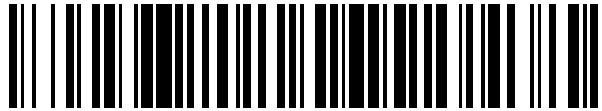


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 470**

51 Int. Cl.:

C12N 9/64 (2006.01)

C12N 9/74 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.10.2004** **E 10185166 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.12.2014** **EP 2292748**

54 Título: **Método para producir proteínas gamma-carboxiladas**

30 Prioridad:

14.10.2003 GB 0324044

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

27.03.2015

73 Titular/es:

**MEDLMMUNE LIMITED (100.0%)
Milstein Building, Granta Park
Cambridge CB21 6GH, GB**

72 Inventor/es:

**FENGE, CHRISTEL;
LOVGREN, ANN y
THELIN, ANDERS**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 532 470 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para producir proteínas gamma-carboxiladas

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a una célula hospedadora que comprende un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína que requiere gamma-carboxilación y secuencias de control de la expresión asociadas que comprenden un primer promotor y una molécula de ácido nucleico que codifica una γ -glutamil carboxilasa y secuencias de control de la expresión asociadas que comprenden un segundo promotor. La invención se refiere adicionalmente a un método para producir una proteína que requiere gamma-carboxilación en altos rendimientos.

15 Antecedentes de la invención

La hemorragia es un problema clínico común. Es una consecuencia de enfermedad, traumatismo, cirugía y tratamiento medicinal. Es imperativo detener mecánicamente las hemorragias. Esto puede ser difícil o incluso imposible debido a la ubicación de la hemorragia o porque se difunde desde muchos vasos (pequeños). Los pacientes que están sangrando por tanto pueden requerir tratamiento con agentes que mantienen la hemostasis. Éste puede ser productos derivados de la sangre (hemoterapia), agentes que causan la liberación de agentes hemostáticos endógenos, factores de coagulación recombinantes (F), o agentes que retardan la disolución de los coágulos de sangre.

El tratamiento de primera línea entre los productos derivados de la sangre, a menudo obtenidos del hospital local, son sangre completa para la sustitución del volumen y el mantenimiento de la hemostasis, glóbulos rojos concentrados para la mejora de la capacidad de transporte de oxígeno, concentrados de plaquetas para aumentar el número de plaquetas (si es bajo o deficiente) y plasma fresco congelado para el mantenimiento de la hemostasis (coagulación de la sangre y agregación plaquetaria). Los productos derivados de plasma de segunda que mantienen la hemostasis son crioprecipitado de plasma, concentrados de complejo de protrombina, concentrados de complejo de protrombina activado y factores de coagulación purificados. Varios factores de coagulación están hoy disponibles como proteínas humanas recombinantes, inactivos (factores de coagulación VIII y IX) y activados (factor de coagulación VIIa).

La hemofilia es un trastorno hemorrágico hereditario o adquirido con factor de coagulación anormal o deficiente o anticuerpos dirigidos contra un factor de coagulación que inhibe la función procoagulante. Las hemofilias más comunes son la hemofilia A (ausencia de factor de coagulación VIII) y la hemofilia B (factor IX). Los factores de coagulación individuales purificados o recombinantes son el principal tratamiento de los pacientes con hemofilia. Los pacientes con anticuerpos inhibidores poseen un problema de tratamiento, ya que también pueden neutralizar el factor de coagulación que se administra al paciente. La forma activa de la proteína C (APC) es un inhibidor de la coagulación plasmática mediante degradación de los factores de coagulación activado Va y VIIIa. Se ha demostrado que APC recombinante es un tratamiento eficaz de la coagulación plasmática indebida en pacientes con sepsis.

Los factores de coagulación para uso terapéutico se pueden obtener a partir de plasma humano, aunque el proceso de purificación no es simple y requiere muchas etapas de las cuales varias están dirigidas a eliminar virus contaminantes. Pero incluso con medidas de seguridad extensivas y ensayos de productos derivados de la sangre, la contaminación con virus o priones infecciosos no puede descartarse. Debido a este riesgo es muy deseable producir proteínas terapéuticas humanas a partir de células recombinantes cultivadas en medios sin componentes derivados de animales. Esto no siempre es sencillo ya que muchas proteínas requieren un hospedador mamífero que las produzca en una forma totalmente funcional, es decir, las modifique correctamente después de la traducción. Entre los factores de coagulación producidos comercialmente en células recombinantes están FVII (NovoSeven), FVIII (Kogenate, Recombinate, Refacto) y FIX (Benefix) (Roddie y Ludlam. Blood Rev. 11: 169-177, 1997) y proteína C activa (Xigris). Uno de los principales obstáculos en la obtención de grandes cantidades de factores de coagulación humanos recombinantes totalmente funcionales radica en el dominio Gla presente en FII, FVII, FIX, FX y Proteína C. Este dominio contiene restos de ácido glutámico que se modifican después de la traducción mediante la adición de grupos carboxilo. La producción de estos factores se ve impedida por el hecho de que la sobre-expresión de los mismos produce proteína sub-carboxilada, y por tanto inactiva. Las modificaciones Gla son el resultado de la acción de una enzima dependiente de vitamina K llamada γ -glutamil carboxilasa (GGCX). Esta enzima se ha estudiado ampliamente por muchos científicos, particularmente aquellos implicados en la investigación de factores de coagulación (documento WO-A-8803926; Wu et al. Science 254 (5038): 1634-1636, 1991; Rehemtulla et al., Proc Natl Acad Sci USA 90: 4611-4615, 1993; Stanley J. Biol. Chem. 274 (24): 16940-16944, 1999; Vo et al., FEBS letters 445: 256-260, 1999; Begley et al., The Journal of Biological Chemistry 275(46): 36245-36249, 2000; Walker et al., The Journal of Biological Chemistry 276 (11): 7769-7774, 2001; Bandyopadhyay, et al. Proc Natl Acad Sci USA 99 (3): 1264-1269, 2002; Czerwicz et al., Eur J Biochem 269: 6162-6172, 2002; Hallgren et al., Biochemistry 41 (50): 15045-15055, 2002; Harvey et al., The Journal of Biological Chemistry 278 (10): 8363-8369, 2003). Al menos dos grupos de científicos probaron intentos por aumentar los rendimientos mediante co-expresión de GGCX con factor de coagulación FIX, pero no tuvieron éxito (Rehemtulla, et al. 1993, ibid; Hallgren et al. 2002,

ibid). Considerando el gran interés en las proteínas γ -carboxiladas, se puede suponer que muchos más ensayos de co-expresión han fallado y por tanto no se han presentado.

Para FII humano (protrombina) al menos 8 de los 10 restos Glu tienen que modificarse correctamente para obtener protrombina totalmente funcional (Malhotra, et al., J. Biol. Chem. 260: 279-287, 1985; Seegers y Walz 'Prothrombin and other vitamin K proteins', CRC Press, 1986). Se han hecho grandes esfuerzos para obtener altos niveles de producción de rhFII usando varios sistemas diferentes, tales como células CHO, células BHK, células 293 y sistemas de expresión de virus vaccinia, pero han fallado o ha producido un producto de sub-carboxilado y por tanto protrombina funcionalmente inactiva (Jørgensen et al., J. Biol. Chem. 262: 6729-6734, 1987; Russo et al., Biotechnol Appl Biochem 14 (2): 222-233, 1991; Fischer et al., J Biotechnol 38 (2): 129-136, 1995; Herlitschka et al. Protein Expr. Purif. 8 (3): 358-364, 1996; Russo et al., Protein Expr. Purif. 10: 214-225, 1997; Vo et al. 1999, ibid; Wu y Suttie Thromb Res 96 (2): 91-98, 1999). Las productividades presentadas anteriormente para protrombina humana recombinante carboxilada son bajas; 20 mg/l para protrombina mutante (Côte et al., J. Biol. Chem 269: 11374-11380, 1994), 0,55 mg/l para protrombina humana expresada en células CHO (completamente carboxilada, Jørgensen et al. 1987, ibid), 25 mg/l en células CHO (grado de carboxilación no mostrado, Russo et. al., 1997, ibid).

El documento WO 92/19636 describe la clonación e identificación de secuencia de una carboxilasa dependiente vitamina K humana y bovina. La solicitud sugiere la co-expresión de la carboxilasa dependiente de vitamina K y una proteína dependiente de vitamina K en una célula hospedadora adecuada para preparar la proteína dependiente de vitamina K. No se ejemplifica co-expresión de la carboxilasa y proteína dependiente de la vitamina K.

El documento WO 02/29045 A2 describe un método para preparar proteínas dependientes de vitamina K y células hospedadoras eucariotas co-transfectadas, y vectores recombinantes, a usar en métodos para preparar proteínas dependientes de vitamina K.

Existe la necesidad de métodos mejorados para producir factores de coagulación sanguínea activados en altos rendimientos. La presente invención propone abordar esta necesidad.

Sumario de la invención

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona una célula hospedadora CHO-S de acuerdo con la reivindicación 1 de este documento.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un método para producir protrombina humana recombinante activa (factor de coagulación II) de acuerdo con la reivindicación 5 de este documento.

Breve descripción de las figuras

- La Figura 1a ilustra un mapa plasmídico del vector de co-expresión PN32 (protrombina + GGCX).
- La Figura 1b representa un mapa plasmídico del vector de expresión Ptext5 (protrombina).
- La Figura 2 representa un mapa plasmídico del vector de co-expresión PP6 (protrombina + GGCX).
- La Figura 3a representa un mapa plasmídico del vector de co-expresión F9NopA (factor IX + GGCX).
- La Figura 3b representa un mapa plasmídico del vector de co-expresión F9hglx (factor IX + GGCX).

Descripción detallada de la invención

Hemos ideado un enfoque diferente para la expresión de factores de coagulación dependientes de vitamina K recombinantes carboxilados apropiadamente en niveles altos, que implica la co-expresión del factor de coagulación dependiente de vitamina K y una γ -glutamil carboxilasa (GGCX) en una proporción diferencial. Como ejemplo hemos expresado protrombina humana (rhFII) y GGCX humana. En lugar de usar promotores fuertes tanto para rhFII como para GGCX como otros han intentado (Rehemtulla et al., 1993, ibid; Hallgren et al., 2002, ibid), usamos una estrategia destinada a una fuerte expresión de FII en combinación con expresión débil o muy débil de la GGCX, de modo que la cantidad de GGCX expresada fuera de menos de $1/10^9$ del rhFII expresado. Para nuestra sorpresa esta estrategia condujo a altos niveles de rhFII secretado modificado correctamente y buena viabilidad de las células hospedadoras, incluso cuando las células se cultivaban en medio químicamente definido libre de componentes animales.

Hemos clonado GGCX y protrombina humana en un vector de expresión de tal manera que el nivel de ARNm de protrombina excede el del ARNm de GGCX en un factor de al menos 10. Esto provoca la producción de un gran exceso de proteína protrombina en comparación con la proteína GGCX.

Como ejemplo adicional hemos expresado rhFIX usando los mismos vectores de co-expresión de GGCX. Esto produjo líneas celulares que producen ARNm de factor IX a niveles que exceden los niveles de ARNm de GGCX en un factor de al menos 10 en un caso. En otra línea celular la proporción ARNm de factor IX:GGCX fue de aproximadamente 5,4: 1. Sólo la línea celular que da una proporción de al menos 10:1 mostró productividad sustancialmente aumentada de rhFIX (Tabla 1).

Tabla 1. Resumen de productividad y proporción de ARNm de proteína carboxilada:GGCX

NOMBRE DEL CLON /CONSTRUCCIÓN	PROTEÍNA PRODUCIDA	PRODUCCIÓN * DE PROTEÍNA TOTALMENTE ACTIVA (mg/l)	PROPORCIÓN APROX. DE ARNm DE PROTEÍNA CARBOXILADA:GGCX	FUENTE DE DATOS
P1E2/PN32	Protrombina humana	40	250:1	Ejemplo 3
B2F4/PP6		26	50:1	Ejemplo 5
H3B10/PP6		30	30:1	Ejemplo 5
E1A9/PText5		3,5	Sin GGCX	Ejemplo 3
N4D5/F9NopA	FIX humano	7,3	45:1	Ejemplo 7
P1G9/F9hg1x		1,3	4:1	Ejemplo 7
IC4		1 ^α	Sin GGCX	Rehemtulla 1993, documento US 5.460.950

* La productividad se midió a partir de cultivos de agitación en condiciones similares de crecimiento.

^α Datos de Rehemtulla 1993 y la patente de Estados Unidos N° 5.460.950.

Puede esperarse que los factores de coagulación dependientes de vitamina K (FII, FVII, FIX, FX y sus formas activadas FIIa o trombina, factor VIIa, FIXa, FXa) producidos por el presente método de co-expresión con GGCX sean útiles en la prevención y tratamiento de hemorragia después de traumatismo, cirugía o enfermedades del hígado, los riñones, las plaquetas o factores de coagulación sanguínea (hemofilia). Asimismo, puede esperarse que el factor de coagulación proteína C y su forma activada APC sean útiles en la prevención y tratamiento de trastornos de coagulación aumentada con o sin niveles disminuidos de proteína C. El método es también aplicable a otras proteínas que requieren carboxilación post-traducciona1.

En una realización particular, tanto la molécula de ácido nucleico que codifica la protrombina que requiere gamma-carboxilación y las secuencias de control de la expresión asociadas, como la molécula de ácido nucleico que codifica la γ -glutamil carboxilasa y las secuencias de control de la expresión asociadas se localizan en el mismo vector de expresión. En otra realización estas dos moléculas de ácido nucleico están localizadas en vectores de expresión diferentes.

Las células hospedadoras pueden transfectarse o transformarse con un vector que comprende la secuencia de la SEC ID N° 1, SEC ID N° 2 o SEC ID N° 3 para la expresión de protrombina humana.

Se proporcionan ejemplos que usan protrombina y el factor de coagulación IX como las proteínas que requieren carboxilación. Sin embargo, varias proteínas distintas de protrombina y factor IX son dependientes de una correcta γ -carboxilación para su actividad biológica completa. Entre los conocidos en el hombre están el factor de coagulación FVII, que en la actualidad sólo se produce comercialmente en células de mamífero recombinantes a niveles relativamente bajos (aproximadamente 10 mg/l o menos). La presente invención será aplicable para mejorar la productividad de cualquier proteína que sea dependiente de γ -carboxilación, dichas proteínas incluyen, aunque sin limitación: protrombina, factor de coagulación II (FII), factor de coagulación VII (FVII), factor de coagulación IX (FIX), factor de coagulación X (FX), proteína C, proteína S, proteína Z, proteína Gla ósea (también conocida como: BGP u osteocalcina), proteína Gla de matriz (MGP), polipéptido Gla 1 rico en prolina (PRRG1), polipéptido Gla 2 rico en prolina (PRRG2), proteína 6 específica de detención del crecimiento (Gas 6). Otras proteínas adecuados son: proteína tipo FXa en el veneno de serpiente elapid (subfamilia Acanthophiina) y el veneno del caracol cónico (Conus textile).

Cada una de estas proteínas, incluyendo sus secuencias de ácido nucleico y aminoácidos, son bien conocidas. La Tabla 2 identifica secuencias representativas de formas de tipo silvestre y mutantes de las diversas proteínas que pueden usarse.

Tabla 2.

DESCRIPCIÓN	ADNC EMBL ACC N°	VARIANTES DE CORTE Y AJUSTE (PROTEÍNA)	MUTACIONES	GEN EMBL ACC N°
Glutamato gamma carboxilasa	BC013979	2; BC013979; AF253530	1 SNP (EMBL n° U65896); 2 SNP (OMIM n° 137167)	U65896
Protrombina	V00595	1; V00595	aprox. 100 SNP (EMBL n° AF478696)	AF478696
Factor VII	AF466933	4; AF466933; AF272774; AR030786; AAN60063	21 SNP (OMIM n° 277500)	J02933
Factor IX	A01819	3; A01819; A34669; M 19063	5 SNP (EMBL n° AF536327); 108 SNP (OMIM n° 306900)	AF536327

DESCRIPCIÓN	ADNC EMBL ACC N°	VARIANTES DE CORTE Y AJUSTE (PROTEÍNA)	MUTACIONES	GEN EMBL ACC N°
Factor X	BC046125	4; BC040125; M57285; AR095306; AB005892	118 SNP (EMBL n° AF503510); 14 SNP (OMIM n° 227600)	AF503510
Proteína C	BC034377	7; AB083690; AB083693; I09623; S50739; S72338	57 SNP (EMBL n° AF378903); 25 SNP (OMIM n° 176860)	AF378903
Osteocalcina	AF141310	5; AF141310; AF141310; BC033656; X04143; X51699		X04143
Proteína GLA de matriz	BC005272	1; BC005272		
Factor estimulador de AXL; 6 específico de detención del crecimiento	BC038984	1; BC038984		
Proteína Z	M55670	2; AB033749; AB033749		
Polipéptido Gla 1 rico en prolina (ácido G-carboxiglutámico)	AF009242	2; AF009242; BC030786		
Polipéptido Gla 2 rico en prolina (ácido G-carboxiglutámico)	AF009243	2; AF009243; BC026032		
Precursor de proteína S dependiente de vitamina K	SC015801	1; BC015801	aprox. 100 SNP (EMBL n° AY308744); 8 SNP (OMIM n° 176880)	AY308744

Se apreciará que la invención no se restringe a una secuencia codificante de proteína particular de una de estas proteínas a co-expresar. Además, y en particular con respecto a factores de coagulación sanguínea, se han descrito en la técnica numerosas formas mutantes de las proteínas. La presente invención es igualmente aplicable a estas formas mutantes, incluyendo variantes alélicas de origen natural, de las proteínas, como a la secuencia de tipo silvestre. En una realización, la invención puede emprenderse con cualquier protrombina de tipo silvestre o una con al menos un 90%, preferiblemente al menos un 95% de identidad de secuencia con la misma.

La identidad de secuencia entre dos secuencias puede determinarse por análisis de alineación informática por pares, usando programas tales como, BestFit, PILEUP, Gap o FrameAlign. La herramienta de alineación preferida es BestFit. En la práctica, en la búsqueda de secuencias similares/idénticas para la búsqueda de consulta, desde dentro de una base de datos de secuencias, generalmente es necesario realizar una identificación inicial de secuencias similares usando algoritmos adecuados, tales como Blast, Blast2, NCBI Blast2, WashU Blast2, FastA, o Fasta3, y una matriz de valores tal como Blosum 62. Dichos algoritmos tratan de aproximarse estrechamente al algoritmo de alineación "de norma de oro" de Smith-Waterman. Por tanto, el software/programa motor de búsqueda preferido para su uso en la evaluación de la similitud, es decir, el modo en que dos secuencias polipeptídicas primarias se alinean es Smith-Waterman. Identidad se refiere a apareamientos directos, similitud permite sustituciones conservativas.

La expresión " γ -glutamil carboxilasa" o "GGCX", como se usa en este documento, se refiere a una enzima dependiente de vitamina K que cataliza la carboxilación de restos de ácido glutámico.

Las enzimas GGCX están ampliamente distribuidas, y se han clonado a partir de diferentes especies como la ballena beluga *Delphinapterus leucas*, el pez sapo *Opsanus tau*, el pollo (*Gallus gallus*), los mixinos (*Myxine glutinosa*), el cangrejo de herradura (*Limulus polyphemus*), y el caracol cónico *Conus textile* (Begley et al., 2000, *ibid*; Bandyopadhyay et al. 2002, *ibid*). La carboxilasa del caracol cónico es similar a la carboxilasa bovina y se ha expresado en células COS (Czerwiec et al. 2002, *ibid*). Pueden encontrarse proteínas adicionales similares a GGCX en insectos y procariotas tales como *Anopheles gambiae*, *Drosophila melanogaster* y *Leptospira* con los números de acceso NCBI: gi 31217234, gi 21298685, gi 24216281, gi 24197548 y (Bandyopadhyay et al., 2002, *ibid*), respectivamente. La enzima carboxilasa presenta conservación evolutiva notable. Varias de las enzimas no humanas han mostrado, o puede predecirse que tengan, actividad similar a la de GGCX humana que hemos usado, y por lo tanto pueden usarse como alternativa a la enzima humana.

La Tabla 3 identifica secuencias representativas de proteínas predichas homólogas a GGCX humana (ordenados por origen de la especie) que pueden usarse en la presente invención.

Tabla 3.

Especie	Nº/ID de acceso a la base de datos
Homo sapiens (hombre)	NM_000821.2 HUMGLUCARB HUMHGCA BC004422 HSU65896 AF253530.1
Papio hamadryas (babuino rojo)	AC116665.1
Delphinapterus leucas ballena blanca)	AF278713
Bos taurus (bovino)	NM_174066.2 BOVCARBOXG BOVBGCA
Ovis aries (oveja doméstica)	AF312035
Rattus norvegicus (rata marrón)	NM_031756.1 AF065387
Mus musculus (ratón)	NM_019802.1 AF087938
Opsanus tau (peces óseos)	AF278714.1
Conus textile (moluscos)	AY0044904.1 AF382823.2
Conus imperialis (moluscos)	AF448234.1
Conus episcopatus (moluscos)	AF448233.1
Conus omaria (moluscos)	AF448235.1
Drosophila melanogaster (mosca de la fruta)	NM_079161.2
Anopheles gambiae (mosquito)	XM_316389.1
Secale cereale (monocotiledóneas)	SCE314767
Triticum aestivum (trigo común)	AF280606.1
Triticum urartu (monocotiledóneas)	AY245579.1
Hordeum vulgare (cebada)	BLYHORDCA
Leptospira interrogans (espiroquetas)	AE011514.1
Streptomyces coelicolor (bacterias Gram+ de alto GC)	SCO939109 SCO939124 AF425987.1
Streptomyces lividans (bacterias Gram+ de alto GC)	SLU22894
Streptomyces virginiae (bacterias Gram+ de alto GC)	SVSNBDE
Micrococcus luteus (bacterias Gram+ de alto GC)	MLSPCOPER
Chlamydomonas reinhardtii (algas verdes)	AF479588.1
Dictyostelium discoideum (moho de fango)	AC115612.2
Coturnix coturnix (aves)	AF364329.1
Bradyrhizobium japonicum (α -proteobacterias)	AP005937.1
Rhodobacter sphaeroides (α -proteobacterias)	RSY14197
Sinorhizobium meliloti (α -proteobacterias)	RME603647 AF119834
Mesorhizobium loti (α -proteobacterias)	AP003014.2
Chromobacterium violaceum (β -proteobacterias)	AE016910.1 AE016918.1
Pseudomonas aeruginosa (γ -proteobacterias)	AE004613.1 AF165882
Xanthomonas axonopodis (γ -proteobacterias)	AE011706.1
Herpesvirus humano 8	KSU52064 KSU75698 AF305694 AF360120 AF192756

Cada una de las proteínas GGCX identificadas anteriormente y proteínas GGCX de otras especies puede usarse como la enzima carboxilasa en la presente invención.

Uno modo para efectuar la expresión diferencial de las dos proteínas co-expresadas es usar diferentes promotores como parte de las respectivas secuencias de control de la expresión. La técnica está repleta de ejemplos de diferentes promotores y otras secuencias de control de la expresión que son capaces de expresar proteínas heterólogas en diferentes grados o niveles. La tecnología de expresión recombinante está adecuadamente
 5 avanzada de modo que un especialista en la técnica arte de la expresión de proteínas es capaz de seleccionar promotores y otras secuencias de control para lograr la co-expresión de la proteína que requiere carboxilación y la carboxilasa en la proporción deseada. La selección de los cuales de los promotores particulares y otras secuencias de control de la expresión usar es una cuestión de elección individual.

10 Un promotor fuerte se define aquí como un promotor que da lugar a más de 1000 transcritos/célula. Un promotor débil se define aquí como un promotor que da lugar a menos de 1000 transcritos/célula.

La invención se ha ejemplificado mediante el uso del promotor de CMV fuerte (Boshart et al. Cell 41: 521-530, 1985) para sobre-expresar Factor IX o protrombina y el promotor de SV40 más débil (Wenger et al. Anal Biochem 221: 416-418, 1994) para controlar la expresión de GGCX. Otro promotor fuerte que podría usarse incluye, aunque sin limitación, pEF-1 α [gen de la subunidad 1 α del factor de elongación humano] (Mizushima y Nagata, Nuc Acids Res 18: 5322, 1990; Goldman et al., BioTechniques 21: 1013-1015, 1996), pRSV [virus del sarcoma de Rous (Gorman et al., Proc Natl Acad Sci USA 79: 6777-6781, 1982)] y pUbc [ubiquitina humana (Schorpp et al., Nuc Acids Res 24: 1787-1788, 1996)].
 15

20 Es importante asegurarse de que la proteína a producir (proteína que requiere carboxilación) está en exceso en comparación con la enzima de modificación, dando una proporción de al menos 10:1. Las maneras de conseguir un bajo nivel de expresión de la enzima de modificación (γ -glutamil carboxilasa) incluyen:

- 25 1) Usar un promotor débil para controlar la expresión de la enzima de modificación incluyendo, aunque sin limitación, el promotor temprano inmediato de SV40, el promotor FIX minimizado (Rouet et al., The Journal of Biological Chemistry 267: 20765-20773, 1992) o el promotor de timidina quinasa de HSV (Wenger et al., 1994, ibid).
- 30 2) Mutar las secuencias promotoras o potenciadoras de un promotor fuerte para reducir la fuerza del promotor.
- 3) Quitar o cambiar la secuencia Kozak (señal de inicio de la traducción) para reducir la eficacia de traducción (Kozak. Nuc Acids Res 15: 8125-8148, 1987; Kozak. Proc Natl Acad Sci USA 87: 8301-8305 1987, 1990).
- 4) Clonar el ácido nucleico que codifica la proteína a producir (proteína que requiere carboxilación) y el ácido nucleico que codifica GGCX en vectores diferentes y transfectar con un gran exceso de la construcción que contiene la proteína a producir para generar una célula con múltiples copias de la construcción que contiene la
 35 proteína a producir.
- 5) Clonar el ARN que codifica la proteína a producir y el ADN que codifica vectores de modificación de GGCX en vectores diferentes, co-transfectar o transfectar por separado, y usar un sistema de amplificación para amplificar la expresión de la proteína a producir.
- 6) Aislar una línea celular estable que expresa de forma recombinante bajos niveles de GGCX (pero por encima de los niveles endógenos) y el usar como línea de células hospedadoras para la expresión de proteínas en
 40 necesidad de γ -carboxilación.
- 7) Introducir una o más mutaciones en la GGCX para disminuir la afinidad por sustrato de GGCX.

45 Además de éstos, los especialistas en la técnica de la expresión de proteínas recombinantes serán conscientes de otros métodos que podrían usarse para generar una célula hospedadora que exprese la proteína que requiere carboxilación y la proteína carboxilasa en una proporción de al menos 10:1.

La sobre-expresión de proteínas dependientes de carboxilación anteriormente ha provocado generalmente productos su-carboxilados. Esto se debe a que se está limitando la capacidad endógena de carboxilación de la
 50 célula hospedadora. Por otro lado una inmensa (16 a 70 veces) sobre-expresión de la actividad GGCX no mejora el rendimiento del producto (Rehemtulla et al., Proc Natl Acad Sci USA 90: 4611-4615, 1993), (Berkner y Pudota, Proc Natl Acad Sci USA. 95: 446-471, 1998), (Hallgren et al., Biochemistry 41 (50): 15045-15055, 2002). La razón de esto no se entiende completamente. Nuestra invención requiere una moderada sobre-expresión de GGCX. Esto asegura que se expresen niveles mayores que los endógenos de GGCX a partir de la célula, por ejemplo, donde el nivel de actividad GGCX se eleva sólo de 1,5 a 5 veces. A este nivel moderadamente elevado, se obtuvieron niveles sorprendentemente altos de rhFII completamente carboxilado como se muestra en el Ejemplo 1.
 55

Por lo tanto se apreciará que la proporción de expresión de la proteína que requiere carboxilación y la carboxilasa que distingue a esta invención de las enseñanzas previas de co-expresión, excluye niveles de GGCX que se producen de manera endógena. Para cumplir con la alta productividad requerida es necesario expresar la carboxilasa y la proteína que requiere carboxilación a niveles por encima de los encontrados en células normales.
 60

En una realización preferida, se usa una célula o una línea celular que tiene poco o nada de carboxilasa expresada constitutivamente y/o proteína que requiere carboxilación.
 65

En una realización, la γ -glutamyl carboxilasa se expresa a menos de o igual al 10% de la cantidad de la proteína que requiere gamma-carboxilación. En realizaciones adicionales alternativas, la γ -glutamyl carboxilasa se expresa a menos de o igual al 5%, 2%, 1%, 0,5%, 0,25%, 0,1%, 0,05% o 0,01% de la cantidad de la proteína que requiere gamma-carboxilación.

5 El grado de expresión de las dos proteínas puede medirse usando técnicas familiares para los especialistas en la técnica. Éstas incluyen mediciones directas, por ejemplo midiendo la actividad biológica de la proteína, o la cantidad de proteína (por ejemplo usando anticuerpos), o mediciones indirectas, por ejemplo a través de la medición de los niveles de transcrito de ARNm (por ejemplo, análisis Taqman como en el Ejemplo 3). Las siguientes referencias describen formas de medir la actividad de la enzima GG CX (Lingenfelter et al., *Biochemistry* 35: 8234-8243, 1996; Berkner et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 446-471, 1998; Hallgren et al., *Biochemistry* 41 (50): 15045-15055, 2002; y, Berkner et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 6242-6246, 1992).

15 Para los fines de esta invención, la proporción de expresión de las dos proteínas se determina indirectamente a través del nivel de transcrito de ARNm (por ejemplo, por análisis Taqman).

En una realización, la γ -glutamyl carboxilasa es de origen de ratón, rata, bovino o de caracol cónico. En otra realización, la γ -glutamyl carboxilasa es una proteína humana.

20 Los vectores de expresión habitualmente incluyen un origen de replicación, un promotor, un sitio de inicio de la traducción, opcionalmente un péptido señal, un sitio de poliadenilación, y un sitio de terminación de la transcripción. Estos vectores contienen también usualmente uno o más genes marcadores de resistencia a antibiótico para la selección. Los vectores de expresión adecuados pueden ser plásmidos, cósmidos o virus tales como fagos o retrovirus. La secuencia codificante del polipéptido se coloca bajo el control de un promotor apropiado (es decir, HSV, CMV, TK, RSV, SV40, etc.), elementos de control y terminador de la transcripción (estas son las secuencias de control de la expresión asociadas) de manera que la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido se transcribe en ARN en la célula hospedadora transformada o transfectada por la construcción de vector de expresión. La secuencia codificante puede o no contener un péptido señal o secuencia líder para la secreción del polipéptido fuera de la célula hospedadora. Los vectores preferidos comprenderán habitualmente al menos un sitio de clonación múltiple. En ciertas realizaciones, habrá un sitio de clonación o sitio de clonación múltiple situado entre el promotor y el gen a expresar. Dichos sitios de clonación pueden usarse para crear proteínas de fusión N-terminal clonando una segunda secuencia de ácido nucleico en el sitio de clonación de modo que esté contigua y en fase con la secuencia génica. En otras realizaciones puede haber un sitio de clonación o sitio de clonación múltiple situado inmediatamente cadena abajo del gen para facilitar la creación de fusiones C-terminales de una manera similar a la de las fusiones N-terminales descritas anteriormente.

La célula hospedadora puede modificarse genéticamente (tener ácidos nucleicos adicionales introducidos) por numerosos métodos, bien conocidos para los especialistas en la técnica, tales como transfección, transformación y electroporación.

40 La invención se describirá adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes:

La práctica de la presente invención empleará, salvo que se indique lo contrario, métodos convencionales de biología molecular y técnicas de ADN recombinante pertenecientes a las habilidades de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., eds., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3ª ed.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (2001); Ausubel et al., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York, NY (2002); Glover y Hames, eds., *DNA Cloning 3: A Practical Approach*, Vol. I, II, y III, IRL Press, Oxford (1995); Colowick y Kaplan, eds., *Methods in Enzymology*, Academic Press; Weir et al., eds., *Handbook of Experimental Immunology*, 5ª ed., Blackwell Scientific Publications, Ltd, Edimburgo, (1997).

Ejemplo 1

Amplificación del ADNc que codifica FII humano (hPT) y GG CX humana

55 Se adquirió ARNm de hígado humano en Clontech y la síntesis de ADNc se realizó utilizando el sistema Superscript de Invitrogen. El ADNc obtenido se usó como molde para la amplificación de FII humano usando:

60 cebador PTF0 5'-ATTCCTCAGTGACCCAGGAGCTGACA-3', (SEC ID N° 3) y
cebador PTEXT 5'-CTACTCTCCAAACTGATCAATGACCTTCTGTATCCACTTCTT-3', (SEC ID N° 4).

La GG CX humana se amplificó usando

65 cebador hglx5, 5'-TCCGCAGAGCAATGGCGGTGTCT-3', (SEC ID N° 5) y
cebador hglx3, 5'-CCAACATCTGGCCCCCTTCAGAACT-3', (SEC ID N° 6).

El producto de PCR que codifica FII se clonó directamente en el vector pCDNA3.1V5/His tratado con TA-TOPO (Invitrogen). La selección de un clon con ADNc de hFII insertado en la dirección correcta dio la construcción de control Ptext5 (Fig. 1b). El ADNc que codifica GGCX bajo el control del promotor de SV40 se obtuvo por transferencia del fragmento que codifica GGCX de pCDNA3.1V5/His TA-TOPO al vector pZeoSV2+ (Invitrogen), usando las enzimas de restricción BamH1 y NotI. Se eliminaron los sitios de restricción EcoRV-NotI cadena abajo del inserto GGCX. Después se clonó un fragmento ClaI-BclI romo del plásmido resultante pZeoSV2-GGCX (que contiene el promotor SV40 y el inserto que contiene GGCX, pero no el sitio de poliadenilación y la señal de poliadenilación cadena abajo de la secuencia que codifica GGCX) en el sitio de restricción DraIII romo de pCDNA3.1+ (Invitrogen). Se seleccionó un clon con el fragmento pSV40-GGCX insertado en tándem (misma dirección transcripcional) con respecto al promotor de CMV y un fragmento KpnI-NotI romo que codifica FII de Ptext5 en el sitio EcoRV para obtener la construcción PN32 (Fig. 1a). Las secuencias de ADN de PN32 y Ptext5 son como en el Apéndice 2. Todos los métodos de clonación fueron de acuerdo con métodos estándar y/o los procedimientos recomendados por el fabricante.

15 La construcción PN32 contiene las siguientes características principales:

- Promotor temprano-inmediato de citomegalovirus humano (HCMV) que controla la transcripción del ADNc de protrombina humana seguido por la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (BGH) para la eficaz terminación de la transcripción y poliadenilación del ARNm.
- 20 - Promotor temprano de SV40 que controla la transcripción del ADNc de γ -carboxilasa humana (GGCX) sin sitio o señal de poliadenilación aparente.
- Otras características son como se muestra en la Figura 1 a).

25 Para la comparaciones se usó la construcción PText5 sin GGCX (Figura 1b). La secuencia de nucleótidos de PTEXT5 se muestra en la SEC ID N° 1. La secuencia de nucleótidos de PN32 se muestra en la SEC ID N° 2.

Líneas celulares productoras de protrombina obtenidas

30 Las dos construcciones en la Figura 1 se transfectaron en células CHO-S (Invitrogen). Se seleccionaron transfectantes estables y se exploraron los clones altamente productivos usando un ensayo disponible en el mercado para la actividad protrombina (Chromogenix). En este ensayo las muestras que contienen protrombina se trataron primero con toxina de veneno de serpiente (Ecarina - disponible en Sigma) para generar trombina. Después se ensayó la actividad trombina por adición de un sustrato cromogénico (S-2238) - que genera color cuando se procesa por la trombina. La transfección y selección de clones se hicieron en paralelo con ambas construcciones. El cultivo celular se hizo en medio DMEM que contenía suero bovino fetal inactivado por calor al 9%. Los clones obtenidos se adaptaron después al crecimiento en medio libre de componentes animales. El mejor clon de producción obtenido fue de transfección con PN32 (FII + GGCX), que produjo hasta 400 mg/l de protrombina recombinante humana cuando se cultivó en medio definido químicamente libre de componentes animales (muy por encima de cualquier nivel publicado). Se purificó el rhFII producido de forma recombinante (de acuerdo con el método descrito en Josic et al., Journal of Chromatography B, 790: 183-197, 2003), y se fraccionó por cromatografía de intercambio iónico usando una columna de Q-Sepharose de acuerdo con técnicas convencionales, para obtener rhFII totalmente carboxilado puro. El rhFII producido de fermentador hasta 78 mg/l estaba completamente carboxilado y tenía la misma actividad biológica que la protrombina purificada de plasma humano. La carboxilación se analizó por secuenciación N-terminal de la proteína y por ensayo de protrombinasa (Mao et al. JBC, 273: 30086-30091, 1998). La generación de trombina se desencadenó en plasma humano pobre en plaquetas por la adición de factor tisular, y el potencial endógeno de la trombina se midió esencialmente como se describe por Stig et al., (Blood Coagulation and Fibrinolysis, 14: 457-462, 2003).

50 El mejor clon obtenido con la construcción de PText5 dio una productividad de hasta 10 mg/l en medio químicamente definido libre de componentes animales, que está en el mismo intervalo presentado en la bibliografía. El porcentaje de protrombina completamente carboxilada obtenido a partir del clon PText5 se estimó en aproximadamente el 50%. La recuperación final de rhFII completamente activo fue por tanto al menos diez veces superior usando la construcción PN32 que contiene una disposición de bajo nivel de expresión de la γ -carboxilasa. Para cada una de las construcciones se identificaron varios clones con niveles similares de expresión.

55 Ejemplo 2

Medición de la actividad GGCX en líneas celulares CHO

60 Dos líneas celulares CHO-S productoras de rhFII, obtenidas por transfección con la construcción PN32 (co-expresión de GGCX humana) y PTEXT5 (sin co-expresión de GGCX), respectivamente, se cultivaron en frascos de agitación usando medio libre de proteínas suplementado con 5 μ g/ml de vitamina K. Una décima parte del medio de cultivo se sustituyó a diario. Las células se recogieron después de 7 días de cultivo y los microsomas se prepararon como se describe por Berkner et al., (Proc Natl Acad Sci USA 89: 6242-6246, 1992). Se purificó FII recombinante humano del sobrenadante de cultivo de las células recogidas. Se midió la actividad GGCX como se describe por Berkner y Pudota (Proc Natl Acad Sci USA 95: 446-471 1998; y Lingenfelter y Berkner (Biochemistry 35: 8234-8243,

1996). Nuestras mediciones mostraron que la actividad GGCX es 1,5 veces mayor en la línea celular CHO que co-expresa GGCX humana, en comparación con la línea celular CHO que expresa sólo rhFII, usando las mismas condiciones de cultivo.

5 Ejemplo 3

Análisis por reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) a tiempo real de la expresión del ARNm de γ -carboxilasa y protrombina en líneas celulares CHO-S

10 Se cultivaron dos líneas celulares CHO-S obtenidas por transfección estable con las construcciones PN32 (FII + GGCX) y Ptext5 (sólo FII) respectivamente, en frascos de agitación usando medio libre de proteínas suplementado con vitamina K. Se extrajeron muestras de cultivo después de 4, 5 y 6 días de cultivo para cubrir los niveles máximos estimados en la producción de ARNm. Se aisló el ARN con Trizol™ de acuerdo con el protocolo suministrado por el proveedor, Invitrogen. El ARN aislado se trató con DNaseI con el kit de ADN-free™ de Ambion. La síntesis de ADNc se realizó usando cebadores hexaméricos aleatorios y los contenidos del kit del sistema de síntesis de primera hebra Superscript™ de RT-PCR, Invitrogen.

15 Los cebadores y sondas marcadas con Vic para RT-PCR a tiempo real se seleccionaron usando el software Primer Express™, Applied Biosystems.

20 Oligonucleótidos de γ -carboxilasa humana

25 5'ACACCTCTGGTTCAGACCTTTCTT 3' Cebador directo (SEC ID N° 7)
 5'AATCGCTCATGGAAAGGAGTATTT 3' Cebador inverso (SEC ID N° 8)
 5'CAACAAAGGCTCCAGGAGATTGAACGC 3' Sonda (SEC ID N° 9)
 Longitud de amplicón 86 pb

Oligonucleótidos protrombina humana

30 5'TGGAGGACAAAACCGAAAGAGA 3' Cebador directo (SEC ID N° 10)
 5'CATCCGAGCCCTCCACAA 3' Cebador inverso (SEC ID N° 11)
 5'CTCCTGGAATCCTACATCGACGGGC 3' Sonda (SEC ID N° 12)
 Longitud de amplicón 69 pb

35 Los cebadores se fabricaron por Operon/Qiagen y las sondas se solicitaron en Applied Biosystems. También se usaron cebadores de control y sonda de GAPDH de roedores (Applied Biosystems, ABI n° 4308318 TaqMan® Rodent GAPDH Control Reagents Protocol)-longitud de amplicón 177 pb. Las reacciones de RT-PCR a tiempo real se realizaron en el detector de secuencia ABI Prism™ 7700, Applied Biosystems. La longitud esperada de los productos de PCR amplificados se confirmó en geles de agarosa. Se realizaron series de dilución para investigar la eficacia de las reacciones de PCR para los tres genes. Los niveles de expresión de γ -carboxilasa y de protrombina se presentan en relación con la expresión del gen de control, GAPDH de roedores.

Protrombina

2 ^{^-delta} Ct	CHO-S PText5 día 4	CHO-S PText5 día 5	CHO-S PText5 día 6	CHO-S PN32 día 4	CHO-S PN32 día 5	CHO-S PN32 día 6
	0,008014	0,076239	0,066677	0,204948	0,322343	0,364334

45 γ -carboxilasa

2 ^{^-delta} Ct	CHO-S PText5 día 4	CHO-S PText5 día 5	CHO-S PText5 día 6	CHO-S PN32 día 4	CHO-S PN32 día 5	CHO-S PN32 día 6
	3,39E-07	0	0	0,000277	0,00159	0,001568

A partir de los niveles relativos de expresión se calcularon las proporciones rhFII:GGCX detectadas, de aproximadamente 74-232:1 despendiendo del día de recogida de muestras. Para la línea celular transfectada con PN32, co-expresión de rhFII y GGCX, se calculó el número de transcritos por célula en aproximadamente 8 para el ARNm de GGCX y aproximadamente 2000 para el ARNm de rhFII, dando de este modo una proporción rhFII:GGCX de aproximadamente 250:1. Los transcritos de ARNm de control de GAPDH/célula fueron para la misma muestra de aproximadamente 4000.

55 Ejemplo 4

Producción de FII humano

El ADNc de FII y GGCX humano clonados en el Ejemplo 1 se insertaron en pCDNA3.1 de manera similar como en el Ej.1. Para dar niveles de GGCX más altos, se incluyó la señal de poliadenilación de pZeoSV2+ en el fragmento

pSV40-GGCX-pA clonado en el sitio DralIII romo de pCDNA3.1. Se seleccionó un clon con el fragmento que contiene GGCX en orden inverso en comparación con el Ej. 1. Clonación del fragmento FII se hizo después de la misma manera que en el Ej. 1. La construcción final PP6 se muestra en la Figura 2 y la secuencia de nucleótidos de PP6 se muestra en la SEC ID N° 13.

5 Se obtuvieron dos líneas celulares de producción de protrombina, B2F4 y H3B 10 transfectando células CHO-S como se ha descrito en el Ej. 1. Se purificó la protrombina de estas dos líneas celulares y se caracterizó como en el Ej. 1. Los cultivos de B2F4 dieron productividades que varían de 30-70 mg/l y el porcentaje de completamente carboxilado del 55-87% (cuanto más rhFII menos completamente carboxilado). La adición de butirato dio
10 productividad un poco más alta, pero disminuyó el porcentaje de rhFII completamente carboxilado y no se consideró beneficioso. H3B10 es de crecimiento lento y dio una productividad de aproximadamente 50 mg/l, que fue elevada en relación con la cantidad de células en el cultivo, y el porcentaje de rhFII completamente carboxilado fue de aproximadamente el 60%. En comparación con la línea celular obtenida en el ejemplo 1, se produjo menos rhFII completamente carboxilado usando la construcción PP6 para una línea celular CHO. La producción de protrombina
15 recombinante totalmente activa está todavía, sin embargo, muy por encima de los niveles publicados anteriormente.

Ejemplo 5

20 Análisis por RT-PCR a tiempo real de la expresión de γ -carboxilasa y protrombina en líneas celulares CHO-S midiendo la cantidad de ARNm

Se analizaron las líneas celulares B2F4 y H3B10 del ejemplo 4 por análisis de PCR a tiempo real por el mismo método y los mismos cebadores que en el Ej. 3. Se recogieron muestras de cultivo de 10 ml en la máxima productividad para que fueran equivalente a las muestras del Ej. 3. Para el clon H3B10 las muestras eran del día 10
25 debido al lento crecimiento de este clon, y para el clon B2F4 las muestras eran del día 6.

Tabla 4. Resultados de análisis por RT-PCR a tiempo real de líneas celulares de producción de protrombina que co-expresan GGCX. Se muestrearon dos cultivos de agitación de 100 ml independientes para cada uno de B2F4 y H3B 10 para análisis por RT-PCR a tiempo real.

Transcrito	Nº total de células	Cantidad resultante de ARN total	ARN total usado para RT-PCR	Cantidad de ARNm en RT-PCR	Cantidad de células en RT-PCR	Ct	Copias de ARNm	Copias de ARNm/célula
P1E2 * Día 6								
PT	2,00E+07 19	2,39E-04	1,25E-08	2,50E-09	1,05E+03	19	2,10E+06	2005
GGCX	2,00E+07	2,39E-04	1,25E-08	2,50E-09	1,05E+03	27	8,19E+03	8
GAPDH	2,00E+07	2,39E-04	1,25E-08	2,50E-09	1,05E+03	18	4,19E+06	4010
B2F4-1 Día 6								
PT	1,30E+07	2,20E-04	1,25E-08	2,50E-09	7,39E+02	19,2	1,83E+06	2472
GGCX	1,30E+07	2,20E-04	1,25E-08	2,50E-09	7,39E+02	24,1	6,11E+04	83
GAPDH	1,30E+07	2,20E-04	1,25E-08	2,50E-09	7,39E+02	19,8	1,20E+06	1631
B2F4-2 Día 6								
PT	1,10E+07	1,40E-04	1,25E-08	2,50E-09	9,82E+02	19,2	1,83E+06	1859
GGCX	1,10E+07	1,40E-04	1,25E-08	2,50E-09	9,82E+02	24,1	6,11E+04	62
GAPDH	1,10E+07	1,40E-04	1,25E-08	2,50E-09	9,82E+02	19	2,10E+06	2135
H3B10-1 Día10								
PT	1,10E+07	2,90E-04	1,25E-08	2,50E-09	4,74E+02	17,77	4,92E+06	10375
GGCX	1,10E+07	2,90E-04	1,25E-08	2,50E-09	4,74E+02	23,4	9,93E+04	210
GAPDH	1,10E+07	2,90E-04	1,25E-08	2,50E-09	4,74E+02	17,96	4,31E+06	9095
H3B10-2 Día10								
PT	8,90E+06	3,10E-04	1,25E-08	2,50E-09	3,59E+02	19,2	1,83E+06	5087
GGCX	8,90E+06	3,10E-04	1,25E-08	2,50E-09	3,59E+02	25,3	2,66E+04	74
GAPDH	8,90E+06	3,10E-04	1,25E-08	2,50E-09	3,59E+02	18,9	2,25E+06	6263

* Datos de P1E2 del ejemplo 3 para comparaciones.

30 La proporción ARNm de rhFII:ARNm de GGCX calculada fue de aproximadamente 30:1 para el clon H3B10, aproximadamente 50:1 para el clon B2F4 y aproximadamente 250:1 para el clon P1E2.

Ejemplo 6

Producción de factor de coagulación humano IX (FIX)

5 Se amplificó el ADNc del factor de coagulación humano IX a partir de ADNc de hígado combinado Gene humano adquirido de Invitrogen. Los cebadores oligonucleotídicos fueron para el extremo 5'; F9f.ampl.: 5'-CACCATGCAGCGGTGAACATGAT-3' (SEC ID N° 16), y el extremo 3'; F9r.ampl.: 5'-CCTTGGAATCCATCTTTCATTA-3' (SEC ID N° 17).

10 La clonación de la secuencia correcta se confirmó mediante secuenciación de ADN. El fragmento de FIX humano se amplificó por PCR usando la polimerasa Pfx (Invitrogen) y los cebadores de clonación para producir un fragmento de extremos romos. El fragmento de extremos romos se fosforiló usando polinucleótido quinasa T4, y se clonó en los vectores pcDNA-GGCX digeridos con EcoRV y desfosforilados del Ej. 1 y Ej. 4. De esta manera se obtuvieron construcciones para la co-expresión de FIX y GGCX humanos análogas a las construcciones de co-expresión usadas para la producción de protrombina humana (Ej. 1 y 4). La clonación de las secuencias correctas se confirmó por secuenciación de ADN y expresión transitoria en células COS-7. La construcción de vector F9NopA se puede ver en la Fig. 3a y la construcción de vector F9hglx se muestra en la Fig. 3b. La diferencia entre los vectores F9NopA y F9hglx es la dirección de transcripción del gen GGCX. La secuencia de nucleótidos de F9NopA se muestra en SEC ID N° 14 y la secuencia de nucleótidos de F9hglx se muestra en la SEC ID N° 15.

20 Establecimiento de líneas celulares que producen rhFIX

Las construcciones de rhFIX se transfectaron en células CHO-S usando el procedimiento descrito en el Ej. 1. Para cada construcción de FIX se exploraron aproximadamente 3000 clones para la expresión de rhFIX por ELISA de los sobrenadantes celulares. Los anticuerpos usados fueron de Haemathology Technology Inc. y DakoCytomation. Se seleccionaron los clones y se adaptaron al crecimiento en medio CHO químicamente definido libre de proteínas. Las células se cultivaron en matraces T a 37°C o en frascos de agitación a 32-37°C. La concentración de CO₂ fue de 5% para ambos tipos de cultivos. El rhFIX producido se purificó hasta homogeneidad mediante cromatografía de intercambio aniónico en Q-Sepharose a pH 7,0. La actividad hFIX recombinante se determinó mediante ensayo de coagulación usando plasma deficiente en FIX (Precision Biologic). El mejor clon de producción de rhFIX obtenido fue N4D5, que se obtuvo usando la construcción F9NopA, que producía hasta 4 µg/ml de rhFIX activo cultivado en medio químicamente definido libre de proteínas en matraz T. Cultivado en frasco de agitación el mismo clon produjo hasta 7,1 µg/ml de rhFIX. La productividad global, incluyendo también rhFIX no activo incompletamente carboxilado, se estimó mediante transferencia de Western en al menos 30 µg/ml. El mejor clon de producción obtenido con la construcción de rhFIX F9hglx fue P1G9 que produjo 0,7 (matraz T) - 1,3 (agitación) µg/ml de rhFIX en condiciones similares. Los resultados indican que la productividad de rhFIX mejoró por co-expresión de GGCX a un nivel bajo usando la construcción F9NopA, pero que la co-expresión de GGCX usando la construcción F9hglx, fue menos beneficiosa. También se observó que la construcción F9NopA, que da lugar al clon N4D5, generalmente dio señales más altas de ELISA que la construcción F9hglx, que da lugar al clon de P1G9, en exploraciones simultáneas para la productividad durante el procedimiento de desarrollo de líneas celulares.

La productividad de la línea celular N4D5 es aproximadamente 4-6 veces mejor que los niveles publicados previamente obtenidos en condiciones comparables, donde IC4, IG8, r-FIX, BHK y r-FIX 293 es el nombre de los clones mencionados en las referencias (Tabla 5).

Tabla 5. Comparación de la productividad de líneas celulares que producen FIX humano.

Línea celular/construcción	Cantidad de rhFIX activo producido		Productividad total (µg/ml)	Referencia
	Matraz T (µg/ml)	Agitación (µg/ml)		
N4D5/F9NopA CHO, baja co-expr. GGCX	4	7,1	>30	Ejemplo 6
P1G9/F9hglx CHO, mediana co-expr. GGCX	0,7	1,3	nd	Ejemplo 6
IC4 CHO, co-expr. HA (control)	0,9	nd	30	Rehemtulla 1993.
IC4 CHO. alta co-expr. GGCX	1	nd	29	Rehemtulla 1993.
IC4	0,9	nd	20	Documento US 5.460.950
1G8 CHO	1,5	nd	43	Kaufman, RJ et al 1986 JBC 261:9622-9628
r-FIX BHK	0,004/24h	nd	0,004/24 h	Hallgren 2002

Línea celular/construcción	Cantidad de rhFIX activo producido		Productividad total (µg/ml)	Referencia
	Matraz T (µg/ml)	Agitación (µg/ml)		
r-FIX 293	0,004/24h	nd	0,004/24 h	Hallgren 2002

Ejemplo 7

5 Análisis por RT-PCR a tiempo real de la expresión de γ -carboxilasa y factor IX en líneas celulares CHO-S midiendo la cantidad de ARNm

10 Se cultivaron clones que producen hFIX recombinante en frascos de agitación a 32-37°C, en 100 ml de medio químicamente definido libre de proteínas suplementado con vitamina K. Se recogieron muestras de 5-10 ml en la concentración máxima de rhFIX y se analizaron para el contenido de transcritos de FIX y GGcX humanos, así como transcritos del gen de control GAPDH (constitutivo). El procedimiento fue como en el ejemplo 3. Los cebadores para rhFIX fueron los siguientes:

Cebadores de factor IX humano

- 15 5' AATAGTGCTGATAACAAGGTGGTTTG 3' cebador directo (SEC ID N° 18)
 5' CACTGCTGGTTCACAGGACTTCT 3' cebador inverso (SEC ID N° 19)
 5' TCCTGTACTGAGGGATATCGACTTGCAGAAAAC 3' sonda (SEC ID N° 20) Longitud del amplicón 84 pb

20 Se encontraron niveles de ARN mensajero en máximos en diferentes días, dependiendo de la temperatura del cultivo y el tamaño de inóculo del cultivo. Se encontraron niveles máximos de ARNm que correspondían bien con la concentración máxima de rhFIX en el medio de cultivo.

Tabla 6. Resultados de análisis por RT-PCR a tiempo real de clones que producen rhFIX.

Línea celular-lote	Día de cultivo	2 ^{-delta} Ct FIX	2 ^{-delta} Ct GGcX	Proporción de ARN de FIX:GGcX
N4D5-100	11	0,255253	0,005461	47:1
N4D5-2	14	0,264866	0,006201	43:1
P1G9-A	6	0,022982	0,005601	4:1
P1G9-B	8	0,04181	0,007687	5:1

25 A partir de los análisis por RT-PCR a tiempo real también se encontró que, aunque los valores de 2^{-delta} Ct variaron con el tiempo y las condiciones de cultivo, las proporciones de ARNm de FIX:GGcX fueron aproximadamente iguales para cada clon. Para el mejor clon productor de rhFIX N4D5 la proporción fue de aproximadamente 45:1. Los análisis de otro clon, P1G9, dieron una proporción menor de aproximadamente 4,5:1. El clon P1G9 produjo sólo el 20% de la cantidad de rhFIX producida por N4D5.

30 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> AstraZeneca AB

35 <120> MÉTODO PARA PRODUCIR PROTEÍNAS GAMMA-CARBOXILADAS

<130> MED0545.2EP.DIV

40 <150> PCT/SE2004/001453
 <151> 12-10-2004

<150> 0324044.7
 <151> 14-10- 2003

45 <160> 15

<170> PatentIn versión 3.2

50 <210> 1
 <211> 7422
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Vector

55 <400> 1

ES 2 532 470 T3

gacggatcgg gagatctccc gatccccctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg 60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtggt ggaggtcgct gagtagtgcg 120
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180
ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt 240
gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata 300
tggagtccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc 360
cccgccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 420
attgacgtca atgggtggac tatttacggg aaactgccca cttggcagta catcaagtgt 480
atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 540
atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca 600
tcgctattac catgggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg 660
actcacgggg atttccaagt ctccaccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 720
aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatgggcg 780
gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaacca 840
ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagaccaa gctggctagt 900
taagcttggg accgagctcg gatccactag tccagtgtgg tggaaattgcc cttattcctc 960
agtgaccag gagctgacac actatggcgc acgtccgagg cttgcagctg cctggctgcc 1020
tggccctggc tgcctgtgt agccttgtgc acagccagca tgtgttcctg gctcctcagc 1080
aagcacggtc gctgctccag cgggtccggc gagccaacac cttcttggag gaggtgcgca 1140
agggcaacct ggagcgagag tgcgtggagg agacgtgacg ctacgaggag gccttcgagg 1200
ctctggagtc ctccacggct acggatgtgt tctgggcca gtacacagct tgtgagacag 1260

ES 2 532 470 T3

cgaggacgcc tcgagataag cttgctgcat gtctggaagg taactgtgct gagggctctgg 1320
 gtacgaacta ccgagggcat gtgaacatca cccggctcagg cattgagtgc cagctatgga 1380
 ggagtcgcta cccacataag cctgaaatca actccactac ccatcctggg gccgacctac 1440
 aggagaatth ctgcccaac cccgacagca gcaccacggg accctggtgc tacactacag 1500
 accccaccgt gaggaggcag gaatgcagca tcctgtctg tggccaggat caagtcactg 1560
 tagcgatgac tccacgctcc gaaggctcca gtgtgaatct gtcacctcca ttggagcagt 1620
 gtgtccctga tcgggggcag cagtaccagg ggcgcctggc ggtgaccaca catgggctcc 1680
 cctgcctggc ctgggccagc gcacaggcca aggccctgag caagcaccag gacttcaact 1740
 cagctgtgca gctggtggag aacttctgcc gcaaccaga cggggatgag gagggcgtgt 1800
 ggtgctatgt ggccgggaag cctggcgact ttgggtactg cgacctcaac tattgtgagg 1860
 aggccgtgga ggaggagaca ggagatgggc tggatgagga ctgagacagg gccatcgaag 1920
 ggcgtaccgc caccagtgag taccagactt tcttcaatcc gaggacctt ggctcgggag 1980
 aggcagactg tgggctgca cctctgttcg agaagaagtc gctggaggac aaaaccgaaa 2040
 gagagctcct ggaatcctac atcgacgggc gcattgtgga gggctcggat gcagagatcg 2100
 gcatgtcacc ttggcaggtg atgcttttcc ggaagagtcc ccaggagctg ctgtgtgggg 2160
 ccagcctcat cagtgaccgc tgggtcctca ccgccgcca ctgcctcctg taccgcct 2220
 gggacaagaa cttcaccgag aatgaccttc tgggtgcgcat tggcaagcac tcccgcacca 2280
 ggtacgagcg aacattgaa aagatatcca tgttgaaaa gatctacatc cccccagg 2340
 acaactggcg ggagaacctg gaccgggaca ttgccctgat gaagctgaag aagcctgtt 2400
 ccttcagtga ctacattcac cctgtgtgtc tgcccgacag ggagacggca gccagcttgc 2460
 tccaggctgg atacaagggg cgggtgacag gctggggcaa cctgaaggag acgtggacag 2520
 ccaacgttgg taaggggcag cccagtgtcc tgcagggtgt gaacctgccc attgtggagc 2580
 ggccggtctg caaggactcc acccgatcc gcatcactga caacatgtt tgtgctggtt 2640
 acaagcctga tgaagggaaa cgaggggatg cctgtgaagg tgacagtggg ggacctttg 2700
 tcatgaagag cccctttaac aaccgctggt atcaaatgg catcgtctca tggggtgaag 2760
 gctgtgaccg ggatgggaaa tatggcttct acacacatgt gttccgctg aagaagtgga 2820
 tacagaaggc cattgatcag tttggagagt agaagggcaa ttctgcagat atccagcaca 2880
 gtggcggccg ctgagtcta gagggcccgc ggttcgaagg taagcctatc cctaaccctc 2940
 tcctcggctc cgattctacg cgtaccggtc atcatcacca tcaccattga gtttaaacc 3000
 gctgatcagc ctgactgtg cttctagtt gccagccatc tgttgtttgc cctcccccg 3060
 tgccttcctt gaccctgga ggtgccactc cactgtcct ttctaataa aatgaggaaa 3120
 ttgcatcgca ttgtctgagt aggtgtcatt ctattctggg ggggtgggtg gggcaggaca 3180
 gcaaggggga ggattgggaa gacaatagca ggcattctgg ggatgcggtg ggctctatgg 3240
 cttctgaggc ggaaagaacc agctggggct ctagggggta tccccacgcg ccctgtagcg 3300

ES 2 532 470 T3

gcgcattaag cgcgggcgggt gtggtggtta cgcgcagcgt gaccgctaca cttgccagcg 3360
 ccctagcgcc cgctccttcc gctttcttcc ctccctttct cgccacgttc gccggctttc 3420
 cccgtcaagc tctaaatcgg ggcacccctt tagggttccg atttagtgct ttacggcacc 3480
 tcgaccccaa aaaacttgat tagggatgatg gttcacgtag tgggccatcg ccctgataga 3540
 cggtttttcg ccctttgacg ttggagtcca cgttctttaa tagtggactc ttgttccaaa 3600
 ctggaacaac actcaaccct atctcggctt attcttttga tttataaggg attttgggga 3660
 tttcggccta ttggttaaaa aatgagctga tttacaataa atttaacgcg aattaattct 3720
 gtggaatgtg tgctcagttag ggtgtggaat gtccccaggc tccccaggca ggcagaagta 3780
 tgcaaagcat gcatctcaat tagtcagcaa ccaggtgtgg aaagtcccca ggctccccag 3840
 caggcagaag tatgcaaagc atgcatctca attagtcagc aaccatagtc ccgccccctaa 3900
 ctccgccccat cccgccctca actccgcccc gttccgcccc ttctccgccc catggctgac 3960
 taatTTTTTT tatttatgca gaggccgagg ccgctctgct ctctgagcta ttccagaagt 4020
 agtgaggagg cttttttgga ggcctaggct tttgcaaaaa gctcccggga gcttgatat 4080
 ccattttcgg atctgatcaa gagacaggat gaggatcgtt tcgcatgatt gaacaagatg 4140
 gattgcacgc aggttctccg gccgctggg tggagaggct attcggctat gactgggcac 4200
 aacagacaat cggctgctct gatgccgccg tgttccggct gtcagcgag gggcgcccgg 4260
 ttctttttgt caagaccgac ctgtccgggt ccctgaatga actgcaggac gaggcagcgc 4320
 ggctatcgtg gctggccacg acgggcgttc cttgcgcagc tgtgctcgac gttgtcactg 4380
 aagcgggaag ggactggctg ctattgggag aagtgccggg gcaggatctc ctgtcatctc 4440
 accttgctcc tgccgagaaa gtatccatca tggctgatgc aatgcggcgg ctgcatacgc 4500
 ttgatccggc tacctgcccc ttcgaccacc aagcgaatac tcgcatcgag cgagcacgta 4560
 ctccgatgga agccggtctt gtcgatcagg atgatctgga cgaagagcat caggggctcg 4620
 cgccagccga actgttcgcc aggtcaagg cgcgcatgcc cgacggcgag gatctcgtcg 4680
 tgacccatgg cgatgcctgc ttgccgaata tcatggtgga aaatggccgc ttttctggat 4740
 tcatcactg tggccggctg ggtgtggcgg accgctatca ggacatagcg ttggctaccc 4800
 gtgatattgc tgaagagctt ggcggcgaat gggctgaccg ctccctcgtg ctttacggta 4860
 tcgccgctcc cgattcgcag cgcatcgct tctatcgct tcttgacgag ttcttctgag 4920
 cgggactctg gggttcgcga aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc atcacgagat 4980
 ttcgattcca ccgccctt ctatgaaagg ttgggttcg gaatcgtttt ccgggacgcc 5040
 ggctggatga tctccagcg cgggatctc atgctggagt tcttcgcccc ccccaacttg 5100
 tttattgcag cttataatgg ttacaaataa agcaatagca tcacaaattt cacaaataaa 5160
 gcattTTTTT cactgcattc tagttgtggt ttgtccaaac tcatcaatgt atcttatcat 5220
 gtctgtatac cgtcgacctc tagctagagc ttggcgtaat catggtcata gctgtttcct 5280
 gtgtgaaatt gttatccgct cacaattcca cacaacatac gagccggaag cataaagtgt 5340

ES 2 532 470 T3

aaagcctggg gtgcctaata agtgagctaa ctacattaa ttgcgttgcg ctcaactgcc 5400
 gctttccagt cgggaaacct gtcgtgccag ctgcattaat gaatcggcca acgcgcgggg 5460
 agaggcgggt tgcgtattgg gcgctcttcc gttcctcgc tcaactgactc gctgcgctcg 5520
 gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaagg cggaataacg gttatccaca 5580
 gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac 5640
 cgtaaaaagg ccgctgtgct ggcgtttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac 5700
 aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga aaccgcagc gactataaag ataccagggc 5760
 tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgct taccggatac 5820
 ctgtccgctt ttctccctc gggaagcgtg gcgctttctc aatgctcacg ctgtaggtat 5880
 ctcagttcgg tgtaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag 5940
 cccgaccgct gcgcttctc cggaactat cgtcttgagt ccaacccggt aagacacgac 6000
 ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggt 6060
 gctacagagt tcttgaagtg gtgcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggt 6120
 atctgcgctc tgctgaagcc agttacctc ggaaaagag ttggtagctc ttgatccggc 6180
 aaacaacca ccgctggtag cgggtggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgaga 6240
 aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac 6300
 gaaaactcac gtaagggat tttggtcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc 6360
 cttttaaatt aaaaatgaag ttttaaatca atctaaagta tataatgagta aacttggtct 6420
 gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca cctatctcag cgatctgtct atttcgttca 6480
 tccatagttg cctgactccc cgtcgtgtag ataactacga tacgggaggg cttaccatct 6540
 ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac ccacgctcac cggctccaga tttatcagca 6600
 ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc agaagtggc ctgcaacttt atccgcctcc 6660
 atccagtcta ttaattggtg ccgggaagct agagtaagta gttcgccagt taatagtttg 6720
 cgcaacggtg ttgccattgc tacaggcatc gtgggtgcac gctcgtcgtt tggatggct 6780
 tcattcagct ccggttccca acgatcaagg cgagttacat gatccccat gttgtgcaaa 6840
 aaagcgggta gtccttcggt tcctccgatc gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtggtta 6900
 tcaactcatg ttatggcagc actgcataat tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc 6960
 ttttctgtga ctggtgagta ctcaaccaag tcattctgag aatagtgtat gggcgaccg 7020
 agttgctctt gccggcgctc aatacgggat aataccgctc cacatagcag aactttaaaa 7080
 gtgctcatca ttggaaaacg ttcttcgggg cgaaaactct caaggatctt accgctggtg 7140
 agatccagtt cgatgtaacc cactcgtgca cccaactgat cttcagcatc ttttactttc 7200
 accagcgttt ctgggtgagc aaaaacagga aggcaaaatg ccgcaaaaaa gggataaagg 7260
 gcgacacgga aatggtgaat actcactctc ttcctttttc aatattattg aagcatttat 7320
 cagggttatt gtctcatgag cggatacata tttgaatgta tttagaaaaa taaacaaata 7380
 ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg ccacctgacg tc 7422

<210> 2
 <211> 10139
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

ES 2 532 470 T3

<220>
<223> Vector

<400> 2

5

```

gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtgactct cagtacaatc tgctctgatg      60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtggt ggaggtcgtc gagtagtgcg      120
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc      180
ttaggggttag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt      240
gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata      300
tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc      360
cccgccatt gagtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc      420
attgacgtca atgggtggag tatttacggt aaactgcca cttggcagta catcaagtgt      480
atcatatgcc aagtacgcc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt      540
atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca      600
tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacaacaa tgggctgga tagcggtttg      660
actcacgggg atttccaagt ctccaccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc      720
aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatgggcg      780
gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaacca      840
ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagaccaa gctggctagc      900
gtttaaactt aagcttggtg cagagctcgg atccactagt ccagtgtggt ggaattgccc      960
ttattcctca gtgaccagg agctgacaca ctatggcgca cgccgaggc ttgacagctgc     1020
ctggctgect ggccctggct gccctgtgta gccttgtgca cagccagcat gtgttcctgg     1080
ctcctcagca agcacggtcg ctgctccagc gggctccggcg agccaacacc ttcttggagg     1140
aggtgcgcaa gggcaacctg gagcgagagt gcgtggagga gacgtgcagc tacgaggagg     1200
ccttcgaggc tctggagtcc tccacggcta cggatgtggt ctgggccaag tacacagctt     1260
gtgagacagc gaggacgcct cgagataagc ttgctgcatg tctggaaggc aactgtgctg     1320
agggctctggg tacgaactac cgagggcatg tgaacatcac ccggtcaggc attgagtgcc     1380
agctatggag gagtcgctac ccacataagc ctgaaatcaa ctccactacc catcctgggg     1440
ccgacctaca ggagaatttc tgccgcaacc ccgacagcag caccacggga ccctggtgct     1500
acactacaga cccaccgtg aggaggcagg aatgcagcat ccctgtctgt ggccaggatc     1560
aagtcactgt agcgatgact ccacgtccg aaggctccag tgtgaatctg tcacctccat     1620
tggagcagtg tgccctgat cgggggcagc agtaccaggg gcgcctggcg gtgaccacac     1680

```

ES 2 532 470 T3

atgggctccc ctgcctggcc tgggccagcg cacaggccaa ggccctgagc aagcaccagg 1740
acttcaactc agctgtgcag ctggtggaga acttctgccg caaccagac ggggatgagg 1800
agggcgtgtg gtgctatgtg gccgggaagc ctggcgactt tgggtactgc gacctcaact 1860
attgtgagga ggccgtggag gaggagacag gagatgggct ggatgaggac tcagacaggg 1920
ccatcgaagg gcgtaccgcc accagtgagt accagacttt cttcaatccg aggacctttg 1980
gctcgggaga ggcagactgt gggctgcgac ctctgttcga gaagaagtcg ctggaggaca 2040
aaaccgaaag agagctcctg gaatcctaca tcgacggcg cattgtggag ggctcggatg 2100
cagagatcgg catgtcacct tggcaggtga tgcttttccg gaagagtccc caggagctgc 2160
tgtgtggggc cagcctcatc agtgaccgct gggctctcac cgccgccac tgctcctgt 2220
acccgccttg ggacaagaac ttcaccgaga atgaccttct ggtgcgcatt ggcaagcact 2280
cccgcaccag gtacgagcga aacattgaaa agatatccat gttggaaaag atctacatcc 2340
accccaggta caactggcgg gagaacctgg accgggacat tgccctgatg aagctgaaga 2400
agcctgttgc cttcagtgc tacattcacc ctgtgtgtct gcccagacag gagacggcag 2460
ccagcttget ccaggctgga tacaaggggc gggtgacagg ctggggcaac ctgaaggaga 2520
cgtggacagc caacgttggc aaggggcagc ccagtgtcct gcaggtggg aacctgcca 2580
ttgtggagcg gccggtctgc aaggactcca cccgatccg catcactgac aacatgttct 2640
gtgctggtta caagcctgat gaagggaaac gaggggatgc ctgtgaaggc gacagtgggg 2700
gaccttttgt catgaagagc ccctttaaca accgctggta tcaaatgggc atcgtctcat 2760
ggggtgaagg ctgtgaccgg gatgggaaat atggcttcta cacacatgtg ttccgcctga 2820
agaagtggat acagaaggtc attgatcagt ttggagagta gaagggcaat tctgcagata 2880
tccagcacag tggcggccgc tcgagtctag agggcccgtt taaaccgct gatcagcctc 2940
gactgtgcct tctagtggcc agccatctgt tgtttgcccc tccccgtgc cttccttgac 3000
cctggaaggt gccactcca ctgtccttc ctaataaaat gaggaaattg catcgcattg 3060
tctgagtagg tgtcattcta ttctgggggg tggggtgggg caggacagca agggggagga 3120
ttggaagac aatagcaggc atgctgggga tgcggtgggc tetatggctt ctgaggcggga 3180
aagaaccagc tggggctcta gggggtatcc ccacgcgcc ttagcggcg cattaagcgc 3240
ggcgggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac cgctacactt gccagcgcct tagcggccgc 3300
tcctttcgtt ttcttccctt ctttctcgc cacgttcgcc ggctttcccc gtcaagctct 3360
aaatcggggg ctccctttag ggttccgatt tagtgcttta cggcaccttc gaccccaaaa 3420
aacttgatta gggctgtgga atgtgtgtca gttagggtgt ggaaagtccc caggctcccc 3480
agcaggcaga agtatgcaa gcatgcatct caattagtca gcaaccaggc gtggaaagtc 3540
cccaggctcc ccagcaggca gaagtatgca aagcatgcat ctcaattagt cagcaacct 3600
agtccccccc ctaactccgc ccatcccgc ctaactccg ccagttccg cccattctcc 3660
gccccatggc tgactaattt tttttattha tgcagaggcc gaggccgct cggcctctga 3720

ES 2 532 470 T3

gctattccag aagtagtgag gaggcttttt tggaggccta ggcttttgca aaaagctctc 3780
tggctaacta gagaaccac tgcttactgg cttatcgaaa ttaatacgac tcaactatagg 3840
gagacccaag ctggctagcg tttaaactta agcttggtag cgagctcgga tccactagtc 3900
cagtgtggtg gaattgccct ttccgcagag caatggcggg gtctgccggg tccgcgcgga 3960
cctcgcccag ctcagataaa gtacagaaa gacaaggctga actgatctca gggcccaggc 4020
aggacagccg aatagggaaa ctcttgggtt ttgagtggac agatttgtcc agttggcggg 4080
ggctggtgac cctgctgaat cgaccaacgg accctgcaag cttagctgtc tttcgttttc 4140
tttttgggtt cttgatggtg ctagacattc cccaggagcg ggggctcagc tctctggacc 4200
ggaaatacct tgatgggctg gatgtgtgcc gcttccccct gctggatgcc ctacgcccac 4260
tgccacttga ctggatgtat cttgtctaca ccatcatggt tctgggggca ctgggcatga 4320
tgctgggcct gtgctaccgg ataagctgtg tgttattcct gctgccatac tggatgtgt 4380
ttctcctgga caagacatca tggacaacc actcctatct gtatgggttg ttggcctttc 4440
agctaacatt catggatgca aaccactact ggtctgtgga cggctctgtg aatgcccata 4500
ggaggaatgc ccacgtgcc ctttggaaact atgcagtgtc ccgtggccag atcttcattg 4560
tgtacttcat tgcgggtgtg aaaaagctgg atgcagactg ggttgaaggc tattccatgg 4620
aatatttgtc ccggcactgg ctcttcagtc ccttcaaact gctgttgtct gaggagctga 4680
ctagcctgct ggtcgtgcac tggggtgggc tgctgcttga cctctcagct ggtttcctgc 4740
tcttttttga tgtctcaaga tccattggcc tgttctttgt gtcctacttc cactgcatga 4800
attcccagct tttcagcatt ggtatgttct cctacgtcat gctggccagc agccctctct 4860
tctgtcccc tgagtggcct cggaagctgg tgtcctactg cccccgaagg ttgcaacaac 4920
tgttgcccc caaggcagcc cctcagccca gtgtttcctg tgtgtataag aggagccggg 4980
gcaaaagtgg ccagaagcca gggctgcgcc atcagctggg agctgccttc accctgctct 5040
acctcctgga gcagctattc ctgccctatt ctcatcttct caccagggc tataacaact 5100
ggacaaatgg gctgtatggc tattctctggg acatgatggt gcactcccgc tcccaccagc 5160
acgtgaagat cacctaccgt gatggccgca ctggcgaact gggctacctt aaccctgggg 5220
tatttacaca gagtcggcga tggaggatc atgcagacat gctgaagcaa tatgccactt 5280
gcctgagccg cctgcttccc aagtataatg tcaactgagc ccagatctac tttgatattt 5340
gggtctccat caatgaccgc ttccagcaga ggatttttga ccctcgtgtg gacatcgtgc 5400
aggccgcttg gtcacccttt cagcgcacat cctgggtgca accactcttg atggacctgt 5460
ctccctggag ggccaagtta caggaaatca agagcagcct agacaaccac actgaggtgg 5520
tcttcattgc agatttccct ggactgcact tggagaattt tgtgagtga gacctgggca 5580
acactagcat ccagctgctg cagggggaag tgactgtgga gcttgtggca gaacagaaga 5640
accagactct tcgagagggg gaaaaaatgc agttgcctgc tggtgagtac cataaggtgt 5700
atacgacatc acctagccct tcttgctaca tgtacgtcta tgtcaacact acagagcttg 5760

ES 2 532 470 T3

cactggagca agacctggca tatctgcaag aattaaagga aaaggtggag aatggaagtg 5820
 aaacagggcc tctaccccca gagctgcagc ctctgttggga aggggaagta aaagggggcc 5880
 ctgagccaac acctctgggt cagacctttc ttagacgccca acaaaggctc caggagattg 5940
 aacgccggcg aaatactcct ttccatgagc gattcttccg cttcttgttg cgaaagctct 6000
 atgtctttcg ccgacagctt ctgatgactt gtatctcact tcgaaatctg atattaggcc 6060
 gtccttcctt ggagcagctg gcccaggagg tgacttatgc aaacttgaga ccctttgagg 6120
 cagttggaga actgaatccc tcaaacacgg attcttcaca ttctaactct cctgagtcaa 6180
 atcctgatcc tgtccactca gagttctgaa gggggccaga tgttggaagg gcaattcgag 6240
 tctagagggc ccgccctgat agacggtttt tcgccctttg acgttggagt ccacgttctt 6300
 taatagtgga ctcttgttcc aaactggaac aacactcaac cctatctcgg tctattcttt 6360
 tgatttataa gggattttgc cgatttcggc ctattggtta aaaaatgagc tgatttaaca 6420
 aaaatttaac gcgaattaat tctgtggaat gtgtgtcagt taggggtgtg aaagtcccca 6480
 ggctccccag caggcagaag tatgcaaagc atgcatctca attagtcagc aaccagggtg 6540
 ggaaagtccc caggctcccc agcaggcaga agtatgcaaa gcatgcatct caattagtca 6600
 gcaaccatag tcccgccctt aactccgcc atccccccc taactccgcc cagttccgcc 6660
 cattctccgc cccatggctg actaattttt tttatttatg cagaggccga ggccgcctct 6720
 gcctctgagc tattccagaa gtagtgagga ggcttttttg gaggcctagg cttttgcaaa 6780
 aagctccccg gagcttgtat atccattttc ggatctgatc aagagacagg atgaggatcg 6840
 tttcgcatga ttgaacaaga tggattgcac gcaggttctc cggccgcttg ggtggagagg 6900
 ctattcggct atgactgggc acaacagaca atcggctgct ctgatgccg cgtgttccgg 6960
 ctgtcagcgc aggggcgccc ggttcttttt gtcaagaccg acctgtccgg tgccctgaat 7020
 gaactgcagg acgaggcagc gcggctatcg tggctggcca cgacgggcgt tccttgcgca 7080
 gctgtgctcg acgttgtcac tgaagcggga agggactggc tgctattggg cgaagtgccg 7140
 gggcaggatc tctgtcatc tcaccttgc cctgccgaga aagtatccat catggctgat 7200
 gcaatgcggc ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc cattcgacca ccaagcgaaa 7260
 catgcatcg agcgagcacg tactcggatg gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg 7320
 gacgaagagc atcaggggct cgcgccagcc gaactgttcg ccaggctcaa ggcgcgatg 7380
 cccgacggcg aggatctcgt cgtgaccat ggcgatgcct gcttgccgaa tatcatggtg 7440
 gaaaatggcc gcttttctgg attcatcgac tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat 7500
 caggacatag cgttggctac ccgtgatatt gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac 7560
 cgcttctctg tgctttacgg tatcgccgct cccgattcgc agcgcacgc cttctatcgc 7620
 cttcttgacg agttcttctg agcgggactc tggggttcga aatgaccgac caagcgacgc 7680
 ccaacctgcc atcacgagat ttcgattcca ccgccgcctt ctatgaaagg ttgggcttcg 7740
 gaatcgtttt ccgggacgcc ggctggatga tcctccagcg cggggatctc atgctggagt 7800

ES 2 532 470 T3

tcttcgccca ccccaacttg tttattgcag cttataatgg ttacaaataa agcaatagca 7860
tcacaaatth cacaataaaa gcattttttt cactgcattc tagttgtggt ttgtccaaac 7920
tcataaatgt atcttatcat gtctgtatac cgctgacctc tagctagagc ttggcgtaat 7980
catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgct cacaattcca cacaacatac 8040
gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaag agtgagctaa ctcacattaa 8100
ttgctgtgag ctcactgccc gctttccagt cgggaaacct gtcgtgccag ctgcattaat 8160
gaatcggcca acgctcgggg agaggcgggt tgcgtattgg gcgctcttc gcttctcgc 8220
tcactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaagg 8280
cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaag 8340
gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgctgtgct ggcgtttttc cataggctcc 8400
gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga aaccggacag 8460
gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga 8520
ccctgcccgt taccggatac ctgtccgctt ttctccctc gggaaagcgtg gcgctttctc 8580
atagctcacg ctgtaggat ctcagtccgg tgtaggctgt tcgctccaag ctgggctgtg 8640
tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct gcgcttctc cggtaaactat cgtcttgagt 8700
ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac aggattagca 8760
gagcgaggta tgtaggcggg gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca 8820
ctagaagaac agtatttggg atctgcgctc tgcgtgaagc agttacctc ggaaaaagag 8880
ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cggttttttt gtttgcaagc 8940
agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatctt tctacggggg 9000
ctgacgctca gtggaacgaa aactcacggt aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa 9060
ggatcttcac ctgatcctt ttaaattaaa aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat 9120
atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga 9180
tctgtctatt tcgttcatcc atagttgcct gactccccgt cgtgtagata actacgatac 9240
gggagggcct accatctggc ccagtgctg caatgatacc gcgagacca cgctcaccgg 9300
ctccagattt atcagcaata aaccagccag ccggaagggc cgagcgcaga agtggctctg 9360
caactttatc cgctccatc cagtctatta attgttgccg ggaagctaga gtaagtagtt 9420
cgccagttaa tagtttgccg aacgttggtt ccattgctac aggcacgctg gtgtcacgct 9480
cgtcgtttgg tatggcttca ttcagctccg gttcccaacg atcaaggcga gttacatgat 9540
ccccatggt gtgcaaaaaa gcggttagct ccttcggctc tccgatcgtt gtcagaagta 9600
agttggccgc agtgttatca ctcatggta tggcagcact gcataattct cttactgtca 9660
tgccatccgt aagatgctt tctgtgactg gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat 9720
agtgatgagc gcgaccgagt tgctcttgcc cggcgtcaat acgggataat accgcgccac 9780
atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg gaaaacgctt ttcggggcga aaactctcaa 9840
ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga tgtaaccac tcgtgcaccc aactgatctt 9900
cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg caaaatgccg 9960
caaaaaaggg aataagggcg acacggaaat gttgaatact catactctc ctttttcaat 10020
attattgaag catttatcag ggttattgtc tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt 10080
agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca catttccccg aaaagtgcc cctgacgctc 10139

ES 2 532 470 T3

<210> 3
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 3
 attcctcagt gaccaggag ctgaca 26
 <210> 4
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 10
 <400> 4
 ctactctcca aactgatcaa tgacctctg tatccacttc tt 42
 <210> 5
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 20
 <400> 5
 tccgcagagc aatggcgggtg tct 23
 <210> 6
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 25
 <400> 6
 ccaacatctg gcccttcag aact 24
 <210> 7
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 35
 <400> 7
 acacctctgg tcagacctt tctt 24
 <210> 8
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 40
 <400> 8
 aatcgctcat ggaaaggagt attt 24
 <210> 9
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 50
 <400> 9
 caacaaaggc tccaggagat tgaacgc 27
 <210> 10
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 60
 <400> 10
 tggaggacaa aaccgaaaga ga 22
 65

ES 2 532 470 T3

<210> 11
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 11
 catccgagcc ctccacaa 18
 <210> 12
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 10
 <400> 12
 ctctggaat cctacatcga cgggc 25
 <210> 13
 <211> 10238
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> Vector
 25
 <400> 13
 gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtgcaactct cagtacaatc tgctctgatg 60
 ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtggt ggaggtcgct gagtagtgcg 120
 cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180
 ttagggtag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt 240
 gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata 300
 tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc 360
 cccgccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 420
 attgacgtca atgggtggag tatttacggt aaactgccc a cttggcagta catcaagtgt 480
 atcatatgcc aagtacgcc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 540
 atgccagta catgacctta tgggactttc ctacttgga gtacatctac gtattagtca 600
 tcgctattac catgggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg 660
 actcacggg atttccaagt ctccaccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 720
 aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgt acaactccgc cccattgacg caaatgggcg 780

ES 2 532 470 T3

gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaaccca 840
 ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagacccaa gctggctagc 900
 gtttaactt aagcttggtta ccgagctcgg atccactagt ccagtgtggt ggaattgccc 960
 ttattcctca gtgaccagg agctgacaca ctatggcgca cgtccgaggc ttgagctgc 1020
 ctggctgcct ggccctggct gccctgtgta gccttgtgca cagccagcat gtgttcctgg 1080
 ctctcagca agcacggtcg ctgctccagc gggtcggcg agccaacacc ttcttgagg 1140
 aggtgcgcaa gggcaacctg gagcgagagt gcgtggagga gacgtgcagc tacgaggagg 1200
 ccttcgaggc tctggagtcc tccacggcta cggatgtgtt ctgggccaag tacacagctt 1260
 gtgagacagc gaggacgcct cgagataagc ttgctgcatg tctggaaggt aactgtgctg 1320
 agggctctggg tacgaactac cgagggcatg tgaacatcac ccggtcaggc attgagtgcc 1380
 agctatggag gagtcgctac ccacataagc ctgaaatcaa ctccactacc catcctgggg 1440
 ccgacctaca ggagaatttc tgccgcaacc ccgacagcag caccacggga ccctgggtgct 1500
 aactacaga cccaccgtg aggaggcagg aatgcagcat ccctgtctgt ggccaggatc 1560
 aagtcactgt agcgatgact ccacgctccg aaggctccag tgtgaatctg tcacctcat 1620
 tggagcagtg tgtccctgat cgggggcagc agtaccaggg gcgcctggcg gtgaccacac 1680
 atgggtccc ctgcctggcc tgggccagcg cacaggccaa ggccctgagc aagcaccagg 1740
 acttcaactc agctgtgcag ctgggtggaga acttctgccg caaccagac ggggatgagg 1800
 agggcgtgtg gtgctatgtg gccgggaagc ctggcgactt tgggtactgc gacctcaact 1860
 attgtgagga ggccgtggag gaggagacag gagatgggct ggatgaggac tcagacaggg 1920
 ccatcgaagg gcgtaccgcc accagtgagt accagacttt cttcaatccg aggaccttg 1980
 gctcgggaga ggcagactgt gggctgcgac ctctgttcga gaagaagtcg ctggaggaca 2040
 aaaccgaaag agagctctg gaatcctaca tcgacgggcg cattgtggag ggctcggatg 2100
 cagagatcgg catgtcacct tggcaggtga tgctttccg gaagagtccc caggagctgc 2160
 tgtgtggggc cagcctcatc agtgaccgct gggtcctcac cgcgcccac tgctcctgt 2220
 accgccttg ggacaagaac ttcaccgaga atgaccttct ggtgcgcatt ggcaagcact 2280
 cccgcaccag gtacgagcga aacattgaaa agatatccat gttggaaaag atctacatcc 2340
 accccaggta caactggcgg gagaacctg accgggacat tgccctgatg aagctgaaga 2400
 agcctgttgc cttcagtac tacattcacc ctgtgtgtct gcccgacagg gagacggcag 2460
 ccagcttgct ccaggctgga tacaagggc gggtgacagg ctggggcaac ctgaaggaga 2520
 cgtggacagc caacgttggg aaggggcagc ccagtgtcct gcaggtggtg aacctgccc 2580
 ttgtggagcg gccggtctgc aaggactcca cccgatccg catcactgac aacatgttct 2640
 gtgctggtta caagcctgat gaagggaaac gaggggatgc ctgtgaaggt gacagtgggg 2700
 gacccttgt catgaagagc cccttaaca accgctggta tcaaatggc atcgtctcat 2760
 ggggtgaagg ctgtgaccgg gatgggaaat atggcttcta cacacatgtg ttccgctga 2820

ES 2 532 470 T3

agaagtggat acagaaggtc attgatcagt ttggagagta gaagggcaat tctgcagata 2880
 tccagcacag tggcggcccgc tcggttccta gagggcccgt ttaaaccgcg tgatcagcct 2940
 cgactgtgcc ttctagttgc cagccatctg ttgtttgcc ctccccctg ccttccttga 3000
 ccctggaagg tgccactccc actgtccttt cctaataaaa tgaggaaatt gcatcgatt 3060
 gtctgagtag gtgtcattct attctggggg gtgggggtgg gcaggacagc aagggggagg 3120
 attgggaaga caatagcagg catgctgggg atgcggtggg ctctatggct tctgaggcgg 3180
 aaagaaccag ctggggctct agggggatc cccacgcgcc ctgtagcggc gcattaagcg 3240
 cggcgggtgt ggtggttacg cgcagcgtga ccgctacact tgccagcggc ctagcggccg 3300
 ctctttctgc tttcttcct tcctttctcg ccacgttcgc cggtttccc cgtcaagctc 3360
 taaatcgggg gctcccttta gggttccgat ttagtgcttt acggcacctc gaccccaaaa 3420
 aacttgatta gggatgatgt tcacatcgat gcaatttctt cattttatta ggaaaggaca 3480
 gtgggagtgg caccttccag ggtcaaggaa ggcacggggg aggggcaaac aacagatggc 3540
 tggcaactag aaggcacagt cgaggctgat cagcggggtt aaacgggccc tctagactcg 3600
 aattgccctt ccaacatctg gcccccttca gaactctgag tggacaggat caggatttga 3660
 ctcaggagga ttagaatgtg aagaatccgt gtttgaggga ttcagttctc caactgcctc 3720
 aaagggtctc aagtttgc atagtcacct ctgggccagc tgctccaggg aaggacggcc 3780
 taatatcaga tttcgaagt agatacaagt catcaggaag ctgcggcgaa agacatagag 3840
 ctttcgcaac aagaagcggg agaatcgctc atggaaagga gtatttcgcc ggcgttcaat 3900
 ctctggagc cttgtttggc gtctaagaaa ggtctgaacc agaggtgttg gctcagggcc 3960
 ccttttact tccccttcca acagaggctg cagctctggg ggtagaggcc ctgtttcact 4020
 tccattctcc accttttct ttaattcttg cagatatgcc aggtcttgct ccagtgcaag 4080
 ctctgtagtg ttgacataga cgtacatgta gcaagaagg ctaggatgat tctgtatacac 4140
 cttatggtac tcaccagcag gcaactgcat tttttctccc tctcgaagag tctggttctt 4200
 ctgttctgcc acaagctcca cagtcacttc cccctgcagc agctggatgc tagtgttgcc 4260
 caggtcttca ctcaaaaat tctccaagt cagtcaggg aaatctgcaa tgaagaccac 4320
 ctcagtgtgg ttgtctaggc tgctcttgat ttctgtaac ttggccctcc agggagacag 4380
 gtccatcaag agtggttgca cccaggatgt gcgctgaaag ggtgaccaag cggcctgcac 4440
 gatgtccaca cgagggtcaa aaatcctctg ctggaagcgg tcattgatgg agacccaaat 4500
 atcaaagtag atctggggct cagtgcatt atacttggga agcaggcggc tcaggcaagt 4560
 ggcattatgc ttcagcatgt ctgcatgat cttccatcgc cgactctgtg taaatacccc 4620
 agggttaagg tagcccagtt cgcagtgcg gccatcacgg taggtgatct tcacgtgctg 4680
 gtgggagcgg gagtgcacca tcatgtcca ggaatagcca tacagcccat ttgtccagtt 4740
 gttatagccc tgggtgagaa aatgagaata gggcaggaat agctgctcca ggaggtagag 4800
 cagggatgaag gcagctcca gctgatggcg cagccctggc ttctggccac ttttgccccg 4860

ES 2 532 470 T3

gctcctctta tacacacagg aaacactggg ctgaggggct gccttgaggg gcaacagttg 4920
ttgcaacctt cgggggcagt aggacaccag cttccgaggg cactcagggg agcagaagag 4980
agggctgctg gccagcatga cgtaggagaa cataccaatg ctgaaaagct ggaattcat 5040
gcagtggaag taggacacaa agaacaggcc aatggatctt gagacatcaa aaaagagcag 5100
gaaaccagct gagaggtaaa gcagcagccc accccagtg cagaccagca ggctagtcag 5160
ctcctcagac aacagcagtt tgaagggact gaagagccag tgccgggaca aatattccat 5220
ggaatagcct tcaaccagc ctgcatccag ctttttcaca cccgcaatga agtacacaat 5280
gaagatctgg ccacggagca ctgcatagtt ccaaaggggc acgtgggcat tcctcctatg 5340
ggcattcagc agaccgtcca cagaccagta gtggtttgca tccatgaatg ttagctgaaa 5400
ggccaacaac ccatacagat aggagtggtt gttccatgat gtcttgcca ggagaaacac 5460
ataccagtat ggcagcagga ataacacaca gcttatccgg tagcacaggc ccagcatcat 5520
gcccagtgcc ccagaaaca tgatggtgta gacaagatac atccagtcaa gtggcagtg 5580
gcgtagggca tccagcaagg ggaagcggca cacatccagc ccatcaaggt atttccggtc 5640
cagagagctg agccccgct cctggggaat gtctagcacc atcaagaacc caaaaagaaa 5700
acgaaagaca gctaagcttg cagggtccgt tggctgatcc agcagggta ccagcctccg 5760
ccaactggac aaatctgtcc actcaaaacc caagagtttc cctattcggc tgcctgcct 5820
gggcccctgag atcagttcag cttgtcttt ctgtacttta tctgagctgg gcgaggtccg 5880
cgcggaaccg gcagacaccg ccattgctct gcggaaggg caattccacc aactggact 5940
agtgatccg agctcggta caagcttaag tttaaacgct agccagcttg ggtctcccta 6000
tagtgagctg tattaatttc gataagccag taagcagtg gttctctagt tagccagaga 6060
gctttttgca aaagcctagg cctccaaaaa agcctcctca ctacttctgg aatagctcag 6120
aggccgagc ggccctggcc tctgcataaa taaaaaaat tagtcagcca tggggcggag 6180
aatggcgga actggcgga gttagggcg ggatggcg agttagggc gggactatgg 6240
ttgctgacta attgagatgc atgctttgca tacttctgcc tgctggggag cctggggact 6300
ttccacacc taactgacac acattccaca gccggatcga tgtgggcat cgcctgata 6360
gacggttttt cgcctttga cgttgagtc cacgttcttt aatagtgac tctgttcca 6420
aactggaaca aactcaacc ctatctcggc ctattctttt gatttataag ggattttgcc 6480
gatttcggcc tattggttaa aaaatgagct gatttaacaa aaatttaacg cgaattaatt 6540
ctgtggaatg tgtgtcagtt aggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt 6600
atgcaaagca tgcatctcaa ttagtcagca accaggtgtg gaaagtcccc aggcctccca 6660
gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caaccatagt cccgcccta 6720
actccgcca tcccggcct aactccgcc agttccgcc attctccgcc ccatggctga 6780
ctaatttttt ttatttatgc agaggccgag gccgcctctg cctctgagct attccagaag 6840
tagtgaggag gcttttttg aggcctaggc ttttgcaaaa agctccccgg agcttgata 6900

ES 2 532 470 T3

tccattttcg gatctgatca agagacagga tgaggatcgt ttcgcatgat tgaacaagat 6960
 ggattgcacg caggttctcc gggcgcttgg gtggagaggc tatteggcta tgactgggca 7020
 caacagacaa tcggctgctc tgatgccgcc gtgttccggc tgtcagcgca ggggcgcccg 7080
 gttctttttg tcaagaccga cctgtccggt gccctgaatg aactgcagga cgaggcagcg 7140
 cggctatcgt ggctggccac gacgggcgtt ccttgcgag ctgtgctcga cgttgtcact 7200
 gaagcgggaa gggactggct gctattgggc gaagtgccgg ggcaggatct cctgtcatct 7260
 caccttgctc ctgccgagaa agtatccatc atggctgatg caatgcggcg gctgcatacg 7320
 cttgatccgg ctacctgccc attcgaccac caagcgaaac atcgcatacga gcgagcacgt 7380
 actcggatgg aagccggtct tgtcgatcag gatgatctgg acgaagagca tcaggggctc 7440
 gcgccagccg aactgttcgc caggctcaag gcgcgcatgc ccgacggcga ggatctcgtc 7500
 gtgacccatg gcgatgcctg cttgccgaat atcatggtgg aaaatggccg cttttctgga 7560
 ttcacgact gtggccggct ggggtgtggcg gaccgctatc aggacatagc gttggctacc 7620
 cgtgatattg ctgaagagct tggcggcgaa tgggctgacc gcttcctcgt gctttacggt 7680
 atcgcgctc ccgattcgca gcgcatcgcc ttctatcgcc ttcttgacga gttcttctga 7740
 gcgggactct ggggttcgaa atgaccgacc aagcgcgccc caacctgcca tcacgagatt 7800
 tcgattccac cgccgccttc tatgaaaggt tgggcttcgg aatcgttttc cgggacgccg 7860
 gctggatgat cctccagcgc ggggatctca tgctggagtt cttcgcccac cccaacttgt 7920
 ttattgcagc ttataatggt tacaataaaa gcaatagcat cacaaatttc acaaataaag 7980
 catttttttc actgcattct agttgtggtt tgtccaaact catcaatgta tcttatcatg 8040
 tctgtatacc gtcgacctct agctagagct tggcgtaatc atggtcatag ctgtttcctg 8100
 tgtgaaattg ttatccgctc acaattccac acaacatacg agccggaagc ataaagtgta 8160
 aagcctgggg tgccctaatga gtgagctaac tcacattaat tgcggtgctc tctactgcccg 8220
 cttccagtc gggaaacctg tcgtgccagc tgcattaatg aatcggccaa cgcgcgggga 8280
 gaggcggttt gcgtattggg cgctcttccg cttcctcgt cactgactcg ctgcgctcgg 8340
 tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc ggtaatacgg ttatccacag 8400
 aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc 8460
 gtaaaaaggc gcggttgctg gcgtttttcc ataggctccg cccccctgac gagcatcaca 8520
 aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg actataaaga taccaggcgt 8580
 tccccctgg aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac cctgccgctt accggatacc 8640
 tgccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgctttctca tagctcacgc tgtaggtatc 8700
 tcagttcggg ttaggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaacct cccgttcagc 8760
 ccgaccgctg gccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc caaccggta agacacgact 8820
 tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag agcgaggtat gtaggcggtg 8880
 ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaagaaca gtatttggtg 8940

ES 2 532 470 T3

tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca 9000
aacaaaccac cgctggtagc ggtttttttg tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa 9060
aaggatctca agaagatcct ttgatctttt ctacggggtc tgacgctcag tggaacgaaa 9120
actcacgfta agggatfttg gtcatgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt 9180
taaattaaaa atgaagfttt aatcaatct aaagtatata tgagtaaact tggcttgaca 9240
gttaccaatg cttaatcagt gaggcaccta tctcagcgat ctgtctattt cgttcacca 9300
tagttgcctg actccccgtc gtgtagataa ctacgatacg ggagggtta. ccatctggcc 9360
ccagtgcctg aatgataccg cgagaccac gtcaccggc tccagattta tcagcaataa 9420
accagccagc cggaagggcc gagcgcagaa gtggtcctgc aactttatcc gcctccatcc 9480
agtctattaa ttgttgccgg gaagctagag taagtagttc gccagttaat agtttgcgca 9540
acgttgctgc cattgctaca ggcctcgtgg tgtcacgctc gtcgtttggt atggcttcat 9600
tcagctccgg ttccaacga tcaaggcgag ttacatgatc ccccatggtg tgcaaaaaag 9660
cggttagctc cttcggctct ccgatcgttg tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac 9720
tcatggttat ggcagcactg cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt 9780
ctgtgactgg tgagtactca accaagctat tctgagaata gtgtatgctg cgaccgagtt 9840
gctcttggcc ggcgtcaata cgggataata ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc 9900
tcatcattgg aaaaagtctc tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctgttgagat 9960
ccagttcgat gtaaccactc cgtgcacca actgatcttc agcatctttt actttcacca 10020
gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaaagccgc aaaaaaggga ataaggcgca 10080
cacggaaatg ttgaatactc atactcttc ttttcaata ttattgaagc atttatcagg 10140
gttattgtct catgagcgga tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg 10200
ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac ctgacgtc 10238

<210> 14
<211> 9683
<212> ADN
<213> Artificial

5

<220>
<223> Vector

10

<400> 14

gacggatcgg gagatctccc gatccccat ggtgcactct cagtacaatc tgctctgatg 60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtggt ggaggctcgt gagtagtgcg 120
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180
ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgag atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt 240
gattattgac tagttattaa tagtaatca ttacggggtc attagttcat agccatata 300
tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccccc tggctgaccg cccaacgacc 360
cccgccatt gacgtcaata atgacgatg ttccatagat aacgccaata gggactttcc 420

ES 2 532 470 T3

attgacgtca atgggtggag tatttacggt aaactgcca cttggcagta catcaagtgt 480
 atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgy taaatggccc gcctggcatt 540
 atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca 600
 tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacaatcaa tgggcgtgga tagcggtttg 660
 actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 720
 aaaatcaacg ggactttcca aatgtcgtg acaactccgc cccattgacg caaatgggcy 780
 gtaggcgtgt acgggtggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaacca 840
 ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagacccaa gctggctagc 900
 gtttaaacct aagcttggta ccgagctcgg atccactagt ccagtgtggt ggaattgccc 960
 ttattcctca gtgaccagc agctgacaca cttagaaggc caattctgca gatcaccatg 1020
 cagcgcgtga acatgatcat ggcagaatca ccaggcctca tcaccatctg ccttttagga 1080
 tatctactca gtgctgaatg tacagttttt cttgatcatg aaaacgcca caaaattctg 1140
 aatcgccaa agaggtataa ttcaggtaaa ttggaagagt ttgttcaagg gaaccttgag 1200
 agagaatgta tggaagaaa gtgtagtttt gaagaagcac gagaagtttt tgaaaacact 1260
 gaaagaacaa ctgaattttg gaagcagtat gttgatggag atcagtgtga gtccaatcca 1320
 tgtttaaatg gcggcagttg caaggatgac attaattcct atgaatggtg gtgtcccttt 1380
 ggatttgaag gaaagaactg tgaattagat gtaacatgta acattaagaa tggcagatgc 1440
 gagcagtttt gtaaaaatag tgctgataac aagggtggtt gtcctgtac tgagggatat 1500
 cgacttgacg aaaaccagaa gtccctgtgaa ccagcagtg catttccatg tggaaagagt 1560
 tctgtttcac aaacttctaa gctcaccctg gctgagactg ttttctctga tgtggactat 1620
 gtaaattcta ctgaagctga aaccattttg gataacatca ctcaaagcac ccaatcattt 1680
 aatgacttca ctcggttgt tgggtggagaa gatgccaaac caggtcaatt cccttggcag 1740
 gttgttttga atggtaaagt tgatgcattc tgtggaggct ctatcgtaa tgaaaaatgg 1800
 attgtaactg ctgcccactg tgttgaact ggtgttaaaa ttacagttgt cgcaggtgaa 1860
 cataatattg aggagacaga acatacagag caaaagcgaa atgtgattcg aattattcct 1920
 caccacaact acaatgcagc tattaataag tacaaccatg acattgccct tctggaactg 1980
 gacgaaccct tagtgctaaa cagctacggt acacctattt gcattgctga caaggaatac 2040
 acgaacatct tcctcaaatt tggatctggc tatgtaagtg gctggggaag ggtcttccac 2100
 aaaggagat cagctttagt tcttcagtac cttagagttc cacttgttga ccgagccaca 2160
 tgtcttcgat ctacaaagt caccatctat aacaacatgt tctgtgctgg ctccatgaa 2220
 ggaggtagag attcatgtca aggagatagt gggggacccc atgttactga agtgaaggg 2280
 accagtttct taactggaat tattagctgg ggtgaagagt gtgcaatgaa aggcaaatat 2340
 ggaatatata ccaaggtatc ccggtatgtc aactggatta aggaaaaaac aaagctcact 2400
 taatgaaaga tggatttcca aggatccagc acagtggcgg ccgctcgagt ctagagggcc 2460

ES 2 532 470 T3

cgtttaaacc cgctgatcag cctcgactgt gccttctagt tgccagccat ctggtgtttg 2520
 cccctcccc gtgccttctc tgaccctgga aggtgccact cccactgtcc tttcctaata 2580
 aaatgaggaa attgcatcgc attgtctgag taggtgtcat tctattctgg ggggtgggg 2640
 ggggcaggac agcaaggggg aggattggga agacaatagc aggcattgctg gggatgcggt 2700
 gggctctatg gcttctgagg cggaaagaac cagctggggc tctagggggg atccccacgc 2760
 gcctgtagc ggcgcattaa gcgcggcggg tgtggtggtt acgcgcagcg tgaccgctac 2820
 acttgccagc gccctagcgc ccgctccttt cgctttcttc ccttcctttc tcgccacggt 2880
 cgccggcttt ccccgtaag ctctaaatcg ggggctccct ttagggttcc gatttagtgc 2940
 tttacggcac cttcgacccc aaaaaacttg attagggctg tggaatgtgt gtcagttagg 3000
 gtgtggaaag tccccaggct ccccagcagg cagaagtatg caaagcatgc atctcaatta 3060
 gtcagcaacc aggtgtggaa agtccccagg ctccccagca ggcagaagta tgcaaagcat 3120
 gcatctcaat tagtcagcaa ccatagtccc gccccactc cgcgccatcc cgccccctaac 3180
 tccgccagc tccgccatt ctccgcccc tggtgacta atttttttta tttatgcaga 3240
 ggccgaggcc gcctcggcct ctgagctatt ccagaagtag tgaggaggct tttttggagg 3300
 cctaggcttt tgcaaaaagc tctctggcta actagagaac ccactgctta ctggcttacc 3360
 gaaattaata cgactcacta tagggagacc caagctggct agcgtttaa cttagcttg 3420
 gtaccgagct cggatccact agtccagtgt ggtggaattg ccctttccgc agagcaatgg 3480
 cgggtgtctgc cgggtccgcg cggacctcgc ccagctcaga taaagtacag aaagacaagg 3540
 ctgaactgat ctcagggccc aggcaggaca gccgaatagg gaaactcttg ggttttgagt 3600
 ggacagattt gtccagttgg cggaggctgg tgaccctgct gaatcgacca acggaccctg 3660
 caagcttagc tgtctttcgt tttcttttg ggttcttgat ggtgctagac attccccagg 3720
 agcgggggct cagctctctg gaccggaaat acctgatgg gctggatgtg tgccgcttc 3780
 ccttgctgga tgccctacgc ccactgccac ttgactggat gtatcttgc tacaccatca 3840
 tgtttctggg ggcactgggc atgatgctgg gcctgtgcta ccggataagc tgtgtgttat 3900
 tcctgctgcc atactggtat gtgtttctcc tggacaagac atcatggaac aaccactcct 3960
 atctgtatgg gttgttgccc tttcagctaa cattcatgga tgcaaaccac tactggtctg 4020
 tggacggtct gctgaatgcc cataggagga atgccacgt gccctttgg aactatgcag 4080
 tgctccgtgg ccagatctc attgtgtact tcattgcggg tgtgaaaag ctggatgcag 4140
 actgggttga aggctattcc atggaatatt tgtcccggca ctggetcttc agtccctca 4200
 aactgctgtt gtctgaggag ctgactagcc tgctggtcgt gcactggggg gggctgctgc 4260
 ttgacctctc agctggtttc ctgctcttt ttgatgtctc aagatccatt ggcctgttct 4320
 ttgtgtccta cttccactgc atgaattccc agcttttcag cattggtatg ttctctacg 4380
 tcatgctggc cagcagccct ctcttctgct cccctgagtg gcctcggag ctggtgtcct 4440
 actgcccccg aaggttgcaa caactgttgc ccctcaaggc agccccctcag cccagtgtt 4500

ES 2 532 470 T3

cctgtgtgta taagaggagc cggggcaaaa gtggccagaa gccagggctg cgccatcagc 4560
 tgggagctgc cttcacctcg ctctacctcc tggagcagct attcctgccc tattctcatt 4620
 ttctcaccca gggctataac aactggacaa atgggctgta tggctattcc tgggacatga 4680
 tgggtgcactc ccgctcccac cagcacgtga agatcaccta ccgtgatggc cgcactggcg 4740
 aactgggcta ccttaaccct ggggtattta cacagagtcg gcgatggaag gatcatgcag 4800
 acatgctgaa gcaatatgcc acttgccctga gccgcctgct tcccaagtat aatgtcactg 4860
 agccccagat ctactttgat atttgggtct ccatcaatga ccgcttccag cagaggattt 4920
 ttgaccctcg tgtggacatc gtgcaggccg cttggtcacc ctttcagcgc acatcctggg 4980
 tgcaaccact cttgatggac ctgtctccct ggaggggcaa gttacaggaa atcaagagca 5040
 gcctagacaa ccacactgag gtggtcttca ttgcagattt ccctggactg cacttgagaa 5100
 attttgtgag tgaagacctg ggcaacacta gcatccagct gctgcagggg gaagtgactg 5160
 tggagcttgt ggcagaacag aagaaccaga ctcttcgaga gggagaaaaa atgcagttgc 5220
 ctgctggtga gtaccataag gtgtatacga catcacctag cccttcttgc tacatgtacg 5280
 tctatgtcaa cactacagag cttgcactgg agcaagacct ggcatatctg caagaattaa 5340
 aggaaaaggt ggagaatgga agtgaaacag ggcctctacc cccagagctg cagcctctgt 5400
 tggaaagggg agtaaaaggg ggccctgagc caacacctct ggttcagacc tttcttagac 5460
 gccaaacaaag gctccaggag attgaacgcc ggcgaaatac tcctttccat gagcgattct 5520
 tccgcttctt gttgcgaaag ctctatgtct ttcgccgag cttcctgatg acttgtatct 5580
 cacttcgaaa tctgatatta ggccgtcctt ccctggagca gctggcccag gaggtgactt 5640
 atgcaaacct gagacccttt gaggcagttg gagaactgaa tccctcaaac acggattctt 5700
 cacattctaa tcctcctgag tcaaatcctg atcctgtcca ctcagagttc tgaagggggc 5760
 cagatgttgg aagggcaatt cgagtctaga gggcccgcc tgatagacgg tttttcggcc 5820
 tttgacgttg gagtccacgt tctttaatag tggactcttg ttccaaactg gaacaacact 5880
 caaccctatc tcggtctatt cttttgattt ataagggatt ttgccgattt cggcctattg 5940
 gttaaaaaat gagctgattt aacaaaaatt taacgcgaat taattctgtg gaatgtgtgt 6000
 cagttagggg gtggaaagtc cccaggctcc ccagcaggca gaagtatgca aagcatgcat 6060
 ctcaattagt cagcaaccag gtgtggaaag tccccaggct ccccagcagg cagaagtatg 6120
 caaagcatgc atctcaatta gtcagcaacc atagtcccgc ccctaactcc gcccatcccg 6180
 cccctaactc cgcccagttc cgcccattct ccgcccctg gctgactaat tttttttatt 6240
 tatgcagagg ccgaggccgc ctctgcctct gagctattcc agaagtagtg aggaggcttt 6300
 tttggaggcc taggcttttg caaaaagctc ccgggagctt gtatatccat tttcggatct 6360
 gatcaagaga caggatgagg atcgtttcgc atgattgaac aagatggatt gcacgcaggt 6420
 tctccggccg cttgggtgga gaggctattc ggctatgact gggcacaaca gacaatcggc 6480
 tgctctgatg ccgccgtgtt ccggctgtca gcgcaggggc gcccggttct ttttgtcaag 6540

ES 2 532 470 T3

accgacctgt ccggtgccct gaatgaactg caggacgagg cagcgcggct atcgtggctg 6600
 gccacgacgg gcgttccttg cgcagctgtg ctcgacgttg tcaactgaagc ggggaagggac 6660
 tggctgctat tgggcgaagt gccggggcag gatctcctgt catctcacct tgctcctgcc 6720
 gagaaagtat ccatcatggc tgatgcaatg cggcggctgc atacgcttga tccggctacc 6780
 tgcccattcg accaccaagc gaaacatcgc atcgagcgag cacgtactcg gatggaagcc 6840
 ggtcttgtcg atcaggatga tctggacgaa gagcatcagg ggctcgcgcc agccgaactg 6900
 ttcgccaggc tcaaggcgcg catgcccgac ggcgaggatc tcgtcgtgac ccatggcgat 6960
 gcctgcttgc cgaatatcat ggtggaaaat ggccgctttt ctggattcat cgactgtggc 7020
 cggctgggtg tggcggaccg ctatcaggac atagcgttgg ctaccctgga tattgtgaa 7080
 gagcttggcg gcgaatgggc tgaccgcttc ctcgtgcttt acggtatcgc cgctcccgat 7140
 tcgcagcgca tcgccttcta tcgccttctt gacgagttct tctgagcggg actctggggg 7200
 tcgaaatgac cgaccaagcg acgccaacc tgccatcacg agatttcgat tccaccgccg 7260
 ccttctatga aaggttgggc ttcggaatcg tttccggga gcccgctgg atgatcctcc 7320
 agcgcgggga tctcatgctg gagttcttcg cccaccccaa cttgtttatt gcagcttata 7380
 atggttacaa ataaagcaat agcatcacia atttcaciaa taaagcattt ttttactgc 7440
 attctagtgt tggtttgtcc aaactcatca atgtatctta tcatgtctgt ataccgtcga 7500
 cctctagcta gagcttggcg taatcatggt catagctggt tctgtgtga aattgttatc 7560
 cgctcacaat tccacacaac atacgagccg gaagcataaa gtgtaaagcc tggggtgcct 7620
 aatgagtgag ctaactcaca ttaattgcgt tgcgctcact gcccgctttc cagtcgggaa 7680
 acctgtcgtg ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc ggggagaggc ggtttgcgta 7740
 ttgggcgctc ttccgcttcc tcgctcactg actcgtcgcg ctcggtcgtt cggctgcggc 7800
 gagcggatc agctcactca aaggcggtaa tacggttatc cacagaatca ggggataacg 7860
 caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt 7920
 tgctggcgtt tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgtcaa 7980
 gtcagagggt gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct 8040
 ccctcgtcgc ctctcctggt ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc 8100
 cttcgggaag cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg 8160
 tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt tcagcccgac cgctgcgcct 8220
 tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaaagaca cgacttatcg cactggcag 8280
 cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cggtgctaca gattcttga 8340
 agtgggtggc taactacggc taaactagaa gaacagtatt tggatctgc gctctgctga 8400
 agccagttac cttcggaaaa agagtggta gctcttgatc cggcaaacia accaccgctg 8460
 gtagcggttt ttttgttgc aagcagcaga ttacgcgag aaaaaagga tctcaagaag 8520
 atcctttgat cttttctacg ggtctgacg ctcagtggaa cgaaaactca cgtaaagga 8580

ES 2 532 470 T3

ttttggatcat gagattatca aaaaggatct tcacctagat ctttttaaat taaaaatgaa 8640
 gttttaaatc aatctaagt atatatgagt aaacttggtc tgacagttac caatgcttaa 8700
 tcagtgaggc acctatctca gcgatctgtc tatttcgttc atccatagtt gcctgactcc 8760
 ccgtcgtgta gataactacg atacgggagg gcttaccatc tggccccagt gctgcaatga 8820
 taccgcgaga cccacgctca ccggctccag atttatcagc aataaaccag ccagccggaa 8880
 gggccgagcg cagaagtggc cctgcaactt tatccgcctc catccagtct attaattggt 8940
 gccgggaagc tagagtaagt agttcgccag ttaatagttt gcgcaacggt gttgccattg 9000
 ctacaggcat cgtggtgtca cgctcgtcgt ttggtatggc ttcattcagc tccggttccc 9060
 aacgatcaag gcgagttaca tgatcccca tgttgtgcaa aaaagcgggt agctccttcg 9120
 gtcctccgat cgttgtcaga agtaagttgg ccgcagtgtt atcactcatg gttatggcag 9180
 cactgcataa ttctcttact gtcatgccat ccgtaagatg cttttctgtg actggtgagt 9240
 actcaacca gtcattctga gaatagtgtg tgcggcgacc gagttgctct tgcccggcgt 9300
 caatacggga taataccgcg ccacatagca gaactttaa agtgctcacc attggaaaac 9360
 gttcttcggg gcgaaaactc tcaaggatct taccgctgtt gagatccagt tcgatgtaac 9420
 ccactcgtgc acccaactga tcttcagcat cttttacttt caccagcgtt tctgggtgag 9480
 caaaaacagg aaggcaaat gccgcaaaa agggaataag ggcgacacgg aaatggtgaa 9540
 tactcact cttccttttt caatattatt gaagcattta tcagggttat tgtctcatga 9600
 gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg cgcacatttc 9660
 cccgaaaagt gccacctgac gtc 9683

<210> 15
 <211> 9781
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Vector

10

<400> 15

gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtgactct cagtacaatc tgctctgatg 60
 ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggctcgt gagtagtgcg 120
 cgagcaaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180
 ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt 240
 gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata 300
 tggagtcccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc 360
 cccgccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 420
 attgacgtca atgggtggag tatttacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt 480
 atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 540
 atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca 600

ES 2 532 470 T3

tcgctattac	catggtgatg	cggttttggc	agtacatcaa	tgggcgtgga	tagcggtttg	660
actcacgggg	atttccaagt	ctccacccca	ttgacgtcaa	tgggagtttg	ttttggcacc	720
aaaatcaacg	ggactttcca	aaatgtcgtg	acaactccgc	cccattgacg	caaatgggcg	780
gtaggcgtgt	acgggtgggag	gtctatataa	gcagagctct	ctggctaact	agagaacca	840
ctgcttactg	gcttatcgaa	attaatacga	ctcactatag	ggagacccaa	gctggctagc	900
gtttaaactt	aagcttggta	ccgagctcgg	atccactagt	ccagtgtggt	ggaattgccc	960
ttattcctca	gtgaccagg	agctgacaca	cttagaaggg	caattctgca	gataccatgc	1020
agcgcgtgaa	catgatcatg	gcagaatcac	caggcctcat	caccatctgc	cttttaggat	1080
atctactcag	tgctgaatgt	acagtttttc	ttgatcatga	aaacgccaac	aaaattctga	1140
atcggccaaa	gagggtataat	tcaggtaaat	tggaagagtt	tgttcaaggg	aaccttgaga	1200
gagaatgtat	ggaagaaaag	tgtagttttg	aagaagcacg	agaagttttt	gaaaacactg	1260
aaagaacaac	tgaatttttg	aagcagtatg	ttgatggaga	tcagtgtgag	tccaatccat	1320
gtttaaatgg	cggcagtgtc	aaggatgaca	ttaattccta	tgaatgttgg	tgtccctttg	1380
gatttgaagg	aaagaactgt	gaattagatg	taacatgtaa	cattaagaat	ggcagatgcg	1440
agcagttttg	taaaaatagt	gctgataaca	aggtggtttg	ctcctgtact	gagggatc	1500
gacttgcaga	aaaccagaag	tcctgtgaac	cagcagtgcc	atttccatgt	ggaagagttt	1560
ctgtttcaca	aacttctaag	ctcaccctg	ctgagactgt	ttttcctgat	gtggactatg	1620
taaattctac	tgaagctgaa	accatttttg	ataacatcac	tcaaagcacc	caatcattta	1680
atgacttcac	tcgggttgtt	ggtggagaag	atgccaaacc	aggtcaattc	ccttggcagg	1740
ttgttttgaa	tggtaaagtt	gatgcattct	gtggaggctc	tatcgttaat	gaaaaatgga	1800
ttgtaactgc	tgcccactgt	gttgaaactg	gtgttaaaat	tacagttgtc	gcaggtgaac	1860
ataatattga	ggagacagaa	catacagagc	aaaagcgaaa	tgtgattcga	attattcctc	1920
accacaacta	caatgcagct	attaataagt	acaaccatga	cattgccctt	ctggaactgg	1980
acgaaccctt	agtgcataac	agctacgtta	cacctatttg	cattgctgac	aaggaataca	2040
cgaacatctt	cctcaaattt	ggatctggct	atgtaagtgg	ctggggaagg	gtcttcaca	2100
aagggagatc	agcttttagt	cttcagtacc	ttagagttcc	acttgttgac	cgagccacat	2160
gtcttcgatc	tacaaagttc	accatctata	acaacatggt	ctgtgctggc	ttccatgaag	2220
gaggtagaga	ttcatgtcaa	ggagatagtg	ggggacccca	tgttactgaa	gtggaaggga	2280
ccagtttctt	aactggaatt	attagctggg	gtgaagagtg	tgcaatgaaa	ggcaaatatg	2340
gaatatatac	caaggtatcc	cggtatgtca	actggattaa	ggaaaaaaca	aagctcactt	2400
aatgaaagat	ggatttccaa	ggatccagca	cagtggcggc	cgctcggttc	ctagagggcc	2460
cgtttaaacc	cgctgatcag	cctcgactgt	gccttctagt	tgccagccat	ctgttgtttg	2520
ccccccccc	gtgccttctc	tgacctgga	aggtgccact	cccactgtcc	tttccataata	2580
aaatgaggaa	attgcatcgc	attgtctgag	taggtgtcat	tctattctgg	ggggtggggt	2640

ES 2 532 470 T3

ggggcaggac agcaaggggg aggattggga agacaatagc aggcatgctg gggatgcggt 2700
 gggctctatg gcttctgagg cggaaagaac cagctggggc tctagggggg atccccacgc 2760
 gccctgtagc ggcgcattaa gcgcggcggg tgtggtggtt acgcgcagcg tgaccgctac 2820
 acttgccagc gccctagcgc ccgctccttt cgctttcttc ccttcctttc tcgccacggt 2880
 cgccggcttt ccccgtaag ctctaaatcg ggggctccct ttagggttcc gatttagtgc 2940
 tttacggcac ctgcacccca aaaaacttga ttaggggtgat ggttcacatc gatgcaattt 3000
 cctcatttta ttaggaaagg acagtgggag tggcaccttc cagggtcaag gaaggcacgg 3060
 gggaggggca aacaacagat ggctggcaac tagaaggcac agtcgaggct gatcagcggg 3120
 tttaaacggg ccctctagac tcgaattgcc cttccaacat ctggccccct tcagaactct 3180
 gagtggacag gatcaggatt tgactcagga ggattagaat gtgaagaatc cgtgtttgag 3240
 ggattcagtt ctccaactgc ctcaaagggt ctcaagtttg cataagtcac ctctggggcc 3300
 agctgctcca gggaggacg gcctaatac agatttcgaa gtgagataca agtcatcagg 3360
 aagctgctggc gaaagacata gagctttcgc aacaagaagc ggaagaatcg ctcatggaaa 3420
 ggagtatttc gccggcgttc aatctcctgg agcctttggt ggcgtctaag aaaggctctga 3480
 accagaggtg ttggctcagg gccccctttt acttcccctt ccaacagagg ctgcagctct 3540
 gggggtagag gccctgtttc acttccattc tccacctttt ctttaattc ttgcagatat 3600
 gccaggtctt gctccagtgc aagctctgta gtgttgacat agacgtacat gtagcaagaa 3660
 gggctaggtg atgtcgtata caccttatgg tactcaccag caggcaactg cattttttct 3720
 ccctctcgaa gagtctggtt cttctgttct gccacaagct ccacagtcac ttccccctgc 3780
 agcagctgga tgctagtgtt gcccaggtct tctctcacia aattctccaa gtgcagtcca 3840
 gggaaatctg caatgaagac cacctcagtg tggttgtcta ggctgctctt gatttctgt 3900
 aacttggccc tccagggaga cagggtccatc aagagtgggt gcacccagga tgtgcgctga 3960
 aagggtgacc aagcggcctg cacgatgtcc acacgagggt caaaaatcct ctgctggaag 4020
 cggtcattga tggagaccca aatatcaaag tagatctggg gctcagtgac attatacttg 4080
 ggaagcaggc ggctcaggca agtggcatat tgcttcagca tgtctgcatg atccttccat 4140
 cgccgactct gtgtaaatac cccagggta aggtagccca gttcgccagt gcggccatca 4200
 cggtaggtga tcttcacgtg ctggtgggag cgggagtgca ccatcatgtc ccaggaatag 4260
 ccatacagcc catttgtcca gttgttatag ccctgggtga gaaaatgaga atagggcagg 4320
 aatagctgct ccaggaggtg gagcaggggt aaggcagctc ccagctgatg gcgcagccct 4380
 ggcttctggc cacttttgcc ccggctcctc ttatacacac aggaaact gggctgaggg 4440
 gctgccttga ggggcaacag ttgttgcaac cttcgggggc agtaggacac cagcttccga 4500
 ggccactcag gggagcagaa gagagggctg ctggccagca tgacgtagga gaacatacca 4560
 atgctgaaaa gctgggaatt catgcagtgg aagtaggaca caaagaacag gccaatggat 4620
 cttgagacat caaaaaagag caggaaacca gctgagaggt caagcagcag cccaccccag 4680

ES 2 532 470 T3

tgcacgacca gcaggctagt cagctcctca gacaacagca gtttgaaggg actgaagagc 4740
 cagtgccggg acaaatattc catggaatag ccttcaaccc agtctgcatc cagctttttc 4800
 acacccgcaa tgaagtacac aatgaagatc tggccacgga gcactgcata gttccaaagg 4860
 ggcacgtggg cattcctcct atgggcattc agcagaccgt ccacagacca gtagtggttt 4920
 gcatccatga atgttagctg aaaggccaac aaccataca gataggagtg gttgttccat 4980
 gatgtcttgt ccaggagaaa cacataccag tatggcagca ggaataacac acagcttattc 5040
 cggtagcaca ggcccagcat catgcccagt gccccagaa acatgatggg gtagacaaga 5100
 tacatccagt caagtggcag tgggcgtagg gcatccagca aggggaagcg gcacacatcc 5160
 agcccatcaa ggtatttccg gtccagagag ctgagccccc gctcctgggg aatgtctagc 5220
 accatcaaga acccaaaaag aaaacgaaag acagctaagc ttgcagggtc cgttggtcga 5280
 ttcagcaggg tcaccagcct ccgccaactg gacaaatctg tccactcaa acccaagagt 5340
 ttccctattc ggctgtcctg cctgggccct gagatcagtt cagccttgtc tttctgtact 5400
 ttatctgagc tgggcgaggt ccgcgaggac ccggcagaca ccgccattgc tctgcggaaa 5460
 gggcaattcc accacactgg actagtggat ccgagctcgg taccaagctt aagtttaaac 5520
 gctagccagc ttgggtctcc ctatagttag tcgtattaat ttcgataagc cagtaagcag 5580
 tgggttctct agttagccag agagcttttt gcaaaagcct aggcctcaa aaaagcctcc 5640
 tcactacttc tggaatagct cagaggccga ggcggcctcg gcctctgcat aaataaaaaa 5700
 aattagtcag ccatggggcg gagaatgggc ggaactgggc ggagttaggg gcgggatggg 5760
 cggagttagg ggcgggacta tggttgctga ctaattgaga tgcattgctt gcatacttct 5820
 gcctgctggg gagcctgggg actttccaca ccctaactga cacacattcc acagccggat 5880
 cgatgtgggc catcgccctg atagacggtt tttcgccctt tgacgttggg gtccacgttc 5940
 tttaatagtg gactcttggt ccaaactgga acaacactca accctatctc ggtctattct 6000
 tttgatttat aagggatttt gccgatttcg gcctattggt taaaaaatga gctgatttaa 6060
 caaaaattta acgcgaatta attctgtgga atgtgtgtca gttaggggtg ggaaagtccc 6120
 caggctcccc agcaggcaga agtatgcaaa gcatgcatct caattagtca gcaaccagg 6180
 gtggaaagtc cccaggctcc ccagcaggca gaagtatgca aagcatgcat ctcaattagt 6240
 cagcaaccat agtcccgcc ctaactccgc ccatccgcc cctaactccg cccagttccg 6300
 cccattctcc gcccattggc tgactaattt tttttattta tgcagaggcc gaggccgcct 6360
 ctgcctctga gctattccag aagtagtgag gaggcttttt tggaggccta ggcttttgca 6420
 aaaagctccc gggagcttgt atatccattt tcggatctga tcaagagaca ggatgaggat 6480
 cgtttcgcat gattgaacaa gatggattgc acgcagggtc tccggccgct tgggtggaga 6540
 ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga caatcggctg ctctgatgcc gccgtgttcc 6600
 ggctgtcagc gcaggggagc ccggttcttt ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga 6660
 atgaactgca ggacgaggca gcgcggctat cgtggctggc cagcagggc gttccttgcg 6720

ES 2 532 470 T3

cagctgtgct cgacgttgtc actgaagcgg gaagggactg gctgctattg ggcgaagtgc 6780
 cggggcagga tctcctgtca tctcaccttg ctctgccga gaaagtatcc atcatggctg 6840
 atgcaatgcg gcggttgcac acgcttgatc cggctacctg cccattcgac caccaagcga 6900
 aacatcgcac cgagcgagca cgtactcgga tggaaagccgg tcttgtcgat caggatgatc 6960
 tggacgaaga gcatcagggg ctctgcccag ccgaactggt cgcagggctc aaggcgcgca 7020
 tggcccagcg cgaggatctc gtcgtgacct atggcgatgc ctgcttgccg aatatcatgg 7080
 tggaaaatgg ccgcttttct ggattcatcg actgtggccg gctgggtgtg gcggaccgct 7140
 atcaggacat agcgttggct acccgtgata ttgtgaaga gcttggcggc gaatgggctg 7200
 accgcttctt cgtgctttac ggtatcgccg ctcccgatcc gcagcgcac gccttctatc 7260
 gccttcttga cgagtcttc tgagcgggac tctggggttc gaaatgaccg accaagcgcac 7320
 gcccaacctg ccatcacgag atttcgatcc caccgcccgc ttctatgaaa gggtgggctt 7380
 cggaatcgtt ttccgggacg ccggttggat gatcctccag cgcggggatc tcatgctgga 7440
 gttctctgcc caccctcaact tgttatttgc agcttataat ggttacaat aaagcaatag 7500
 catcacaat ttcacaata aagcattttt ttcactgcat tctagtgtg gtttgtccaa 7560
 actcatcaat gtatcttacc atgtctgtat accgtcgacc tctagctaga gcttggcgta 7620
 atcatggtca tagctgttcc ctgtgtgaaa ttgttatccg ctcaaatc cacacaacat 7680
 acgagccgga agcataaagt gtaaagcctg ggggtgcctaa tgagttagct aactcacatt 7740
 aattgcgttg cgctcactgc ccgctttcca gtcgggaaac ctgtcgtgcc agctgcatta 7800
 atgaatcggc caacgcgagg ggagagggcg tttgcgtatt gggcgcctt ccgcttctc 7860
 gctcactgac tcgctgcgct cggctgctcg gctgcggcga gcggtatcag ctactcaaa 7920
 ggcgtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa 7980
 aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggcgcggtt ctggcgttt tccataggct 8040
 ccgccccct gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaaccgcac 8100
 aggactataa agataccagg cgtttcccc tggaaagctc ctctgctgct ctctgttcc 8160
 gaccctgccc cttaccggat acctgtccgc ttttctccct tcgggaagcg tggcgttcc 8220
 tcatagctca cgctgtagg atctcagttc ggtgtaggtc gttcgtcca agctgggctg 8280
 tgtgcacgaa cccccgttc agcccagccg ctgcccctta tccgtaact atcgtcttga 8340
 gtccaacccg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggta acaggattag 8400
 cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag tggggccta actacggcta 8460
 cactagaaga acagtatttg gtatctgccc tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag 8520
 agttggtagc tcttgatccg gcaaacaaac caccgctggg agcggttttt ttgtttgcaa 8580
 gcagcagatt acgctcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct tttctacggg 8640
 gtctgagct cagtggacg aaaaactcag ttaagggatt ttggtcatga gattatcaaa 8700
 aaggatcttc acctagatcc ttttaatta aaaaatgaagt tttaaatcaa tctaaagtat 8760

ES 2 532 470 T3

atatgagtaa	acttggctg	acagttacca	atgcttaatc	agtgaggcac	ctatctcagc	8820
gatctgtcta	tttcgttcat	ccatagttgc	ctgactcccc	gtcgtgtaga	taactacgat	8880
acgggagggc	ttaccatctg	gccccagtgc	tgcaatgata	ccgcgagacc	cacgctcacc	8940
ggctccagat	ttatcagcaa	taaaccagcc	agccggaagg	gccgagcgca	gaagtggctc	9000
tgcaacttta	tccgcctcca	tccagtctat	taattgttgc	cgggaagcta	gagtaagtag	9060
ttcgccagtt	aatagtttgc	gcaacgttgt	tgccattgct	acaggcatcg	tggtgtcacg	9120
ctcgtcgttt	ggtatggctt	cattcagctc	cggttcccaa	cgatcaaggc	gagttacatg	9180
atccccatg	ttgtgcaaaa	aagcggttag	ctccttcggt	cctccgatcg	ttgtcagaag	9240
taagttggcc	gcagtgttat	cactcatggt	tatggcagca	ctgcataatt	ctcttactgt	9300
catgccatcc	gtaagatgct	tttctgtgac	tggtgagtac	tcaaccaagt	cattctgaga	9360
atagtgtatg	cggcgaccga	gttgctcttg	cccggcgcca	atacgggata	ataccgcgcc	9420
acatagcaga	actttaaaag	tgctcatcat	tggaacacgt	tcttcggggc	gaaaactctc	9480
aaggatctta	ccgctgttga	gatccagttc	gatgtaaccc	actcgtgcac	ccaactgate	9540
ttcagcatct	tttactttca	ccagcgtttc	tggttgagca	aaaacaggaa	ggcaaaatgc	9600
cgcaaaaaag	ggaataaggg	cgacacggaa	atgttgaata	ctcatactct	tcctttttca	9660
atattattga	agcatttatc	agggttattg	tctcatgagc	ggatacatat	ttgaatgtat	9720
ttagaaaaat	aaacaaatag	gggttccgcy	cacatttccc	cgaaaagtgc	cacctgacgt	9780
c						9781

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una célula hospedadora CHO-S que comprende ácido nucleico que codifica una protrombina humana recombinante (factor de coagulación II) y una γ -glutamil carboxilasa recombinante, en la que la célula hospedadora comprende un promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano (hCMV) para el control de la expresión de protrombina humana recombinante y un promotor temprano de SV40 para el control de la expresión para la γ -glutamil carboxilasa recombinante.
- 10 2. La célula hospedadora de la reivindicación 1, en la que dicha protrombina humana recombinante (factor de coagulación II) y dicha γ -glutamil carboxilasa recombinante están codificadas en un vector de expresión diferente.
- 15 3. La célula hospedadora de las reivindicaciones 1 ó 2, en la que el vector de expresión comprende ácido nucleico que codifica tanto la protrombina humana recombinante (factor de coagulación II) como la γ -glutamil carboxilasa recombinante.
- 20 4. La célula hospedadora de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicha γ -glutamil carboxilasa recombinante es una γ -glutamil carboxilasa humana.
5. Un método para producir una protrombina humana recombinante activa (factor de coagulación II) que comprende: (i) cultivar la célula hospedadora de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4; y (ii) aislar la protrombina humana recombinante activa (factor de coagulación II).

Figura 1a.

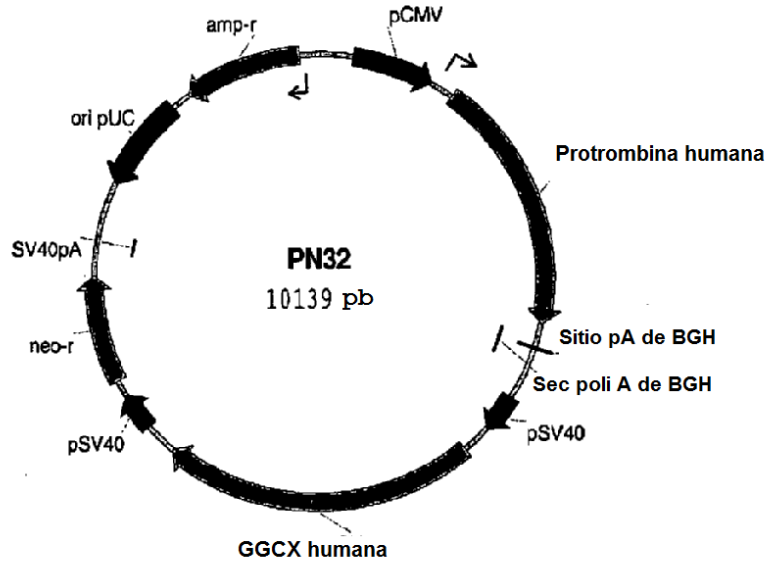


Figura 1b.

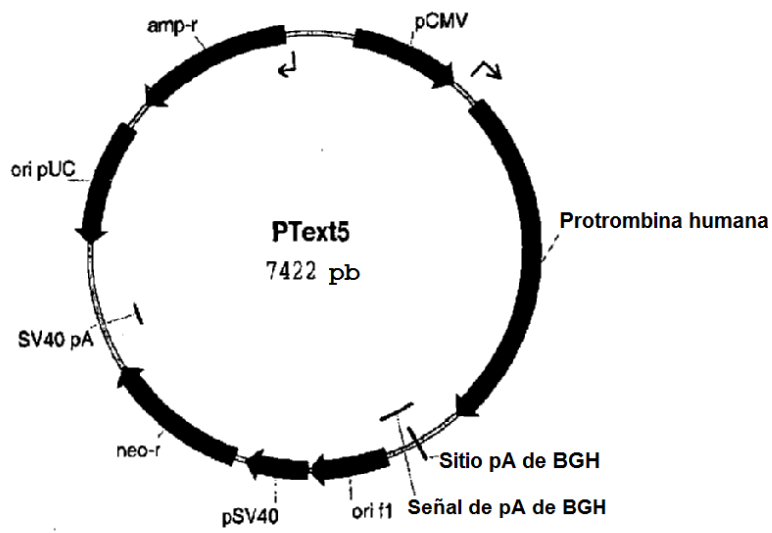


Figura 2.

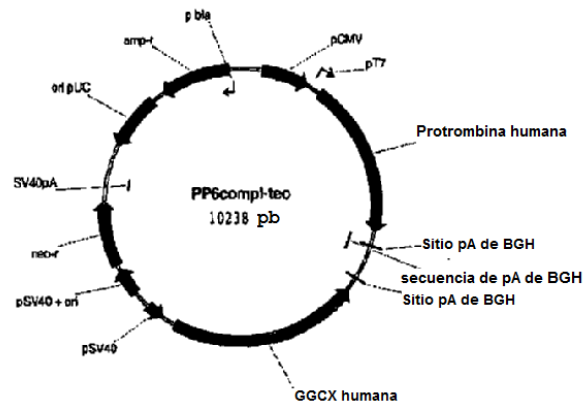


Figura 3a.

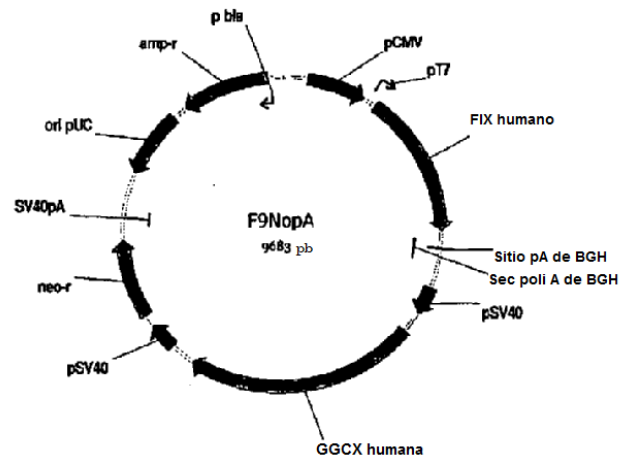


Figura 3b.

