
t t t g c c g a t t t c g g c c t a t t g g t t a a a a a a t g a g c t g a t t t a a c a a a a a t t t a a c g c g a a	5520
t t a a t t c t g t g g a a t g t g t g t c a g t t a g g g t g t g g a a a g t c c c c a g g c t c c c a g c a g g c	5580
a g a a g t a t g c a a a g c a t g c a t c t c a a t t a g t c a g c a a c c a g g t g t g g a a a g t c c c c a g g c	5640

t cccacagcag gcagaagt at gcaaagcat g cat ct caat t agt cagcaac cat agt cccg	5700
ccccaaact c cgcceat ccc gcccct aact cgcceagtt cgcceatt c t cgccecat	5760
ggct gact aa tttttttt at ttatgcagag gccgagggcg cct ct gcct c tgagct at t c	5820
cagaagt agt gaggaggctt ttttggaggc ct aggcct ttt gcaaaaagct cccgggagct	5880
tgtat at cca tttt cggat c t gat caagag acaggat gag gat cgt t t cg cat gat t gaa	5940
caagat ggat tgcacgcagg ttctccggcc gct tgggt gg agaggct at t cggct at gac	6000
tgggcacaac agacaat cgg ct gct ct gat gccgcctgt t cggct gt c agcgcagggg	6060
cgcgcgggt t c tttt t gt caa gaccgacct g t ccggt gcc t gaat gaact gcaggacgag	6120
gcagcgcggc t at cgt ggc t ggccacgacg ggct t cct t gcgcagct gt gct cgacgt t	6180
gt cact gaag cgggaaggga ct ggct gct a ttgggcgaag t gccggggca ggat ct cct g	6240
t cal ct cacc ttgct cct gc cgagaaagt a t ccat cal gg ct gat gcaat gcggcggt g	6300
cat acgct t g at ccggct ac ct gccat t c gaccaccaag cgaaacat cg cat cgagcga	6360
gcacgt act c ggat ggaagc cggct ct t gt c gat caggat g at ct ggacga agagcat cag	6420
gggct cgcgc cagccgaact gt t cgcagg ct caaggcgc gcat gccga cggcgaggat	6480
ct cgt cgt ga cccat ggca t gccct gct t g ccgaat at ca t ggt ggaaaa tggccgt t t	6540
t ct ggat t ca t cgact gt gg ccggct ggg gtggcggacc gct at cagga cat agcgt t g	6600
gct acccgt g at at t gct ga agagct t ggc ggcaat ggg ct gaccgt t cct cgt gct t	6660
t accgt at cg ccgct cccga tt cgcagcgc at cgcct t ct at cgcct t ct t gacgagt t c	6720
ttct gagcgg gact ct gggg tt cgaat ga ccgaccaagc gacgcccaac ct gccat cac	6780
gagat tt cga tt ccacggcc gcc t ct at g aaaggt t ggg ct t cggat c gt t t t cggg	6840
acgccggct g gat gat cct c cagcgcgggg at ct cal gct ggagt t ct t c gccacccca	6900
act t gt t t at tgcagct t at aat ggt t aca aat aaagcaa tagcat caca aat t t cacia	6960
at aaagcat t tttt t cact g cat t ct agt t gt ggt t t gt c caaact cat c aat gt at ct t	7020
at cal gt ct g t at accgt cg acct ct agct agagct t ggc gt aat cal gg t cat agct gt	7080
tt cct gt gt g aaat t gt t at ccgct cacia tt ccacacaa cat acgagcc ggaagcat aa	7140
agt gt aaagc ct ggggt gcc t aat gagt ga gct aact cac at t aat t gcg tt gcgct cac	7200
t gcccgct t t ccagt cggga aacct gt cgt gccagct gca tt aat gaat c ggccaacgcg	7260
cggggagagg cgg t t t gcgt at t gggcgct ct t ccgct t c ct cgt cact gact cgt gc	7320
gct cgt cgt t cggct gcgg cgagcggat at cagct cact c aaaggcgg t a at accgt t at	7380
ccacagaat c aggggat aac gcaggaaaga acat gt gagc aaaaggccag caaaaggcca	7440
ggaaccgt aa aaaggccgcg tt gct ggcgt tttt ccat ag gct cgcgcc cct gacgagc	7500
at cacaataa t cgacgt ca agt cagaggt ggcaaaacc gacaggact a t aaagat acc	7560
aggcgt t t cc cctt ggaagc t cctt cgt gc gct ct cct gt t ccgacct g ccgct t accg	7620
gat acct gt c cgcct t t ct c cct t cgggaa gcgt ggcgct tt ct cal agc t cacgct gt a	7680

ggat at ct cag	t t cggg t ag	gt cgt t cgt	ccaagct ggg	ct gt gt gca	gaaccccccg	7740
t t cagccccga	ccgct gcgcc	t t at cgggt a	act at cgt ct	t ggt ccaac	ccggt aagac	7800
acgact t at c	gccact ggca	gcagccact g	gt aacaggat	t agcagagcg	aggt at gt ag	7860
gcgggt gct ac	agagt t ct t g	aagt ggt ggc	ct aact acgg	ct acact aga	agaacagt at	7920
t t ggt at ct g	cgct ct gct g	aagccagt t a	cct t cggaaa	aagagt t ggt	agct ct t gat	7980
ccggcaaaaca	aaccaccgct	ggt agcgggt g	gt t t t t t t g	t t gcaagcag	cagat t acgc	8040
gcagaaaaaaa	aggat ct caa	gaagal cct t	t gat ct t t t c	t acgggggt ct	gacgct cagt	8100
ggaacgaaaa	ct cacgt t aa	gggat t t t gg	t cat gagat t	at caaaaagg	at ct t cacct	8160
agat cct t t t	aaat t aaaaa	t gaagt t t t a	aat caat ct a	aagt at at at	gagt aaact t	8220
ggt ct gacag	t t accaat gc	t t aat cagt g	aggcacct at	ct cagcgat c	t gt ct at t t c	8280
gt t cat ccat	agt t gcct ga	ct ccccgct cg	t gt agat aac	t acgat acgg	gagggct t ac	8340
cat ct ggccc	cagt gct gca	at gat accgc	gagaccacg	ct caccggct	ccagat t t at	8400
cagcaat aaa	ccagccagcc	ggaagggccg	agcgcagaag	t ggt cct gca	act t t at ccg	8460
cct ccat cca	gt ct at t aat	t gt t gccggg	aagct agagt	aagt agt t cg	ccagt t aat a	8520
gt t t gcgcaa	cgt t gt t gcc	at t gct acag	gcat cgt ggt	gt cacgct cg	t cgt t t ggt a	8580
t ggt t cat t	cagct ccggt	t cccaacgat	caaggcgagt	t acat gat cc	cccat gt t gt	8640
gcaaaaaagc	ggt t agct cc	t t cgggt cct c	cgat cgt t gt	cagaagt aag	t t ggccgcag	8700
t gt t at cact	cat ggt t at g	gcagcact gc	at aat t ct ct	t act gt cal g	ccat ccgt aa	8760
gat gct t t t c	t gt gact ggt	gagt act caa	ccaagt cat t	ct gagaat ag	t gt at gcggc	8820
gaccgagt t g	ct ct t gcccg	gcgt caat ac	gggat aat ac	cgcgccacat	agcagaact t	8880
t aaaagt gct	cat cat t gga	aaacgt t ct t	cggggcgaaa	act ct caagg	at ct t accgc	8940
t gt t gagat c	cagt t cgat g	t aacccact c	gt gcacccaa	ct gat ct t ca	gcat ct t t t a	9000
ct t t caccag	cg t t t ct ggg	t gagcaaaaa	caggaaggca	aaat gccgca	aaaaagggaa	9060
t aagggcgac	acggaaat gt	t gaat act ca	t act ct t cct	t t t t caat at	t at t gaagca	9120
t t t at caggg	t t at t gt ct c	at gagcggat	acat at t t ga	at gt at t t ag	aaaaat aaac	9180
aaat aggggt	t ccgcgcaca	t t t ccccgaa	aagt gccacc	t gacgt c		9227

<210>	2
<211>	8635
5 <212>	ADN
<213>	Secuencia artificial
<220>	
<223>	vector X1GC/GEPO
<400>	2

gacggatcgg gagatccatt ctccgccca tggctgacta atttttttta tttatgcaga 60
ggccgagggcc gcctctgcct ctgagctatt ccagaaglag tgaggaggct tttttggagg 120
cctaggcttt tgcaaaaagc tcccggaatg gttcgaccat tgaactgcat cgtcgccgtg 180

t cccaaaat a tggggat tgg caagaacgga aacct accct ggcct cgcct caggaacgag	240
t t caagt act t ccaaagaat gaccacaacc t c t t cagt gg aaggt aaaca gaat ct ggt g	300
at t at ggg t a ggaaaacct g g t t c t ccat t cct gagaaga at cgacct t t aaaggacaga	360
at t aat at ag t t c t cagt ag agaact caaa gaaccaccac gaggagct ca t t t t c t t gcc	420
aaaagt t t gg at gat gcct t aagact t at t gaacaaccgg aat tggcaag t aaagt agac	480
at ggt t t gga t agt cggagg cagt t c t g t t t accaggaag ccat gaat ca accaggccac	540
ct cagact ct t t gt gacaag gat cat gcag gaat t t gaaa gt gacacgt t t t t cccagaa	600
at t gat t t gg ggaaat at aa act t c t ccca gaat acccag gcgt cct c t c t gaggt ccag	660
gaggaaaaag gcat caagt a t aagt t t gaa gt c t acgaga agaaagact a acaggt t cga	720
aat gaccgac caagcgacgc ccaacct gcc at cagagat t t cgal t cca ccgcgcct t	780
ct at gaaagg t t gggct t cg gaat cgt t t t cggggacgcc ggct ggat ga t cct ccagcg	840
cggggat ct c at gct ggagt t c t t cgccca ccccaact t g t t t at t gcag ct t at aat gg	900
t t acaaat aa agcaat agca t c acaaat t t c acaaat aaa gcat t t t t t cact gcat t c	960
t agt t gt ggt t t gt ccaaac t cat caat gt at ct t at cat gt ct gggat c t cccgat ccc	1020
ct at ggt gca ct ct cagt ac aat ct gct ct gat gccgat agt t aagcca gt at ct gct c	1080
cct gct t gt g t gt t ggaggt cgt gagt ag t gcgcgagca aaat t t aagc t acaacaagg	1140
caaggct t ga ccgacaat t g cal gaagaat ct gct t aggg t t aggcgt t t t gcgcgt gct t	1200
cgcgat gt ac ggcccgat a t acgcgt t ga cat t gat t at t gact agt t a t t aat agt aa	1260
t caat t acgg ggt cat t agt t cat agccca t at at ggagt t ccgcgt t ac at aact t acg	1320
gt aaat ggcc cgcct ggct g accgccaac gacccccgcc cat t gacgt c aat aat gacg	1380
t at gt t ccca t agt aacgcc aat agggact t t ccat t gac gt caat ggg t ggagt at t t a	1440
cgg t aaact g cccact t ggc agt acat caa gt gt at cat a t gccaaat ac gccccct at t	1500
gacgt caat g acggt aaat g gcccgcct gg cal t at gcc agt acat gac ct t at gggac	1560
t t t cct act t ggcagt acat ct acgt at t a gt cat cgct a t t accat ggt gat gcggt t t	1620
t ggcagt aca t caat gggcg t ggt agcgg t t t t gact cac ggggat t t cc aagt ct ccac	1680
cccat t gacg t caat gggag t t t gt t t t gg caccaaaat c aacgggact t t ccaaaat gt	1740
cgt aacaact ccgccccat t gacgcaaat g ggcggt aggc gt gt acggt g ggaggt ct at	1800
at aagcagag ct ct ct ggct aact agagaa cccact gct t act ggct t at cgaaat t aat	1860
acgact cact at agggagac ccaagct gcc t agcgt t t aa act t aagct t ggt accgagc	1920
t cggat ccac t agt aacggc cgccagt gt g ct ggaat t ct gcagat t cga ggt cgacggt	1980
at cgat aagc t t ccaagcgc ggagat gggg gt gcacggt g agt act cgcg ggct gggcgc	2040
t cccgccccgc ccgggt cctt gt t t gacgg ggat t t agcg ccccggt at t ggccaggag	2100
gt ggct ggg t t caaggaccg gcgact t gt c aaggaccccg gaagggggag ggggt gggg	2160
cagcct ccac gt gccagcgg ggact t gggg gagt cct t gg ggat ggcaaa aacct gacct	2220
gt gaagggga cacagt t t gg ggg t t gagg gaagaaat t t ggggg t ct gct gt gccag	2280

tggagaggaa gctgat aagc t gat aacct g ggcgctggag ccaccactia tctgccagag	2340
gggaagccctc t g t cacacca ggat t gaagt t tggccggag aagt ggat gc t ggt agct gg	2400
gggt ggggt g tgcacacggc agcaggat t g aat gaaggcc agggaggcag cacct gagt g	2460
ct t gcat ggt tggggacagg aaggacgagc tggggcagag acgt ggggat gaaggaagct	2520
gt cct tccac agccacccct t ctccctcccc gcct gact ct cagcct ggct at ct gt t c t a	2580
gaat gt cct g cct ggct gt g gct t ct cct g tccct gct gt cgct cct ct gggcct ccca	2640
gt cct gggcg cccaccacg cct cat ct gt gacagccgag t cct ggagag gt acct ct t g	2700
gaggccaagg aggccgagaa t at cacggt g agacccct t c cccagcacat tccacagaac	2760
t cagct cag ggct t caggg aact cct ccc agat ccagga acct ggcact t ggt t t aggg	2820
tggagt t ggg aagct agaca ct gccccct acat aagaat aagt ct ggt g gccccaaacc	2880
at acct ggaa act aggcaag gagcaaagcc agcagat cct acggcct gt g ggccagggcc	2940
agagcct t ca gggacccct t g act ccccggt ct gt gt gcat t t cagacggg ct gt gct gaa	3000
cact gcagct t gaat gagaa t at cact gt c ccagacacca aagt t aat t t ct at gcct gg	3060
aagaggat gg aggt gagt t c cttttttttt ttttttctt t ctttttggag aat ct catt t	3120
gcgagcct ga ttttggat ga aagggagaat gat cgaggga aaggt aaaat ggagcagcag	3180
agat gaggct gcct gggcg agaggct cac gt ct at aat c ccaggct gag at gggcgaga	3240
tgggagaat t gct t gagccc tggagt t t ca gaccaacct a ggcagcat ag t gagat cccc	3300
cat ct ct aca aacat t t aaa aaaat t agt c aggt gaagt g gt gcat ggt g gt agt cccag	3360
at at t t ggaa ggct gaggcg ggaggat cgc t t gagcccag gaat t t gagg ct gcagt gag	3420
ct gt gat cac accact gcac tccagcct ca gt gacagagt gaggccct gt ct caaaaaag	3480
aaaagaaaaa agaaaaat aa t gagggt gt at ggaat aca t t catt at t c at t cact cac	3540
t cact cact c at t catt cat t catt cat t c aacaagt ct t at t gcat acc t t ct gt t t gc	3600
t cagct t ggt gct t ggggt gct gaggggc agggaggaga ggggacat g ggt cagct ga	3660
ct cccagagt ccaact cct g t aggt cgggc agcaggccgt agaagt ct gg cagggcct gg	3720
ccct gct gt c ggaagct gt c ct ggggggc aggccct gt t ggt caact ct t cccagccgt	3780
gggagccct gcagct gcat gt ggal aaag ccgt cagt gg cct t cgcagc ct caccact c	3840
t gct t cgggc t ct gggagcc cagggt gagt a ggagcggaca ct t ct gct t g cct t t ct gt	3900
aagaagggga gaagggt ct t gct aaggagt acaggaact g t ccgt at t cc t t cct t t ct	3960
gt ggcact gc agcgacct cc t gt t t t ct cc t t ggcagaag gaagccat ct cccct ccaga	4020
t gggcct ca gct gct ccac tccgaacaat cact gct gac act t t ccgca aact ct t ccg	4080
agt ct act cc aat t t cct cc ggggaaagct gaagct gt ac acaggggagg cct gcaggac	4140
aggggacaga t gaccagct t gat at cgaat t at ccat cac act ggcggcc gct cgagt ct	4200
agagggcccg t t t aaaccg ct gat cagcc t cgact gt gc ct t ct agt t g ccagccat ct	4260
gt t gt t t gcc cct ccccggt gcct t cct t g accct ggaag gt gccact cc cact gt cct t	4320

t cct aat aaa at gaggaat t gcat cgc at t gt ct gagt a ggt gt cat t c t at t ct gggg	4380
ggg ggggt gg ggcaggacag caagggggag gat t gggaag acaat agcag gcat gct ggg	4440
gat gcggt gg gct ct at ggc t t ct gaggcg gaaagaacca gct ggggct c t aggggggt at	4500
ccccacgcgc cct gt agcgg cgc at t aagc ggcgcgggt g t ggt ggt t ac ggcgcagcgt g	4560
accgct acac t t gccagcgc cct agcgcgc gct cct t t cg ct t t ct t ccc t t cct t t ct c	4620
gccacgt t cg ccggt t t cc ccgt caagct ct aaat cggg ggct cct t t aggggt t ccga	4680
t t t agt gct t t acggcacct cgaccccaaa aaact t gatt aggggt gat gg t t cacgt agt	4740
gggccat cgc cct gat agac ggt t t t t cgc cct t t gacgt t ggagt ccac gtt ct t t aat	4800
agt ggact ct t gt t ccaaac t ggaacaaca ct caacct a t ct cgggt ct a t t ct t t t gat	4860
t t at aaggga t t t t gccgat t t cggcct at t ggt t aaaaa at gagct gat t t aacaaaaa	4920
t t t aacgcga att aat t ct g t ggaat gt gt gt cagt t agg gt gt ggaaag t cccagggct	4980
ccccagcagg cagaagt at g caaagcat gc at ct caat t a gt cagcaacc aggt gt ggaa	5040
agt cccagg ct cccagca ggcagaagt a t gcaaagcat gcat ct caat t agt cagcaa	5100
ccat agt ccc gcccc aact ccgcccc at cc cgcccc aac t ccgcccagt t ccgcccc t t	5160
ct ccgcccc t gggt gact a at t t t t t t a t t t at gcaga ggccgaggcc gct ct gct	5220
ct gagct at t ccagaagt ag t gaggaggct t t t t t ggagg cct aggc t t t t gcaaaaagc	5280
t cccgggagc t t gt at at cc at t t t cggat ct gat caaga gacaggat ga ggal cgt t t c	5340
gcat gat t ga acaagat gga t t gcacgcag gt t ct ccggc cgt t ggggt g gagaggct at	5400
t ccggt at ga ct gggcaca cagacaat cg gct gct ct ga t gccgcgt g t t ccggct gt	5460
cagcgcagg ggcgccgt t ct t t t t gt ca agaccgacct gt ccgt gcc ct gaat gaac	5520
t gcaggacga ggcagcgcg ct at cgt ggc t ggcacgcac gggcgt t cct t gcgcagct g	5580
t gct cgacgt t gt cact gaa gcgggaaggg act ggct gct at t gggcgaa gt gccggggc	5640
aggat ct cct gt cat ct cac ct t gct cct g ccgagaaagt at ccat cat g gct gat gaa	5700
t gcggcggct gcat acgt t gat ccggt a cct gccat t cgaccaccaa gcgaaacat c	5760
gcat cgagcg agcacgt act cggat ggaag ccggt ct t gt cgat caggat gat ct ggacg	5820
aagagcat ca ggggt cgcg ccagccgaac t gt t cgcag gct caaggcg cgc at gccg	5880
acggcgagga t ct cgt cgt g acccat ggcg at gcct gct t gccgaat at c at ggt ggaaa	5940
at ggccgct t t t ct ggat t c at cgact gt g gccggct ggg t gt ggcggac cgt at cagg	6000
acat agcgt t ggct accgt gat at t gct g aagagct t gg cggcgaat gg gct gaccgt	6060
t cct cgt gct t t acggt at c gccgt cccg at t cgcagcg cat cgcct t c t at cgcct t c	6120
t t gacgagt t ct t ct gagcg ggact ct ggg gt t cgaaat g accgaccaag cgacgcccaa	6180
cct gccat ca cgagat t t cg att ccacgc cgct t ct at gaaagg t gg gct t cggaat	6240
cgt t t t ccgg gacgccggct ggat gat cct ccagcgcggg gat ct cat gc t ggagt t ct t	6300
cgcccccccc aact t gt t t a t t gcagct t a t aat ggt t ac aaat aaagca at agcat cac	6360
aaat t t caca aat aaagcat t t t t t cact gcat t ct agt t gt ggt t t gt ccaaaact cat	6420

caat gt at ct t at cat gt ct gt at accgt c gacct ct agc t agagct t gg cgt aat cat g	6480
gt cat agct g ttt cct gt gt gaaat t gt t a t ccgct caca at t ccacaca acat acgagc	6540
cggaagcat a aagt gt aaag cct ggggt gc ct aat gagt g agct aact ca cat t aat t gc	6600
gt t gcgt ca ct gcccgct t t ccagt cggg aaacct gt cg t gccagct gc at t aat gaat	6660
cggccaacgc gcggggagag gcgggt t t gcg t at t gggcgc t ct t ccgct t cct cgct cac	6720
t gact cgct g cgct cggc cg t t cggct gcg gcgagcggg a t cagct cact caaaggcgg	6780
aat acgggt t a t ccacagaat caggggat aa cgcaggaaag aacat gt gag caaaaggcca	6840
gcaaaaggcc aggaaccgt a aaaaggccgc gt t gct ggcg t t t t t ccat a ggct ccgccc	6900
ccct gacgag cat caca aaa at cgacgt c aagt cagagg tggcgaaacc cgacaggact	6960
at aaagat ac caggcg t t c cccct ggaag ct cccct cgl g cgct ct cct g t t ccgacct	7020
gcgct t acc ggat acct gt ccgct t t ct cccct cggga agcgt ggcgc t t t ct cat ag	7080
ct caogct gt aggt at ct ca gt t cgggt g a ggt cgt t cgc tccaagct gg gct gt gt gca	7140
cgaaccccc gt t cagccc accgct gcgc ct t at ccggt aact at cgt c t t gagt ccaa	7200
cccggt aaga cagcact t at cgccact ggc agcagccact ggt aacagga t t agcagagc	7260
gaggt at gt a ggcgggt gct a cagagt t ct t gaagt ggt gg cct aact acg gct acact ag	7320
aagaacagt a t t t ggt at ct gcgct ct gct gaagccagt t acct t cggaa aaagagt t gg	7380
t agct ct t ga t ccggcaaac aaaccaccgc t ggt agcgg t t t t t t gt t t gcaagcagca	7440
gat t acgcgc agaaaaaag gat ct caaga agat cct t t g at ct t t t ct a cgggggt ct ga	7500
cgct cagt gg aacgaaaact caggt t aagg gat t t t ggt c at gagat t at caaaaaggat	7560
ct t cacct ag at cct t t t aa att aaaaat g aagt t t t aaa t caat ct aaa gt at at at ga	7620
gt aaact t gg t ct gacagt t accaat gct t aat cagt gag gcacct at ct cagcgat ct g	7680
t ct att t t cgt t cat ccat ag t t gcct gact ccccg t cgt g t agat aact a cgat accgga	7740
gggct t acca t ct gggccca gt gct gcaat gat accgcga gacccacgct caccggct cc	7800
agat t t at ca gcaat aaacc agccagccgg aagggccgag cgcagaagt g gt cct gcaac	7860
t t t at ccgcc t ccat ccagt ct at t aat t g t t gcccggaa gct agagt aa gt agt t cgcc	7920
agt t aat agt t t ggcgaacg t t gt t gccat t gct acagge at cgt ggt gt caccgt cgt c	7980
gt t t ggt at g gct t cat t ca gct ccggt t c ccaacgat ca aggcgagt t a cat gat cccc	8040
cat gt t gt gc aaaaaagcgg t t agct cct t cgggt cct ccg at cgt t gt ca gaagt aagt t	8100
ggcgcgagt t t at cact ca t ggt t at ggc agcact gcat aat t ct ct t a ct gt cat gcc	8160
at ccgt aaga t gct t t t ct g t gact ggt ga gt act caacc aagt cat t ct gagaat agt g	8220
t at gggcga ccgagt t gct ct t gcccggc gt caat accg gat aat accg cgccacat ag	8280
cagaact t t a aaagt gct ca t cal t ggaaa acgt t ct t cg gggcgaaaac t ct caaggat	8340
ct t accgct g t t gagat cca gtt cgal g t a acccact cgt gcacccaact gat ct t cagc	8400
at ct t t t act t t caccagcg t t t ct ggggt g agcaaaaaca ggaaggcaaa at gccgc aaa	8460
aaagggaa t a agggcgacac ggaaat gt t g aat act cat a ct ct t cct t t t t caat att a	8520
t t gaagcatt t at caggggt t att gt ct cat gagcggat ac at att t gaat gt att t agaa	8580
aaat aaacaa at aggggt t c cgcgcacat t t ccccgaaaa gt gccacct g acgt c	8635

<211> 8657
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> vector X3GC/GEPO
 <400> 3

```

gacggatcgg gagatcccta actccgcccga gtccgcccga ttctccgccc catggctgac      60
taattttttt tatttatgca gaggccgagg ccgcctctgc ctctgagcta ttccagaagt      120
agtgaggagg cttttttggg ggccctaggct ttgcaaaaaa gctcccgga tggttcgacc      180
attgaactgc atcgtcgccg tgtcccaaaa tatggggat tggcaagaacg gaaacctacc      240
ctggcctccg ctcaggaacg agttcaagta ctccaaaga atgaccacaa cctcttcagt      300
ggaaggtaaa cagaatctgg tgaatatggg taggaaaacc tggttctcca ttcttgagaa      360
gaatcgacct ttaaaggaca gaattaatat agttctcagt agagaactca aagaaccacc      420
acgaggagct cattttcttg ccaaaagttt ggatgatgcc ttaagactta ttgaacaacc      480
ggaattggca agtaaatgac acatggtttg gatagtcgga ggcagttctg ttaccagga      540
agccatgaat caaccaggcc acctcagact ctctgtgaca aggatcatgc aggaatttga      600
aagtgacacg tttttccag aaattgat tggggaaat ataaacttctcc cagaatacc      660
aggcgtctc tctgaggtcc aggaggaaaa aggcataag tatagtttg aagtctacga      720
gaagaaagac taacagggtc gaaatgaccg accaagcgac gccaacctg ccatcacgag      780
atttcgatlc caccgccc ttctatgaaa ggttgggtct cggaatcgtt ttccgggacg      840
ccggctggat gatctccag cgcggggatc lcatgctgga gttcttcgcc caccccaact      900
tgtttatfgc agcttataat ggttacaat aaagcaatag catcacaat ttacaaata      960
aagcattttt ttcaactgat tctagtgtg gtgtgtccaa actcatcaat gtatcttatc      1020
atgtctggga tctccgatc cctatggtg cactctcagt acaatctgct ctgatgccgc      1080
atagttaagc cagtatctgc tccctgcttg tgtgtggag gtcgctgagt agtgcgcgag      1140
caaattttaa gctacaacaa ggcaaggctt gaccgacaat tgcataaga atctgcttag      1200
ggttaggcgt tttgcgctgc ttcgcgatgt acgggccaga tatcgcgctt gacattgat      1260
attgactagt tattaatagt aatcaatfac ggggtcatla gtatcatagcc catatatgga      1320
gttccgctgt acataactta cggtaaatgg cccgcctggc tgaccgcccga acgacccccg      1380
cccatfgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtacg ccaataggga ctttccattg      1440
acgtcaatgg gtggagtatt tacggtaaac tgccacttg gcagtacatc aagtgtatca      1500
tatgccaagt acgccccct tttgacgtcaa tgacggtaaa tggccgcctt ggcattatgc      1560

```

ccagtagcatg	accttatggg	actttctac	ttggcagtag	atctacgtat	tagtcatcgc	1620
tattaccatg	gtgatgcgg	tttggcagta	catcaatggg	cgtggaatagc	ggtttgactc	1680
acgggggat	ttccaagtctcc	accccataga	cgtcaatggg	agttttgttt	ggcaccacaaa	1740
tcaacggggac	tttccaaaat	gtcgtaacaa	ctccgccccca	ttgacgcaaa	tgggcggtag	1800
gcgtgtacgg	tgggaggtct	atatagacag	agctctctgg	ctaactagag	aacctactgc	1860
ttactggctt	atcgaaattat	atagactca	ctataggag	acccaagctg	gctagcgttt	1920
aaacttaagc	ttggtaccga	gctcggatcc	actagtacg	gccgcccagtg	tgttggaatt	1980
ctgcagatct	gaggtagacg	glatcgataa	gcttccaggc	gcggagatgg	gggtgcacgg	2040
tgagtactcg	cgggctgggc	gctcccgcgc	gcccgggtcc	ctgtttgagc	ggggatttag	2100
cgcgccggct	attggccagg	aggtagctgg	gttcaaggac	cggcgacttg	tcaaggaccc	2160
cgaaggggg	aggggggtgg	ggcagccctcc	acgtgccagc	ggggacttgg	gggagtcctt	2220
ggggatggca	aaaacctgac	ctgtgaaggg	gacacagttt	gggggttgag	gggaagaagg	2280
tttgggggtt	ctgctgtgcc	agtggagagg	aagctgataa	gctgataac	tgggcgctgg	2340
agccaccact	tatctgccag	aggggaagcc	tctgtcacac	caggattgaa	gtttggccgg	2400
agaagtggat	gctggtagct	gggggtgggg	tgtgcacacg	gcagcaggat	tgaatgaagg	2460
ccaggagggc	agcacctgag	tgtttgcatg	gttggggaca	ggaaggacga	gctggggcag	2520
agacgtgggg	atgaaggaag	ctgtccttcc	acagccaccc	ttctccctcc	ccgcctgact	2580
ctcagcctgg	ctatctgttc	tagaatgtcc	tgcctggctg	tggcttctcc	tgtccctgct	2640
gtcgctccct	ctgggcctcc	cagtcctggg	cgcgccacca	cgcctcatct	gtgacagccg	2700
agtcctggag	aggtagctct	tggaggccaa	ggaggccgag	aatatcacgg	tgagaccctt	2760
tcccagcac	attccacaga	actcacgctc	agggcttcag	ggaactcctc	ccagatccag	2820
gaacctggca	cttggtttag	ggtggagttg	ggaagctaga	cactgcccc	ctacataaga	2880
ataagtctgg	tggcccaaaa	ccatacctgg	aaactaggca	aggagcaaag	ccagcagatc	2940
ctacggcctg	tgggccaggg	ccagagcctt	cagggaccct	tgactccccg	ggctgtgtgc	3000
atttcagacg	ggctgtgctg	aacactgcag	cttgaatgag	aatatcactg	tcccagacac	3060
caaagttaat	ttctatgctt	ggaagaggat	ggaggtagt	tctttttttt	ttttttttcc	3120
tttcttttgg	agaatctcat	ttgcgagcct	gattttggat	gaaagggaga	atgatcgagg	3180
gaaaggtaaa	atggagcagc	agagatgagg	ctgctgggc	gcagaggctc	acgtctataa	3240
tcccaggctg	agatggccga	gatgggagaa	ttgcttgagc	cctggagttt	cagaccaacc	3300
taggcagcat	agtgagatcc	cccatctcta	caaacattta	aaaaaatag	tagggtgaag	3360
tgggtgcatgg	tggtagtccc	agatatattg	aaggctgagg	cgggaggatc	gcttgagccc	3420
aggaatttga	ggctgcagtg	agctgtgatc	acaccactgc	actccagcct	cagtgacaga	3480
gtgaggccct	gtctcaaaaa	agaaaagaaa	aaagaaaaat	aatgagggct	gtatggaata	3540
catfcatfat	tcatfcactc	actcactcac	tcatfcattc	attcatfcat	tcaacaagtc	3600
ttatgcatata	cttctgtttt	gctcagcttg	gtgcttgggg	ctgctgaggg	gcaggagggga	3660

gaggggtgaca tgggtcagct gactcccaga gteactccc tgtaggtegg gcagcaggcc 3720
 gtagaagctct ggcagggcct ggcctgctg tgggaagctg tctgcgggg ccaggccctg 3780
 ttggccaact ctcccagcc gtgggagccc ctgcagctgc atgtggataa agccgtcagt 3840
 ggccttcgca gcctcaccac tctgcttcgg gctctgggag ccagggtgag taggagcgga 3900
 cacttctgct tgccttttct gtaagaaggg gagaagggtc ttgctaagga gtacaggaac 3960
 tgtccgtatt ccttcccttt ctgtggcact gcagcgacct cctgttttct ccttggcaga 4020
 aggaagccat ctccctcca gatgcggcct cagctgctcc actccgaaca atcactgctg 4080
 aactttccg caaactcttc cgagtctact ccaatttctt ccggggaaag ctgaagctgt 4140
 acacagggga ggcctgcagg acaggggaca gatgaccagc ttgatatcga attatccatc 4200
 aactggcgg ccgctcgagt ctagagggcc cgtttaaac ccgtgatcag cctcgactgt 4260
 gccctctagt tgcagccat ctgttgtttg cccctcccc gtgccttctt tgaccttga 4320
 aggtgccact cccactgtcc ttctctaat a aaatgaggaa attgcatcgc attgtctgag 4380
 taggtgtcat tctattctgg ggggtgggtt ggggcaggac agcaaggggg aggatggga 4440
 agacaatagc aggcattgctg gggatgcgtt gggctctatg gcttctgagg cggaaagaac 4500
 cagctggggc tctaggggtt atccccagc gccctgtagc ggcgcattaa gcgcggcggg 4560
 tgtggtggtt acgcgcagcg tgaccgctac acttgccagc gccctagcgc ccgctccttt 4620
 cgctttcttc ccttcccttc tgcaccgtt cgccggcttt ccccgtaag ctctaatcg 4680
 ggggtccct ttagggttcc gatttagtgc ttacggcac ctgcaccca aaaaacttga 4740
 ttagggtgat ggttcagcta gtgggcatc gccctgatag acggtttttc gccctttgac 4800
 gttggagtcc acgttcttta atagtggact ctgttccaa actggaacaa cactcaaccc 4860
 tatctcggctc tatcttttg atttataagg gattttgccg attcggcct attggttaa 4920
 aaatgagctg atttaacaaa aatttaacgc gaattaatc tgggaatgt gtgtcagta 4980
 ggggtggaa agtccccagg ctccccagca ggcagaagta tgcaaagcat gcatctcaat 5040
 tagtcagcaa ccagggtgtg aaagtcccc ggcctcccc caggcagaag tatgcaaagc 5100
 atgcatctca attagtgcg aaccatagtc ccgccccaa ctccgccat ccgccccat 5160
 actccgcca gttccgcca ttctccgcc catggtgac taattttttt tatttatgca 5220
 gaggcgagg ccgctctgc ctctgagcta ttccagaagt agtgaggagg cttttttgga 5280
 ggcctaggct ttggcaaaaa gctccggga gcttgtat atccattttcg atctgatcaa 5340
 gagacaggat gaggatcgtt tcgcatgatt gaacaagatg gattgcacgc aggttctcg 5400
 gccgcttggg tggagaggct attcggtat gactgggcac aacagacaat cggctgctct 5460
 gatgccgcg tgttccggt gtgagcgag gggcgcccg ttctttttgt caagaccgac 5520
 ctgtccggtg cctgaatga actgcaggac gaggcagcgc ggctatcgtg gctggccagc 5580
 acgggcgttc cttgccgagc tgtgctcgac gttgtcactg aagcgggaag ggactggctg 5640
 ctattggcg aagtgcggg gcaggatctc ctgtcatctc acctgtctcc tgcgagaaa 5700

gt at ccat ca t ggct gat gc aat gcggcgg ct gcat acgc t t gat ccggc t acct gccca	5760
t t cgaccacc aagcgaaca t cgcat cgag cgagcacgt a ct cggat gga agccggt ct t	5820
gt cgat cagg at gat ct gga cgaagagcat caggggct cg cgccagccga act gt t cgcc	5880
aggct caagg cgcgcat gcc cgacggcgag gat ct cgt cg t gacccat gg cgat gcct gc	5940
t t gccgaat a t cat ggt gga aaat ggccgc t t t t ct ggal t cat cgact g t ggccggct g	6000
ggt gt ggccg accgct at ca ggacat agcg t t ggct accc gt gat at t gc t gaagagct t	6060
ggcggcgaa t gggct gaccg ct t cct cgt g ct t t acgg t a t cgccgct cc cgat t cgag	6120
cgcat cgct t ct at cgct t ct t gacgag t t ct t ct gag cgggact ct g ggg t t cgaaa	6180
t gaccgacca agcgacgcc aacct gccat cagagat t t cgat t ccacc gccgct t ct	6240
at gaaaggt t gggct t cgga at cgt t t t cc gggacggcg ct ggt gat c ct ccagcgcg	6300
gggat ct cat gct ggagt t c t t cgccacc ccaact t gt t t at t gcagct t at aat ggt t	6360
acaaal aaag caat agcat c acaaal t t ca caaal aaagc at t t t t t t ca ct gcat t ct a	6420
gt t gt ggt t t gt ccaaact c at caat gt at ct t at cal gt ct gt at accg t cgacct ct a	6480
gct agagct t ggcgt aat ca t ggt cat agc t gt t t cct gt gt gaaat t gt t at ccgct ca	6540
caat t ccaca caacat acga gccggaagca t aaagt gt aa agcct ggggt gcct aat gag	6600
t gagct aact cacat t aat t gcgt t gcgct cact gccgc t t t ccagt cg ggaaacct gt	6660
cgt gccagct gcat t aat ga at cggccaac gcgcggggag aggcgggt t g cgt at t gggc	6720
gct ct t ccgc t t cct cgct c act gact cgc t gcgct cgg t cgt t cggct g cggcgagcgg	6780
t at cagct ca ct caaaggcg gt aat accgt t at ccacaga at caggggat aacgcaggaa	6840
agaacat gt g agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg t aaaaaggcc gcgt t gct gg	6900
cgt t t t t cca t aggc t ccgc cccct gacg agcat caca aaat cgacgc t caagt caga	6960
ggt ggcgaaa cccgacagga ct at aaagat accaggcgt t t cccct gga agct cct cg	7020
t gcgct ct cc t gt t ccgacc ct gccgct t a ccggat acct gt ccgct t t ct cct t cgg	7080
gaagcgt ggc gct t t ct cat agct cacgct gt aggt at ct cagt t cgg t g t aggt cgt t c	7140
gct ccaagct gggct gt gt g cacgaacccc ccgt t cagcc cgaccgct gc gcct t at ccg	7200
gt aact at cg t ct t gagi cc aaccgggt aa gacacgact t at cgccact g gcagcagcca	7260
ct ggt aacag gat t agcaga gcgaggt at g t aggcgggt gc t acagagt t c t t gaagt ggt	7320
ggcct aact a cggct acact agaagaacag t at t t ggt at ct gcgct ct g ct gaagccag	7380
t t acct t cgg aaaaagagt t ggt agct ct t gat ccggcaa acaaaccacc gct ggt agcg	7440
gt t t t t t t t t t t gcaagcag cagat t acgc gcagaaaaaa aggat ct caa gaagat cct t	7500
t gat ct t t t c t acggggt ct gacgct cagt ggaacgaaaa ct cagct t aa gggat t t t gg	7560
t cat gagat t at caaaaagg at ct t cacct agat cct t t t aaat t aaaaa t gaagt t t a	7620
aat caat ct a aagt at at at gagt aaact t ggt ct gacag t t accaat gc t t aat cagt g	7680
aggcact at ct cagcgat c t gt ct at t t c gt t cat ccat agt t gect ga ct ccccg t cg	7740
t gt agat aac t acgat acgg gagggct t ac cat ct ggccc cagt gct gca at gat accgc	7800

gagacccacg ct caccggct ccagatttat cagcaataaa ccagccagcc ggaagggccg 7860
agcgcagaag tggcctgca actttatccg cctccatcca gtctatlaa tgttgccggg 7920
aagctagagt aagtgttcg ccagttataa gtgtgcccga cgttgttgc attgctacag 7980
gcatcgttgt gt caccgtcg t cgttttgt a tggcttcat t cagctccgt t cccaacgat 8040
caaggcgagt tacatgatcc cccatgttgt gcaaaaaagc ggttagctcc tt cggctctc 8100
cgatcgttgt cagaagt aag ttggccgcag tgttatcact catggttatg gcagcactgc 8160
ataatctct t actgtcatg ccatccgt aa gatgctttt tgtgactgtt gactactcaa 8220
ccaagtcatt ctgagaatag tglalgcggc gaccgagttg ctctlgccc gcgtcaat ac 8280
gggat aat ac cgcgccacat agcagaactt taaaagtgct catcat t gga aaacgttctt 8340
cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc tgttgagatc cagttcgatg taaccactc 8400
gtgcacccaa ctgatcttca gcatcttta ctctcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa 8460
caggaaggca aaatgccgca aaaaagggaa taagggcgac acggaatgt tgaat actca 8520
tactcttct ttttcaat at taltgaagca ttlatcaggg ttaltgtctc atgagcggt 8580
acatalttga atgtatttag aaaaat aaac aaat aggggt tccgcgcaca tt ccccgaa 8640
aagt gccacc tgacgtc 8657

<210> 4
<211> 8691
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> vector x6GC/GEPO
<400> 4

gacggatcgg gagatcccat agtcccgcct ct aactccgc ccatcccgc cct aactccg 60
cccagttccg cccattctcc gcccctggc t gactaatit tttttatit a tgcagaggcc 120
gaggccgct ctgctctga gctatccag aagtgtgag gaggttttt tggaggccta 180
ggcttttgca aaaagctccc gggatggttc gaccattgaa ctgcatcgtc gccgtgtccc 240
aaaat atggg gat tggcaag aacggaaacc t accctggcc tccgctcagg aacgagttca 300
agtacttcca aagaatgacc acaacctctt cagt ggaagg taaacagaat ctggtgatt a 360
tgggtaggaa aacctggttc tccattctctg agaagaatcg acctttaag gacagaatt a 420
at atagtct cagt agagaa ctcaaagaac caccacgagg agctcatitt ct tgcacaaa 480
gtttggatga tgcctlaaga ct t at tgaac aaccggaatt ggcaagt aaa gt agacatgg 540
tttggatagt cggaggcagt tctgtttacc aggaagccat gaatcaacca ggccacctca 600
gactctttgt gacaaggatc atgcaggaat ttgaaagtga cagtttttc ccagaaat t g 660
at t tggggaa at at aaactt ctcccagaat acccaggcgt cctctctgag gtccaggagg 720
aaaaaggcat caagtalaag tt t gaagtct acgagaagaa agactaacag gt t cgaat g 780
accgaccaag cgacgcccaa cctgccatca cgagatttctg attccaccgc cgccttctat 840

10

gaaagggttgg	gcttcggaat	cgttttcggg	gacgccggct	ggatgatcct	ccagcgcggg	900
gatctcatgc	tggagttctt	cgcccacccc	aacttgttta	tfgcagctta	tatagggtac	960
aaataaagca	atagcatcac	aaatttcaca	aataaagcat	ttttttcact	gcattctagt	1020
tgtggtttgt	ccaaactcat	caatgtatct	fatcatgtct	gggatctccc	gatccctat	1080
ggtgcactct	cagtaacaatc	tgtctgatg	cgcgatagtt	aagccagtat	ctgctccctg	1140
cttgttgtgt	ggaggtcgct	gagtgtgcg	cgagcaaaat	ttagctaca	acaaggcaag	1200
gcttgaccga	caatfgcatg	aagaatctgc	ttagggttag	gcgttttgcg	ctgcttcgcg	1260
atgtacgggc	cagatatacg	cgttgacat	gattattgac	tagttattaa	tagtaatacaa	1320
ttacggggct	atagttcat	agcccatata	tggagttccg	cgttacaata	cttacgggtaa	1380
atggcccgcc	tggctgaccg	cccaacgacc	cccgcccat	gacgtcaata	atgacgtatg	1440
ttcccatagt	aacgccaat	gggactttcc	attgacgtca	atgggtggag	tatttacgggt	1500
aaactgcca	cttggcagta	catcaagtgt	atcatatgcc	aagtacgccc	cctattgacg	1560
tcaatgacgg	taaatggccc	gcctggcat	atgccagta	catgacctta	tgggactttc	1620
ctacttggca	gtacatctac	gtattagtca	tcgctattac	catggtgatg	cgggttttggc	1680
agtaacataa	tgggcgtgga	tagcggtttg	actcacgggg	atttccaagt	ctccacccca	1740
ttgacgtcaa	tgggagtttg	ttttggcacc	aaaaacaacg	ggactttcca	aaatgtcgt	1800
acaactcgc	cccatgacg	caaatggcg	gtaggcgtgt	acgggtgggag	gtctatataa	1860
gcagagctct	ctggctaact	agagaaccca	ctgcttactg	gcttalcgaa	attaatacga	1920
ctcactatag	ggagacccaa	gctggctagc	gtttaaactt	aagcttggta	ccgagctcgg	1980
atccactagt	aacggccgcc	agtggtgtgg	aatctcgcag	attcgaggtc	gacgggtatcg	2040
ataagcttcc	aagcggggag	atgggggtgc	acgggtgagta	ctcgcgggct	gggcgctccc	2100
gcccgcggg	gtccctgttt	gagcggggat	ttagcgcgcc	ggctattggc	caggaggtgg	2160
ctgggttcaa	ggaccggcga	cttgtcaagg	accccggaag	ggggaggggg	gtggggcagc	2220
ctccacgtgc	cagcggggac	ttgggggagt	ccttggggat	ggcaaaaacc	tgacctgtga	2280
aggggacaca	gtttgggggt	tgggggaag	aaggtttggg	ggttctgctg	tgccagtggg	2340
gaggaagctg	ataagctgat	aacctggcg	ctggagccac	cacttatactg	ccagagggga	2400
agcctctgtc	acaccaggat	tgaagtttgg	cgggagaagt	ggatgctggt	agctgggggt	2460
gggtgtgca	cacggcagca	ggattgaatg	aaggccaggg	aggcagcacc	tgagtgttgg	2520
catggttggg	gacaggaagg	acgagctggg	gcagagacgt	ggggatgaag	gaagctgtcc	2580
ttccacagcc	accttctcc	ctccccgct	gactctcagc	ctggctatct	gttctagaat	2640
gtcctgcctg	gctgtggctt	ctcctgtccc	tgtgtcgct	ccctctgggc	ctcccagctcc	2700
tgggcgcccc	accacgcttc	atctgtgaca	gccgagctct	ggagaggtac	ctcttggagg	2760
ccaaggaggc	cgagaatatc	acgggtgagac	cccttcccc	gcacattcca	cagaactcac	2820
gctcagggtc	tagggaact	cctcccagat	ccaggaacct	ggcacttggg	ttaggggtga	2880

gaaagggttgg gcttcggaat cgttttcggg gacgccggct ggatgatcc cccagcgcggg 900
 gatctcatgc tggagttctt cgcccacccc aacttgttta ttgcagctta t aatggttac 960
 aaat aaagca atagcatcac aaatttcaca aat aaagcat ttttttcact gcatctc agt 1020
 tgtggtttgt ccaaactcat caatgtatct tatcatgtct gggatctccc gatccctat 1080
 ggtgcactct cagtacaatc tgcctgatg ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg 1140
 cttgttgtt ggaggtcgct gagt agtgcg cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag 1200
 gcttgaccga caat tgcag aagaatctgc tt agggtt ag gcgttttgcg ctgcttcgcg 1260
 atgtacgggc cagat atacg cgttgacat t gattattgac tagttattaa tagtaaatcaa 1320
 ttacgggggtc att agttcat agcccatata tggagttccg cgttacat aa ctacgggt aa 1380
 atggcccgc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt gacgtcaat a atgacgtatg 1440
 ttcccatagt aacgccaat a gggactttcc attgacgtca atgggtggag t attt acgggt 1500
 aaactgccc a ct tggcagta cat caagtgt atcatatgcc aagtacgcc cctattgacg 1560
 tcaatgacgg taaatggccc gccggcat t atgccagta catgacctta tgggactttc 1620
 ctacttggca gtacatctac gtattagtca t cgtat t ac catggtgatg cggttttggc 1680
 agtacaatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg atttccaagt ctccaccca 1740
 ttgacgtcaa tgggagttg ttttggcacc aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgt a 1800
 acaactcgc cccattgacg caaatggcg gt aggcgtgt acgggtggag gtctatataa 1860
 gcagagctct ctggctaact agagaacca ctgcttactg gcttalcgaa attaatacga 1920
 ctcactatag ggagacccaa gctggctagc gt ttaaaact aagcttggta ccgagctcgg 1980
 atccactagt aacggccgcc agtgtgctgg aattctgcag attcgaggctc gacgggtatcg 2040
 at aagcttcc aagcgcggag atgggggtgc acgggtgagta ctgcgggct gggcgtccc 2100
 gccgcgccgg gtccctgttt gagcggggat tt agcgcgcc ggctattggc caggaggtgg 2160
 ctgggttcaa ggaccggcga cttgtcaagg accccggaag ggggaggggg gtggggcagc 2220
 ctccacgtgc cagcggggac ttgggggagt ccttggggat ggcaaaaacc tgacctgtga 2280
 aggggacaca gt t tgggggt tgggggaag aaggtttggg ggttctgctg tggcagtgga 2340
 gaggaagctg at aagctgat aacctggcg ctggagccac cacttattctg ccagagggga 2400
 agcctctgtc acaccaggat tgaagtttgg ccggagaagt ggatgctggt agctgggggt 2460
 ggggtgtgca cacggcagca ggattgaatg aaggccaggg aggcagcacc tgagtgttg 2520
 catggttggg gacaggaagg acgagctggg gcagagacgt ggggatgaag gaagctgtcc 2580
 ttccacagcc acccttctcc ctcccgcct gactctcagc ctggctatct gttctagaat 2640
 gtccctgctg gctgtggctt ctccctgtccc tgcctgtcgct cctctgggc ctccagctcc 2700
 tgggcgcccc accacgccctc atctgtgaca gccgagttct ggagaggtac ctcttggagg 2760
 ccaaggaggc cgagaat atc acgggtgagac ccttcccca gcacattcca cagaactcac 2820
 gctcagggct tcaggaact cctcccagat ccaggaacct ggcacttgggt tt aggggtgga 2880

gt t gggaagc t agacact gc cccct acat aagaat aagt ct ggt ggccc caaaccat ac	2940
ct ggaaact a ggcaaggagc aaagccagca gat cct acgg cct gt gggcc agggccagag	3000
cct t cagggc cct t gact c cccgggct gt gt gcat t t ca gacgggct gt gct gaacact	3060
gcagct t gaa t gagaat at c act gt cccag acaccaagt t aat t t ct at gcci ggaaga	3120
ggat ggaggf gagt t cct t t t t t t t t t t t cct t t ct t t ggagaat c t cat t t gcga	3180
gcc t gat t t t ggat gaaagg gagaat gat c gagggaaagg t aaaat ggag cagcagagat	3240
gaggt gcct gggcgagag gct cacgt ct at aat cccag gct gagat gg ccgagat ggg	3300
agaat t gct t gagccct gga gt t t cagacc aacct aggcga gcat agt gag at ccccat c	3360
t ct acaaca t t t aaaaaa t t agt caggf gaagt ggt gc at ggt ggt ag t cccagat at	3420
t t ggaaggct gaggcgggag gat cgct t ga gccaggaat t t gaggct gc agt gagct gt	3480
gat cacacca ct gcact cca gcc t cagt ga cagagt gagg cct gt ct ca aaaaagaaaa	3540
gaaaaagaa aaat aal gag ggct gt at gg aal acat t ca t t at t cat t c act cact cac	3600
t cact cat t c at t cat t cat t cat t caaca agt ct t at t g cat acct t ct gt t t gct cag	3660
ct t ggt gct t ggggct gct g aggggcagga gggagagggt gacat gggc agct gact cc	3720
cagagt ccac t cct gt agg t cgggcagca ggccgt agaa gt ct ggcagg gcc t ggccct	3780
gct gt cggaa gct gt cct gc ggggccaggc cct gt t ggt c aact ct t ccc agccgt gggc	3840
gcccc gcag ct gcat gt gg at aaagccgt cagt ggcc t cgcagcct ca ccaact ct gct	3900
t cgggct ct g ggagcccagg t gagt aggag cggacact t c t gct t gccct t t ct gt aaga	3960
aggggagaag ggt ct t gct a aggagt acag gaact gt ccg t at t cct t cc ct t t ct gt gg	4020
cact gcagcg acct cct gt t t t ct cct t gg cagaaggaag ccat ct cccc t ccagat gcg	4080
gcc t cagct g ct ccaact ccg aacaat cact gct gacact t t ccgcaaact ct t ccgagt c	4140
t act ccaat t t cct ccggg aaagct gaag ct gt acacag gggaggcct g caggacagg	4200
gacagat gac cagct t gat a t cgaat t at c cat cacact g gggccgct c gagt ct agag	4260
ggccct t t a aaccgct ga t cagcct cga ct gt gcc t c t agt t gccag ccat ct gt t g	4320
t t t gcccc c cccgt gcc t t cct t gacc t ggaaggf gc cact cccact gl cct t t cct	4380
aat aaaa ga ggaaat t gca t cgcalt gt c t gagt aggt g t cat t ct at t ct ggggggt g	4440
gggt ggggca ggacagcaag ggggaggat t ggggaagaaa t agcaggcat gct ggggat g	4500
cggt gggct c t at ggct t ct gaggcggaaa gaaccagct g gggt ct agg gggt at cccc	4560
acgcgccct g t agcggcgca t t aagcgcg cgggt gt ggt ggt t acgcgc agcgt gaccg	4620
ct acact t gc cagcgccct a ggcgcgct c ct t t cgct t t ct t cct t cc t t t ct cgcca	4680
cgt t cgccg ct t t cccgt caagct ct aa at cgggggct cct t t aggg t t ccgat t t a	4740
gt gct t t acg gcacct cgac ccaaaaaac t t gat t aggg t gat ggt t ca cgt agt gggc	4800
cat cgccct g at agacggt t t t cgccct t t gacgt t gga gt ccacgt t c t t t aat agt g	4860
gact ct t gt t ccaact gga acaacact ca acct at ct c ggt ct at t ct t t t gat t t at	4920
aagggat t t t gccgat t t cg gccat t ggt t aaaaaat ga gct gat t t aa caaaaat t t a	4980

acgcgaat t a	at t ct gt gga	at gt gt gt ca	gt t aggg gt	ggaaagt ccc	caggct cccc	5040
agcaggcaga	agt at gcaaa	gc at gc at ct	caat t agt ca	gcaaccaggt	gt ggaaagt c	5100
cccaggct cc	ccagcaggca	gaagt at gca	aagcat gc at	ct caat t agt	cagcaacat	5160
agt cccgccc	ct aact ccgc	ccat cccgcc	cct aact ccg	cccagt t ccg	cccat t ct cc	5220
gccccat ggc	t gact aat t t	t t t t t at t t a	t gcagaggcc	gaggccgcct	ct gcct ct ga	5280
gct at t ccag	aagt agt gag	gaggct t t t t	t ggaggcct a	ggct t t t gca	aaaagt ccc	5340
gggagct t gt	at at ccat t t	t cggat ct ga	t caagagaca	ggat gaggat	cgt t t cgc at	5400
gat t gaacaa	gat ggat t gc	acgcaggt t c	t cgggccgct	t ggggt ggaga	ggct at t cgg	5460
ct at gact gg	gcacaacaga	caat cggct g	ct ct gat gcc	gccgt gt t cc	ggct gt cagc	5520
gcagggggcg	ccggt t ct t t	t t gt caagac	cgacct gt cc	ggg gccct ga	at gaact gca	5580
ggacgaggca	gcgcggct at	cgt ggc t ggc	cacgacgggc	gt t cct t gcg	cagct gt gct	5640
cgacgt t gt c	act gaagcgg	gaagggact g	gct gct at t g	ggcgaagt gc	cggggcagga	5700
t ct cct gt ca	t ct cacct t g	ct cct gccga	gaaagt at cc	at cat ggct g	at gcaat gcg	5760
gcggct gc at	acgct t gat c	cggct acct g	cccat t cgac	caccaagcga	aacat cgc at	5820
cgagcgagca	cgt act cgg a	t ggaagccgg	t ct t gt cgat	caggat gat c	t ggacgaaga	5880
gc at cagggg	ct cgcgccag	ccgaact gt t	cgccaggct c	aaggcgcgca	t gcccgacgg	5940
cgaggat ct c	gt cgt gaccc	at ggcgat gc	ct gct t gccg	aat at cat gg	t ggaaaat gg	6000
ccgct t t t ct	ggat t cat cg	act gt ggccg	gct ggg t gt g	gcggaccgct	at caggacat	6060
agcgt t ggct	acccgt gat a	t t gct gaaga	gct t ggccgg	gaat gggct g	accgct t cct	6120
cgt gct t t ac	gg t at cgccg	ct cccgat t c	gcagcgcat c	gcct t ct at c	gcct t ct t ga	6180
cgagt t ct t c	t gagcgggac	t ct ggggt t c	gaaat gaccg	accaagcgac	gcccacct g	6240
ccat cagcag	at t t cgatt c	caccgccgcc	t t ct at gaaa	gg t t gggct t	cggaat cgt t	6300
t t cggggacg	ccggct ggat	gat cct ccag	cgcggggat c	t cat gct gga	gt t ct t cgcc	6360
caccccaact	t g t t at t gc	agct t at aat	gg t t acaaat	aaagcaat ag	cat cacaaat	6420
t t cacaaat a	aagcat t t t t	t t cact gc at	t ct agt t gt g	gt t t gt ccaa	act cat caat	6480
gt at ct t at c	at gt ct gt at	accgt cgacc	t ct agct aga	gct t ggcgt a	at cat ggt ca	6540
t agct gt t t c	ct gt gt gaaa	t t gt t at ccg	ct cacaat t c	cacacaacat	acgagccgga	6600
agcat aaagt	gt aaagcct g	gggt gcc t aa	t gagt gagct	aact cacat t	aat t gcgt t g	6660
cgt cact gc	ccgct t t cca	gt cgggaaac	ct gt cgt gcc	agct gc at t a	at gaat cggc	6720
caacgcgcgg	ggagaggcgg	t t t gcgt at t	gggcgct ct t	ccgct t cct c	gct cact gac	6780
t cgct gcgct	cgg t cgt t cg	gct cgggcga	gcgg t at cag	ct cact caaa	ggcgg t aat a	6840
cgg t t at cca	cagaat cagg	ggat aacgca	ggaaagaaca	t gt gagcaaa	aggccagcaa	6900
aaggccagga	accgt aaaaa	ggccgcgt t g	ct ggcg t t t t	t ccat aggct	ccgccccct	6960
gacgagcat c	acaaaaat cg	acgct caagt	cagaggt ggc	gaaacccgac	aggact at aa	7020

```

agat accagg cgtttcccc tggagctcc ct cgtgcgt ct cctgficc gacctgccg 7080
ctt accggat acctgtccgc ct tctccct t cgggaagcg tggcgtttc tcat agctca 7140
cgctgt aggt atctcagttc ggtgt aggtc gttcgctcca agctgggtg tgtgcacgaa 7200
cccccggttc agcccgaccg ctgcccctta tccggt aact atcgtcttga gtccaacccg 7260
gt aagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggt aacaggat tag cagagcgagg 7320
t atgt aggcg gtgctacaga gttcttgaag tggggccct aactacggcta cactagaaga 7380
acagtatttg gatctgccc tctgctgaag ccagttacct t cggaaaaag agttggt agc 7440
tcttgatccg gcaaacaac caccgctggt agcggttttt ttgtttgcaa gcagcagatt 7500
acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct tttctacggg gtctgacgt 7560
cagtggaacg aaaactcacg tt aagggtat ttgggtcatga gattatcaaa aaggatcttc 7620
acctagatcc ttttaattt aaaaagaagt tttaaatcaa tctaaagtat atatgagt aa 7680
acttgggtctg acagttacca atgtt aatc agtgaggcac ctatctcagc gatctgtcta 7740
tttcgttcat ccatagttgc ctgactcccc gt cgtgtaga taaactacgat acgggagggc 7800
ttaccatctg gcccagtgct tgcattgata ccgcgagacc cagctcacc ggctccagat 7860
ttatcagcaa taaaccagcc agccggaagg gccgagcgca gaagtggtcc tgcacttta 7920
tccgcctcca tccagttat t aattgttgc cgggaagcta gagt aagt ag ttcgccagtt 7980
aatagtttgc gcaacgttgt tggcatgtct acaggcatcg tgggtgtcacg ct cgtcgttt 8040
gggtatggctt catctagctc cgggtcccaa cgatcaaggc gaggttacatg atccccatg 8100
ttgtgcaaaa aagcggttag ct ccttcggg cctccgatcg ttgtcagaag taagltggcc 8160
gcagtgltat cactcatggt tatggcagca ctgcat aatt ctcttactgt catgccatcc 8220
gt aagatgct tttctgtgac tgggtgaglac tcaaccaagt caltctgaga atagtgtatg 8280
cggcgaccga gttgtctctg cccggcgtca atacgggat aat accgcgcc acatagcaga 8340
actttaaaag tgtcatcat tggaaaacgt tcttcggggc gaaaactctc aaggatctta 8400
ccgctgttga gatccagttc gatgt aacc actcgtgcac ccaactgatc ttcagcatct 8460
tttactttca ccagcgtttc tgggtgagca aaaacaggaa ggcaaatgc cgcaaaaaag 8520
ggaataaggg cgacacggaa atgttgaata ctcat actct tctttttca atattatga 8580
agcatttatc agggttatg tctcatgagc ggaat acat at ttgaatgtat tt agaaaaat 8640
aaacaaat ag ggggtccgcg cacattccc cgaaaagtc cacctgacgt c 8691

```

<210> 5
 <211> 7022
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> vector X0GC/dhfr
 <400> 5

gacggatcgg gagatccgac atgat aagat acatlgatga gtttggacaa accacaacta

60

gaatgcagt g aaaaaaatgc tttatitgtg aaattitgtga tgcctatitgct tttatitgt aa	120
ccattat aag ctgcaat aaa caagtt aaca acaacaatttg caltcalttt atgtttcagg	180
ttcaggggga ggtgtgggag gtttttt aaa gcaagt aaaa cctctacaaa tgtggtatgg	240
ctgattatga tctctagtca aggcactata catcaaatat tccctatitaa cccctttaca	300
aattaaaaag ct aaaggtac acaatttttg agcat agtta ttaat agcag acaactctatg	360
cctgtgtgga gtaagaaaaa acagtatgtt atgattat aa ctgttatgcc tactttataaa	420
ggttacagaa tatttttcca taattttctt gtatagcagt gcagcttttt cctttgtggt	480
gtaaatagca aagcaagcaa gagttctatt actaaacaca gcatgactca aaaaacttag	540
caattctgaa ggaaagtcct tgggtcttc tactttctc ttttttttg gaggagtaga	600
atgttgagag tcagcagtag cctcatcatc actagatggc atttcttctg agcaaacag	660
gttttcttca ttaaggcat tccaccactg ctccatttca tcagttccat aggttggat	720
ctaaaataca caaacaattt gaatcagt ag tttaacacat tat acactta aaaaatttat	780
atttacctta gagctttaaa tctctgtagg tagttgtcc aattatgtca caccacagaa	840
gtaagggtcc ttcacaaaga tccaaagcca gcaaaagtc catggtctta taaaaatgca	900
tagctttagg aggggagcag agaacttgaa agcatcttc tgttagtctt tcttctcgt a	960
gacttcaaac ttatacttga tgcctttttc ctctggacc tcagagagga cgcctgggt a	1020
ttctgggaga agtttatatt tccccaaatc aatttctggg aaaaacgtgt cactttcaaa	1080
ttcttgcctg atcttgtca caaagagtct gaggtggcct ggttgattca tggcttctg	1140
gtaaacagaa ctgctccga ctatccaaac catgtctact ttacttgcca attcgggttg	1200
ttcaataagt cttaaggcat catccaaact tttggcaaga aaatgagctc ctctggtgg	1260
ttctttgagt tctctactga gaactatatt aattctgtcc tttaaaggctc gatcttctc	1320
aggaatggag aaccaggttt tctacctat aatcaccaga ttctgtttac ctccactga	1380
agagggtgtg gtcattcttt ggaagtaact gaactcgttc ctgagcggag gccagggt ag	1440
gtctccgttc ttgccaatcc ccatattttg ggacacggcg acgatgcagt tcaatggctg	1500
aaccatgatg gcagcgggga taaaalctt a ccagccttca cgtaggat t gccgtcaagt	1560
ttggcgcgaa atcgagccc tgagctgtgg atctccgat cccctatggt gcactctcag	1620
tacaatctgc tctgatgcc catagttaag ccagtatctg ctccctgctt gtgtgttga	1680
ggtcgctgag tagtgcgga gcaaaattta agctacaaca aggaaggct tgaccgacaa	1740
ttgcatgaag aatctgctta ggggttaggcg ttttgcgctg ctctcgcatg tacgggccag	1800
atatcgctg tgacattgat tattgactag ttattaatag taaatcaatt a cggggtcatt	1860
agttcatagc ccatatagg agttccgct tactaaactt acggtaaatg gcccgcctgg	1920
ctgaccgccc aacgaccccc gcccatlgac gtcaataatg acgtatgttc ccatagtaac	1980
gccaataggg actttccatt gacgtcaatg ggtggaglat ttacggtaaa ctgccactt	2040
ggcagtaaat caagtgtatc atatgccaaag tacgccccct attgacgtca atgacggt aa	2100
atggccccgc tggcatatg cccagtaaat gaccttatgg gactttctt a ctggcagta	2160

cat ct acgt a t t agt cat cg ct at t accat ggt gat gccg t t t t gccagt acat caat gg	2220
gcgt ggat ag cggt t t gact cacggggat t t ccaagt ct c caccocat t g acgt caat gg	2280
gag t t t g t t t t ggcacaaa at caacggga ct t t ccaaaa t gt cgt aaca act ccgcccc	2340
at t gaogcaa at gggcggg a ggcgt gt acg gt gggagg t c t at at aagca gagct ct ct g	2400
gct aact aga gaacccact g ct t act ggct t at cgaaat t aat acgact c act at agggg	2460
gaccaagct t ggt accgag ct cggat cca ct agt aacgg ccgccagt gt gct ggaat t c	2520
t gcagat at c cat cacact g gcggccgct c gagcat gcat ct agagggcc ct at t ct at a	2580
gt gt cacct a aat gct agag ct cgt gal c agcct cgact gt gct t ct a gt t gccagcc	2640
at ct gt t gt t t gccccct ccc ccgt gcc t t c ct t gacct g gaagg t gcc a ct cccact gt	2700
cc t t t cct aa taaaat gagg aaat t gcat c gcat t gt ct g agt aggt gt c at t ct at t ct	2760
gggggggt ggg gt ggggcagg acagcaaggg ggaggat t gg gaagacaat a gcaggcat gc	2820
t ggggat gcg gt gggct ct a t ggc t t ct ga ggcggaaaga accagct ggg gct ct agggg	2880
gt at cccac gcgccct gt a gcggcgcat t aagcgcggcg ggt gt ggt gg t t acgcgcag	2940
cgt gaccgct acact t gcc a gcgccct agc gccgct cct t t cgt t t ct t ccc t t cct t	3000
t ct cgccacg t t cgccggct t t cccgct ca agct ct aaat cgggggct cc ct t t aggg t t	3060
ccgat t t agt gct t t acggc acct cgacct caaaaaact t gat t aggg t g at ggt t cag	3120
t agt gggcca t cgccct gat agacggt t t t t cgccct t t g acgt t ggagt ccacgt t ct t	3180
t aat agt gga ct ct t gt t cc aaact ggaac aacact caac cct at ct cgg t ct at t ct t t	3240
t gat t t at aa gggat t t t gc cgat t t cggc ct at t ggt t a aaaaat gage t gat t t aaca	3300
aaaat t t aac gcgaat t aat t ct gt ggaat gt gt gt cagt t aggg t gt gg aaagt cccca	3360
ggct cccag caggcagaag t at gcaaagc at gcat ct ca at t agt cage aaccagg t gt	3420
ggaaagt ccc caggct cccc agcaggcaga agt at gcaaa gcat gcat ct caat t agt ca	3480
gcaacat ag t cccgcccc aact ccgccc at cccgcccc t aact ccgcc cagt t ccgcc	3540
cat t ct ccgc cccat ggct g act aat t t t t t t at t t at g cagaggccga ggccgct ct	3600
gcct ct gage t at t ccagaa gt agt gagga ggct t t t t t g gaggcct agg ct t t t gcaaa	3660
aagct cccgg gagct t gt at at ccat t t t c ggat ct gat c aagagacagg at gaggat cg	3720
t t t cgc at ga t t gaacaaga t gga t t gcac gcagg t t ct c cggccgct t g ggt ggagagg	3780
ct at t cggct at gact gggc acaacagaca at cggct gct ct gat gccgc cgt gt t ccgg	3840
ct gt cagegc aggggcgccc ggt t ct t t t t gt caagaccg acct gt ccgg t gccct gaat	3900
gaact gcagg acgaggcagc gcggct at cg t ggt ggcca cgacgggct t cct t gcgca	3960
gct gt gct cg acgt t gt cac t gaagcggga agggact ggc t gct at t ggg cgaagt gccg	4020
gggcaggat c t cct gt cat c t cact t gct cct gccgaga aagt at ccat cat ggct gat	4080
gcaat gcggc ggct gcat ac gct t gat ccg gct acct gcc cat t cgacca ccaagcgaaa	4140
cat cgc at cg agcagacag t act cggat g gaagccggt c t t gt cgat ca ggat gat ct g	4200

gacgaagagc atcaggggct cgcgccagcc gaactgttcg ccaggctcaa ggccgcgatg 4260
 cccgacggcg aggatctcgt cgtgacccat ggcatgcct gcttgcgaa tatcatggtg 4320
 gaaaatggcc gcttttctgg atlcatcgac tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat 4380
 caggacalag cgttggctac ccgtgatatl gctgaagagc ttggcggcga atgggtgac 4440
 cgcttccfcg tgccttacgg tatcgccgt cccgatlcgc agcccatcgc ctctatcgc 4500
 ctctctgacg agtctctctg agcgggactc tggggttcca aatgaccgac caagcgacgc 4560
 ccaacctgcc atcacgagat ttcatlcca ccgccgctt ctatgaaagg ttgggttcg 4620
 gaatcgtttt cggggacgcc ggctggatga tccccagcg cggggatctc atgctggagt 4680
 tcttcgcccc ccccaacttg tttatlgcag ctatalaagg ttacaaataa agcaatagca 4740
 tcacaaattt cacaaataaa gcatttttt cactgcattc tagtgtgtgt ttgtccaaac 4800
 tcatcaatgt atcttatcat gtctglatac cgtcgacctc tagctagagc ttggcgtaat 4860
 catggtcata gctglttcc tgttgaaatt gtatalccgt cacaattcca cacaacat ac 4920
 gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaatg agtgagctaa ctacatlaa 4980
 ttgctgtgcg ctcactgcc gctttccagt cgggaaacct gtgctgccag ctgcatlaa 5040
 gaatcggcca acgcgcgggg agaggcgggt tgcgtatltg gcgctcttcc gcttccfcgc 5100
 tcactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaagg 5160
 cggtaatcgc gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacalgt gagcaaaag 5220
 gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgc tggcgtttttc cataggctcc 5280
 gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga aaccgcacag 5340
 gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga 5400
 cctgccgct taccggat ac ctgtccgct tctcccttc gggaagcgtg gcgctttctc 5460
 atagctcagc ctgtaggat ctcagltcgg tgtaggctgt tgcctccaag ctgggtgtg 5520
 tgcacgaacc cccgttcag cccgaccgt gcgctlatc cgttaactat cgtcttgagt 5580
 ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac aggatlagca 5640
 gagcgaggla tgtaggcgt gctacagagt tcttgaagtgt gtggcctaac taccgctaca 5700
 ctagaagaac agtatltgt atctgcgctc tgcctgaagcc agtaccttc ggaaaaagag 5760
 ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cgttgggttt ttgtttgca 5820
 agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcccttgatc ttttctacgg 5880
 ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gttaaaggat ttltgtcatg agatlatcaa 5940
 aaaggatctt cactagatc ctlttaaat taaaaatgaag ttttaaatca atctaaagta 6000
 tatatgagta aacttggct gacagttacc aatgctfaat cagtgaggca cctatctcag 6060
 cgatctgtct alttcgttca tccatagttg cctgactccc cgtcgtgtag ataaclacga 6120
 tacggggagg cttaaccatct ggccccagtgt ctgcaatgat accgcgagac ccacgctcac 6180
 cggctccaga ttlatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc agaagtggtc 6240
 ctgcaacttt atccgctcc atccagtcta tttaattgttg ccgggaagct agagt aagta 6300

gttcgccagt taatagtgtg cgcaacgttg ttgccattgc tacaggcatc gtggtgtcac 6360
gctcgtcgtt tggatggct tcatlcagct ccggttccca acgatcaagg cgagtiacat 6420
gatccccat gtigtgcaaa aaagcggfta gctccttcgg tcctccgatc gtigtcagaa 6480
gtaagttggc cgcagtgfta tcactcatgg ttatggcagc actgcataat tctcttactg 6540
tcatgccatc cgt aagatgc ttttctgtga ctgglgagta cicaaccaag tcatlctgag 6600
aatagtgtat gggcgaccg agtgcctctt gcccggggtc aatccgggat aatccgcgc 6660
cacatagcag aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaacg ticttcgggg cgaaaactct 6720
caaggatctt accgctgttg agatccagtt cgatgt aacc cactcgtgca cccaactgat 6780
cttcagcatc ttttactttc accagcgttt ctgggtgagc aaaaacagga aggcaaaatg 6840
ccgcaaaaaa gggaat aagg ggcacacgga aatgtigaat actcalactc ttcctttttc 6900
aatattatig aagcatilat cagggtlat gtctcalgag cggatacata tttgaatgta 6960
ttlagaaaaa taacaaata ggggttcgc gcacatttcc ccgaaaagtg ccacctgacg 7020
tc 7022

<210> 6
<211> 6422
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> vector X1GC/dhfr
<400> 6

gacggatcgg gagatccatt ctccgcccc a tggctgacta atttttttta tttatgcaga 60
ggccgaggcc gctctgcc ctgagctatt ccagaagt ag taggaggct tttttggagg 120
cctaggcttt tgcaaaaagc tcccgggatg gttcgaccat tgaactgcat cgtcgccglg 180
tccccaaat a tggggat tgg caagaacgga aacctacct ggctccgct caggaacgag 240
ttcaagtact tccaaagaat gaccacaacc tcttcagttg aaggt aaaca gaatctgggtg 300
attatgggt a ggaaaacctg gtctccatt cctgagaaga atcgacctt aaaggacaga 360
attaatatag tcttcagtag agaactcaaa gaaccaccac gaggagctca ttttcttggc 420
aaaagtttgg atgatgcc tt aagacttatt gaacaaccgg aattggcaag taaagt agac 480
atggtttgga tagtcggagg cagttctgtt taccaggaag ccatgaatca accaggccac 540
ctcagactct ttgtgacaag gatcatgcag gaatttgaaa gtgacacgtt tttccagaa 600
attgatttgg ggaaatataa acttctccca gaataccag gcgtcctctc tgagggtccag 660
gaggaaaaag gcatcaagta taagtttgaa gtctacgaga agaaagacta acaggttcga 720
aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc atcacgagat ttcgattcca ccgccgctt 780
ctatgaaagg ttgggttcg gaatcgtttt ccgggacgcc ggctggatga tctccagcg 840
cggggatctc atgctggagt tcttcgcca cccaacttg ttatattgcag cttaataagg 900
ttacaaataa agcaatagca tcacaaattt cacaataaaa gcatttttt cactgatttc 960

t agt t gt ggt t t gt ccaaac t cal caat gl at ct t at cat gt ct gggat c t cccgat ccc 1020
 ct at ggt gca ct ct cagt ac aat ct gct ct gat gccgcat agt t aagcca gt at ct gct c 1080
 cct gct t gt g t gt t ggaggt cgc t gagt ag t gcgcgagca aaat t t aagc t acaacaagg 1140
 caaggct t ga ccgacaat t g cat gaagaat ct gct t aggg t t aggcgt t t t gcgct gct t 1200
 cgcgat gt ac gggccagat a t acgcgt t ga cat t gat t at t gact agt t a t t aat agt aa 1260
 t caat t acgg ggt cat t agt t cal agccca t at at ggagt t ccgcgt t ac at aact t acg 1320
 gt aaat ggc cgcct ggt g accgcccac gaccccgcc cat t gacgt c aat aat gacg 1380
 t at gt t ccca t agt aacgcc aat agggact t t ccat t gac gt caat ggg t ggagt at t t a 1440
 cgg t aaact g cccact t ggc agt acat caa gt gt at cat a t gccaaagt ac gccccct at t 1500
 gacgt caat g acgg t aaat g gcccgct gg cat t at gcc agt acat gac ct t at gggac 1560
 t t t cct act t ggcagt acat ct acgt at t a gt cat cgct a t t accat ggt gat gcggt t t 1620
 t ggcagt aca t caat gggcg t ggat agcgg t t t gact cac ggggat t t cc aagt ct ccac 1680
 cccat t gacg t caat gggag t t t gt t t t gg caccaaaat c aacgggact t t ccaaaaat gt 1740
 cgt aacaact ccgccccat t gacgcaaat g ggcgt aggc gt gt acgg t g ggaggt ct at 1800
 at aagcagag ct ct ct ggt aact agagaa cccact gct t act ggct t at cgaaat t aat 1860
 acgact cact at agggagac ccaagct ggc t agcgt t t aa act t aagct t ggt accgagc 1920
 t cggat ccac t agt ccagt g t ggt ggaat t ct gcagat at ccagcacagt ggcggccgct 1980
 cgagt ct aga gggcccg t t t aaaccgcgt g at cagcct cg act gt gcct t ct agt t gcc a 2040
 gccat ct gt t gt t t gccct cccccgt gcc t t cct t gacc ct ggaaggt g ccact cccac 2100
 t gt cct t t cc t aat aaaat g aggaat t gc at cgc at t gt ct gagt aggt gt cat t ct at 2160
 t ct ggggggt ggggt ggggc aggacagcaa gggggaggat t ggggaagaca at agcaggca 2220
 t gct ggggat gcggt gggct ct at ggct t c t gaggcgga agaaccagct ggggt ct ag 2280
 ggggt at ccc cagcgccct gt agcgggc at t aagcgc ggcgggt gt gg t ggt t acgcg 2340
 cagcgt gacc gct acact t g ccagcgccct agcgcgcgt cct t t cgct t t ct t cct t c 2400
 ct t t ct cgcc acgt t cgccg gct t t ccccg t caagct ct a aat cgggggc t cct t t agg 2460
 gt t ccgat t t agt gct t t ac ggcacct cga ccccaaaaaa ct t gat t agg gt gat ggt t c 2520
 acgt agt ggg ccat cgccct gat agcgggt t t t t cgccct t t gacgt t gg agt ccacgt t 2580
 ct t t aat agt ggact ct t gt t ccaaaact gg aacaacact c aacct at ct cgg t ct at t c 2640
 t t t t gat t t a t aagggt t t t gccgat t t c ggct at t gg t t aaaaaa g agct gat t t a 2700
 acaaaaat t t aacgcgaat t aat t ct gt gg aat gt gt gt c agt t aggg t g t ggaaagt cc 2760
 ccaggct ccc cagcaggcag aagt at gcaa agcat gcat c t caat t agt c agcaaccagg 2820
 t gt ggaaagt cccaggt c cccagcaggc agaagt at gc aaagcat gca t ct caat t ag 2880
 t cagcaacca t agt cccgcc cct aact ccg cccat cccgc cct aact cc gccag t t cc 2940
 gccat t ct c cgccccat gg ct gact aat t t t t t t at t t at gcagaggc cgaggccgcc 3000

t ct gcc t ct g	agct at t cca	gaagt agt ga	ggaggct t t t	t t ggaggcct	aggct t t t gc	3060
aaaaagct cc	cgggagct t g	t at at ccat t	t t cggat ct g	at caagagac	aggat gagga	3120
t cgt t t cgca	t gat t gaaca	agat g gat t g	cacgcagg t t	ct ccggccgc	t t ggg t ggag	3180
aggct at t cg	gct at gact g	ggcacaacag	acaat cggct	gct ct gat gc	cgccgt g t c	3240
cggct g t cag	cgcaggggcg	cccgt t ct t	t t t g t caaga	ccgacct g t c	cgg t gccct g	3300
aat gaact gc	aggacgaggc	agcgcggct a	t cgt ggct gg	ccacgacggg	cgt t cct t gc	3360
gcagct gt gc	t cgacgt t gt	cact gaagcg	ggaagggaact	ggct gct at t	gggcgaagt g	3420
ccggggcagg	at ct cct g t c	at ct cacc t t	gct cct gccg	agaaagt at c	cat cat ggt	3480
gat gcaat gc	ggcggct gca	t acgct t gat	ccggct acct	gcccat t cga	ccaccaagcg	3540
aaacat cgca	t cgagcgagc	acgt act cgg	at ggaagccg	gt ct t g t cga	t caggat gat	3600
ct ggacgaag	agcat caggg	gct cgcgccca	gccgaact gt	t cggcaggct	caaggcgcgc	3660
at gcccgacg	gcgaggat ct	cgt cgt gacc	cat ggcgat g	cct gct t gcc	gaat at cat g	3720
gt ggaaaaat g	gccgct t t t c	t ggat t cat c	gact gt ggcc	ggct ggg t gt	ggcggaccgc	3780
t at caggaca	t agcgt t ggc	t accgt gat	at t gct gaag	agct t ggcgg	cgaat gggct	3840
gaccgt t cc	t cgt gct t t a	cgg t at cgcc	gct cccgat t	cgcagcgcat	cgcct t ct at	3900
cgcct t ct t g	acgagt t ct t	ct gacggga	ct ct ggggt t	cgaaat gacc	gaccaagcga	3960
cgcccaacct	gccat cacga	gat t t cgat t	ccaccgcgcg	ct t ct at gaa	agg t t gggct	4020
t cggaat cgt	t t t ccgggac	gccggct gga	t gat cct cca	gcgcggggat	ct cat gct gg	4080
agt t ct t cgc	ccaccccaac	t t g t t at t g	cagct t at aa	t ggt t acaaa	t aaagcaat a	4140
gcat cacaaa	t t t cacaaa	aaagcat t t t	t t t cact gca	t t ct agt t gt	gg t t t gt cca	4200
aaact cat caa	t gt at ct t at	cat gt ct gt a	t accgt cgac	ct ct agct ag	agct t ggcgt	4260
aat cat ggt c	at agct g t t t	cct gt gt gaa	at t gt t at cc	gct cacaa t t	ccacacaaca	4320
t acgagccgg	aagcat aaag	t gt aaagcct	gggg t gcct a	at gagt gagg	t aact cacat	4380
t aat t gcgt t	gcgct cact g	cccgt t t cc	agt cgggaaa	cct gt cgt gc	cagct gcat t	4440
aat gaat cgg	ccaacgcgcg	gggagaggcg	gt t t gcgt at	t gggcgct ct	t ccgct t cct	4500
cgt cact ga	ct cgct gcgc	t cgg t cgt t c	ggct gcggcg	agcgg t at ca	gct cact caa	4560
aggcgg t aat	acgg t t at cc	acagaat cag	gggat aacgc	aggaaagaac	at gt gagcaa	4620
aaggccagca	aaaggccagg	aaccgt aaaa	aggccgcgt t	gct ggcgt t t	t t ccat aggc	4680
t ccgcccccc	t gacgagcat	cacaaaaat c	gacgt caag	t cagagg t gg	cgaaacccga	4740
caggact at a	aagat accag	gcgt t t cccc	ct ggaagct c	cct cgt gcgc	t ct cct g t c	4800
cgacct gcc	gct t accgga	t acct gt ccg	cct t t ct ccc	t t cgggaagc	gt ggcgt t t	4860
ct cat agct c	acgt gt agg	t at ct cagt t	cgg t gt aggt	cgt t cgct cc	aagct gggct	4920
gt gt gcacga	acccccgt t	cagcccgacc	gct gcgcct t	at ccgg t aac	t at cgt ct t g	4980
agt ccaaccc	ggt aagacac	gact t at cgc	cact ggcagc	agccact ggt	aacaggat t a	5040
gcagagcgag	gt at gt aggc	ggt gct acag	agt t ct t gaa	gt ggt ggcct	aact acggct	5100

```

acact agaag aacagf atf f ggl al cf gcg cf cf gct gaa gccagf t acc f f cggaaaaa 5160
gagf f ggt ag cf cf f gat cc ggcaaaacaaa ccaccgcf gg f agcggf f f f f f g f f gca 5220
agcagcagat f acgcgcaga aaaaaaggat cf caagaaga f cct f f gat c f f f f cf acgg 5280
ggt cf gacgc f cagf ggaac gaaaact cac g f f aagggat f f f ggt cat g agat f at caa 5340
aaaggat cf f cacct agat c cf f f f aaat f aaaaat gaag f f f f aaat ca at cf aaagt a 5400
f at at gagf a aact f ggt cf gacagf t acc aat gct t aat cagt gaggca cct at cf cag 5460
cgat cf g f cf at f f cgt f ca f ccat agf f g cct gact ccc cgt cgt g f ag at aact acga 5520
f acgggaggg cf f accat cf ggccccagf g cf gcaat gat accgcgagac ccacgcf cac 5580
cggct ccaga f f f at cagca at aaaccagc cagccggaag ggccgagcgc agaagf ggt c 5640
cf gcaact f f at ccgcct cc at ccagf cf a f f aat f g f f cggggaagct agagf aagf a 5700
g f f cgcagf f aat agf f f g cgaacg f f f f g ccat f g c f acaggcat c g f ggt g f cac 5760
gct cgt cgt f f ggt at ggct f cat f cagct ccggt f ccca acgat caagg cgagf f acat 5820
gat ccccat g f f g f gcaaa aaagcggf f a gct cct f cgg f cct ccgat c g f f g f cagaa 5880
g f aagf f ggc cgcagf g f f a f cact cat gg f f at ggcagc act gcat aat f cf cf f act g 5940
f cat gccat c cgt aagat gc f f f f cf g f ga cf ggt gagf a cf caaccaag f cat f cf gag 6000
aat agf g f at gcggcgaccg agf f gcf cf f gcccggcgc aat acgggat aat accgcgc 6060
cacat agcag aact f f aaaa g f gcf cat ca f f ggaaaacg f f cf f cgggg cgaaaact cf 6120
caaggat cf f accgcf g f f g agat ccagf f cgat g f aacc cact cgt gca cccaact gat 6180
cf f cagcat c f f f f act f f c accagcgt f f cf gggf ggc aaaaacagga aggcaaaat g 6240
ccgcaaaaaa gggaat aagg gcgacacgga aat g f f gaat act cat act c f f cct f f f c 6300
aat at f at f g aagcat f f at cagggt f at f g f cf cat gag cggat acat a f f f gaat g f a 6360
f f f agaaaaa f aaacaaat a ggggt f ccgc gcacat f f cc ccgaaaagt g ccacct gacg 6420
f c 6422

```

<210> 7
 <211> 1572
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> módulo x0GC/dhfr
 <400> 7

gacatgat aa gat acattga t gagg t t t gga caaaccacaa ct agaat gca gt gaaaaaaa 60
tgc t t t a t t t gt gaaat t t g t gat gct a t t gc t t t a t t t g t a accat t a t aagct gcaat 120
aaacaag t t a acaacaacaa t t gcat t t cat t t t a t g t t t c aggt t caggg ggaggt gt gg 180
gagg t t t t t t aaagcaagt a aaacct ct ac aaat gt ggt a t ggct gat t a t gat ct ct ag 240
t caaggcact at acat caaa t at t cct t at t aacccct t t acaaat t aaa aagct aaagg 300
t acacaat t t t t gaggcat ag t t a t t aat ag cagacact ct at gcct gt gt ggagt aagaa 360

aaaacag t at gt t at gat t a t aact gt t at gcct act t at aaagg t t aca gaat at t t t t 420
ccat aat t t t ct t g t at agc agt gcagct t t t t cct t t g t ggt gt aaat a gcaaagcaag 480
caagag t t ct at t act aaac acagcat gac t caaaaaact t agcaat t ct gaaggaaagt 540
cct t ggggt c t t ct acct t t ct ct t ct t t t t t ggaggagt agaat gt t ga gagt cagcag 600
tagcct cat c at cact agat ggcat t t ct t ct gagcaaaa cagg t t t t c t cat t aaagg 660
cat t ccacca ct gct cccat t cal cag t t c cat aggt t gg aat ct aaaat acacaaacaa 720
t tagaal cag t agt t t aaca cat t at acac t t aaaaa t t t at at t t acc t t agagct t t 780
aaat ct ct gt aggt agt t t g t ccaat t at g t cacaccaca gaagt aaggt t cct t cacia 840
agat ccaaag ccagcaaaag t cccat ggt c t t at aaaaat gcat agct t t aggaggggag 900
cagagaact t gaaagcat ct t cct gt t agt ct t t ct t ct c gt agact t ca aact t at act 960
t gat gcc t t t t t cct cct gg acct cagaga ggacgcct gg gt at t ct ggg agaagt t t at 1020
at t t ccccaa at caat t t ct gggaaaaacg t gt cact t t c aaat t cct gc at gat cct t g 1080
t caciaaagag t ct gagg t gg cct ggt t gat t cal ggt t c ct ggt aaaca gaact gcc t c 1140
cgact at cca aacct gt ct act t t act t g ccaat t ccgg t t gt t caat a agt ct t aagg 1200
cat cal ccaa act t t t ggca agaaaat gag ct cct cgt gg t ggt t ct t t g agt t ct ct ac 1260
t gagaact at at t aat t ct g t cct t t aaag gt c gat t ct t ct caggaat g gagaaccagg 1320
t t t t cct acc cat aat cacc agat t ct g t t t acct t ccac t gaagaggt t gt ggt cat t c 1380
t t t ggaagt a ct t gaact cg t t cct gagcg gaggccaggg t aggt ct ccg t t ct t gccaa 1440
t ccccat at t t t gggacacg ggcagcat gc agt t caat gg t cgaacct g at ggcagcgg 1500
ggat aaaa t c ct accagcct t cagcct agg at t gccgt ca agt t t ggcgc gaaat cgcag 1560
ccct gagct g t g 1572

- <210> 8
<211> 988
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> módulo x1GC/dhfr
<400> 8

at t c t c g c c c c c a t g g c t g a c t a a t t t t t t t a t t t a t g c a g a g g c c g a g g c c g c c t c t g 60
c c t c t g a g c t a l l c c a g a a g t a g t g a g g a g g c t t t t t t g g a g g c c t a g g c t t t t g c a a a a 120
a g c t c c c g g g a t g g t t c g a c c a t t g a a c t g c a t c g t c g c c g t g t c c c a a a a t a t g g g g a t 180
t g g c a a g a a c g g a a c c t a c c c t g g c c t c c g c t c a g g a a c g a g t t c a a g t a c t t c c a a a g 240
a a t g a c c a c a a c c t c t t c a g t g g a a g g t a a a c a g a a t c t g g t g a t t a t g g g t a g g a a a c 300
c t g g t t c t c c a t t c c t g a g a g a a t c g a c c t t t a a a g g a c a g a a t t a a t a t a g t t c t c a g 360
t a g a g a a c t c a a g a a c c a c c a c g a g g a g c t c a t t t t c t t g c c a a a a g t t t g g a t g a t g c 420
c t t a a g a c t t a t t g a a c a a c c g g a a t t g g c a a g t a a a g t a g a c a t g g t t t g g a t a g t c g g 480

a g g c a g t t c t g t t a c c a g g a a g c c a t g a a t c a a c c a g g c c a c c t c a g a c t c t t t g t g a c 540
a a g g a t c a t g c a g g a a t t t g a a a g t g a c a c g t t t t c c c a g a a t t g a t t t g g g g a a a t a 600
t a a a c t t c t c c c a g a a t a c c a g g c g t c c t c t c t g a g g t c c a g g a g g a a a a a g g c a t c a a 660
g t a l a a g t t t g a a g t c t a c g a g a a g a a g a c t a a c a g g t t c g a a a t g a c c g a c c a a g c g a 720
c g c c c a a c c t g c c a t c a c g a g a t t c g a t t c c a c c g c c g c c t t c t a t g a a a g g t t g g g c t 780
t c g g a a t c g t t t t c c g g g a c g c c g g c t g g a t g a t c c t c c a g c g c g g g g a t c t c a t g c t g g 840
a g t t c t t c g c c c a c c c a a c t t g t t t a t t g c a g c t t a t a a t g g t t a c a a a t a a a g c a a t a 900
g c a t c a c a a a t t t c a c a a a t a a a g c a t t t t t t c a c t g c a t t c t a g t t g t g g t t t g t c c a 960
a a c t c a t c a a t g t a t c t t a t c a t g t c t g 988

- <210> 9
- <211> 1010
- 5 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> módulo x3GC/dhfr
- <400> 9

ct aact ccgc ccagtt ccgc ccat tct ccg ccccat ggct gact aatttt ttttat tttat	60
gcagaggccg aggccgcctc tgcct ct gag ct att ccaga agt agt gagg aggct ttttt	120
ggaggcct ag gctttt gcaa aaagct cccg ggat ggt t cg accat t gaac t gcat cgt cg	180
ccgt gt ccca aaat at gggg at tggcaaga acggaaacct accct ggct cgc t cagga	240
acgagtt caa gt act t ccaa agaat gacca caacct ct t c agt ggaaggt aaacagaat c	300
t ggt gat t at gggg aggaaa acct ggt t ct ccat t cct ga gaagaat cga cct t t aaagg	360
acagaatt aa t at agt t ct c agt agagaac t caaagaacc accacgagga gct cat t t t c	420
t t gccaaaag t t t ggat gat gcc t t aagac t t at t gaaca accggaat t g gcaagt aaag	480
t agacat ggt t t ggat agt c ggaggcagtt ct gtt t acca ggaagccat g aat caaccag	540
gccacct cag act ct t t gt g acaaggat ca t gcaggaatt t gaaagt gac acgt t t t t c	600
cagaaatt ga t t t ggggaaa t at aaact t c t cccagaat a cccaggcgt c ct ct ct gagg	660
t ccaggagga aaaaggcat c aagt at aagt t t gaagt ct a cgagaagaaa gact aacagg	720
t t cgaaat ga ccgaccaagc gacgccaac ct gccat cac gagat t t cga t t ccaccgcc	780
gct t ct at g aaagggt t ggg ct t cggaat c gt t t t cggg acgcccgt g gat gat cct c	840
cagcgcgggg at ct cat gct ggagt t ct t c gccacccca act t gtt t at t gcagct t at	900
aat ggt t aca aat aaagcaa t agcat caca aat t t caca at aaagcat t t t t t cact g	960
cat t ct agt t gt ggt t t gt c caaact cat c aat gt at ct t at cat gt ct g	1010

<210> 10
 <211> 1044
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> módulo x6GC/dhfr
 <400> 10

cat agt cccg cccct aact c cgcccat ccc gccct aact ccgcccagt t ccgcccatt c 60
 tccgcccatt ggct gact aa tttttttt at ttat gcagag gccgaggccg cct ct gcct c 120
 tgagct att c cagaagt agt gaggaggct t ttttggaggc ct aggc ttt gcaaaaagct 180
 cccgggat gg ttcgacctt gaact gcat c gt cgcctgt cccaaaaat at ggggat tggc 240
 aagaacggaa acct accct g gcct ccgct c aggaacgagt tcaagt act t ccaaagaat g 300
 accacaacct ct t cagt gga aggt aaacag aat ct ggt ga ttat gggtag gaaaacct gg 360
 ttctccatt c ctgagaagaa t cgacct tta aaggacagaa ttaat at agt tct cagt aga 420
 gaact caaag aaccaccacg aggagct cat tttct t gcc aaggt t t gga t gat gcct t a 480
 agact t at t g aacaaccgga at tggcaagt aaagt agaca tgggt t t gga agt cggaggc 540
 agt t ct gt t t accaggaagc cat gaat caa ccaggccacc t cagact ct t t gt gacaagg 600
 at cat gcagg aat t t gaaag t gacacgt t t t cccagaaa t t gat t t ggg gaaat at aaa 660
 ct t ct cccag aat acccagg cgt cct ct ct gaggt ccagg aggaaaaagg cat caagt at 720
 aagt t t gaag t ct acgagaa gaaagact aa caggt t cgaa at gaccgacc aagcgacgcc 780
 caacct gcc a t cagagatt t cgat t ccac cgccgcc t t c t at gaaaggt tgggt t t cgg 840
 aat cgt t t t c cgggacgccg gct ggat gat cct ccagcgc ggggat ct ca t gct ggagt t 900
 ct t cggccac cccaact t gt ttat t gcagc ttat aat ggt t acaaat aaa gcaat agcat 960
 cacaaatt t c acaaat aaag cat ttttttt c act gcat t ct agt t gt ggt t tgt ccaaact 1020
 cat caat gt a t ctt at cat g t c t g 1044

- <210> 11
 <211> 30
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador dhfr-01
 <400> 11
 10 ggcgcggga tgggt cgacc at t gaact gc 30
 <210> 12
 <211> 34
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador dhfr-02
 <400> 12
 cact t agaac ct gt t agt ct tt ctt t ct cgt agac 34
 20
 <210> 13
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> cebador x1GC
 <400> 13
 tcaggatcca ttccggccc catggctgac taa 33
 30 <210> 14
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> cebador x3GC
 <400> 14
 catggatcct aactccgccc agttccgccc at t ct 35

5 <210> 15
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

10 <223> cebador x6GC
 <400> 15
 catggatccc atagtcgccg ccct aact cc gccc 34

<210> 16
 15 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> cebador X0GC
 20 <400> 16
 ccatggatcc gacatgataa gat acat t ga t 31

<210> 17
 <211> 31
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> cebador X0GCRR
 <400> 17
 30 cgttggatcc acagctcagg gctgcgattt c 31

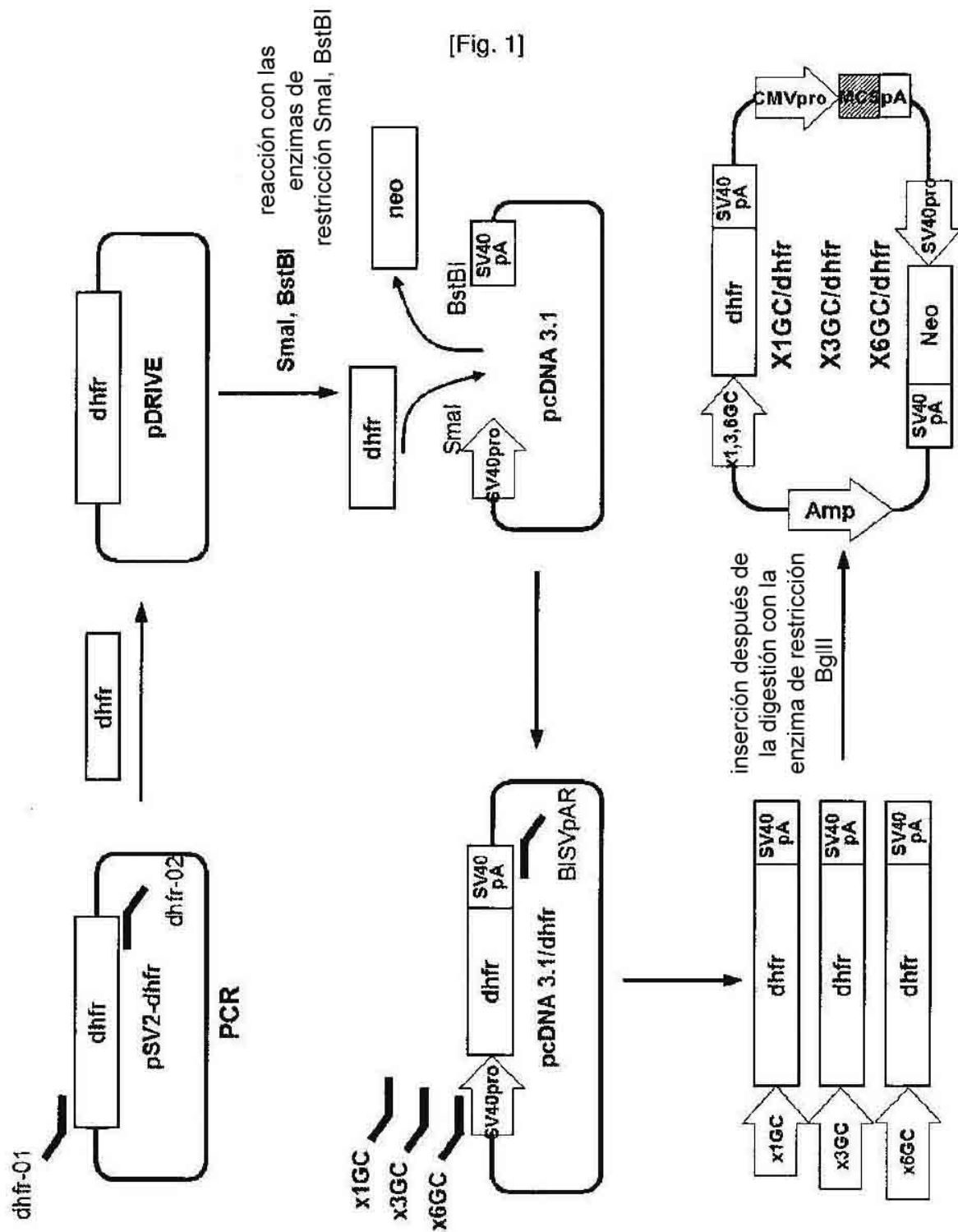
<210> 18
 <211> 33
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> cebador BI SVpAR
 <400> 18
 tcaggatccc agacatgata agatacattg atg 33

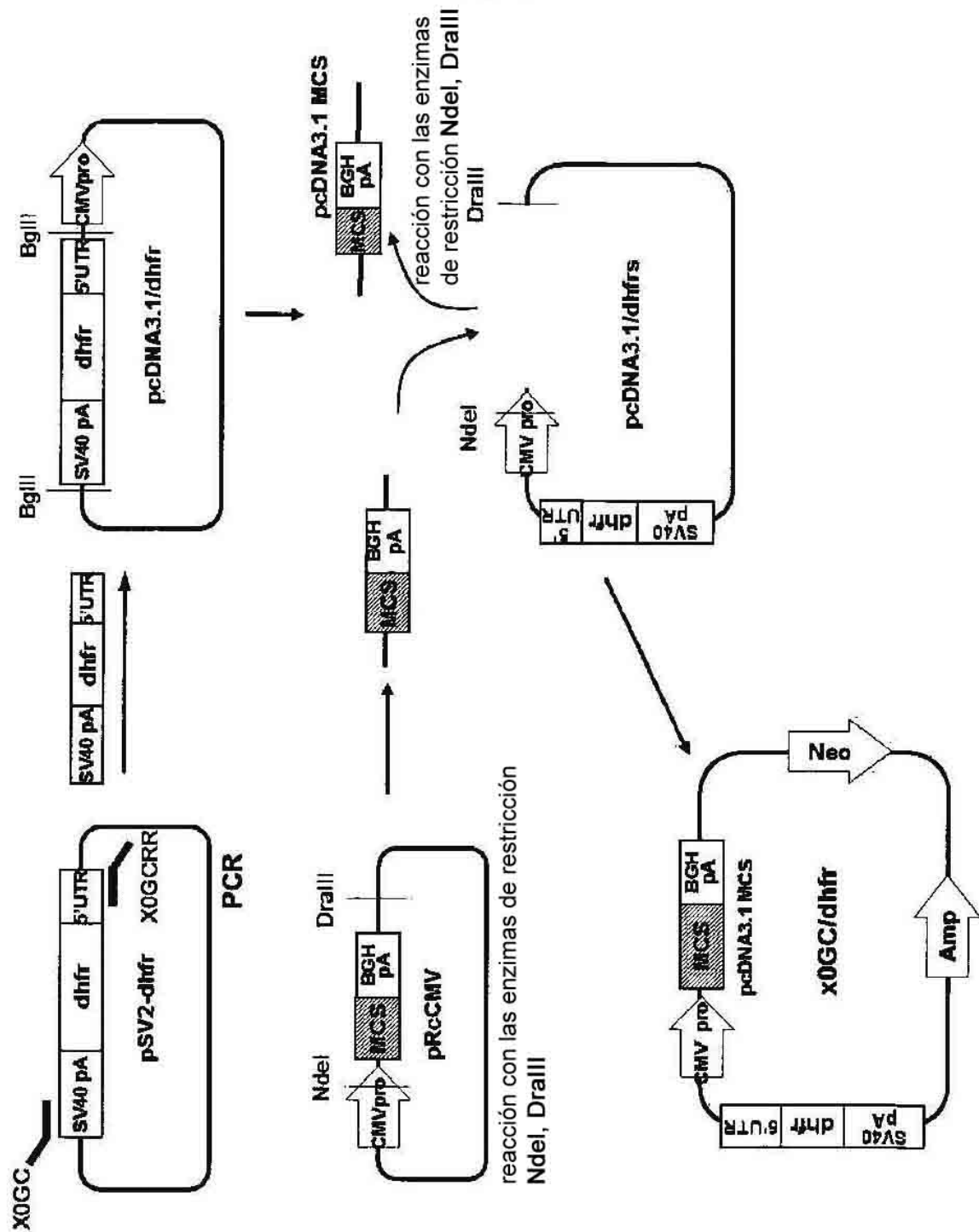
40

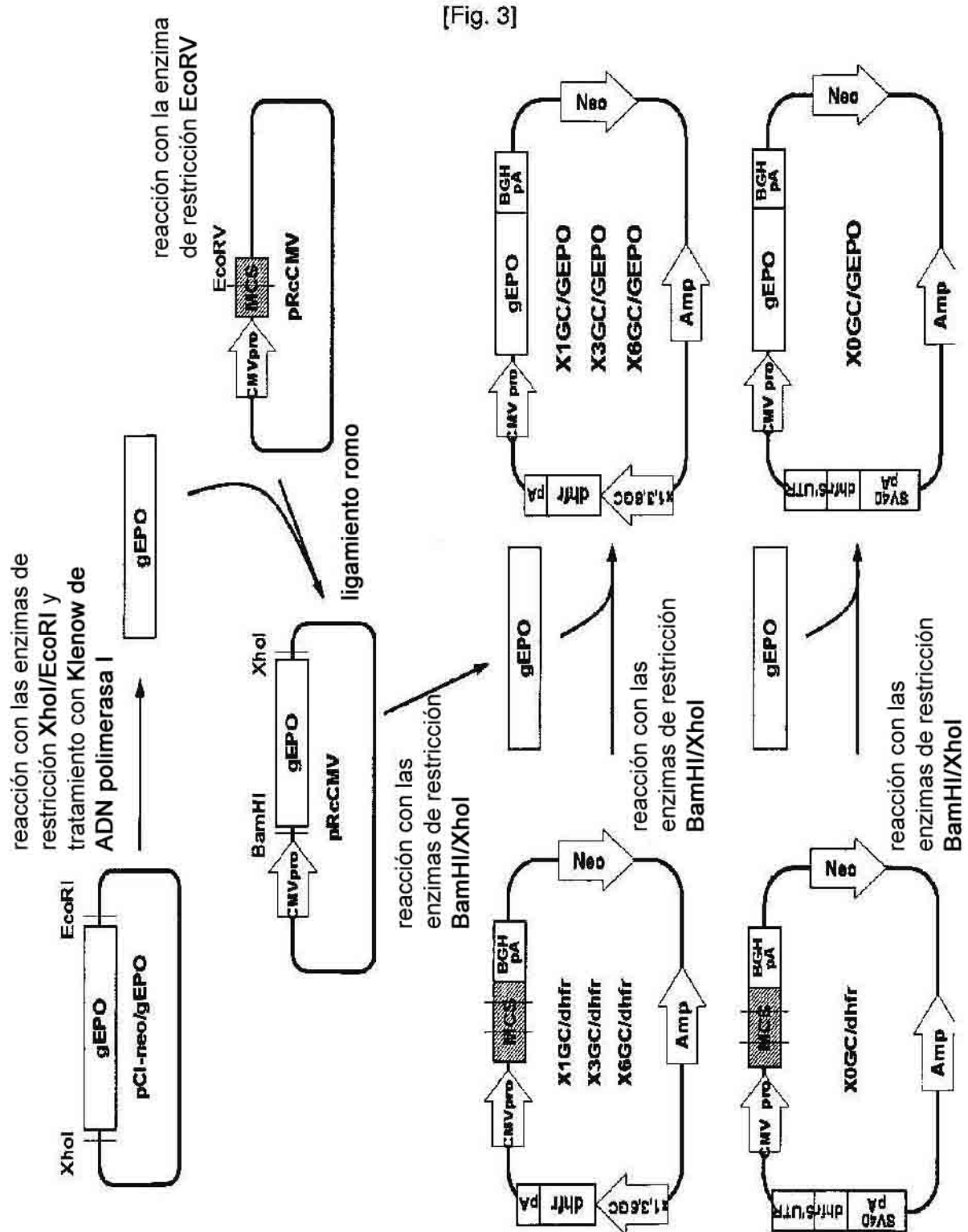
REIVINDICACIONES

1. Un modulo de alta expresión inducible que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una dihidrofolato reductasa y una secuencia nucleotídica que está ligada con la secuencia nucleotídica y codifica un promotor de dihidrofolato reductasa del que se han eliminado una o más secuencias CCGCCC repetidas.
2. El módulo de alta expresión inducible según la reivindicación 1, en el que el promotor de dihidrofolato reductasa contiene una o cero secuencias CCGCCC repetidas
3. El módulo de alta expresión inducible según la reivindicación 1, que tiene una secuencia nucleotídica cualquiera seleccionada del grupo constituido por las representadas por las SEQ ID Nos. 7 a 10.
4. Un vector de expresión que comprende el módulo de alta expresión inducible de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. El vector de expresión según la reivindicación 4, que comprende adicionalmente un gen que codifica un polipéptido fisiológicamente activo.
6. El vector de expresión según la reivindicación 5, en el que el polipéptido fisiológicamente activo es eritropoyetina humana.
7. El vector de expresión según la reivindicación 6, que tiene una secuencia nucleotídica cualquiera de las seleccionadas del grupo constituido por las representadas por las SEQ ID Nos. 1 a 4.
8. El vector de expresión según la reivindicación 4, que tiene una secuencia nucleotídica representada por la SEQ ID No. 5 o 6.
9. Una línea celular transformada con el vector de expresión de la reivindicación 8.
10. La línea celular según la reivindicación 9, que tiene los números de acceso KCTC10991BP o KCTC10992BP.
11. Una línea celular transformada con el vector de expresión de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7.
12. La línea celular según la reivindicación 11, que es una línea celular de CHO.
13. La línea celular según la reivindicación 12, en la que la línea celular de CHO es deficiente en el gen de dihidrofolato reductasa.
14. La línea celular según la reivindicación 12, que tiene los números de acceso KCTC10993BP, KCTC10994BP o KCTC10995BP.
15. Un procedimiento de producción de una proteína recombinante que comprende las etapas de: (a) transformar una línea celular animal con un vector de expresión que incluye un gen que codifica la dihidrofolato reductasa que contiene un promotor del que se han eliminado parcial o completamente las secuencias CCGCCC repetidas y un gen que codifica una proteína recombinante; y (b) cultivar la línea celular animal transformada en presencia de un inhibidor de dihidrofolato reductasa.
16. El procedimiento según la reivindicación 15, en el que la proteína recombinante es eritropoyetina humana
17. El procedimiento según la reivindicación 16, que comprende adicionalmente purificar eritropoyetina que tiene un alto contenido de ácido siálico.
18. El procedimiento según la reivindicación 15, en el que el vector de expresión es un vector de expresión mostrado en la FIG. 1.
19. El procedimiento según la reivindicación 15 o 16, en el que la línea celular animal de la etapa (a) es una línea celular de CHO deficiente en dihidrofolato reductasa.
20. El procedimiento según la reivindicación 15, en el que la línea celular animal transformada de la etapa (b) tiene los números de acceso KCTC10993BP, KCTC10994BP o KCTC10995BP.

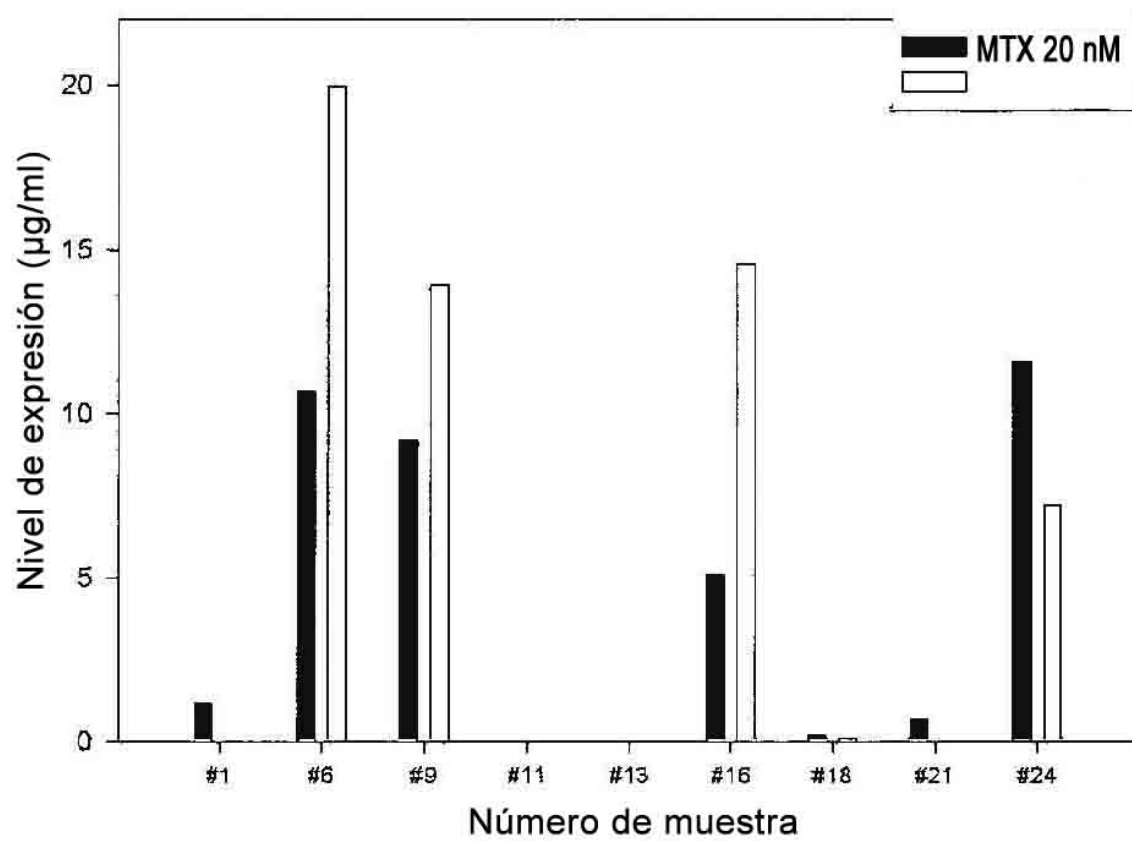


[Fig. 2]

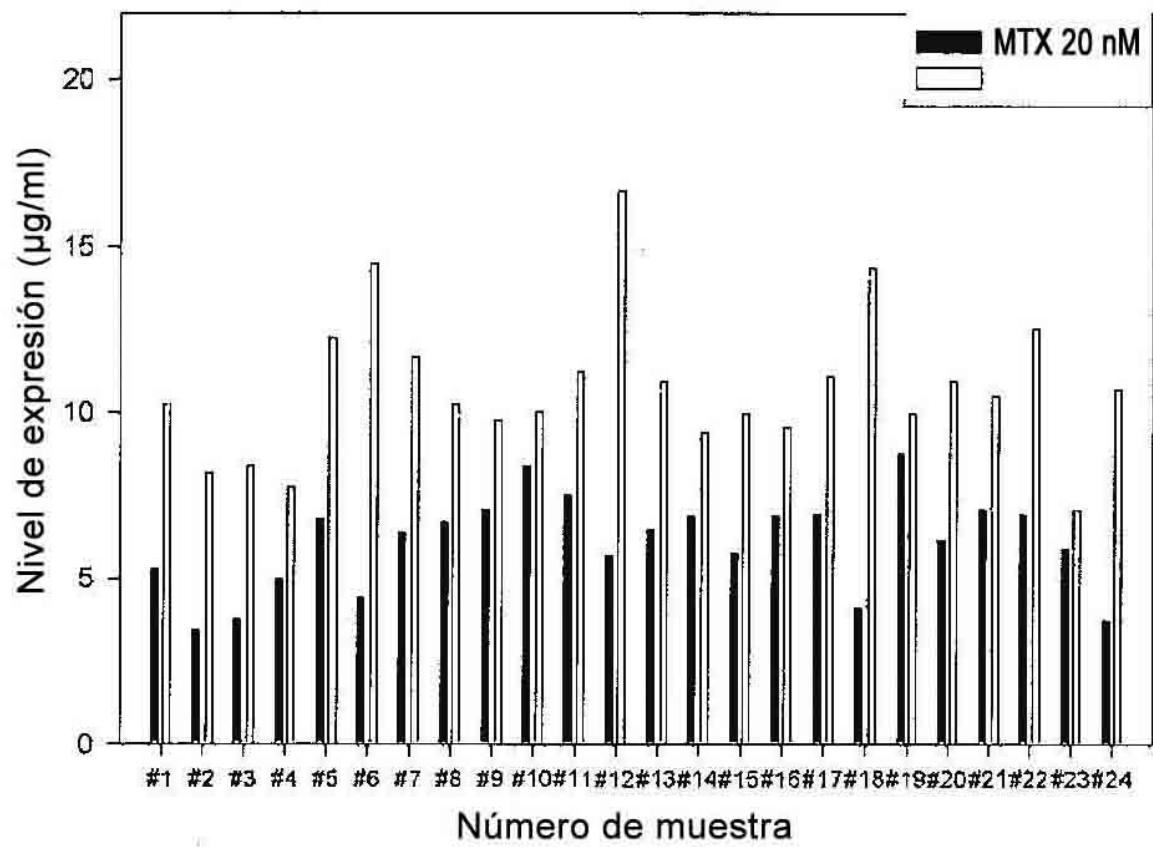




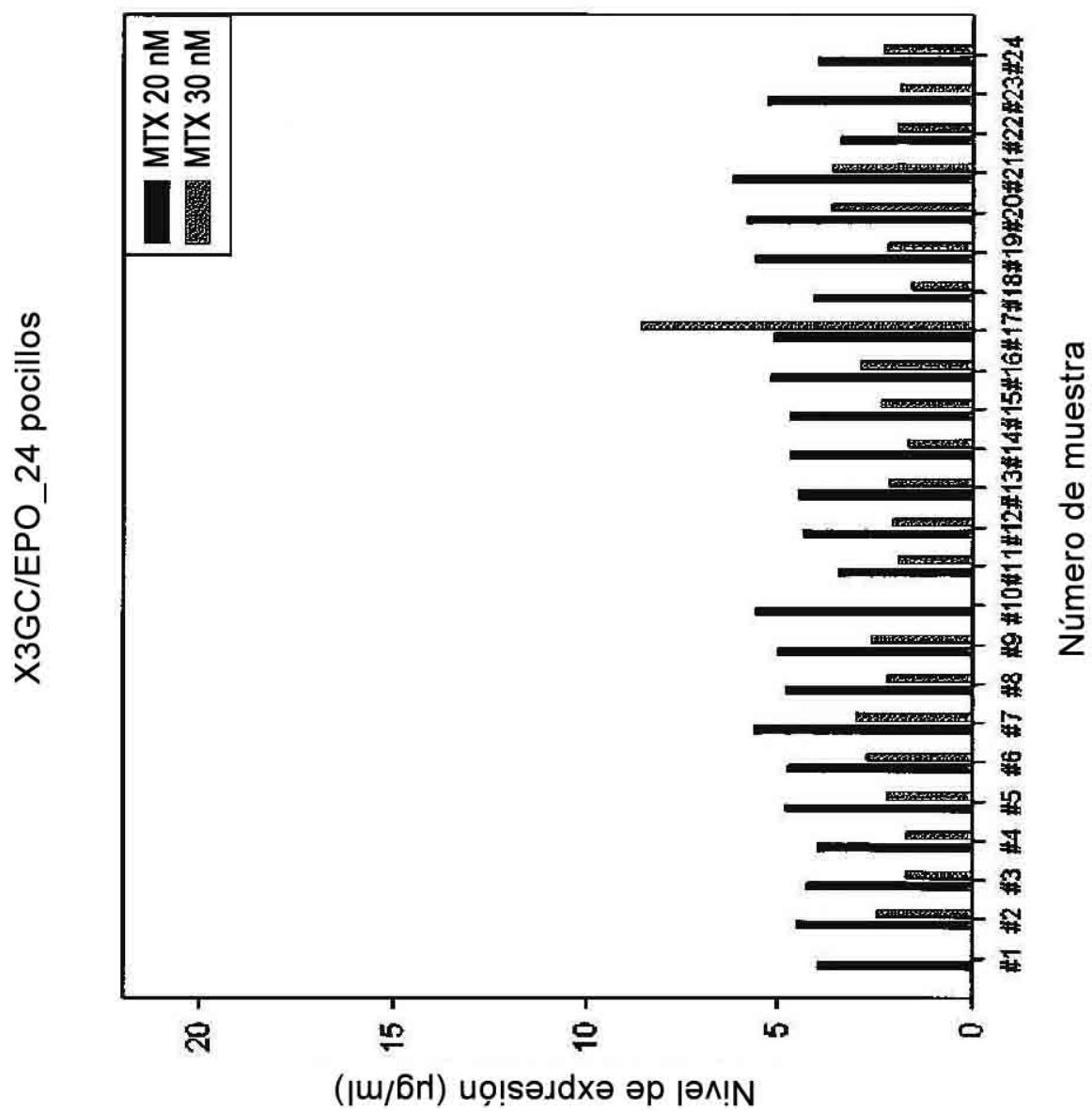
[Fig. 4]
XOGC/EPO_24 pocillos



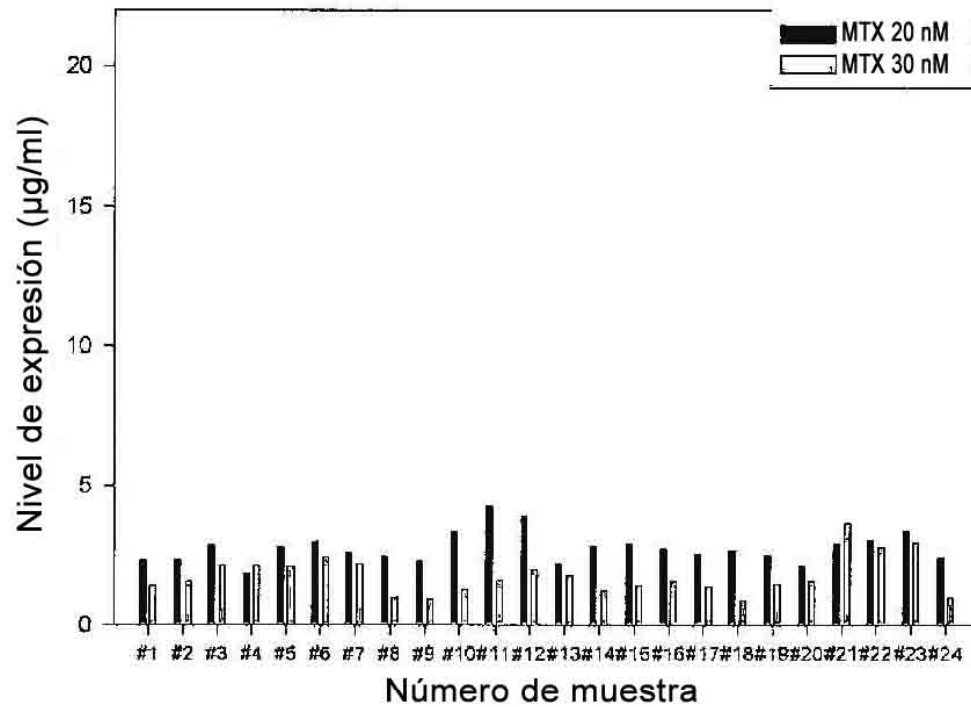
[Fig. 5]
X1GC/EPO_24 pocillos



[Fig. 6]



[Fig. 7]
X6GC/EPO_24 pocillos

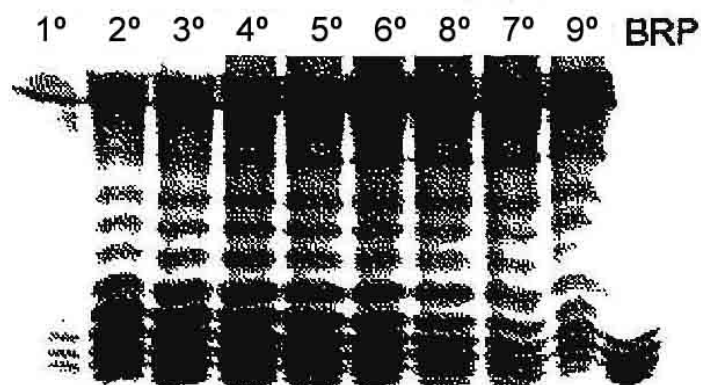


[Fig. 8]

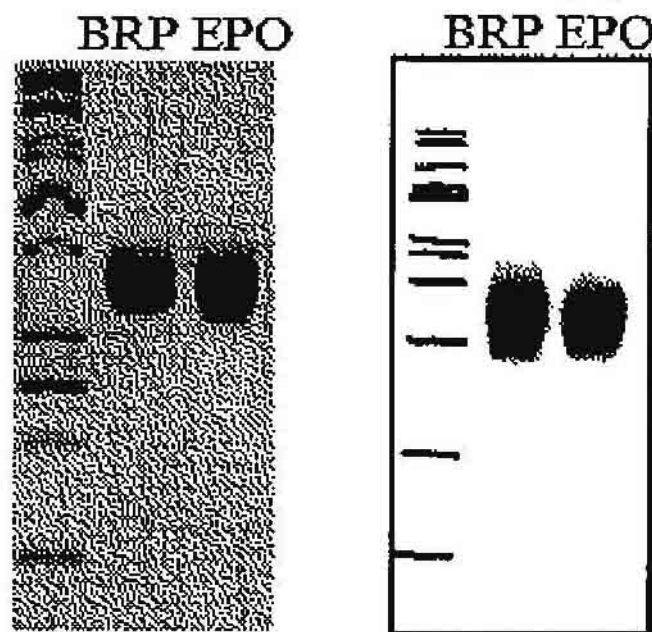
DHFR CHO
100ng (dhfr-) X0GC X1GC X3GC X6GC



[Fig. 9]



[Fig. 10]



[Fig. 11]

