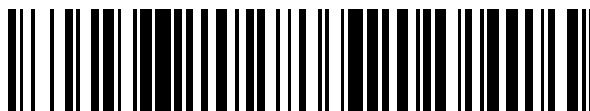


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 611 402**

51 Int. Cl.:

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.05.2012 PCT/KR2012/003995**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.12.2012 WO12173344**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.05.2012 E 12800088 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.10.2016 EP 2719764**

54 Título: **Vector de expresión para células animales incluyendo el factor 5'-SAR de CSP-B y método para producir proteínas recombinantes mediante su utilización**

30 Prioridad:

13.06.2011 KR 20110056685

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

08.05.2017

73 Titular/es:

**CHONG KUN DANG PHARMACEUTICAL CORP.
(100.0%)**

**8, Chungjeong-ro, Seodaemun-gu
Seoul 120-756, KR**

72 Inventor/es:

**KOH, YEO-WOOK;
LEE, SANG-YONG;
KIM, SU-YON y
MOON, SEUNG-KEE**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 611 402 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

Vector de expresión para células animales incluyendo el factor 5'-SAR de CSP-B y método para producir proteínas recombinantes mediante su utilización

CAMPO TÉCNICO

- 5 La presente invención se refiere a un vector de expresión para células animales, que incluye una estructura 5' o región de unión a la matriz (5'-SAR) de serina proteasa B citotóxica (CSP-B), y métodos para producir proteínas recombinantes usando los vectores de expresión.

ESTADO DE LA TÉCNICA

- 10 La introducción de genes foráneos que codifican proteínas recombinantes en células animales tales como células de ovario de hámster chino (CHO) puede producir fármacos proteicos para tratamiento clínico.

- 15 Una nueva proteína estimulante de eritropoyesis (NESP), que es un factor estimulante de eritropoyesis, también denominada Darbepoetina alfa, y es un fármaco proteico obtenido mediante la adición de dos cadenas de azúcar enlazadas al extremo terminal N a la eritropoyetina de origen natural mediante modificación genética (Egrie y Browne, Br. J. Cancer, 84 Suplemento 1: 3-10 (2001)). NESP promueve la producción de glóbulos rojos mediante la estimulación de células madre hematopoyéticas y facilitando su diferenciación en eritrocitos. Dado que la semivida en suero de NESP es tres veces más larga que la de la eritropoyetina recombinante existente, se puede esperar un efecto terapéutico equivalente con menos administraciones cuando se trata la anemia de pacientes con enfermedad renal crónica.

- 20 El trastuzumab como agente contra los tumores malignos es un anticuerpo monoclonal humanizado preparado usando tecnología de ADN recombinante, y actúa selectivamente sobre el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) en las superficies de las células. La sobreexpresión de HER2 se confirma en el 25~30% de los cánceres primarios de mama y el trastuzumab suprime la proliferación de células tumorales humanas sobreexpresadas en el HER2.

- 25 Los niveles de expresión de genes foráneos pueden variarse dependiendo de sus sitios de inserción en los cromosomas de células animales ya que la expresión génica foránea está influenciada por elementos reguladores circundantes o por la estructura de la cromatina (Zahn-Zabal y colaboradores, J. Biotechnol, 87, 29-42 (2001)).

- 30 Cuando se utilizan factores de cromatina que evitan que las cromatinas circundantes influyan en la expresión de genes foráneos, puede superarse la supresión de la expresión génica dependiendo de la posición (efecto de posición) y puede aumentarse la posibilidad de aislamiento de clones de células animales que expresan en gran medida proteínas recombinantes, disminuyendo así el tiempo de preparación de las líneas celulares para producción de fármacos. Se han realizado intentos para producir líneas celulares estables usando factores de cromatina que pueden vencer la supresión de la expresión génica dependiendo de la posición. Los factores son por lo tanto, el elemento que sirve de límite (BE), la estructura o la región de unión a la matriz (SAR/MAR), la región de control del locus (LCR) y similares.

- 35 La SAR también denominada MAR es un elemento de ADN de 300 - 3000 pb. Se sabe que la SAR permite que la cromatina se adhiera a las proteínas de la matriz nuclear y controle la expresión génica (Makrides (Ed.), Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells, Elsevier, capítulo 10 (2003)). Además, la SAR puede mejorar la expresión de genes foráneos en líneas celulares transfectadas (Poljak y colaboradores, Nucleic Acids Res, 22, 4386 - 4394 (1994), Kalos y Fournier, Mol. Cell. Biol, 15, 198-207 (2005)).

- 40 Zahn-Zabal y colaboradores han producido células estables mediante la introducción de una lisozima 5'-MAR de pollo en un vector de expresión de luciferasa y transfectando células CHO con el vector (Zahn-Zabal y colaboradores, J. Biotechnol, 87, 29-42 (2001)). Las células estables transfectadas con un vector que contenía lisozima 5'-MAR exhibieron un mayor nivel de expresión de luciferasa en comparación con las células estables transfectadas con un vector que no contenía MAR. Además, el vector que contenía dos copias de MAR mostró un mayor nivel de expresión de luciferasa que el vector que contenía una copia de lisozima 5'-MAR. Este resultado muestra que la introducción de MAR en el vector de expresión de células animales puede aumentar el nivel de expresión de proteína objetivo.

- 50 La solicitud de patente coreana KR200020010327 y el miembro de su familia WO0214525 describe que el vector de expresión de células animales incluye la MAR de globina beta humana de manera que la supresión de la expresión génica que se produce cuando se introducen genes foráneos en células animales puede ser superada. Esta patente describe que, además de la MAR de β -globina humana, se usan la MAR de interferón β humano (GenBank acceso # M83137) y 3'-SAR de CSP-B (GenBank acceso # M62716), y estas tres SAR/MAR pueden mejorar el nivel de

expresión de β -galactosidasa, que es una proteína objetivo. Además, esta patente describe que la MAR de β -globina tenía excelentes efectos en comparación con la MAR del interferón β o la 3'-SAR de CSP-B.

5 La solicitud de patente coreana KR200220047006 describe que la introducción de la MAR de interferón β humano en el vector de expresión de células animales puede mejorar la expresión génica foránea y conducir a la expresión eficiente de proteínas recombinantes. Además, la solicitud de patente coreana No. KR20070118563 describe que el vector de expresión de células animales que incluye dos copias de MAR de puede mejorar adicionalmente el nivel de expresión de proteína objetivo en comparación con el vector que incluye una copia de la MAR de β -globina humana. Esta patente describe resultados de la comparación entre una copia y dos copias de factores MAR, pero no resultados de la comparación entre dos copias y tres copias de factores MAR.

10 Hanson y Ley hallaron 5'-SAR de CSP-B y 3'-SAR de CSP-B de aproximadamente 70 kb de la agrupación de genes de serina proteasa hematopoyética 14q11.2 del cromosoma humano, y obtuvieron sus secuencias de nucleótidos, y verificaron que estas SAR se unen a estructuras derivadas del núcleo celular a través de experimentos *in vitro* (Hanson y Ley, Blood, 79, 610-618 (1992)).

15 La 5'-SAR de CSP-B y la 3'-SAR de CSP-B se registran como el acceso del GenBank # M62717 y el acceso del GenBank # M62716, respectivamente. Son de 2429 pb de largo y 1233 pb de largo, respectivamente, y por lo tanto, la 5'-SAR de CSP-B es dos veces más larga que la 3'-SAR. La secuencia de ADN del cromosoma 14 humano se registra como el acceso del GenBank # AL136018. En esta secuencia, la longitud entre un codón de iniciación de transcripción para un gen que codifica la proteína CSP-B y la 5'-SAR situada secuencia arriba de la misma es de 1195 pb, y la longitud entre un codón de terminación de transcripción del gen para codificación de la proteína CSP-B y la 3'-SAR situada secuencia abajo del mismo es de 4543 pb.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Esta invención en su sentido más amplio es como se define en las reivindicaciones independientes.

PROBLEMA TÉCNICO

25 Los presentes inventores han hecho esfuerzos para desarrollar vectores capaces de producir eficientemente proteínas recombinantes en células animales. Como resultado, los presentes inventores han establecido que las proteínas recombinantes pueden producirse con una eficiencia de producción excelente cuando se incorpora en el vector una estructura 5' de serina proteasa B citotóxica (CSP-B) o región de unión a la matriz (SAR), y luego se completa la presente invención.

Por lo tanto, un aspecto de la presente invención es proporcionar vectores de expresión para células animales.

30 Otro aspecto de la presente invención es proporcionar células animales transfectadas con los vectores de expresión.

Todavía otro aspecto de la presente invención es proporcionar un método para producir proteínas recombinantes.

Otros propósitos y ventajas de la presente invención se clarificarán mediante la siguiente descripción detallada de la invención, reivindicaciones y dibujos.

SOLUCIÓN TÉCNICA

35 De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un vector de expresión para células animales, comprendiendo el vector de expresión: (a) una estructura 5' o región de unión a la matriz (5'-SAR) de serina proteasa B citotóxica (CSP-B); (b) un promotor operable en células animales; y (c) una secuencia de poliadenilación.

40 Los presentes inventores han hecho esfuerzos para desarrollar vectores capaces de producir eficientemente proteínas recombinantes en células animales. Como resultado, los presentes inventores han establecido que las proteínas recombinantes pueden producirse con una excelente eficiencia de producción cuando se incorpora en el vector la estructura 5' o región de unión a la matriz (5'-SAR) de serina proteasa B citotóxica (CSP-B).

El vector de expresión para células animales de la presente invención incluye 5'-SAR de CSP-B; un promotor operable en células animales; y una secuencia de poliadenilación.

45 La presente invención se caracteriza principalmente por el uso de un vector que incluye 5'-SAR de CSP-B. 5'-SAR de CSP-B utilizada en la presente invención incluye preferiblemente una secuencia de nucleótidos registrada con el acceso del GenBank # M62717, y su ejemplo de secuencia de nucleótidos se describe en la SEQ ID NO: 1.

La 5'-SAR de CSP-B aumenta significativamente la eficacia en la producción de proteínas recombinantes en el vector de expresión.

La 5'-SAR CSP-B puede estar situada secuencia arriba o secuencia abajo de la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que se va a expresar, y está preferiblemente situada secuencia abajo de la secuencia de nucleótidos.

De acuerdo con una realización preferible de la presente invención, dos copias de la 5'-SAR están continuamente presentes en el vector.

De acuerdo con una realización preferible de la presente invención, las dos copias de la 5'-SAR están continuamente presentes secuencia abajo de una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína que se va a expresar.

Como se demostró en los siguientes ejemplos, 5'-SAR de CSP-B mejora adicionalmente el nivel de expresión de la proteína objetivo en células animales en comparación con 3'-SAR de CSP-B y MAR de β -globina de la técnica relacionada. Por ejemplo, cuando se introduce una copia de 5'-SAR de CSP-B, 3'-SAR de CSP-B y MAR de β -globina respectivamente en vectores que expresan β -galactosidasa como proteína objetivo en células animales CHO, las actividades de β -galactosidasa para los casos respectivos se midió que eran 10,0 veces, 2,2 veces y 8,7 veces más altas en comparación con cuando no se introdujo el factor SAR (Figura 7). Es decir, 5'-SAR de CSP-B exhibe un nivel de expresión de proteína objetivo relativamente más alto que otros factores.

Además, se obtuvieron resultados similares cuando se verificaron los efectos del factor SAR utilizando NESP como una proteína objetivo. Cuando se introdujeron 5'-SAR de CSP-B y 3'-SAR de CSP-B en los vectores y luego las células CHO fueron transfectadas con los vectores, se midió que los niveles de expresión de NESP para los casos respectivos eran 11,2 veces y 3,2 veces superiores en comparación con cuando no se introdujo el factor SAR (Tabla 3 y Figura 9). La introducción de 5'-SAR de CSP-B en vectores aumentó la frecuencia de formación de clones positivos que expresan NESP en las células transfectadas, y también aumentó los niveles de expresión de NESP de clones seleccionados al azar (Tablas 4 y 5 y Figuras 10 y 11).

Mientras tanto, se verificaron los efectos de 5'-SAR de CSP-B usando un anticuerpo anti-HER2 como proteína objetivo. Cuando se introdujeron dos copias de 5'-SAR de CSP-B en el vector y después se transfectaron células CHO con el vector, se midió que el nivel de expresión del anticuerpo anti-HER2 era relativamente más alto que en comparación con cuando no se introdujo el factor SAR (Tabla 6 y Figura 13). La introducción de SAR en vectores aumentó el nivel de expresión del anticuerpo anti-HER2 de clones seleccionados al azar (Figuras 14 y 15).

De acuerdo con una realización preferible de la presente invención, pueden estar presentes múltiples copias de 5'-SAR de CSP-B en el vector de expresión. La eficacia de producción de proteínas recombinantes se incrementa adicionalmente cuando están presentes copias múltiples de 5'-SAR de CSP-B en el vector de expresión que cuando está presente una copia de 5'-SAR de CSP-B en el vector de expresión. Más preferiblemente, dos copias de 5'-SAR de CSP-B pueden estar presentes en el vector de expresión. Como se demostró en los siguientes ejemplos, la eficiencia de producción de proteínas recombinantes fue más excelente cuando dos copias de 5'-SAR de CSP-B están presentes en el vector de expresión que cuando tres copias de 5'-SAR de CSP-B están presentes en el vector de expresión.

Como se demostró en los siguientes ejemplos, como resultado de verificar los efectos de 5'-SAR de CSP-B de acuerdo con el número de copias de 5'-SAR de CSP-B introduciendo una, dos y tres copias de 5'-SAR de CSP-B en vectores, se midió la localización continua de dos copias del factor SAR para exhibir la actividad más alta de β -galactosidasa (Figura 8). Es decir, el número de copias del factor SAR en el vector influye en el nivel de expresión de la proteína objetivo, y dos copias del factor SAR pueden ser lo más deseable.

En el caso en que múltiples copias de 5'-SAR de CSP-B están presentes en el vector de expresión, las copias múltiples de 5'-SAR de CSP-B pueden estar localizadas de manera continua o no continua. Preferiblemente, las copias múltiples de factores SAR pueden estar continuamente presentes, y más preferiblemente, pueden estar continuamente presentes secuencia abajo de una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína a expresar.

De acuerdo con una realización preferible de la presente invención, el promotor operable en las células animales puede ser un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor tardío de adenovirus, un promotor de 7,5 K del virus vacuna, un promotor del virus 40 de simio (SV40), un promotor de SV40E1, un promotor tk del virus del herpes simple (HSV), un promotor del virus sincitial respiratorio (RSV), un promotor del factor 1- α de elongación (EF1- α), un promotor de metalotioneína, un promotor de β -actina, un promotor del gen de interleuquina 2 (IL - 2) humana, un promotor del gen del interferón (IFN) humano, un promotor del gen de IL-4 humana, un promotor del gen de la linfotóxina humana o un promotor del gen del factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) humanos. El promotor del CMV, el promotor del SV40, el promotor del SV40E1, el promotor de EF1- α , el promotor de metalotioneína o el promotor de β -actina es más preferible y el promotor del CMV es el más preferible.

De acuerdo con una realización preferible de la presente invención, el vector de la presente invención puede ser una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína a expresar. Ejemplos preferidos de la proteína pueden incluir una hormona, citoquina, anticuerpo, aptámero de péptido, Adnectina, Affibody (patentes estadounidenses Nos. 5.831.012, 831.012), avímero (Silverman, J. y colaboradores, *Nature Biotechnology* 23 (12): 1556 (2005)), o un dominio de Kunitz (dominio de Kunitz, Arnoux B y colaboradores, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 58 (Pt 7): 12524 (2002)) y (Nixon, AE, *Current opinion in drug discovery & development* 9 (2): 2618 (2006)). Más preferiblemente, la proteína a expresar usando el vector de la presente invención puede ser eritropoyetina (EPO), análogos de EPO o anticuerpos anti-receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (anti-HER2). Pueden ser más preferibles EPO, las nuevas proteínas estimuladoras de eritropoyesis (NESP; A30N, H32T, P87V, W88N y P90T) como análogos de EPO o anticuerpos anti-HER2.

Los análogos de EPO incluyen mutantes que tienen modificación de uno o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de EPO humana. Los análogos de EPO pueden prepararse por mutagénesis mediante la adición, supresión o sustitución de residuos de aminoácidos, por lo que pueden aumentarse o pueden cambiarse los sitios de glicosilación. Los análogos de EPO tienen más cadenas de carbohidratos que la EPO humana, e incluyen al menos un sitio de glicosilación adicional. Además, los análogos de EPO exhiben un nivel de ácido siálico más alto que la EPO humana de origen natural debido al sitio de glicosilación adicional. Sin embargo, la estructura secundaria o terciaria de la proteína, que es importante en la actividad biológica, no cambia por el sitio de glicosilación adicional. Los análogos de EPO pueden tener uno, dos o tres sitios adicionales para la N-glicosilación u O-glicosilación. Por ejemplo, el residuo de leucina en la posición 69 está sustituido con asparagina, que sirve como un cuarto sitio para la N-glicosilación.

Ejemplos de los análogos de EPO que se van a expresar en los vectores de la presente invención pueden ser aquellos en los que se introduce un sitio adicional para la glicosilación en al menos una de las posiciones 30, 51, 57, 69, 88, 89, 136 y 138 en la secuencia de EPO (por ejemplo, secuencia con acceso del GenBank # M11319). Más preferiblemente, los análogos de EPO pueden ser NESP que incluyen las mutaciones A30N, H32T, P87V, W88N y P90T.

De acuerdo con una realización preferible de la presente invención, la secuencia de poliadenilación incluye un terminador de hormona de crecimiento bovino, una timidina quinasa (TK) derivada de virus de herpes simple (HSV) o una secuencia de poliadenilación derivada de SV40.

Un constructo preferible del vector de la presente invención puede ser, en una dirección de 5' a 3', un promotor operable en células animales - un gen de proteína de expresión - una secuencia de poliadenilación - 5'-SAR de CSP-B y un constructo más preferible es un promotor operable en células animales - un gen de proteína de expresión - una secuencia de poliadenilación - 5'-SAR de CSP-B - 5'-SAR de CSP-B.

El vector de la presente invención puede incluir además un marcador de selección. Ejemplos del marcador de selección incluyen genes de resistencia contra antibióticos que actúan sobre células eucariotas, y preferiblemente incluyen genes de resistencia contra neomicina, geneticina (G418) y kanamicina.

De acuerdo con una realización preferible de la presente invención, el vector de la presente invención se utiliza para expresar una proteína objetivo en células animales. Las células animales incluyen células de mamífero, células de roedor, células de ave y células de insecto. Las células animales más preferiblemente incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), células VERO, células HeLa, células WI38, células de riñón de hámster bebé (BHK), células COS y células de riñón de canino Madin-Darby (MDCK). Las células CHO, células VERO, células HeLa o células MDCK son todavía más preferibles y las células CHO son las más preferibles.

De acuerdo con una realización preferible de la presente invención, el vector de la presente invención incluye una secuencia codificante de dihidrofolato reductasa (DHFR). La secuencia es útil en la amplificación del vector.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, la presente invención proporciona células animales transfectadas con los vectores de expresión anteriores de la presente invención.

De acuerdo con todavía otro aspecto de la presente invención, la presente invención proporciona un método para producir proteínas recombinantes, incluyendo el método la incubación de las células animales transfectadas anteriores de la presente invención.

De acuerdo con una realización preferible de la presente invención, el método para producir proteínas recombinantes incluye: (i) incubar las células animales transfectadas de la presente invención; y (ii) recoger las proteínas recombinantes producidas en la incubación.

En la técnica relacionada, la 5'-SAR de CSP-B utilizada en la presente memoria no se usó en un intento de introducirse en vectores de expresión para que las células animales mejoraran la productividad en proteínas

recombinantes para sustancias médicas. Como puede verse en los siguientes ejemplos, la introducción de 5'-SAR de CSP-B en vectores puede mejorar el nivel de expresión de proteína objetivo en células animales. Mediante el desarrollo del método en el que 5'-SAR de CSP-B, un nuevo factor que no se utilizó previamente, se introduce en vectores para producir proteínas recombinantes, se puede mejorar aún más la eficacia de expresión de la proteína objetivo y se puede aumentar la productividad industrial de sustancias medicinales proteicas.

De acuerdo con los informes en la técnica relacionada, no hubo intentos de introducir 5'-SAR de CSP-B en vectores de expresión para células animales con el fin de mejorar la productividad de proteínas recombinantes para sustancias médicas. Además, no se realizaron estudios en los que, en el caso en que se introducen uno, dos y tres copias de factores SAR en los vectores y luego se transfectan las células animales con los vectores, cuántas copias de los factores SAR se incluyen en el vector con el fin de lograr la mayor productividad de proteínas recombinantes. Además, no se han divulgado los resultados detallados del estudio anterior sobre el efecto del aumento en el nivel de expresión génica objetivo dependiendo de la posición del factor SAR.

Cuando los vectores de expresión de la presente invención se introducen en células para producir células animales transfectadas, los vectores pueden introducirse en las células por diversos métodos. Los vectores pueden inyectarse en células animales por ejemplo por microinyección (Capecchi, MR, Cell, 22: 479 (1980)), precipitación con fosfato de calcio (Graham, FL y colaboradores, Virology, 52: 456 (1973)), electroporación (Neumann, E. y colaboradores, EMBO J., 1: 841 (1982)), transfección mediada por liposomas (Wong, TK y colaboradores, Gene, 10:87 (1980)), tratamiento con DEAE-dextrano (Gopal, Mol. Cell Biol. 5: 1188-1190 (1985)), bombardeo de genes (Yang y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci., 87: 9568-9572 (1990)), o similares.

Las células animales transfectadas pueden incubarse por diversos métodos conocidos en la técnica usando protocolos. Como medio utilizable en la presente invención, se puede emplear cualquier medio que se pueda utilizar generalmente para incubar células animales. Por ejemplo, se pueden utilizar el medio esencial mínimo de Eagle (Eagle's MEM, Eagle, H. Science 130: 432 (1959)), α -MEM (Stanner, CP y colaboradores, Natl. New Biol. 230: 52 (1971)), MEM de Iscove (Iscove, N. y colaboradores, J. Exp. Med. 147: 923 (1978)), medio 199 (Morgan y colaboradores, Proc. Soc. Exp. Bio. Med., 73:1 (1950)), CMRL 1066, RPMI 1640 (Moore y colaboradores, J. Amer Med. Assoc. 199: 519 (1967)), F12 (Ham, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 53: 288 (1965)), F10 (Ham, RG Exp. Cell Res. 29: 515 (1963)), una modificación de Dulbecco del medio de Eagle (DMEM, Dulbecco, R. y colaboradores, Virology 8: 396 (1959)), una mezcla de DMEM y F12 (Barnes, D. y colaboradores, Anal. Biochem. 102: 255 (1980)), MB752/1 de Waymouth (Waymouth, CJ Natl. Cancer Inst. 22: 1003 (1959)), 5A de McCoy (McCoy, TA y colaboradores, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 100: 115 (1959)), serie MCDB (Ham, RG y colaboradores, In Vitro 14:11 (1978)), y similares. Descripciones detalladas de incubaciones y medios de células animales se describen en R. Ian Freshney, Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique, Alan R Liss, Inc., Nueva York, que se incorpora como referencia en la presente memoria descriptiva.

EFFECTOS BENEFICIOSOS

Las características y ventajas de la presente invención se resumen de la siguiente manera:

(a) Los vectores de la presente invención incluyen 5'-SAR de CSP-B y pueden tener efectos de superar la supresión de la expresión génica dependiendo de las posiciones de genes foráneos introducidos en células animales y mejorar significativamente el nivel de expresión de la proteína objetivo.

(b) Los vectores de la presente invención pueden expresar eficazmente proteínas recombinantes para sustancias médicas (por ejemplo, EPO) o anticuerpos (por ejemplo, anticuerpo anti-HER2) en células animales.

(c) Los vectores de la presente invención y el método para producir proteínas recombinantes utilizando los vectores pueden emplearse de manera muy útil en la producción industrial en masa de sustancias médicas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra esquemáticamente una estructura de un vector de expresión de β -galactosidasa. En este caso, lac Z representa un gen de β -galactosidasa; la pA de BGH representa una secuencia de poliadenilación de un gen de la hormona de crecimiento bovino; y la pA de TK representa una secuencia de poliadenilación de un gen de timidina quinasa.

La figura 2 muestra esquemáticamente estructuras de vectores de expresión de β -galactosidasa incluyendo una copia del factor SAR/MAR.

La figura 3 muestra esquemáticamente estructuras de vectores de expresión de β -galactosidasa incluyendo dos copias de factores SAR.

La figura 4 muestra esquemáticamente una estructura de un vector de expresión de β -galactosidasa que incluye tres copias de 5'-SAR de CSP-B.

La figura 5 muestra esquemáticamente estructuras de vectores de expresión de NESP.

5 La figura 6 muestra esquemáticamente estructuras de vectores de expresión de NESP incluyendo factores SAR/MAR.

La figura 7 es un gráfico que muestra la actividad de β -galactosidasa (relativa) de células transfectadas con cada uno de los vectores incluyendo una copia del factor SAR/MAR introducido en el mismo.

La figura 8 es un gráfico que muestra la actividad de la β -galactosidasa (relativa) de células transfectadas con cada uno de los vectores, incluyendo una copia, dos copias y tres copias de los factores SAR introducidos en la misma.

10 La figura 9 es un gráfico que muestra el nivel de expresión de NESP (factor estimulante de la eritropoyesis) (relativo) de las células transfectadas con cada uno de los vectores incluyendo factores SAR introducidos en el mismo.

La figura 10 es un gráfico que muestra los niveles de expresión de NESP de 24 clones seleccionados aleatoriamente de células transfectadas con el vector pCLS07A1 no introducido en el factor SAR.

15 La figura 11 es un gráfico que muestra los niveles de expresión de NESP de 24 clones seleccionados aleatoriamente de células transfectadas con el vector pCLS10A1f1 incluyendo 5'-SAR de CSP-B introducida en el mismo.

La figura 12 muestra esquemáticamente estructuras de vectores de expresión del anticuerpo anti-HER2.

La figura 13 es un gráfico que muestra el nivel de expresión del anticuerpo anti-HER2 (relativo) de las células transfectadas con el vector que incluye dos copias de factores SAR introducidas en el mismo.

20 La figura 14 es un gráfico que muestra los niveles de expresión del anticuerpo anti-HER2 de 19 clones seleccionados aleatoriamente de células transfectadas con el vector pCLS05H2 no introducido en el factor SAR.

La figura 15 es un gráfico que muestra los niveles de expresión del anticuerpo anti-HER2 de 19 clones seleccionados aleatoriamente de células transfectadas con el vector pCLS05H2f2 incluyendo dos copias de 5'-SAR de CSP-B introducidas en el mismo.

MODO PARA LLEVAR A CABO LA INVENCIÓN

25 En lo sucesivo, la presente invención se describirá en detalle con referencia a los ejemplos. Estos ejemplos son sólo para ilustrar la presente invención más específicamente, y será evidente para los expertos en la técnica que el alcance de la presente invención no está limitado por estos ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación del factor SAR/MAR

30 Preparación de 5'-SAR de CSP-B humana y 3'-SAR de CSP-B

35 Para la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del ADN de 5'-SAR de CSP-B humana registrado como acceso del GenBank # M62717 y # AL136018, se preparó ADN genómico de células asesinas naturales humanas (células NK, ATCC CRL-2407). El ADN genómico se preparó a partir de las células NK utilizando un kit de aislamiento de ADN (Dneasy Blood & Tissue Kit, Qiagen, No. de catálogo 69504), y se usó como una plantilla para la PCR del ADN de 5'-SAR.

La PCR se realizó usando el cebador Cs5S300F (attcct tcagc acctt cttta tttt ctccc; SEQ ID NO: 5) y el cebador Cs5S300R (ccagg cagcc aaaga tcagt agttg tggtg; SEQ ID NO: 6) aunque utilizando el ADN genómico de células NK como una plantilla. La PCR se realizó bajo las condiciones de 35 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 60°C y 2 minutos y 30 segundos a 72°C.

40 A continuación, se clonó el producto de PCR en el vector pGEM-T (Promega, No. de catálogo A3600) para preparar el vector pGEMT-CS5S.3.0k.

Para la preparación del ADN de 3'-SAR de CSP-B humana registrado como acceso del GenBank # M62716 y # AL136018, se realizó la PCR usando el cebador 2kCspSF (tggtccttc attgg aaaag gaaaa cac; SEQ ID NO: 7) y el

cebador 2kCspSR (tccgc tgagg ctgtg cccac agcca cc; SEQ ID NO: 8) aunque utilizando el ADN genómico de las células NK como una plantilla. A continuación, se realizó la PCR usando el cebador CspSF (ggatc cccctc ttgct tgatg tacta at; SEQ ID NO: 9) y el cebador CspSR (gaatt caaac aactc aatag caaga aac; SEQ ID NO: 10) aunque utilizando el producto de la PCR primaria como una plantilla. Las PCR se realizaron bajo las condiciones de 30 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 60°C y 5 minutos a 72°C. El producto de PCR secundario se clonó en el vector pGEM-T para preparar el vector pGEMT-CS3S.1.2k.

Preparación de la MAR de β -globina humana

Para la amplificación por PCR del ADN de la MAR de β -globina humana registrado como acceso del GenBank # L22754 y # NW_001838021, se preparó ADN genómico de células G-2 humanas. El ADN genómico se preparó a partir de las células G-2 usando un kit de aislamiento de ADN, y se usó como una plantilla para la PCR del ADN de 5' MAR. La PCR se realizó usando el cebador Bg5MF-100F-NheI (aattg ctagc ttgta ttctg tttcg tgagg caagg tt; SEQ ID NO: 11) y el cebador Bg5MR-100R-XhoI (aattc tcgag ttctt ctcta tgttg gtcca aatgt cct; SEQ ID NO: 12) aunque utilizando el ADN genómico de las células G-2 como una plantilla. La PCR se realizó bajo las condiciones de 30 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 60°C y 3 minutos y 30 segundos a 72°C. A continuación, se clonó el producto de PCR en el vector pcDNA3.3-TOPO (Invitrogen, No. de catálogo K8300-01) para preparar el vector pcDNA3.3-Bg5M.

Ejemplo 2: Preparación del vector de expresión de β -galactosidasa

Preparación de pC06

Para la preparación del vector pC06 que incluye secuencialmente el promotor de citomegalovirus (CMV), múltiples sitios de clonación (MCS) y la secuencia de poliadenilación (pA) de la hormona de crecimiento bovino (BGH), se llevó a cabo el siguiente experimento. En primer lugar, la PCR se realizó utilizando el cebador V6_F (aagct tggat ccgaa ttcatt cgatg gccgg ccggt accct cgagc tgtgc ctctt agttgcccc; SEQ ID NO: 13) y el cebador V6_R (gctag ctaga gcccc agctg gttct ttccg; SEQ ID NO: 14) aunque utilizando el vector pcDNA3.1(-) (Invitrogen, No. de catálogo V795-20) como una plantilla. La PCR se realizó bajo las condiciones de 30 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 60°C y 1 minuto a 72°C. A continuación, se clonó el producto de PCR en el vector pcDNA3.3-TOPO (Invitrogen) para preparar el vector pC06.

Preparación de pC04'

Para la preparación del pC04' que incluye secuencialmente el promotor del virus 40 de simio (SV40), la secuencia de Kozak (gccatc), el gen de la dihidrofolato reductasa (*dhfr*), la pA de timidina quinasa del virus del herpes simple (HSV-TK), se llevó a cabo el siguiente experimento. En primer lugar, se realizó la PCR utilizando el cebador PsvApaDraF (aaaat tgggccccac tacgt gctgtggaat gtgtg tcagt taggg; SEQ ID NO: 15) y el cebador PsvKzDHR (tggtc gaacc atgat ggcgc gaaac gatcc tcatt ctgtc tct; SEQ ID NO: 16) aunque utilizando el vector pcDNA3.3 como una plantilla. A continuación, se realizó la PCR usando el cebador DHKzPsvF (ggatc gtttc gcgcc atcat gggtc gacca tggaa ctgca tcg; SEQ ID NO: 17) y el cebador TKNheNdeR (tgtgt gcata tggctagcga taaca atttcacaca ggaaa cag; SEQ ID NO: 18) aunque utilizando el vector pOptiVEC-TOPO como una plantilla. Las PCR se realizaron bajo las condiciones de 30 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 60°C y 1 minuto a 72°C. A continuación, estos dos productos de PCR se ligaron mediante PCR de superposición, y se clonaron entre los sitios de restricción Apal y NdeI del vector pGEM-T, para preparar el vector pC04'.

Preparación de pC04

Para la preparación del vector pC04 en el que se retiró un reforzador de 72 pb (gggtg ggaaa gtccc caggc tcccc agcaggcaga agtat gcaaa gcatg catct caatt agtca gcaac ca; SEQ ID NO: 19) del promotor de SV40 incluido en el vector pC04' (promotor SV40dE1), se llevó a cabo el siguiente experimento. En primer lugar, se digirió el vector pC04' con la enzima de restricción SphI, y luego se ligó por sí mismo el fragmento de ADN grande así obtenido, para preparar el vector pC04.

45 Preparación del vector pCLS07

Para la preparación del vector pCLS07 que incluye el promotor SV40dE1, la secuencia de Kozak, el gen *dhfr* y la pA de TK, que se insertaron entre la pA BGH y el promotor de SV40 del vector pC06, se llevó a cabo el siguiente experimento. Primero, se realizó la PCR usando el cebador PsvApaDraF y el cebador TKNheNdeR aunque utilizando el vector pC04 como una plantilla. La PCR se realizó bajo las condiciones de 30 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 60°C y 1 minuto y 20 segundos a 72°C. A continuación, este producto de PCR y el vector pC06 se digirieron con las enzimas de restricción DralI y NheI, respectivamente, y los dos fragmentos grandes de ADN así obtenidos se ligaron para preparar el vector pCLS07.

Preparación del vector *pCLS08*

Para la preparación del vector *pCLS08* insertando MCS en el sitio de restricción NheI del vector *pCLS07*, se llevó a cabo el siguiente experimento. En primer lugar, se llevó a cabo la PCR utilizando el cebador NhAsE1F (aattg ctagc atata gcgat cgcgc aggac agctt cgcac agcagggcca gg; SEQ ID NO: 20) y el cebador BbPsSbNhE1R (aattg ctagc atata cctgc aggta tatgg gcca tatag ctgag gttga atgag aatat cactg tcca gacac; SEQ ID NO: 21) mientras se usa el gen de eritropoyetina clonado en el vector pGEM-T como una plantilla, para preparar MCS. La PCR se realizó bajo las condiciones de 30 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 60°C y 15 segundos a 72°C. A continuación, se clonó este producto de PCR en el sitio de restricción NheI del vector *pCLS07* para preparar el vector *pCLS08*.

Preparación del vector *pCLS09G1*

Para la preparación del vector *pCLS09G1* insertando los genes lac Z y lac Y entre los sitios de restricción HindIII y XhoI del vector *pCLS08*, se llevó a cabo el siguiente experimento. En primer lugar, se realizó la PCR usando el cebador galHinF (aatta agctt ctgc gcaac ctatt tccc ctga ac; SEQ ID NO: 22) y el cebador galXhoR (aattc tcgag ccgag tttgt cagaa agcag accaa ac; SEQ ID NO: 23) aunque utilizando el vector pSV-β-galactosidasa (Promega, No. de catálogo TB094) como una plantilla, para amplificar los genes lac Z y lac Y. La PCR se realizó bajo las condiciones de 30 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 60°C y 3 minutos y 30 segundos a 72°C. A continuación, se clonó este producto de la PCR entre los sitios de restricción HindIII y XhoI del vector *pCLS08* para preparar el vector *pCLS09G1*.

Preparación del vector *pCLS09G1*

Para la preparación del vector *pCLS09G1* intercambiando el MCS entre dos sitios de restricción NheI del vector *pCLS09G1* con otro MCS, se llevó a cabo el siguiente experimento. En primer lugar, se realizó la PCR utilizando el cebador NhSbE1F (aattg ctagc atata cctgc aggtt gaatg aga atcac tgtcc cagac a; SEQ ID NO: 24) y el cebador NhAsSfPsE1R (aattg ctagc atata gcgatcgtca tatggcatg atggc catat agggc ccagg acagc ttccg acagc agggc caggc; SEQ ID NO: 25) mientras se usa el gen de la eritropoyetina clonado en el vector pGEM-T como una plantilla, para preparar nuevo MCS. La PCR se realizó bajo las condiciones de 30 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 60°C y 15 segundos a 72°C. A continuación, se eliminó el MCS existente entre los dos sitios de restricción NheI del vector *pCLS80G1* y se clonó allí el nuevo MCS generado a través de la PCR para preparar el vector *pCLS09G1*. El mapa del vector *pCLS09G1* se mostró en la figura 1.

Ejemplo 3: Preparación de un vector de expresión de β-galactosidasa que incluye el factor SAR/MAR

Preparación del vector *pCLS09G1t1*

Para la preparación del vector *pCLS09G1t1* insertando el 3'-SAR de CSP-B entre los sitios de restricción SbfI y PspOMI del vector *pCLS09G1*, se llevó a cabo el siguiente experimento. En primer lugar, se llevó a cabo la PCR utilizando el cebador cs3sSbf1F (aattc ctgca gggga tcca ttct ctga tgtac taat; SEQ ID NO: 26) y el cebador cs3sPsp1R (aattg gagccc gaatt caaac aactc aatag caaga aac; SEQ ID NO: 27) aunque utilizando el vector pGEMT-CS3S.1.2k como una plantilla, para amplificar 3'-SAR de CSP-B. La PCR se realizó bajo las condiciones de 30 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 60°C, y 2 minutos y 30 segundos a 72°C. A continuación, se clonó este producto de la PCR entre los sitios de restricción SbfI y PspOMI del vector *pCLS09G1* para preparar el vector *pCLS09G1t1*.

Preparación del vector *pCLS09G1f1*

Para la preparación del vector *pCLS09G1f1* insertando el 5'-SAR de CSP-B entre los sitios de restricción SbfI y PspOMI del vector *pCLS09G1*, se llevó a cabo el siguiente experimento. En primer lugar, se realizó la PCR utilizando el cebador cs5sSbf1F (aattc ctgca gggaa ttctt aaaca gagca attag gtaag; SEQ ID NO: 28) y el cebador cs5sPsp1R (aattg ggccc gaatt ccagt gtaaa cgctt tcctt gt; SEQ ID NO: 29) aunque utilizando el vector pGEMT-CS5S.3.0k como una plantilla, para amplificar 5'-SAR de CSP-B. La PCR se realizó bajo las condiciones de 30 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 60°C, y 2 minutos y 30 segundos a 72°C. A continuación, se clonó este producto de la PCR entre los sitios de restricción SbfI y PspOMI del vector *pCLS09G1* para preparar el vector *pCLS09G1f1*.

Preparación del vector *pCLS09G1g1*

Para la preparación del vector *pCLS09G1g1* insertando la MAR de β-globina entre los sitios de restricción SbfI y PspOMI del vector *pCLS09G1*, se llevó a cabo el siguiente experimento. En primer lugar, la PCR se realizó utilizando el cebador glmSbf1F (aattc ctgca ggttg tattc tgtt cgtga ggcaa ggttt; SEQ ID NO: 30) y el cebador glmPsp1R (aattg ggccc ttctt ctcta tgttg gctca aatgt cct; SEQ ID NO: 31) aunque utilizando el vector pcDNA3.3-Bg5M como una plantilla, para amplificar la MAR de β-globina. La PCR se realizó bajo las condiciones de 30 ciclos de 10

segundos a 98°C, 30 segundos a 60°C, y 3 minutos y 20 segundos a 72°C. A continuación, se clonó este producto de la PCR entre los sitios de restricción SbfI y PspOMI del vector *pCLS09G1* para preparar el vector *pCLS09G1g1*.

Preparación del vector *pCLS09G1t2*

5 Para la preparación del vector *pCLS09G1t2* mediante la inserción de 3'-SAR de CSP-B entre los sitios de restricción PspOMI y SfiI del vector *pCLS09G1t1*, se llevó a cabo el siguiente experimento. En primer lugar, se realizó la PCR usando el cebador cs3sPsp2F (aattg ggccc ggtccatt ctct tgatg tacta at; SEQ ID NO: 32) y el cebador cs3sSfi2R (aattg gccat gatggccgaa ttcaaacac tcaat agcaa gaaac; SEQ ID NO: 33) aunque utilizando el vector pGEMT-CS3S.1.2k como una plantilla, para amplificar 3'-SAR de CSP-B. La PCR se realizó bajo las condiciones de 30 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 60°C, y 2 minutos y 30 segundos a 72°C. A continuación, se clonó este producto de la PCR entre los sitios de restricción PspOMI y SfiI del vector *pCLS09G1t1* para preparar el vector *pCLS09G1t2*.

Preparación del vector *pCLS09G1f2*

15 Para la preparación del vector *pCLS09G1f2* insertando 5'-SAR de CSP-B entre los sitios de restricción PspOMI y SfiI del vector *pCLS09G1f1*, se llevó a cabo el siguiente experimento. En primer lugar, la PCR se realizó utilizando el cebador cs5sPsp2F (aattg ggccc gaatt cctaa acaga gcaat taggt aag; SEQ ID NO: 34) y el cebador cs5sSfi2R (aattg gccat gatggccgaa ttcca gtgta aacgt ctcc ttgt; SEQ ID NO: 35) aunque utilizando el vector pGEMT-CS5S.3.0k como una plantilla, para amplificar 5'-SAR de CSP-B. La PCR se realizó bajo las condiciones de 30 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 60°C, y 2 minutos y 30 segundos a 72°C. A continuación, se clonó este producto de la PCR entre los sitios de restricción PspOMI y SfiI del vector *pCLS09G1f1* para preparar el vector *pCLS09G1f2*.

20 Preparación de vector *pCLS09G1ff*

Para la preparación del vector *pCLS09G1ff* insertando 5'-SAR de CSP-B entre los sitios de restricción PspOMI y SfiI del vector *pCLS09G1f1*, se llevó a cabo el siguiente experimento. En primer lugar, la PCR se realizó utilizando el cebador cs5sPsp2F (aattg ggccc gaatt cctaa acaga gcaat taggt aag; SEQ ID NO: 34) y el cebador cs5sSfi2R (aattg gccat gatggccgaa ttcca gtgta aacgt ctcc ttgt; SEQ ID NO: 35) aunque utilizando el vector pGEMT-CS5S.3.0k como una plantilla, para amplificar 5'-SAR de CSP-B. La PCR se realizó bajo las condiciones de 30 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 60°C, y 2 minutos y 30 segundos a 72°C. A continuación, se clonó este producto de la PCR entre los sitios de restricción PspOMI y SfiI del vector *pCLS09G1f1* para preparar el vector *pCLS09G1ff*.

Preparación del vector *pCLS09G1f3*

30 Para la preparación del vector *pCLS09G1f3* insertando la 5'-SAR de CSP-B en el sitio de restricción BglII entre el promotor de CMV y el promotor bla del vector *pCLS09G1f2*, se llevó a cabo el siguiente experimento. En primer lugar, se realizó la PCR utilizando el cebador cs5sBg13F (aatta gatct gaatt cctaa acaga gcaat taggt aag; SEQ ID NO: 36) y el cebador cs5sBg13R (aatta gatct gaatt ccagt gtaaa cgtct tcctt gt; SEQ ID NO: 37) aunque utilizando el vector pGEMT-CS5S.3.0k como una plantilla, para amplificar 5'-SAR de CSP-B. La PCR se realizó bajo las condiciones de 30 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 60°C, y 2 minutos y 30 segundos a 72°C. A continuación, se clonó este producto de la PCR en el sitio de restricción BglII del vector *pCLS09G1f2* para preparar el vector *pCLS09G1f3*.

Preparación del vector *pCLS09G1f4*

40 Para la preparación del vector *pCLS09G1f4*, en el que los factores SAR están situados a ambos lados de los genes lac Z y lac Y, insertando 5'-SAR de CSP-B en el sitio de restricción BglII entre el promotor de CMV y el promotor bla del vector *pCLS09G1f1*, se llevó a cabo el siguiente experimento. En primer lugar, se realizó la PCR utilizando el cebador cs5sBg13F (aatta gatct gaatt cctaa acaga gcaat taggt aag; SEQ ID NO: 36) y el cebador cs5sBg13R (aatta gatct gaatt ccagt gtaaa cgtct tcctt gt; SEQ ID NO: 37) aunque utilizando el vector pGEMT-CS5S.3.0k como una plantilla, para amplificar 5'-SAR de CSP-B. La PCR se realizó bajo las condiciones de 30 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 60°C, y 2 minutos y 30 segundos a 72°C. A continuación, se clonó este producto de la PCR en el sitio de restricción BglII del vector *pCLS09G1f1* para preparar el vector *pCLS09G1f4*.

45 **Ejemplo 4:** Expresión de β -galactosidasa usando el vector con el factor SAR/MAR introducido

Transfección utilizando el vector *pCLS09G1*, *pCLS09G1f1*, *pCLS09G1t1*, o *pCLS09G1g1*

Con el fin de verificar el efecto debido a la introducción respectiva de una copia de 5'-SAR de CSP-B, 3'-SAR de CSP-B y MAR de β -globina en los vectores, se transfectaron células CHO DG44 (Invitrogen, No. de catálogo 12609) de la siguiente manera.

50 Se dispensaron células DG44 del tipo de cultivo de adhesión en una placa de 6 pozos a razón de 4×10^5 células por

5 pozo. Después de 24 horas, se confirmó que las células se adherían completamente al fondo de la placa. Se dispensaron 500 µl del medio Opti-MEM (Gibco, No. de catálogo 31985-070) en cada uno de los tres tubos esterilizados, y después se mezclaron 2 µg de los vectores *pCLS09G1*, *pCLS09G1f1*, *pCLS09G1t1* o *pCLS09G1g1* preparados, seguido de pipeteo suave. Se dispensaron 500 µl del medio Opti-MEM en cada uno de los tres tubos esterilizados. Se mezclaron 10 µl de Lipofectamina 2000 (Invitrogen, No. de catálogo 11668-027), seguido de pipeteo suave, y después se dejó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se mezclaron el ADN y una solución de reactivo y después se dejaron a temperatura ambiente durante 20 minutos. Esta mezcla se puso en pozos de una placa de 6 pozos preparados para cada ADN, seguido de la mezcla de los pozos.

10 Verificación de la actividad de la β-galactosidasa de la combinación de células transfectadas con *pCLS09G1*, *pCLS09G1f1*, *pCLS09G1t1* o *pCLS09G1g1*

Las células DG44 se transfectaron con el vector *pCLS09G1*, *pCLS09G1f1*, *pCLS09G1t1* o *pCLS09G1g1*. Después de 24 horas, el medio se intercambió con un medio que contenía FBS al 10% y 500 µg/ml de geneticina. El intercambio de medio se realizó cada tres o cuatro días, y las células se cultivaron bajo las condiciones de 37°C y 5% de CO₂ durante tres semanas, preparando así una combinación estable de células.

15 Se utilizó un kit de análisis de β-galactosidasa (Stratagen, No. de catálogo 200383) para verificar la actividad de la β-galactosidasa sobre las células transfectadas en forma estable y luego obtener las actividades de β-galactosidasa de acuerdo con los vectores y las actividades relativas de β-galactosidasa basadas en el vector *pCLS09G1*. Como se muestra en la Tabla 1 y en la figura 7, la actividad de la β-galactosidasa se incrementó para los vectores con el factor SAR/MAR introducido en comparación con el vector del factor SAR/MAR introducido. Además, el vector *pCLS09G1f1* incluyendo 5'-SAR de CSP-B exhibió mayor actividad de la β-galactosidasa que *pCLS09G1g1* incluyendo la MAR de β-globina. Por lo tanto, es preferible introducir la 5'-SAR de CSP-B en vectores para aumentar el nivel de expresión de la proteína objetivo.

[Tabla 1]

Vector usado para transfección	SAR/MAR introducido	Actividad de la β-galactosidasa (unidades/mg)	Actividad relativa de la β-galactosidasa
<i>pCLS09G1</i>	Ninguno	3,4	1,0
<i>pCLS09G1f1</i>	5'-SAR de CSP-B	34,3	10,0
<i>pCLS09G1t1</i>	3'-SAR de CSP-B	7,4	2,2
<i>pCLS09G1g1</i>	MAR de β-globina	29,8	8,7

25 Verificación de la actividad de la β-galactosidasa de la combinación de células transfectadas con *pCLS09G1f1*, *pCLS09G1f2*, *pCLS09G1f3* o *pCLS09G1f4*

30 Se llevó a cabo el siguiente experimento para verificar que la 5'-SAR de CSP-B aumentaba los niveles de expresión de la proteína objetivo e investigar el cambio en el nivel de expresión de la proteína objetivo dependiendo del número de copias de los factores SAR introducidos en el vector. Las células DG44 se transfectaron con el vector *pCLS09G1f1*, *pCLS09G1f2*, *pCLS09G1f3*, o *pCLS09G1f4* y luego se seleccionaron con el medio que contenía geneticina, obteniéndose de este modo combinaciones de células. Se verificó la actividad de la β-galactosidasa sobre las células transfectadas en forma estable. Se obtuvieron las actividades de la β-galactosidasa dependiendo de los vectores. Como se muestra en la Tabla 2 y en la figura 8, el vector que incluye dos copias de los factores SAR introducidos en el mismo exhibió una mayor actividad de la β-galactosidasa que los vectores, incluyendo una copia o tres copias de los factores SAR introducidos en el mismo. Es decir, el aumento en los niveles de expresión de la proteína objetivo debido al factor SAR varía dependiendo del número de copias del factor SAR y se verificó que la introducción de dos copias del factor SAR en los vectores puede conducir al aumento máximo en el nivel de expresión de la proteína objetivo.

[Tabla 2]

Vector usado para la	SAR introducida	Actividad de la β-galactosidasa (unidades/mg)	Actividad relativa de la
----------------------	-----------------	---	--------------------------

transfección						β-galactosidasa			
		Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Media	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Media
<i>pCLS09G1f1</i>	Una copia de 5'-SAR de CSP-B	116	30	50	65	1,0	1,0	1,0	1,0
<i>pCLS09G1f2</i>	Dos copias continuas de 5'-SAR de CSP- B	147	103	107	119	1,3	3,4	2,1	2,3
<i>pCLS09G1f3</i>	Tres copias de 5'-SAR de CSP-B	12	36	19	22	0,1	1,2	0,4	0,6
<i>pCLS09G1f4</i>	Dos copias no continuas de 5'-SAR de CSP-B	112	112	66	97	1,0	3,7	1,3	2,0

Ejemplo 5: Preparación del vector de expresión de NESP

Preparación del gen de la eritropoyetina

5 Para la clonación del gen de eritropoyetina de 582 pb registrado como el acceso del GenBank # M11319 (gen de eritropoyetina genómica de hígado fetal humano) y acceso del GenBank # NM000799 (ARNm de eritropoyetina humana), se llevó a cabo el siguiente experimento. En primer lugar, se realizó la PCR utilizando el cebador IE1ATGF (atggg ggtgc acgaa tgtcc tgcct; SEQ ID NO: 38) y el cebador IE1TGAR (tcatc tgtcc cctgt cctgc aggcct; SEQ ID NO: 39) aunque utilizando la biblioteca de ADnc de Marathon-Ready de hígado humano (BD, No. de catálogo 7407-1) como una plantilla. La PCR se realizó bajo las condiciones de 40 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 58°C y 1 minuto a 72°C. A continuación, se clonó este producto de la PCR en el vector pGEM-T.

Preparación del gen *NESP*

15 Para la preparación de genes de análogos de eritropoyetina, los NESP (A30N, H32T, P87V, W88N y P90T), se realizó el siguiente experimento, como se describe en la reivindicación 3 de la solicitud de patente coreana No. 1995-0701453. En primer lugar, para la preparación de genes de los análogos de eritropoyetina A30N y H32T, se realizó la PCR usando el cebador M13R (gaaac agcta tgacc atg; SEQ ID NO: 40) y el cebador IA1g1R (ctcat tcaag ctgca tggtt catta cagcc ctgctg tgat; SEQ ID NO: 41) y se realizó la PCR utilizando el cebador M13F (caggg tttcccagt cacga; SEQ ID NO: 42) y el cebador IA1g1F (atcac gacgg gctgt aatga aacat gcagc ttgaa tgag; SEQ ID NO: 43), aunque utilizando el gen de eritropoyetina clonado en el vector pGEM-T como una plantilla. Las PCR se realizaron bajo las condiciones de 30 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 60°C y 40 segundos a 72°C. A continuación, se ligaron estos dos productos de PCR mediante PCR de superposición, y luego se clonaron entre los sitios de restricción NdeI y SphI del vector pGEM-T.

25 Con el fin de mutar los genes de los análogos A30N y H32T en genes de los análogos A30N, H32T, P87V, W88N y P90T y unir la secuencia de Kozak (gccacc) antes del codón de iniciación de la transcripción, se realizó la PCR usando el cebador M13R y el cebador IA1G2R (cacat gcagc tgcag tgtct cattcacctg ggaagagttg ac; SEQ ID NO: 44) y se realizó la PCR usando el cebador M13F y el cebador IA1G2F (gtcaa ctctt cccaggtgaa tgaga cactgcagct gcatg tg; SEQ ID NO: 45), aunque utilizando los genes de los análogos, A30N y H32T, clonados en el vector pGEM-T como una plantilla. Las PCR se realizaron bajo las condiciones de 30 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 60°C y 40 segundos a 72°C. A continuación, se realizó la PCR de superposición utilizando el cebador IE1KzATGHinF (aatta agctt gccac catgggggtg cacga atgtc ctgct; SEQ ID NO: 46) y el cebador IE1TGAXhoR (aattc tcgag tcctc tgtcc cctgc cctgc aggc t; SEQ ID NO: 47) aunque usando estos dos productos de PCR como una plantilla. La PCR se realizó bajo las condiciones de 30 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 60°C y 50 segundos a 72°C.

Preparación del vector *pCLS07A1*

El producto de PCR de los genes NESP se clonó entre los sitios de restricción HindIII y XhoI del MSC del vector *pCLS07*, para preparar el vector *pCLS07A1*.

35 **Ejemplo 6:** Preparación del vector de expresión de NESP que incluye el factor SAR

Preparación del vector *pCLS10A1*

Para la preparación del vector *pCLS10A1* insertando MCS para la introducción del factor SAR o MAR en el sitio de restricción NheI del vector *pCLS07A1* capaz de exhibir NESP en células animales, se llevó a cabo el siguiente experimento. En primer lugar, se realizó la PCR utilizando el cebador NhAsf1F (aattg ctagc atata ggcgc gcaa ctga ttgg gtgat ggtc acgta g; SEQ ID NO: 48) y el cebador NhClPaPsf1R (aattg ctagc atata atcta ttata ttaa ttaa tatag ggccc ttgag tgttg ttcca gttg gaaca aga; ID NO: 49) aunque utilizando el vector pcDNA3.1(-) como una plantilla, para obtener MCS. La PCR se realizó bajo las condiciones de 30 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 60°C y 15 segundos a 72°C. Este producto de PCR se clonó en el sitio de restricción NheI del vector *pCLS07A1* para preparar el vector *pCLS10A1*.

Preparación del vector *pCLS10Alt1*

Para la preparación del vector *pCLS10Alt1* insertando la 3'-SAR de CSP-B entre los sitios de restricción Ascl y PspOMI del vector *pCLS10A1*, se llevó a cabo el siguiente experimento. En primer lugar, se realizó la PCR usando el cebador cs3sAsclF (aattg ggcgc ccgga tcccc ttccctga tgtac taat; SEQ ID NO: 50) y el cebador cs3sPsp1R (aattg gagccc gaatt caaac aactc aatag caaga aac; SEQ ID NO: 51) aunque usando el vector pGEMT-CS3S.1.2k como una plantilla, para amplificar 3'-SAR de CSP-B. La PCR se realizó bajo las condiciones de 30 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 60°C, y 2 minutos y 30 segundos a 72°C. A continuación, se clonó este producto de la PCR entre los sitios de restricción Ascl y PspOMI del vector *pCLS10A1* para preparar el vector *pCLS10Alt1*.

Preparación del vector *pCLS10A1f1*

Para la preparación del vector *pCLS10A1f1* insertando la 5'-SAR de CSP-B entre los sitios de restricción Ascl y PspOMI del vector *pCLS10A1*, se llevó a cabo el siguiente experimento. En primer lugar, la PCR se realizó usando el cebador cs5sAsc1F (aattg ggcgc ccgaa ttctt aaaca gagca attag gtaag; SEQ ID NO: 52) y el cebador cs5sPsp1R (aattg ggccc gaatt ccagt gtaaa cgtct tcctt gt; SEQ ID NO: 53) aunque usando el vector pGEMT-CS5S.3.0k como una plantilla, para amplificar la 5'-SAR de CSP-B. La PCR se realizó bajo las condiciones de 30 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 60°C, y 2 minutos y 30 segundos a 72°C. A continuación, se clonó este producto de la PCR entre los sitios de restricción Ascl y PspOMI del vector *pCLS10A1* para preparar el vector *pCLS10A1f1*.

Ejemplo 7: Expresión de NESP usando el vector con el factor SAR introducido

Verificación del nivel de expresión de NESP de la combinación de células DG44 transfectadas con *pCLS07A1*, *pCLS10A1f1*, o *pCLS10Alt1*

Con el fin de verificar si el efecto del factor SAR, que fue confirmado a través del experimento de actividad de la β-galactosidasa, se aplica también a las expresiones de otras proteínas recombinantes, se llevó a cabo el siguiente experimento. Se transfectaron células DG44 con el vector *pCLS07A1*, *pCLS10A1f1*, o *pCLS10Alt1* incluyendo la proteína objetivo NESP y el factor SAR, y se seleccionaron con el medio que contenía genética, obteniendo de este modo una combinación de células. El nivel de expresión de NESP se verificó mediante ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Como se muestra en la Tabla 3 y en la figura 9, se verificó que la introducción del factor SAR aumentó el nivel de expresión. En particular, el nivel de expresión de NESP se aumentó en 11,2 veces cuando se introdujo 5'-SAR de CSP-B secuencia abajo del gen NESP que cuando no se introdujo 5'-SAR de CSP-B.

[Tabla 3]

Vector usado para la transfección	SAR/MAR introducido	Nivel de expresión de NESP (µg/ml)	Nivel de expresión relativo de NESP
<i>pCLS07A1</i>	Ninguno	0,7	1,0
<i>pCLS10A1f1</i>	5'-SAR de CSP-B	7,9	11,2
<i>pCLS10Alt1</i>	3'-SAR de CSP-B	2,3	3,2

Verificación de la frecuencia de formación de clones positivos que expresan NESP

Con el fin de verificar los efectos del factor SAR de superar la supresión de la expresión génica dependiendo de las posiciones de genes foráneos, se transfectaron las células DG44 con el vector *pCLS07A1*, *pCLS10Alt1* o *pCLS10A1f1* y se crearon colonias individuales utilizando una placa de 96 pozos. La frecuencia de formación de

5 colonias para cada vector se confirmó mediante observación microscópica. Se tomó el líquido de cultivo y se midió el nivel de expresión de NESP, obteniendo de este modo la frecuencia de formación de clones positivos que expresan NESP para cada vector. Como se muestra en las Tablas 4 y 5, se mostró un 82% de la frecuencia de formación de colonias cuando no se introdujo el factor SAR y el 90% y el 50% de pozos mostraron formación de colonias para las introducciones de 5'-SAR de CSP-B y 3'-SAR de CSP-B, respectivamente. Además, la frecuencia de clones positivos fue de aproximadamente 40% para la no introducción de factores SAR y la introducción de 3'-SAR de CSP-B, y aumentó a 59% por la introducción de 5'-SAR de CSP-B. Es decir, se puede verificar que la introducción de 5'-SAR de CSP-B supera la supresión de la expresión génica en función de las posiciones de los genes foráneos y por lo tanto se formaron más clones que expresan la proteína objetivo NESP.

10 [Tabla 4]

Vector usado para la transfección	SAR/MAR introducido	Número total de pozos	Número de pozos formadores de colonias	Frecuencia de formación de colonias (%)
<i>pCLS07A1</i>	Ninguno	240	197	82
<i>pCLS10A1f1</i>	5'-SAR de CSP-B	240	217	90
<i>pCLS10Alt1</i>	3'-SAR de CSP-B	240	119	50

[Tabla 5]

Vector usado para la transfección	SAR/MAR introducido	Número total de colonias	Número de clones positivos	Frecuencia de clones positivos (%)
<i>pCLS07A1</i>	Ninguno	197	89	45
<i>pCLS10A1f1</i>	5'-SAR de CSP-B	217	127	59
<i>pCLS10Alt1</i>	3'-SAR de CSP-B	119	51	43

Verificación sobre el nivel de expresión de NESP de un solo clon

15 Entre los clones positivos en la placa de 96 pozos, de los cuales se confirmó la expresión de NESP, se seleccionaron arbitrariamente 24 clones positivos para cada vector y se subcultivaron en una placa de 24 pozos. Se tomó el líquido del cultivo y se midió el nivel de expresión. Como se muestra en las figuras 10 y 11, el número de clones de alta expresión que exhibieron un nivel de expresión de 10 µg/ml o más entre 24 clones positivos seleccionados arbitrariamente fue de 13 para el vector con 5'- SAR de CSP-B introducido y 5 para el vector con factor SAR no introducido. Es decir, se comprobó que la frecuencia de los clones de alta expresión aumentó cuando se introdujo 5'-SAR de CSP-B en el vector.

Ejemplo 8: Preparación del vector de expresión anti-HER2

Preparación del vector *pC01*

25 Para la preparación del vector *pC01* que incluye secuencialmente un gen de resistencia a la neomicina, un gen de resistencia a la ampicilina, un promotor de CMV, MCS y pA de BGH, se llevó a cabo el siguiente experimento. En primer lugar, se realizó la PCR utilizando el cebador V1_F (aagct tctc agcat cgggccgccggcggc tccct gtgcc ctctagttga cagccagctg t; SEQ ID NO: 54) y el cebador V1_R (tagag cccca gctgg ttct tccgc cttag; SEQ ID NO: 55) aunque usando el vector pcDNA3.1(-) como una plantilla. La PCR se realizó bajo las condiciones de 30 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 60°C y 1 minuto a 72°C. A continuación, se clonó este producto de la PCR en el vector pcDNA3.3-TOPO para preparar el vector *pC01*.

Preparación del vector *pC02*

Para la preparación del vector *pC02* que incluye secuencialmente un promotor de CMV, el MCS del vector *pC01* y otro MCS, y pA de BGH, se llevó a cabo el siguiente experimento. En primer lugar, se realizó la PCR utilizando el cebador V2_F (gaatt ctgta caggt acccc tgcag gctcg agctg tgctt tctag ttgcc agccc tctgt; SEQ ID NO: 56) y el cebador V2_R (tagag cccca gctgg ttctt tccgc ctcag; SEQ ID NO: 57) aunque usando el vector pcDNA3.1(-) como una plantilla. La PCR se realizó bajo las condiciones de 30 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 60°C y 1 minuto a 72°C. A continuación, se clonó este producto de la PCR en el vector pcDNA3.3-TOPO para preparar el vector *pC02*.

Preparación del vector *pC03*

Para la preparación del vector *pC03* que incluye secuencialmente el gen de resistencia a la neomicina, el gen de resistencia a la ampicilina, el promotor de CMV, el primer MCS y la pA de BGH del vector *pC01* y el promotor de CMV, el segundo MCS y la pA de BGH del vector *pC02*, se llevó a cabo el siguiente experimento. En primer lugar, el vector *pC01* se digirió con las enzimas de restricción *DraIII* y *AgeI*, obteniendo de este modo un gran fragmento de ADN. A continuación, se realizó la PCR usando el cebador *PcmvAgeF* (aatct gaccg gtgtt agcgc ttttg cgctg cttcg cg; SEQ ID NO: 58) y el cebador *BGHNheDraR* (ttact aact aggcg gatcg agcta gctag agccc cagct gggtc ttccc g; SEQ ID NO: 59) aunque usando el vector *pC02* como una plantilla. Este producto de PCR se digirió con las enzimas de restricción *DraIII* y *AgeI*. La PCR se realizó bajo las condiciones de 30 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 60°C y 1 minuto a 72°C. Por último, este producto de PCR se ligó al fragmento de ADN obtenido por digestión del vector *pC01* con las enzimas de restricción *DraIII* y *AgeI*, preparando con ello el vector *pC03*.

Preparación del vector *pCLS05*

Para la preparación del vector *pCLS05* que incluye el promotor de SV40dE1, la secuencia de Kozak, la secuencia DHFR y la pA de TK insertada entre la pA de BGH y el promotor de SV40 del vector 140pC03, se llevó a cabo el siguiente experimento. Primero, se realizó la PCR usando el cebador *PsvApaDraF* y el cebador *TKNheNdeR* aunque utilizando el vector *pC04* como una plantilla. La PCR se realizó bajo las condiciones de 30 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 60°C y 1 minuto y 30 segundos a 72°C. A continuación, este producto de PCR y el vector *pC03* se digirieron con las enzimas de restricción *DraIII* y *NheI*, y los dos grandes fragmentos de ADN así obtenidos se ligaron para preparar el vector *pCLS05*.

Preparación del vector *pCLS05H1*

Para la preparación del vector *pCLS05H1* insertando el gen de cadena pesada del anticuerpo anti-HER2 entre los sitios de restricción *EcoRI* y *XhoI* del vector *pCLS05*, se llevó a cabo el siguiente experimento. En primer lugar, se realizó la PCR utilizando el cebador *H1ssF* (ctctt ctgg tagca acagc tacag gtgtc cactc cgagg tcaa ctggt cgaac gcggt gga; SEQ ID NO: 60) y el cebador *H1TGAXhoR* (aattc tcgag tcatt taccggaga caggg agagg ctctt; SEQ ID NO: 61) aunque utilizando el gen del anticuerpo anti-HER2 sintetizado como una plantilla, para amplificar un gen de cadena pesada que tiene una parte de la secuencia señal. La PCR se realizó utilizando el cebador *H1ssEcoF* (aattg gccac catgg gatgg agctg tatca tctc ttctt ggtag caaca gctac agg; SEQ ID NO: 62) y el cebador *H1TGAXhoR* (SEQ ID NO: 61) aunque utilizando este producto de PCR como una plantilla, para amplificar un gen de cadena pesada que tiene la secuencia de Kozak y la secuencia señal. La PCR se realizó bajo las condiciones de 30 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 60°C y 1 minuto y 30 segundos a 72°C. A continuación, se clonó este producto de la PCR en el vector *pGEM-T* y después se digirió con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XhoI*, para obtener el gen de cadena pesada que tenía la secuencia Kozak y la secuencia señal, que luego se clonó entre los sitios de restricción *EcoRI* y *XhoI* del vector *pCLS05*, preparando con ello el vector *pCLS05H1*.

Preparación del vector *pCLS05H2*

Para la preparación del vector *pCLS05H2* insertando el gen de la cadena ligera del anticuerpo anti-HER2 entre los sitios de restricción *HindIII* y *BamHI* del vector *pCLS05H1*, se llevó a cabo el siguiente experimento. En primer lugar, la PCR se realizó utilizando el cebador *H2ssF* (ctctt ctgg tagca acagc tacag gtgtc cactc cgata tccag atgac ccaga gtccc tct; SEQ ID NO: 63) y el cebador *H2TGABamR* (aattg gatcc tcaac actct cccctgttga agctc tttgt; SEQ ID NO: 64) aunque utilizando el gen anti-HER2 sintetizado como una plantilla, para amplificar un gen de cadena ligera que tiene una parte de la secuencia señal. La PCR se realizó usando el cebador *H2ssHinF* (aatta agctt gccac catgg gatgg agctg tatca tctc ttctt ggtag caaca gctac agg; SEQ ID NO: 65) y el cebador *H2TGABamR* (SEQ ID NO: 64) aunque utilizando este producto de PCR como una plantilla, para amplificar un gen de cadena ligera que tiene la secuencia de Kozak y la secuencia de señal. La PCR se realizó bajo las condiciones de 30 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 60°C y 1 minuto a 72°C. A continuación, se clonó este producto de la PCR en el vector *pGEM-T* y después se digirió con las enzimas de restricción *HindIII* y *BamHI*, para obtener un gen de cadena ligera que tenía la secuencia de Kozak y la secuencia señal, que luego se clonó entre los sitios de restricción *HindIII* y *BamHI* del vector *pCLS05H1*, preparando con ello el vector *pCLS05H2*. El mapa del vector *pCLS05H2* se muestra en la figura 12a.

Ejemplo 9: Preparación del vector de expresión anti-HER2 que incluye el factor SAR

Preparación del vector pCLS05H2f2

5 Para la preparación del vector pCLS05H2f2 introduciendo dos copias de 5'-SAR de CSP-B entre el gen de la cadena pesada y el gen DHFR del vector pCLS05H2 que puede expresar el anticuerpo anti-HER2 en células animales, se realizó el siguiente experimento. El vector pCLS05H2 y el vector pCLS09G1f2 se digirieron con las enzimas de restricción XhoI y BssHII, y los dos grandes fragmentos de ADN así obtenidos se ligaron para preparar el vector pCLS05H2f2. El mapa del vector pCLS05H2f2 se muestra en la figura 12b.

Ejemplo 10: Expresión del anticuerpo anti-HER2 utilizando el vector con el factor SAR introducido

Verificación sobre el nivel de expresión del anticuerpo anti-HER2 de la combinación de células DG44 transfectadas con el vector pCLS05H2 o el vector pCLS05H2f2

10 Las células DG44 se transfectaron con el vector pCLS05H2 que incluía un gen del anticuerpo anti-HER2 de la proteína objetivo y el vector pCLS05H2f2 que incluía el gen del anticuerpo y el factor SAR, respectivamente, y luego se seleccionaron con medio que contenía geneticina, para obtener combinaciones de células. Los niveles de expresión del anticuerpo anti-HER2 para los respectivos vectores se verificaron mediante el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Como se muestra en la Tabla 6 y en la figura 13, se confirmó que el nivel de expresión del anticuerpo anti-HER2 era 30 veces mayor cuando se introdujeron dos copias de factores SAR que cuando no se introdujo el factor SAR. Se exhibió la resistencia a la geneticina y las células supervivientes fueron relativamente más numerosas cuando se usó el vector pCLS05H2f2 incluyendo el factor SAR.

[Tabla 6]

Vector usado para la transfección	SAR introducido	Nivel de expresión del anticuerpo anti-HER2 (µg/ml)				Nivel de expresión relativo del anticuerpo anti-HER2			
		Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Media	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Media
pCLS05H2	Ninguno	0,29	0,50	0,26	0,35	1,0	1,0	1,0	1,0
pCLS05H2f2	Dos copias continuas de 5'-SAR de CSP-B	6,74	8,22	13,6	9,54	22,7	16,2	52,6	30,5

20 Verificación sobre el nivel de expresión del anticuerpo anti-HER2 de un solo clon

Se seleccionaron arbitrariamente clones positivos en la placa de 96 pozos, de los cuales se confirmó la expresión del anticuerpo anti-HER2, y se subcultivaron en una placa de 24 pozos. Se tomó el líquido del cultivo y se midió el nivel de expresión. Como se muestra en las figuras 14 y 15, el número de clones de alta expresión que exhibieron un nivel de expresión de 5 µg/ml o más entre 19 clones positivos seleccionados arbitrariamente era de 10 para el vector al que se le introdujeron dos copias de 5'-SAR de CSP-B y 6 para el vector al que no se le introdujo el factor SAR. Es decir, se verificó que la frecuencia de los clones de alta expresión aumentó relativamente cuando se introdujo el factor 5'-SAR de CSP-B en el vector.

30 Aunque la presente invención ha sido descrita en detalle con referencia a las características específicas, será evidente para los expertos en la técnica que esta descripción es sólo para una realización preferida y no limita el alcance de la presente invención. Por lo tanto, el alcance sustancial de la presente invención se definirá por las reivindicaciones adjuntas.

<110> Chongkundang

<120> Vectores de expresión animal que portan el factor 5'-SAR de CSP-B y métodos para la preparación de proteínas recombinantes mediante su uso

35 <130> PP120046

<150> KR10-2011-0056685

<151> 2011-06-13

ES 2 611 402 T3

<160> 65
<170> KopatentIn 2.0
<210> 1
<211> 12452
5 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> vector pCS09G1f1
<220>
10 <221> promotor
<222> (4140)..(4834)
<220>
<221> gen
<222> (4937)..(8164)
15 <220>
<221> gen
<222> (8216)..(8418)
<220>
<221> gen
20 <222> (8711)..(11139)
<400> 1

ES 2 611 402 T3

cacgtagtgg gccatcgccc tgatagacgg tttttcgccc tttgacgttg gagtccacgt	60
tctttaatag tggactcttg ttccaaactg gaacaacact caaccctatc tcggtctatt	120
cttttgattt ataagggatt ttggggattt cggcctattg gttaaaaaat gagctgattt	180
aacaaaaatt taacgcgaat taattctgtg gaatgtgtgt cagttagggt gtggaaagtc	240
cccaggctcc ccagcaggca gaagtatgca aagcatgcat ctcaattagt cagcaaccag	300
gtgtggaaag tccccaggct ccccagcagg cagaagtatg caaagcatgc atctcaatta	360
gtcagcaacc atagtcccgc ccctaactcc gcccatcccg ccctaactc cgcccagttc	420
cgcccattct ccgccccatg gctgactaat tttttttatt tatgcagagg ccgaggccgc	480
ctctgcctct gagctattcc agaagtagtg aggaggcttt tttggaggcc taggcttttg	540
caaaaagctc ccgggagctt gtatatccat tttcggatct gatcaagaga caggatgagg	600
atcgtttcgc atgattgaac aagatggatt gcacgcaggt tctccggccg cttgggtgga	660
gaggctattc ggctatgact gggcacaaca gacaatcggc tgctctgatg ccgccgtggt	720

ES 2 611 402 T3

ccggctgtca gcgcaggggc gcccggttct ttttgtcaag accgacctgt ccggtgcctt 780
 gaatgaactg caggacgagg cagcgcggct atcgtggctg gccacgacgg gcgttccttg 840
 cgcagctgtg ctcgacgttg tcaactgaagc ggggaaggac tggctgctat tgggcgaagt 900
 gccggggcag gatctcctgt catctcacct tgctcctgcc gagaaagtat ccatcatggc 960
 tgatgcaatg cggcggctgc atacgcttga tccggctacc tgcccattcg accaccaagc 1020
 gaaacatcgc atcgagcgag cacgtactcg gatggaagcc ggtcttgcg atcaggatga 1080
 tctggacgaa gagcatcagg ggctcgcgcc agccgaactg ttcgccaggc tcaaggcgcg 1140
 catgcccgac ggcgaggatc tcgtcgtgac ccatggcgat gcctgcttgc cgaatatcat 1200
 ggtggaaaaat ggccgctttt ctggattcat cgactgtggc cggctgggtg tggcggaccg 1260
 ctatcaggac atagcgttgg ctaccctgga tattgctgaa gagcttggcg gcgaatgggc 1320
 tgaccgcttc ctcgtgcttt acggtatcgc cgctcccgat tcgcagcgca tcgccttcta 1380
 tcgccttctt gacgagttct tctgagcggg actctggggg tcgcgaaatg accgaccaag 1440
 cgacgcccga cctgccatca cgagatttgc attccaccgc cgccttctat gaaaggttgg 1500
 gcttcggaat cgttttccgg gacgccggct ggatgatcct ccagcgcggg gatctcatgc 1560
 tggagttctt cgcccacccc aacttgttta ttgcagctta taatggttac aaataaagca 1620
 atagcatcac aaatttcaca aataaagcat ttttttcaact gcattctagt tgtggtttgt 1680
 ccaaactcat caatgtatct tatcatgtct gtataaccgtc gacctctagc tagagcttgg 1740
 cgtaatcatg gtcatactgt tttcctgtgt gaaattgtta tccgctcaca attccacaca 1800
 acatacgagc cggaagcata aagtgtaaag cctgggggtgc ctaatgagtg agctaactca 1860
 cattaattgc gttgcgctca ctgcccgctt tccagtcggg aaacctgtcg tgccagctgc 1920
 attaatgaat cggccaacgc gcggggagag gcgggttgcg tattgggcgc tcttccgctt 1980
 cctcgtcac tgactcgtg cgctcggctg ttcggctgcg gcgagcggta tcagctcact 2040
 caaaggcggg aatacgggta tccacagaat caggggataa cgcaggaaag aacatgtgag 2100
 caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata 2160
 ggctccgccc ccctgacgag catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg tggcgaacc 2220
 cgacaggact ataaagatac caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg cgctctcctg 2280
 ttccgaccct gccgcttacc ggatacctgt ccgcctttct cccttcggga agcgtggcgc 2340
 tttctcaatg ctcacgctgt aggtatctca gttcgggtgta ggtcgttcgc tccaagctgg 2400
 gctgtgtgca cgaaccccc gttcagcccg accgctgcgc cttatccggt aactatcgtc 2460
 ttgagtccaa cccggtgaaga cacgacttat cgccactggc agcagccact ggtaacagga 2520
 ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta cagagttctt gaagtgtgg cctaactacg 2580

ES 2 611 402 T3

gctacactag aaggacagta tttggtatct gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa 2640
aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg ggtttttttg 2700
tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct ttgatctttt 2760
ctacgggggc tgacgctcag tggaacgaaa actcacgta agggattttg gtcacgagat 2820
tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaaat atgaagtttt aaatcaatct 2880
aaagtatata tgagtaaact tggctctgaca gttaccaatg cttaatcagt gaggcaccta 2940
tctcagcgat ctgtctattt cgttcatcca tagttgctg actccccgc gtgtagataa 3000
ctacgatacg ggaggggctta ccatctggcc ccagtgctgc aatgataccg cgagaccac 3060
gctcaccggc tccagattta tcagcaataa accagccagc cggaagggcc gagcgcagaa 3120
gtggtcctgc aactttatcc gcctccatcc agtctattaa ttggtgcccg gaagctagag 3180
taagtagttc gccagttaat agtttgcgca acgttggtgc cattgctaca ggcatcgtgg 3240
tgtcacgctc gtcgtttggg atggcttcat tcagctccgg tccccaacga tcaaggcgag 3300
ttacatgatc ccccatggtg tgcaaaaaag cggttagctc cttcggctct ccgatcgttg 3360
tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac tcatggttat ggcagcactg cataattctc 3420
ttactgtcat gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca accaagtcac 3480
tctgagaata gtgtatgccc cgaccgagtt gctcttgccc ggcgtcaata cgggataata 3540
ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct tcggggcgaa 3600
aactctcaag gatcttaccg ctggtgagat ccagttcgat gtaaccact cgtgcacca 3660
actgatcttc agcatctttt actttcacca gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc 3720
aaaatgccgc aaaaaagga ataagggcga cacggaaatg ttgaatactc atactcttcc 3780
tttttcaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct catgagcggg tacatatttg 3840
aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac 3900
ctgacgtcga cggatcggga gatctcccga tcccctatgg tcgactctca gtacaatctg 3960
ctctgatgcc gcatagttaa gccagtatct gctccctgct tgtgtggtgg aggtcgtgga 4020
gtagtgccgc agcaaaattt aagctacaac aaggcaaggc ttgaccgaca attgcatgaa 4080
gaatctgctt agggttaggc gttttgcgct gcttcgcgat gtacgggcca gatatacgcg 4140
ttgacattga ttattgacta gttattaata gtaatcaatt acgggggtcat tagttcatag 4200
cccatatatg gagttccgcg ttacataact tacggtaaact ggcccgcctg gctgaccgcc 4260
caacgacccc cgccattga cgtcaataat gacgtatggt cccatagtaa cgccaatagg 4320
gactttccat tgacgtcaat ggggtggagta tttacggtaa actgcccact tggcagtaca 4380
tcaagtgtat catatgcaa gtacgcccc tattgacgct aatgacggta aatggcccgc 4440
ctggcattat gccagtaca tgacctatg ggactttcct acttggcagt acatctacgt 4500

ES 2 611 402 T3

attagtcatc gctattacca tggatgatgcg gttttggcag tacatcaatg ggcgtggata 4560
 gcggtttgac tcacggggat ttccaagtct ccacccatt gacgtcaatg ggagtttggt 4620
 ttggcaccaa aatcaacggg actttccaaa atgtcgtaac aactccgccc cattgacgca 4680
 aatgggacgt aggcgtgtac ggtgggaggt ctatataagc agagctcgtt tagtgaaccg 4740
 tcagatcgcc tggagacgcc atccacgctg ttttgacctc catagaagac accgggaccg 4800
 atccagcctc cggactctag aggatcgaac cottaagctt ctgcgcgaac ctattttccc 4860
 ctcgaaact ttttaagccg tagataaaca ggctgggaca cttcacatga gcgaaaaata 4920
 catcgtcacc tgggacatgt tgcagatcca tgcacgtaaa ctgcgaagcc gactgatgcc 4980
 ttctgaacaa tggaaaggca ttattgcccgt aagccgtggc ggtctggtac cgggtgggtga 5040
 agaccagaaa cagcacctcg aactgagccg cgatattgcc cagcgtttca acgcgctgta 5100
 tggcgagatc gatcccgtcg ttttacaacg tcgtgactgg gaaaaccctg gcgttacca 5160
 acttaatcgc cttgcagcac atccccctt cgccagctgg cgtaatagcg aagaggcccg 5220
 caccgatcgc ccttccaac agttgcgcag cctgaatggc gaatggcgtt ttgcctggtt 5280
 tccggcacca gaagcgggtc cggaaagctg gctggagtgc gatcttcctg aggccgatac 5340
 tgtcgtcgtc ccctcaaact ggcagatgca cggttacgat gcgcccattc acaccaacgt 5400
 gacctatccc attacggtca atccgccgtt tgttcccacg gagaatccga cgggttggtta 5460
 ctgctcaca tttaatgttg atgaaagctg gctacaggaa ggccagacgc gaattatfff 5520
 tgatggcgtt aactcggcgt tcatctgtg gtgcaacggg cgctgggtcg gttacggcca 5580
 ggacagtcgt ttgccgtctg aatttgacct gagcgcattt ttacgcgccg gagaaaaccg 5640
 cctcgcggtg atggtgctgc gctggagtga cggcagttat ctggaagatc aggatatgtg 5700
 gcggatgagc ggcattttcc gtgacgtctc gttgctgcat aaaccgacta cacaatcag 5760
 cgatttccat gttgccactc gctttaatga tgatttcagc cgcgctgtac tggaggctga 5820
 agttcagatg tgcggcgagt tgcgtgacta cctacgggta acagtttctt tatggcaggg 5880
 tgaaacgcag gtcgccagcg gcaccgcgcc tttcggcggg gaaattatcg atgagcgtgg 5940
 tggttatgcc gatcgcgtca cactacgtct gaacgtcgaa aaccgaaac tgtggagcgc 6000
 cgaaatcccg aatctctatc gtgcgggtgg tgaactgcac accgcccagc gcacgctgat 6060
 tgaagcagaa gcctgcgatg tcggtttccg cgagggtgcgg attgaaaatg gtctgctgct 6120
 gctgaacggc aagccgttgc tgattcgagg cgttaaccgt cacgagcatc atcctctgca 6180
 tggtcaggtc atggatgagc agacgatggt gcaggatatc ctgctgatga agcagaacaa 6240
 ctttaacgcc gtgcgctggt cgcattatcc gaaccatccg ctgtggtaca cgctgtgcga 6300
 ccgctacggc ctgtatgtgg tggatgaagc caatattgaa acccagggca tggtgccaat 6360

ES 2 611 402 T3

gaatcgtctg accgatgatc cgcgctggct accggcgatg agcgaacgcg taacgcgaat 6420
 ggtgcagcgc gatcgtaatc acccgagtgt gatcatctgg tcgctgggga atgaatcagg 6480
 ccacggcgct aatcacgacg cgctgtatcg ctggatcaaa tctgtcgatc cttcccgcgc 6540
 ggtgcagtat gaaggcggcg gagccgacac cacggccacc gatattattt gcccgatgta 6600
 cgcgcgcgctg gatgaagacc agcccttccc ggctgtgccc aatgggtcca tcaaaaaatg 6660
 gctttcgcta cctggagaga cgcgcccgcct gatcctttgc gaatacgccc acgcgatggg 6720
 taacagtctt ggcggtttcg ctaaatactg gcaggcgttt cgtcagtatc cccgtttaca 6780
 gggcggcttc gtctgggact ggggtggatca gtcgctgatt aaatatgatg aaaacggcaa 6840
 cccgtggctg gcttacggcg gtgattttgg cgatacgccc aacgatcgcc agttctgtat 6900
 gaacggtctg gtctttgccc accgcacgcc gcatccagcg ctgacggaag caaaacacca 6960
 gcagcagttt ttccagttcc gtttatccgg gcaaaccatc gaagtgacca gogaatacct 7020
 gttccgctcat agcgataacg agctcctgca ctggatggtg gcgctggatg gtaagccgct 7080
 ggcaagcggg gaagtgcctc tggatgtcgc tccacaaggt aaacagttga ttgaactgcc 7140
 tgaactaccg cagccggaga gcgcccggca actctggctc acagtacgcg tagtgcaacc 7200
 gaacgcgacc gcatggtcag aagccgggca catcagcgcc tggcagcagt ggcgtctggc 7260
 ggaaaacctc agtgtgacgc tccccgcgc gtcccacgcc atcccgcac tgaaccaccag 7320
 cgaaatggat ttttgcacg agctgggtaa taagcgttgg caatttaacc gccagtcagg 7380
 ctttctttca cagatgtgga ttggcgataa aaaacaactg ctgacgcccgc tgcgcatca 7440
 gttcaccctg gcaccgctgg ataacgacat tggcgtaagt gaagcgaccc gcattgaccc 7500
 taacgcctgg gtcgaacgct ggaaggcggc gggccattac caggccgaag cagcgttgtt 7560
 gcagtgcacg gcagatacac ttgctgatgc ggtgctgatt acgaccgctc acgctggca 7620
 gcatcagggg aaaaccttat ttatcagccg gaaaacctac cggattgatg gtagtggta 7680
 aatggcgatt accgttgatg ttgaagtggc gagcgataca ccgcatccgg cgcggattgg 7740
 cctgaactgc cagctggcgc aggtagcaga gcgggtaaac tggctcggat tagggccgca 7800
 agaaaactat cccgaccgcc ttactgccgc ctgttttgac cgctgggatc tgccattgtc 7860
 agacatgtat accccgtacg tcttcccag cgaaaacggg ctgcgctgcg ggacgcgca 7920
 attgaattat ggcccacacc agtggcgcgg cgacttccag ttcaacatca gccgctacag 7980
 tcaacagcaa ctgatggaaa ccagccatcg ccatctgctg cacgcggaag aaggcacatg 8040
 gctgaatata gcaggtttcc atatggggat tgggtggcgac gactcctgga gcccgctcagt 8100
 atcggcggaa ttccagctga gcgcccgtcg ctaccattac cagttggctt ggtgtcaaaa 8160
 ataataataa ccgggcaggc catgtctgcc cgtatttgcg gtaaggaaat ccattatgta 8220
 ctatttaaaa aacacaaact tttggatggt cggtttattc ttttctttt acttttttat 8280

ES 2 611 402 T3

catgggagcc	tacttcccgt	ttttcccgat	ttggctacat	gacatcaacc	atatcagcaa	8340
aagtgatacg	ggtattatth	ttgccgctat	ttctctgttc	tcgctattat	tccaaccgct	8400
gtttggtctg	ctttctgaca	aactcggctc	gagctgtgcc	ttctagttgc	cagccatctg	8460
ttgtttgccc	ctccccctg	ccttccttga	ccctggaagg	tgccactccc	actgtccttt	8520
cctaataaaa	tgaggaaatt	gcatcgcatt	gtctgagtag	gtgtcattct	attctggggg	8580
gtgggggtgg	gcaggacagc	aagggggagg	attgggaaga	caatagcagg	catgctgggg	8640
atgcggtggg	ctctatggct	tctgaggcgg	aaagaaccag	ctggggctct	agctagcata	8700
tacctgcagg	gaattcctaa	acagagcaat	taggtaagaa	aatgaaagaa	aaggatccca	8760
attatgaagg	aagaagtaaa	actatttcta	tttgcagatg	acatgactgt	atacaaagaa	8820
aatcccaaat	aatccacaca	aaaactagta	gagttaataa	gcaaattcaa	caaatttcag	8880
ggtacaaaat	cagttgtgth	tctatacaca	aaccacaaat	gaacaataaa	aaaaggaaac	8940
taagaaaaca	atttccttta	taataacatc	ccaaagaata	aaatacatgg	gactaaatth	9000
aaccaaggaa	gtgaaagaat	tgtacactaa	aaaccacaaa	taattgctga	ttaaatggaa	9060
agatgtccca	tgttcacgga	tagggatact	taatattgth	aatggcaat	acttcccaaa	9120
gcaatctata	gattcaatgc	aatctctgtc	aaaatttcaa	atggtcttct	ttgctgaaat	9180
ggaaaagcca	atcctaaaat	tcatatgtaa	ttccatagga	tccaaaaaag	caaaaccaat	9240
attgaaatag	aaaaacaaag	ttggagtact	tacacttctc	aatttcaaaa	cttacaagct	9300
acagtaatta	aaacagcatg	gcaaaggcat	aaggatagac	atatggatca	atggaataga	9360
ttcagagtcc	agaaataaac	acaacattta	tggccatttg	atthtttgata	aggattgtca	9420
agggggtctt	gaacattcag	tggggaaaga	ataatatctt	caacaagtgg	tgctggaaca	9480
attggatagc	catgtgcaaa	atactctagt	agactcctac	cttatgtcac	atacaataat	9540
taatttaaaa	taaatcaatc	ctaaatataa	gggccaaaac	cataaaactc	ttagaagaaa	9600
acaggcgtaa	tcttcatggt	ttctgatttg	tcaatggatt	cttaaatttg	acaccaaag	9660
cacaagcaac	aaaagataaa	attgatacat	ttgaatgcat	aaaattthtt	taatttgcac	9720
atgaaatgac	aatatcaaga	aatgaaaag	acaatctgca	gaatgggaga	aatatthtac	9780
aagccacata	tctgataagg	gctgagtatc	cagaatatat	aacaaactct	tccagctcaa	9840
caatgaaaac	aaaaacaacg	caattthtaag	aatgggcaaa	ggacttgaat	caacatttct	9900
ccaaagaaga	tatgcgaata	accagcaaac	acatgaagtg	atgctcaaca	tcattactca	9960
taaaggaaat	gtgaatcaaa	accatatgac	atactactth	acaccatta	ggatgaagat	10020
aataattthta	aaataacaag	tgctcagcaag	gatgcagaga	aataggaact	ttcctatgth	10080
gctgataagc	aatgcaaaaag	gataacaacca	ctgtggaaaa	cagthttggtg	gthcctthaa	10140

ES 2 611 402 T3

aaattaaaa taggattatt gtataactca gaaattccaa aagtatatat atttggтата 10200
 tatccaaaag aactgaaaac atattgttca tgcagaaatt tgtacacaaa tgcttattat 10260
 tgctgcatta gctacaatag ccaaagatg aaaacaacc aaatgtccat tgacagatga 10320
 acaaataact tgtggтатаa acatacaatg ggaatattat ttttccatca aaaagaacga 10380
 atactggcat gtgctacagc ttgtatgaat ctacagaaaca ttattacaag tgaatgtagc 10440
 cagccacaac aggccatgta ttgtgtgatt ccgtttatat gaaatatcca gaggtgggtgg 10500
 ttgcagattt tgaatgtgct aaatgtcact gaattgaata ctttaaatg gttaattgta 10560
 tgttatgtga attttacctc aatTTTTTaa atgggtcata aacttatggt tagcataatc 10620
 cccttttaat tttaaaaaat gcagatatta catgagaaaa aatgtgctag agcatatctc 10680
 aagacattaa agatggttat cagtgaatga tgagaaatta ggtaatgttt attatTTTcg 10740
 ctttgctaaa attatTTTaa aattacttgc atattaaatt ttttaatgcc taggaaagaa 10800
 agactatagt tgtattgact aagatttcta cgagcatggg gaaatgctt aattttagg 10860
 gttaatcaag gataaaataa attgcattgt atgtacaatg tgatcccaag tattTaaac 10920
 aactgctta tggtaacagt cagtctgtgg gagacagggt aaaaagtgat atttccctt 10980
 cctactctcc aaatTTTctt aacaaacata tattatgact ataatcagaa aaaattatTT 11040
 tTaaaacgtc tactatgggg caagctaggt tcaaaaaata gaagtttgat aaatgtagtt 11100
 ggcttgctat tgacaaggaa gacgtttaca ctggaattcg ggccctatat ggccatcatg 11160
 gccatatagc gatcgctata tgctagcgat aacaatttca cacaggaaac agctatgacc 11220
 atgattacgc caagctctag ctagaggctc acggtaatgg cagggcctgc cgccccgacg 11280
 ttggctgcga gccctgggcc ttcacccgaa cttgggggggt ggggtgggga aaaggaagaa 11340
 acgcgggcgt attggcccca atggggctc ggtgggggtat cgacagagtg ccagccctgg 11400
 gaccgaaccc cgcgtttatg aacaaacgac ccaacacccg tgcgttttat tctgtctttt 11460
 tattgccgtc atagcgcggg ttccctccgg tattgtctcc ttccgtgttt cagttagcct 11520
 cccccgttta aactcattac taaccggttt tagtctttct tctcgtagac ttcaaactta 11580
 tacttgatgc ctttttctc ctggacctca gagaggacgc ctgggtattc tgggagaagt 11640
 ttatatttcc ccaaataat ttctgggaaa aacgtgtcac tttcaaattc ctgcatgatc 11700
 cttgtcacia agagtctgag gtggcctggt tgattcatgg ctccctggta aacagaactg 11760
 cctccgacta tccaaacat gtctacttta cttgccaaat ccggttgctc aataagtctt 11820
 aaggcatcat ccaaactttt ggcaagaaaa tgagctctc gtgggtggtc tttgagttct 11880
 ctactgagaa ctatattaat tctgtccttt aaaggctgat tcttctcagg aatggagaac 11940
 caggttttcc taccataat caccagattc tgtttacctt ccaactgaaga ggttgtggtc 12000
 attctttgga agtacttgaa ctcgttcctg agcggaggcc agggtaggtc tccgttcttg 12060

ES 2 611 402 T3

ccaatcccca tattttggga cacggcgacg atgcagttca atggtcgaac catgatggcg 12120
cgaaacgatc ctcacacctgt ctcttgatca gatccgaaaa tggatataca agctcccggg 12180
agctttttgc aaaagcctag gcctcctaaa aagcctcctc actacttctg gaatagctca 12240
gagggcagagg cggcctcggc ctctgcataa ataaaaaaaa ttagtcagcc atggggcgga 12300
gaatgggdcgg aactgggdcgg agttaggggc gggatgggdcg gagttagggg cgggactatg 12360
gttgctgact aattgagatg catgctttgc atacttctgc ctgctgggga gcctggggac 12420
ttccacacc ctaactgaca cacattccac ag 12452

<210> 2

<211> 14876

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vector pCLS09G1f2

<220>

<221> promotor

10 <222> (4140)..(4834)

<220>

<221> gen

<222> (4937)..(8164)

<220>

15 <221> gen

<222> (8216)..(8418)

<220>

<221> gen

<222> (8711)..(11139)

20 <220>

<221> gen

<222> (11146)..(13574)

<400> 2

ES 2 611 402 T3

cacgtagtgg gccatcgccc tgatagacgg tttttcgccc tttgacgttg gagtccacgt	60
tctttaatag tggactcttg ttccaaactg gaacaacact caaccctatc tcggtctatt	120
cttttgattt ataagggatt ttggggattt cggcctattg gttaaaaaat gagctgattt	180
aacaaaaatt taacgcgaat taattctgtg gaatgtgtgt cagttagggt gtggaaagtc	240
cccaggctcc ccagcaggca gaagtatgca aagcatgcat ctcaattagt cagcaaccag	300
gtgtggaaag tccccaggct cccagcagg cagaagtatg caaagcatgc atctcaatta	360
gtcagcaacc atagtcccg ccctaactcc gcccatcccg ccctaactc cgcccagttc	420
cgcccattct ccgccccatg gctgactaat tttttttatt tatgcagagg ccgaggccgc	480
ctctgcctct gagctattcc agaagtagtg aggaggcttt tttggaggcc taggcttttg	540

ES 2 611 402 T3

caaaaagctc ccgggagctt gtatatccat tttcggatct gatcaagaga caggatgagg 600
atcgtttcgc atgattgaac aagatggatt gcacgcaggt tctccggccg cttgggtgga 660
gaggctattc ggctatgact gggcacaaca gacaatcggc tgctctgatg ccgccgtggt 720
ccggctgtca gcgcaggggc gcccggttct ttttgtcaag accgacctgt ccggtgccct 780
gaatgaactg caggacgagg cagcgcggct atcgtggctg gccacgacgg gcgttccttg 840
cgcagctgtg ctcgacgttg tcaactgaagc ggggaaggac tggctgctat tgggcgaagt 900
gccggggcag gatctcctgt catctcacct tgctcctgcc gagaaagtat ccatcatggc 960
tgatgcaatg cggcggctgc atacgcttga tccggctacc tgcccattcg accaccaagc 1020
gaaacatcgc atcgagcgag cacgtactcg gatggaagcc ggtcttgctg atcaggatga 1080
tctggacgaa gagcatcagg ggctcgcgcc agccgaactg ttcgccaggc tcaaggcgcg 1140
catgcccgac ggcgaggatc tcgtcgtgac ccatggcgat gcctgcttgc cgaatatcat 1200
ggtggaaaat ggccgctttt ctggattcat cgactgtggc cggctgggtg tggcggaccg 1260
ctatcaggac atagcgttgg ctaccctgga tattgctgaa gagcttggcg gcgaatgggc 1320
tgaccgcttc ctcgtgcttt acggtatcgc cgctcccgat tcgcagcgca tcgccttcta 1380
tcgccttctt gacgagttct tctgagcggg actctggggg tcgcgaaatg accgaccaag 1440
cgacgcccaa cctgccatca cgagatttcg attccaccgc cgccttctat gaaaggttgg 1500
gcttcggaat cgttttccgg gacgccggct ggatgatcct ccagcgcggg gatctcatgc 1560
tgagattctt cgcccacccc aacttgttta ttgcagctta taatggttac aaataaagca 1620
atagcatcac aaatttcaca aataaagcat ttttttcaact gcattctagt tgtggtttgt 1680
ccaaactcat caatgtatct tatcatgtct gtataccgtc gacctctagc tagagcttgg 1740
cgtaatcatg gtcatagetg tttcctgtgt gaaattgtta tccgctcaca attccacaca 1800
acatacgagc cggaagcata aagtgtaaag cctgggggtgc ctaatgagtg agctaactca 1860
cattaattgc gttgcgctca ctgcccgctt tccagtcggg aaacctgtcg tgccagctgc 1920
attaatgaat cggccaacgc gcggggagag gcggtttgcg tattgggcgc tcttccgctt 1980
cctcgtcac tgactcgtg cgctcggtcg ttcggctgcg gcgagcggtg tcagctcact 2040
caaaggcggg aatacgggta tccacagaat caggggataa cgcaggaaag aacatgtgag 2100
caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata 2160
ggctccgccc ccctgacgag catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg tggcgaacc 2220
cgacaggact ataaagatac caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg cgctctcctg 2280
ttccgaccct gccgcttacc ggatacctgt ccgcctttct cccttcggga agcgtggcgc 2340
tttctcaatg ctcacgctgt aggtatctca gttcgggtgta ggtcgttcgc tccaagctgg 2400

ES 2 611 402 T3

gctgtgtgca cgaaccccc gttcagcccc accgctgcgc cttatccggt aactatcgtc 2460
ttgagtccaa cccggtaaaga cacgacttat cgccactggc agcagccact ggtaacagga 2520
ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta cagagttctt gaagtgggtg cctaactacg 2580
gctacactag aaggacagta tttggtatct gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa 2640
aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg ggtttttttg 2700
tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct ttgatctttt 2760
ctacggggtc tgacgctcag tggaacgaaa actcacgta agggattttg gtcgatgagat 2820
tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaa atgaagtttt aaatcaatct 2880
aaagtatata tgagtaaact tggctgaca gttaccaatg cttaatcagt gaggcaccta 2940
tctcagcgat ctgtctatct cgttcatcca tagttgctg actccccgtc gtgtagataa 3000
ctacgatacg ggagggctta ccatctggcc ccagtgctgc aatgataccg cgagaccac 3060
gctcacccgc tccagattta tcagcaataa accagccagc cgggaaggcc gagcgcagaa 3120
gtggtcctgc aactttatcc gcctccatcc agtctattaa ttggtgccgg gaagctagag 3180
taagtagttc gccagttaat agtttgccga acgttggtgc cattgctaca ggcacgtgg 3240
tgtcacgctc gtcgtttgg atggcttcat tcagctccgg tccccaacga tcaaggcgag 3300
ttacatgatc ccccatggtg tgcaaaaaag cggttagctc cttcggctct ccgatcgttg 3360
tcagaagtaa gttggccgca gtggtatcac tcatggttat ggcagcactg cataattctc 3420
ttactgtcat gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca accaagtcat 3480
tctgagaata gtgtatgcgg cgaccgagtt gctcttgccc ggcgtcaata cgggataata 3540
ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct tcggggcgaa 3600
aactctcaag gatcttaccg ctggtgagat ccagttcgat gtaaccact cgtgcacca 3660
actgatcttc agcatctttt actttcacca gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc 3720
aaaatgccgc aaaaaggga ataaggcgca cacggaaatg ttgaatactc atactcttcc 3780
ttttcaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct catgagcgga tacatatttg 3840
aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac 3900
ctgacgtcga cggatcggga gatctcccga tcccctatgg tcgactctca gtacaatctg 3960
ctctgatgcc gcatagttaa gccagtatct gctccctgct tgtgtggtgg aggtcgctga 4020
gtagtgcgag agcaaaatct aagctacaac aaggcaaggc ttgaccgaca attgcatgaa 4080
gaatctgctt agggtaggc gttttgcgct gcttcgcgat gtacgggcca gatatacgcg 4140
ttgacattga ttattgacta gttattaata gtaatcaatt acggggcat tagttcatag 4200
cccatatatg gagttccgag ttacataact tacggtaaat ggcccgcctg gctgaccgcc 4260
caacgacccc cgccattga cgtcaataat gacgtatggt cccatagtaa cgccaatagg 4320

ES 2 611 402 T3

gactttccat tgacgtcaat ggggtggagta tttacggtaa actgcccact tggcagtaca 4380
tcaagtgtat catatgccaa gtacgcccc tattgacgtc aatgacggta aatggccccg 4440
ctggcattat gccagtaca tgacctatg ggactttcct acttggcagt acatctacgt 4500
attagtcatc gctattacca tggatgatgc gttttggcag tacatcaatg ggcgtggata 4560
gcggtttgac tcacggggat ttccaagtct ccacccatt gacgtcaatg ggagtttgtt 4620
ttggcaccaa aatcaacggg actttccaaa atgtcgtaac aactccgcc cattgacgca 4680
aatgggcggt aggcgtgtac ggtgggaggt ctatataagc agagctcgtt tagtgaaccg 4740
tcagatcgcc tggagacgcc atccacgctg ttttgacctc catagaagac accgggaccg 4800
atccagctc cggactctag aggatcgaac cottaagctt ctgcgcgaac ctattttccc 4860
ctcgaacact ttttaagccg tagataaaca ggctgggaca cttcacatga gcgaaaaata 4920
catcgtcacc tgggacatgt tgcagatcca tgcacgtaa ctcgcaagcc gactgatgcc 4980
ttctgaacaa tggaaaggca ttattgccgt aagccgtggc ggtctggtac cggtgggtga 5040
agaccagaaa cagcacctcg aactgagccg cgatattgcc cagcgtttca acgcgctgta 5100
tggcgagatc gatcccgtcg ttttacaacg tcgtgactgg gaaaaccctg gcgttaccca 5160
acttaatcgc cttgcagcac atccccctt cgcagctgg cgtaatagcg aagaggcccg 5220
caccgatcgc ccttcccaac agttgcgcag cctgaatggc gaatggcgtt ttgcctggtt 5280
tccggcacca gaagcgggtc cggaaagctg gctggagtgc gatcttcctg aggccgatac 5340
tgtcgtcgtc ccctcaact ggcagatgca cggttacgat gcgccatct acaccaacgt 5400
gacctatccc attacggtca atccgccgtt tgttcccacg gagaatccga cgggttgta 5460
ctcgtcaca ttaaatggtg atgaaagctg gctacaggaa ggccagacgc gaattatfff 5520
tgatggcgtt aactcggcgt ttcactctgt gtgcaacggg cgtgggtcg gttacggcca 5580
ggacagtcgt ttgccgtctg aatttgacct gagcgcattt ttacgcgccg gagaaaaccg 5640
cctcgcggtg atggtgctgc gctggagtga cggcagttat ctggaagatc aggatatgtg 5700
gcggtatgag gccattttcc gtgacgtctc gttgctgcat aaaccgacta cacaatcag 5760
cgatttccat gttgccactc gctttaatga tgatttcagc cgcgctgtac tggaggctga 5820
agttcagatg tgcggcgagt tgcgtgacta cctacgggta acagtttctt tatggcaggg 5880
tgaaacgcag gtcgccagcg gcaccgcgc tttcggcggg gaaattatcg atgagcgtgg 5940
tggttatgcc gatcgcgtca cactacgtct gaacgtcga aaccgaaac tgtggagcgc 6000
cgaaatcccg aatctctatc gtgcgggtgt tgaactgcac accgccgacg gcacgctgat 6060
tgaagcagaa gcctcgtatg tcggtttccg cgaggtgcgg attgaaaatg gtctgctgct 6120
gctgaacggc aagccgttgc tgattcgagg cgttaaccgt cacgagcatc atcctctgca 6180

ES 2 611 402 T3

tggtcaggtc atggatgagc agacgatggc gcaggatata ctgctgatga agcagaacaa 6240
 ctttaacgcc gtgcgctggt cgcattatcc gaaccatccg ctgtggtaca cgctgtgoga 6300
 ccgctacggc ctgtatgtgg tggatgaagc caatattgaa acccacggca tggtgccaat 6360
 gaatcgtctg accgatgatc cgcgctggct accggcgatg agcgaacgcg taacgcgaat 6420
 ggtgcagcgc gatcgtaatc acccgagtgt gatcatctgg tcgctgggga atgaatcagg 6480
 ccacggcgct aatcacgacg cgctgtatcg ctggatcaaa tctgtcgatc cttcccgcgc 6540
 ggtgcagtat gaaggcggcg gagccgacac cacggccacc gatattatct gcccgatgta 6600
 cgcgcgctg gatgaagacc agcccttccc ggctgtgccg aaatggtcca tcaaaaaatg 6660
 gctttcgcta cctggagaga cgcgcccgcct gatcctttgc gaatacgccc acgcgatggg 6720
 taacagtctt ggcggtttcg ctaaatactg gcaggcgctt cgtcagtatc cccgtttaca 6780
 gggcggcttc gtctgggact gggatgatca gtcgctgatt aaatatgatg aaaacggcaa 6840
 cccgtggtcg gcttacggcg gtgattttgg cgatacgccg aacgatcgcc agttctgtat 6900
 gaacggtctg gtctttgccg accgcacgcc gcatccagcg ctgacggaag caaaacacca 6960
 gcagcagttt ttccagttcc gtttatccgg gcaaaccatc gaagtgacca gcgaatacct 7020
 gttccgtcat agcgataacg agctcctgca ctggatggtg gcgctggatg gtaagccgct 7080
 ggcaagcggc gaagtgcctc tggatgtcgc tccacaaggt aaacagttga ttgaactgcc 7140
 tgaactaccg cagccggaga gcgcccggca actctggctc acagtacgcg tagtgcaacc 7200
 gaacgcgacc gcatggtcag aagccgggca catcagcgcc tggcagcagt ggcgtctggc 7260
 ggaaaacctc agtgtgacgc tccccgccgc gtcccacgcc atcccgcac tgaaccaccg 7320
 cgaaatggat ttttgcatcg agctgggtaa taagcgttgg caatttaacc gccagtcagg 7380
 ctttctttca cagatgtgga ttggcgataa aaaacaactg ctgacgccgc tgcgcatca 7440
 gttcaccctg gcaccgctgg ataacgacat tggcgtaagt gaagcgaccc gcattgaccc 7500
 taacgcctgg gtcgaacgct ggaaggcggc gggccattac caggccgaag cagcgttgtt 7560
 gcagtgcacg gcagatacac ttgctgatgc ggtgctgatt acgaccgctc acgcgtggca 7620
 gcatcagggg aaaaccttat ttatcagccg gaaaacctac cggattgatg gtagtggca 7680
 aatggcgatt accgttgatg ttgaagtggc gagcgataca ccgcatccgg cgcggattgg 7740
 cctgaactgc cagctggcgc aggtagcaga gcgggtaaac tggctcggat tagggccgca 7800
 agaaaactat cccgaccgcc ttactgccgc ctgttttgac cgctgggata tgcattgtc 7860
 agacatgtat accccgtacg tcttcccagc cgaaaacggc ctgcgctgcg ggacgcgca 7920
 attgaattat ggcccacacc agtggcgcgg cgacttccag ttcaacatca gccgctacag 7980
 tcaacagcaa ctgatggaaa ccagccatcg ccatctgctg cacgcggaag aaggcacatg 8040
 gctgaatata gacggtttcc atatggggat tggatggcgac gactcctgga gcccgctcagt 8100

ES 2 611 402 T3

atcggcggaa	ttccagctga	gcgccggtcg	ctaccattac	cagttggtct	ggtgtcaaaa	8160
ataataataa	ccgggcaggc	catgtctgcc	cgtatttcgc	gtaaggaaat	ccattatgta	8220
ctatttaaaa	aacacaaact	ttgggatggt	cggtttattc	tttttctttt	acttttttat	8280
catgggagcc	tacttcccgt	ttttcccgat	ttggctacat	gacatcaacc	atatcagcaa	8340
aagtgatacg	ggtattatth	ttgccgctat	ttctctgttc	tcgctattat	tccaaccgct	8400
gtttggtctg	ctttctgaca	aactcggctc	gagctgtgcc	ttctagttgc	cagccatctg	8460
ttgtttgcc	ctccccctg	ccttccttga	ccctggaagg	tgccactccc	actgtccttt	8520
cctaataaaa	tgaggaaatt	gcatcgcatt	gtctgagtag	gtgtcattct	attctggggg	8580
gtgggggtgg	gcaggacagc	aagggggagg	attgggaaga	caatagcagg	catgctgggg	8640
atgctgggtgg	ctctatggct	tctgagggcg	aaagaaccag	ctggggctct	agctagcata	8700
tacctgcagg	gaattcctaa	acagagcaat	taggtaagaa	aatgaaagaa	aaggtatcca	8760
attatgaagg	aagaagtaaa	actatttcta	tttgcatgag	acatgactgt	atacaaagaa	8820
aatcccaaat	aatccacaca	aaaactagta	gagttaataa	gcaaattcaa	caaatttcag	8880
ggtacaaaat	cagttgtggt	tctatacaca	aaccacaaat	gaacaataaa	aaaaggaaac	8940
taagaaaaca	atctccttta	taataacatc	ccaaagaata	aaatacatgg	gactaaatth	9000
aaccaaggaa	gtgaaagaat	tgtacactaa	aaaccacaaa	taattgctga	ttaaattggaa	9060
agatgtccca	tgttcacgga	tagggatact	taatattggt	aatggcaat	acttcccaaa	9120
gcaatctata	gattcaatgc	aatctctgtc	aaaatttcaa	atggtcttct	ttgctgaaat	9180
ggaaaagcca	atcctaaaat	tcatatgtaa	ttccatagga	tccaaaaaag	caaaaccaat	9240
attgaaatag	aaaaacaaag	ttggagtact	tacacttctc	aatttcaaaa	cttacaagct	9300
acagtaatta	aaacagcatg	gcaaaggcat	aaggatagac	atatggatca	atggaataga	9360
ttcagagtcc	agaaataaac	acaacattta	tggccatttg	atthtttgata	aggattgtca	9420
agggggctct	gaacattcag	tggggaaaga	ataatatctt	caacaagtgg	tgctggaaca	9480
attggatagc	catgtgcaaa	atactctagt	agactcctac	cttatgtcac	atacaataat	9540
taatttaaaa	taaatcaatc	ctaaatataa	gggccaaaac	cataaaactc	ttagaagaaa	9600
acaggcgtaa	tcttcatggt	ttctgatttg	tcaatggatt	cttaaatttg	acaccaaaag	9660
cacaagcaac	aaaagataaa	attgatacat	ttgaatgcat	aaaattthtt	taatttgcac	9720
atgaaatgac	aatatcaaga	aatgaaaag	acaatctgca	gaatgggaga	aatatthtac	9780
aagccacata	tctgataagg	gctgagtatc	cagaatatat	aacaaactct	tccagctcaa	9840
caatgaaaac	aaaaacaacg	caattthtaag	aatgggcaaa	ggacttgaat	caacatttct	9900
ccaaagaaga	tatgcgaata	accagcaaac	acatgaagtg	atgctcaaca	tcattactca	9960

ES 2 611 402 T3

taaaggaaat gtgaatcaaa accatatgac atactacttt acaccatta ggatgaagat 10020
 aataatthta aaataacaag tgtcagcaag gatgcagaga aataggaact ttcctatgtt 10080
 gctgataagc aatgcaaaag gatacaacca ctgtggaaaa cagtttggtg gttccttaaa 10140
 aaattaaaaa taggattatt gtataactca gaaattccaa aagtatatat atttgggtata 10200
 tatccaaaag aactgaaaac atattgttca tgcagaaatt tgtacacaaa tgcttattat 10260
 tgctgcatta gctacaatag ccaaaagatg aaaacaaccc aaatgtccat tgacagatga 10320
 acaataaact tgtggtataa acatacaatg ggaatattat ttttccatca aaaagaacga 10380
 atactggcat gtgctacagc ttgtatgaat ctcagaaaca ttattacaag tgaatgtagc 10440
 cagccacaac aggccatgta ttgtgtgatt ccgtttatat gaaatatcca gaggtggtgg 10500
 ttgcagatth tgaatgtgct aaatgtcact gaattgaata ctttaaaatg gtttaattgta 10560
 tgttatgtga atthttacct aathththta atgggtcata aacttatgtt tagcataatc 10620
 cctththaat thtaaaaaat gcagatatta catgagaaaa aatgtgctag agcatatthc 10680
 aagacattaa agatggttat cagtgaatga tgagaaatta ggtaatgtht attatththc 10740
 cthtgctaaa attatthaaa aathacttgc atathaaatt ththaatgcc taggaaagaa 10800
 agactatagt tgtattgact aagatthcta cgagcatggg gaaaatgctt aaththtagg 10860
 gttaatcaag gataaaataa attgcattgt atgtacaatg tgatcccaag taththaaac 10920
 aactgctta tggtaacagt cagtctgtgg gagacaggtt aaaaagtgat atththccctt 10980
 cctactctcc aaaththctt aacaaacata tattatgact ataatcagaa aaathattht 11040
 thaaaacgtc tactatgggg caagctaggt tcaaaaaata gaagththgat aaththtagt 11100
 ggcttgctat tgacaaggaa gacgththca ctggaatthc ggcccgaatt cthaaacaga 11160
 gcaattaggt aagaaaatga aagaaaaggt atccaattat gaaggaagaa gtaaaactat 11220
 thctatthgc agatgacatg actgtataca aagaaaatcc caaataatcc acacaaaaac 11280
 tagtagagtt aataagcaaa thcaacaaat thcagggtagc aaaatcagtt gtgththctat 11340
 acacaaaccc acaatgaaca ataaaaaaag gaaactaaga aaacaaththc cththataata 11400
 acatcccaaa gaataaaata catgggacta aaththacca aggaagtga agaaththtagc 11460
 actaaaaacc acaataaatt gctgattaaa tggaaagatg tcccatgthc acggataggg 11520
 atacttaata thgtthaaatg gcaatactthc ccaaagcaat ctatagatthc aatgcaatct 11580
 ctgtcaaaat thcaaatggt cthctththgt gaaatggaaa agccaatctt aaaththcata 11640
 tgtaattcca taggatccaa aaaagcaaaa ccaatattga aatagaaaaa caaagththga 11700
 gtacttacac thctcaathth caaaactthc aagctacagt aaththaaaca gcatggcaaa 11760
 ggcataagga tagacatatg gatcaatgga atagattcag agtccagaaa thaaacacaac 11820
 atthtatggcc atththgathth tgataaggat tgtcaagggg gtctthgaaca thcagththggg 11880

ES 2 611 402 T3

aaagaataat	atcttcaaca	agtggtgctg	gaacaattgg	atagccatgt	gcaaaatact	11940
ctagtagact	cctaccttat	gtcacatata	ataattaatt	taaaataaat	caatcctaaa	12000
tataagggcc	aaaaccataa	aactcttaga	agaaaacagg	cgtaatcttc	atggtttctg	12060
atttgtcaat	ggattcttaa	atttgacacc	aaaagcacia	gcaacaaaag	ataaaattga	12120
tacatttgaa	tgcataaaat	ttttttaatt	tgccatgaa	atgacaatat	caagaaaatg	12180
aaaagacaat	ctgcagaatg	ggagaaaata	tttacaagcc	acatatctga	taagggctga	12240
gtatccagaa	tatatacaa	actcttcag	ctcaacaatg	aaaacaaaa	caacgcaatt	12300
ttaagaatgg	gcaaaggact	tgaatcaaca	tttctccaaa	gaagatatgc	gaataaccag	12360
caaacacatg	aagtgatgct	caacatcatt	actcataaag	gaaatgtgaa	tcaaaacat	12420
atgacatact	actttacacc	cattaggatg	aagataataa	ttttaaaata	acaagtgtca	12480
gcaaggatgc	agagaaatag	gaactttcct	atggtgctga	taagcaatgc	aaaaggatac	12540
aaccactgtg	gaaaacagtt	tggtggttcc	ttaaaaaatt	aaaaatagga	ttattgtata	12600
actcagaaat	tccaaaagta	tatatatttg	gtatatatcc	aaaagaactg	aaaacatatt	12660
gttcatgcag	aaatttgtac	acaatgctt	attattgctg	cattagctac	aatagccaaa	12720
agatgaaaac	aacccaaag	tccattgaca	gatgaacaaa	taacttgtgg	tataaacata	12780
caatgggaat	attatttttc	catcaaaaag	aacgaatact	ggcatgtgct	acagcttgta	12840
tgaatctcag	aaacattatt	acaagtgaat	gtagccagcc	acaacaggcc	atgtattgtg	12900
tgattccggt	tatatgaaat	atccagaggt	ggtggttgca	gattttgaat	gtgctaaatg	12960
tcaactgaatt	gaatacttta	aatgggttaa	ttgtatgtta	tgtgaatfff	acctcaatff	13020
tttaaatggg	tcataaactt	atgttttagca	taatcccctt	ttaattttaa	aaaatgcaga	13080
tattacatga	gaaaaaatgt	gctagagcat	atftcaagac	attaaagatg	gttatcagtg	13140
aatgatgaga	aattaggtaa	tgtttattat	tttcgctttg	ctaaaattat	ttaaaaatta	13200
cttgcatatt	aaatftttta	atgcctagga	aagaaagact	atagttgtat	tgactaagat	13260
ttctacgagc	atggggaaaa	tgcttaatft	gtaggggttaa	tcaaggataa	aataaattgc	13320
attgtatgta	caatgtgatc	ccaagtatft	aaaacacact	gcttatggta	acagtcagtc	13380
tgtgggagac	aggftaaaaa	gtgatatftt	cccttccctac	tctccaaatt	ttcttaacaa	13440
acatatatta	tgactataat	cagaaaaaat	tatfttttaa	acgtctacta	tggggcaagc	13500
taggttcaaa	aatagaagt	ttgataaatg	tagttggctt	gctattgaca	aggaagacgt	13560
ttacactgga	attcggccat	catggccata	tagcgatcgc	tatatgctag	cgataacaat	13620
ttcacacagg	aacagctat	gacatgatt	acgccaagct	ctagctagag	gtcgacggta	13680
atggcagggc	ctgccgcccc	gacgttggct	gogagccctg	ggccttcacc	cgaacttggg	13740

ES 2 611 402 T3

ggggtggggtg gggaaaagga agaaacgcgg gcgtattggc cccaatgggg tctcgggtggg 13800
 gtatcgacag agtgccagcc ctgggaccga accccgcggt tatgaacaaa cgaccaaca 13860
 cccgtgcggt ttattctgtc tttttattgc cgtcatagcg cgggttcctt ccggtattgt 13920
 ctcttccgt gtttcagtta gcctccccg tttaaactca ttactaaccg gttttagtct 13980
 ttcttctcgt agacttcaaa cttatacttg atgccttttt cctcctggac ctgagagagg 14040
 acgcctgggt attctgggag aagtttataat ttccccaaat caatttctgg gaaaaacgtg 14100
 tcactttcaa attcctgcat gatccttgtc acaaagagtc tgaggtggcc tggttgatcc 14160
 atggcttcct ggtaaacaga actgcctccg actatccaaa ccatgtctac tttacttgcc 14220
 aattccggtt gttcaataag tcttaaggca tcatccaaac ttttggcaag aaaatgagct 14280
 cctcgtggtg gttctttgag ttctctactg agaactatat taattctgtc ctttaaaggt 14340
 cgattcttct caggaatgga gaaccaggtt ttctaccca taatcaccag attctgttta 14400
 ccttccactg aagaggttgt ggtcattctt tggaagtact tgaactcgtt cctgagcgga 14460
 ggccagggta ggtctccggt cttgccaatc cccatatttt gggacacggc gacgatgcag 14520
 ttcaatggtc gaaccatgat ggcgcgaaac gatcctcatc ctgtctcttg atcagatccg 14580
 aaaatggata tacaagctcc cgggagcttt ttgcaaaagc ctaggcctcc aaaaaagcct 14640
 cctcactact tctggaatag ctgagaggca gaggcggcct cggcctctgc ataaataaaa 14700
 aaaattagtc agccatgggg cggagaatgg gcggaactgg gcggagttag gggcgggatg 14760
 ggcggagtta ggggcgggac tatggttgct gactaattga gatgcatgct ttgcatactt 14820
 ctgcctgctg gggagcctgg ggactttcca caccctaact gacacacatt ccacag 14876

<210> 3

<211> 17311

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vector pCLS09G1f3

<220>

<221> gen

10 <222> (3926)..(6354)

<220>

<221> promotor

<222> (6575)..(7269)

<220>

<221> gen

<222> (7372)..(10599)

<220>

5 <221> gen

<222> (10651)..(10853)

<220>

<221> gen

<222> (11146)..(13574)

10 <220>

<221> gen

<222> (13581)..(16009)

<400> 3

ES 2 611 402 T3

cacgtagtgg gccatcgccc tgatagacgg tttttcgccc tttgacgttg gagtccacgt	60
tctttaatag tggactcttg ttccaaactg gaacaacact caaccctatc tcggtctatt	120
cttttgattt ataagggatt ttggggattt cggcctattg gttaaaaaat gagctgattt	180
aacaaaaatt taacgcgaat taattctgtg gaatgtgtgt cagttagggt gtggaaagtc	240
cccaggctcc ccagcaggca gaagtatgca aagcatgcat ctcaattagt cagcaaccag	300
gtgtggaaag tccccaggct ccccagcagg cagaagtatg caaagcatgc atctcaatta	360
gtcagcaacc atagtcccgc ccctaactcc gcccatcccg ccctaactc cgcccagttc	420
cgcccattct ccgccccatg gctgactaat tttttttatt tatgcagagg ccgaggccgc	480
ctctgcctct gagctattcc agaagtagtg aggaggcttt tttggaggcc taggcttttg	540
caaaaagctc ccgggagctt gtatatccat tttcggatct gatcaagaga caggatgagg	600
atcgtttcgc atgattgaac aagatggatt gcacgcaggt tctccggccg cttgggtgga	660
gaggctattc ggctatgact gggcacaaca gacaatcggc tgctctgatg ccgccgtggt	720
ccggctgtca gcgcaggggc gcccggttct ttttgtcaag accgacctgt ccggtgcctt	780
gaatgaactg caggacgagg cagcgcggct atcgtggctg gccacgacgg gcgttccttg	840
cgcagctgtg ctcgacgttg tcaactgaagc ggggaaggac tggctgctat tgggcgaagt	900
gccggggcag gatctcctgt catctcacct tgctcctgcc gagaaagtat ccatcatggc	960
tgatgcaatg cggcggctgc atacgcttga tccggctacc tgcccattcg accaccaagc	1020
gaaacatcgc atcgagcgag cacgtactcg gatggaagcc ggtcttgtcg atcaggatga	1080
tctggacgaa gagcatcagg ggctcgcgcc agccgaactg ttcgccaggc tcaaggcgcg	1140
catgcccgac ggcgaggatc tcgtcgtgac ccatggcgat gcctgcttgc cgaatatcat	1200
ggtggaaaat ggccgctttt ctggattcat cgactgtggc cggctgggtg tggcggaccg	1260
ctatcaggac atagcgttgg ctaccctgga tattgctgaa gagcttggcg gcgaatgggc	1320
tgaccgcttc ctcgtgcttt acggtatcgc cgctccgat tcgcagcgca tcgccttcta	1380
tcgccttctt gacgagttct tctgagcggg actctggggt tcgcgaaatg accgaccaag	1440
cgacgcccaa cctgccatca cgagatttcg attccaccgc cgccttctat gaaaggttgg	1500
gcttcggaat cgttttccgg gacgccggct ggatgatcct ccagcgcggg gatctcatgc	1560
tggagttctt cgcccacccc aacttgttta ttgcagctta taatggttac aaataagca	1620

ES 2 611 402 T3

atagcatcac	aaatttcaca	aataaagcat	ttttttcact	gcattctagt	tgtggtttgt	1680
ccaaactcat	caatgtatct	tatcatgtct	gtataaccgtc	gacctctagc	tagagcttgg	1740
cgtaatcatg	gtcatagctg	tttctgtgt	gaaattgtta	tccgctcaca	attccacaca	1800
acatacgagc	cggaagcata	aagtgtaaag	cctgggggtgc	ctaatgagtg	agctaactca	1860
cattaattgc	gttgcgctca	ctgcccgctt	tccagtcggg	aaacctgtcg	tgccagctgc	1920
attaatgaat	cggccaacgc	gcggggagag	gcggtttgcg	tattgggcgc	tcttccgctt	1980
cctcgctcac	tgactcgctg	cgctcggtcg	ttcggctgcg	gcgagcggta	tcagctcact	2040
caaaggcgg	aatacggtta	tccacagaat	caggggataa	cgcaggaaag	aacatgtgag	2100
caaaaggcca	gcaaaaggcc	aggaaccgta	aaaaggccgc	gttgcctggcg	ttttccata	2160
ggctccgccc	ccctgacgag	catcacaaaa	atcgacgctc	aagtcagagg	tgccgaaacc	2220
cgacaggact	ataaagatac	caggcgtttc	cccctggaag	ctccctcgtg	cgctctcctg	2280
ttccgaccct	gccgcttacc	ggatacctgt	ccgcctttct	cccttcggga	agcgtggcgc	2340
tttctcaatg	ctcacgctgt	aggtatctca	gttcggtgta	ggtcgttcgc	tccaagctgg	2400
gctgtgtgca	cgaaccccc	gttcagccc	accgctgcg	cttatccggt	aactatcgtc	2460
ttgagtccaa	cccgtaaga	cacgacttat	cgccactggc	agcagccact	ggtaacagga	2520
ttagcagagc	gaggtatgta	ggcggtgcta	cagagttctt	gaagtggagg	cctaactacg	2580
gctacactag	aaggacagta	tttggtatct	gogctctgct	gaagccagtt	accttcggaa	2640
aaagagttgg	tagctcttga	tccggcaaac	aaaccaccgc	tggtagcgg	ggtttttttg	2700
tttgcaagca	gcagattacg	cgcagaaaaa	aaggatctca	agaagatcct	ttgatctttt	2760
ctacggggtc	tgacgctcag	tggaacgaaa	actcacgtta	agggattttg	gtcatgagat	2820
tatcaaaaag	gatcttcacc	tagatccttt	taaattaa	atgaagtttt	aatcaatct	2880
aaagtatata	tgagtaaact	tggtctgaca	gttaccaatg	cttaatcagt	gaggcaccta	2940
tctcagcgat	ctgtctat	cgttcatcca	tagttgcctg	actccccgtc	gtgtagataa	3000
ctacgatacg	ggagggctta	ccatctggcc	ccagtgctgc	aatgataccg	cgagaccac	3060
gctcaccggc	tccagattta	tcagcaataa	accagccagc	cggaagggcc	gagcgcagaa	3120
gtggtcctgc	aactttatcc	gcctccatcc	agtctattaa	ttggtgccgg	gaagctagag	3180
taagtagttc	gccagttaat	agtttgcgca	acgttggtgc	cattgctaca	ggcatcgtgg	3240
tgtcacgctc	gtcgtttgg	atggcttcat	tcagctccgg	ttcccaacga	tcaaggcgag	3300
ttacatgatc	ccccatggtg	tgcaaaaaag	cggttagctc	cttcggtcct	ccgatcgttg	3360
tcagaagtaa	gttggccgca	gtgttatcac	tcatggttat	ggcagcactg	cataattctc	3420
ttactgtcat	gccatccgta	agatgctttt	ctgtgactgg	tgagtactca	accaagtc	3480

ES 2 611 402 T3

tctgagaata gtgtatgCGG cgaccgagtt gctcttgccc ggcgtcaata cgggataata 3540
 ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct tCGGGGCGAA 3600
 aactctcaag gatcttaccg ctggtgagat ccagttcgat gtaaccact cgtgcacca 3660
 actgatcttc agcatctttt actttcacca gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc 3720
 aaaatgccgc aaaaaaggga ataagggcga cacggaaatg ttgaatactc atactcttcc 3780
 tttttcaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct catgagcggga tacatatttg 3840
 aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac 3900
 ctgacgtcga cggatcggga gatctgaatt cctaaacaga gcaattaggT aagaaaatga 3960
 aagaaaaggT atccaattat gaaggaagaa gtaaaactat ttctatttgc agatgacatg 4020
 actgtataca aagaaaatcc caaataatcc acacaaaaac tagtagagtt aataagcaaa 4080
 ttcaacaaat ttcagggtac aaaatcagtt gtgtttctat acacaaacc acaatgaaca 4140
 ataaaaaag gaaactaaga aaacaatttc ctttataata acatcccaa gaataaaata 4200
 catgggacta aatttaacca aggaagtga agaattgtac actaaaaacc acaataatt 4260
 gctgattaaa tggaaagatg tcccatgttc acggataggg atacttaata ttgttaaagT 4320
 gcaatacttc ccaaagcaat ctatagattc aatgcaatct ctgtcaaaat ttcaaagT 4380
 cttctttgct gaaatgaaa agccaatcct aaaattcata tgtaattcca taggatccaa 4440
 aaaagcaaaa ccaatattga aatagaaaa caaagttgga gtacttacac ttctcaattt 4500
 caaaacttac aagctacagT aattaaaca gcatggcaaa ggcataagga tagacatatg 4560
 gatcaatgga atagattcag agtccagaaa taaacacaac atttatggcc atttgatTTT 4620
 tgataaggat tgtcaagggg gtcttgaaca ttcagtgggg aaagaataat atcttcaaca 4680
 agtggTgctg gaacaattgg atagccatgt gcaaaatact ctagtagact cctaccttat 4740
 gtcacataca ataattaatt taaaataaat caatcctaaa tataagggcc aaaaccataa 4800
 aactcttaga agaaaacagc cgtaatcttc atggtttctg atttgtcaat ggattcttaa 4860
 atttgacacc aaaagcacia gcaacaaaag ataaaattga tacatttgaa tgcataaaat 4920
 ttttttaatt tgcacatgaa atgacaatat caagaaaatg aaaagacaat ctgcagaatg 4980
 ggagaaaata tttacaagcc acatatctga taagggctga gtatccagaa tatataacaa 5040
 actcttccag ctcaacaatg aaaacaaaa caacgcaatt ttaagaatgg gcaaaggact 5100
 tgaatcaaca tttctccaaa gaagatatgc gaataaccag caaacacatg aagtgatgct 5160
 caacatcatt actcataaag gaaatgtgaa tcaaaacat atgacatact actttacacc 5220
 cattaggatg aagataataa ttttaaaata acaagtgtca gcaaggatgc agagaaatag 5280
 gaactttcct atgttgctga taagcaatgc aaaaggatac aaccactgtg gaaaacagtt 5340
 tggtggttcc ttaaaaaatt aaaaatagga ttattgtata actcagaat tccaaaagta 5400

ES 2 611 402 T3

tatatatttg	gtatatatcc	aaaagaactg	aaaacatatt	gttcatgcag	aaatttgtac	5460
acaaatgctt	attattgctg	cattagctac	aatagccaaa	agatgaaaac	aaccCAAatg	5520
tccattgaca	gatgaacaaa	taacttgtgg	tataaacata	caatgggaat	attatTTTTc	5580
catcaaaaag	aacgaatact	ggcatgtgct	acagcttgta	tgaatctcag	aaacattatt	5640
acaagtgaat	gtagccagcc	acaacaggcc	atgtattgtg	tgattccggt	tatatgaaat	5700
atccagaggt	ggtggttgca	gattttgaat	gtgctaaatg	tactgaatt	gaatacttta	5760
aatggttaa	ttgatgtta	tgtgaatTTT	acctcaattt	tttaaatggg	tcataaactt	5820
atgtttagca	taatcccctt	ttaattttaa	aaaatgcaga	tattacatga	gaaaaaatgt	5880
gctagagcat	atttcaagac	attaaagatg	gttatcagtg	aatgatgaga	aattaggtaa	5940
tgtttattat	tttcgctttg	ctaaaattat	ttaaaaatta	cttgcatatt	aaatttttta	6000
atgcctagga	aagaaagact	atagttgtat	tgactaagat	ttctacgagc	atggggaaaa	6060
tgcttaatTT	gtagggttaa	tcaaggataa	aataaattgc	attgtatgta	caatgtgatc	6120
ccaagtatTT	aaaacacact	gcttatggta	acagtcagtc	tgtgggagac	aggTTaaaa	6180
gtgatatTTT	cccttcctac	tctccaaatt	ttcttaacaa	acatatatta	tgactataat	6240
cagaaaaaat	tatttttaaa	acgtctacta	tggggcaagc	taggttcaaa	aatagaagt	6300
ttgataaatg	tagttggctt	gctattgaca	aggaagacgt	ttacactgga	attcagatct	6360
ccgatcccc	tatggtcgac	tctcagtaca	atctgctctg	atgccgcata	gTTaagccag	6420
tatctgctcc	ctgcttgtgt	gttgagggtc	gctgagtagt	gcgcgagcaa	aatttaagct	6480
acaacaaggc	aaggcttgac	cgacaattgc	atgaagaatc	tgcttagggT	taggcgTTTT	6540
gcgctgcttc	gcgatgtacg	ggccagatat	acgcgttgac	attgattatt	gactagttat	6600
taatagtaat	caattacggg	gtcattagtt	catagcccat	atatggagtt	ccgcgTTaca	6660
taacttacgg	taaatggccc	gcctggctga	ccgcccaacg	acccccgcc	attgacgtca	6720
ataatgacgt	atgttcccat	agtaacgcca	atagggactt	tccattgacg	tcaatgggtg	6780
gagtattttac	ggtaaactgc	ccacttggca	gtacatcaag	tgatcatat	gccaaGTacg	6840
ccccctattg	acgtcaatga	cggtaaatgg	cccgcctggc	attatgcca	gtacatgacc	6900
ttatgggact	ttcctacttg	gcagtacatc	tacgtattag	tcatcgctat	taccatggTg	6960
atgcggTTTT	ggcagtacat	caatgggcgt	ggatagcggT	ttgactcacg	gggatttcca	7020
agtctccacc	ccattgacgt	caatgggagT	ttgttttggc	acaaaaatca	acgggacttt	7080
ccaaaatgtc	gtaacaactc	cgccccattg	acgcaaatgg	gcggtaggcg	tgtacggTgg	7140
gaggTctata	taagcagagc	tcgtttagTg	aaccgtcaga	tcgcctggag	acgccatcca	7200
cgctgTTTTg	acctccatag	aagacaccgg	gaccgatcca	gcctccggac	tctagaggat	7260

ES 2 611 402 T3

cgaaccctta agcttctcgc gcaacctatt ttcccctcga acacttttta agccgtagat 7320
 aaacaggctg ggacacttca catgagcga aaatacatcg tcacctggga catgttgcag 7380
 atccatgcac gtaaactcgc aagccgactg atgccttctg aacaatggaa aggcattatt 7440
 gccgtaagcc gtggcggctt ggtaccggtg ggtgaagacc agaaacagca cctcgaactg 7500
 agccgcgata ttgcccagcg tttcaacgcg ctgtatggcg agatcgatcc cgtcgtttta 7560
 caacgtcgtg actgggaaaa ccctggcggtt acccaactta atcgccttgc agcacatccc 7620
 cctttcgcca gctggcgtaa tagcgaagag gcccgaccg atcgccttc ccaacagttg 7680
 cgcagcctga atggcgaatg gcgctttgcc tggtttccgg caccagaagc ggtgccggaa 7740
 agctggctgg agtgcgatct tcctgaggcc gatactgtcg tcgtcccctc aaactggcag 7800
 atgcacggtt acgatgcgcc catctacacc aacgtgacct atcccattac ggtcaatccg 7860
 ccgtttgttc ccacggagaa tccgacgggt tgttactcgc tcacattta tgttgatgaa 7920
 agctggctac aggaaggcca gacgcgaatt atttttgatg gcgttaactc ggcgtttcat 7980
 ctgtggtgca acgggcgctg ggtcggttac ggccaggaca gtcgtttgcc gtctgaattt 8040
 gacctgagcg cttttttacg cgcgggagaa aaccgcctcg cggatgatggt gctgcgctgg 8100
 agtgacggca gttatctgga agatcaggat atgtggcgga tgagcggcat tttccgtgac 8160
 gtctcgttgc tgcataaacc gactacacaa atcagcgatt tccatggtgc cactcgcttt 8220
 aatgatgatt tcagccgcgc tgtactggag gctgaagttc agatgtgcgg cgagttgcgt 8280
 gactacctac gggtaacagt ttctttatgg cagggtgaaa cgcaggctgc cagcggcacc 8340
 gcgcctttcg gcggtgaaat tatcgatgag cgtggtggtt atgccgatcg cgtcacacta 8400
 cgtctgaacg tcgaaaacc gaaactgtgg agcgcgaaa tcccgaatct ctatcgtgcg 8460
 gtggttgaac tgcacaccgc cgacggcacg ctgattgaag cagaagcctg cgatgtcgg 8520
 ttccgcgagg tgcggattga aaatggtctg ctgctgctga acggcaagcc gttgctgatt 8580
 cgaggcgta accgtcacga gcatcatcct ctgcatggtc aggtcatgga tgagcagacg 8640
 atggtgcagg atatcctgct gatgaagcag aacaacttta acgccgtgcg ctgttcgcat 8700
 tatccgaacc atccgctgtg gtacacgctg tgcgaccgct acggcctgta tgtggtggat 8760
 gaagccaata ttgaaacca cggcatggtg ccaatgaatc gtctgaccga tgatccgcgc 8820
 tggctaccgg cgatgagcga acgcgtaacg cgaatggtgc agcgcgatcg taatcaccgg 8880
 agtgtgatca tctggtcgtt ggggaatgaa tcaggccacg gcgctaata caacgcgctg 8940
 tatcgctgga tcaaactctgt cgatccttcc cgcgggtgc agtatgaagg cggcggagcc 9000
 gacaccacgg ccaccgatat ttttgcccg atgtacgcgc gcgtggatga agaccagccc 9060
 ttccggctg tgcgaaatg gtccatcaaa aaatggcttt cgctacctgg agagacgcgc 9120
 ccgctgatcc tttgcgaata cgcaccgcg atgggtaaca gtcttggcgg tttcgctaaa 9180

ES 2 611 402 T3

tactggcagc cgtttcgtca gtatccccgt ttacagggcg gcttcgtctg ggactgggtg 9240
gatcagtcgc tgattaaata tgatgaaaac ggcaaccctg ggtcggctta cggcgggtgat 9300
tttggcgata cgccgaacga tcgccagttc tgtatgaacg gtctggctct tgccgaccgc 9360
acgccgcatc cagcgtgac ggaagcaaaa caccagcagc agtttttcca gttccgttta 9420
tccgggcaaaa ccatcgaagt gaccagcgaa tacctgttcc gtcatacgca taacgagctc 9480
ctgcactgga tggtagcgct ggatggtaag ccgctggcaa gcggtgaagt gcctctggat 9540
gtcgtctccac aaggtaaaca gttgattgaa ctgcctgaac taccgcagcc ggagagcgcc 9600
gggcaactct ggctcacagt acgcgtagtg caaccgaacg cgaccgcatg gtcagaagcc 9660
gggcacatca gcgcctggca gcagtggcgt ctggcgghaaa acctcagtgt gacgctcccc 9720
gccgctccc acgccatccc gcatctgacc accagcgaaa tggatttttg catcgagctg 9780
ggtaataagc gttggcaatt taaccgccag tcaggctttc tttcacagat gtggattggc 9840
gataaaaaac aactgctgac gccgctgccc gatcagttca cccgtgcacc gctggataac 9900
gacattggcg taagtgaagc gaccgcatt gaccctaacg cctgggtcga acgctggaag 9960
gcggcgggccc attaccaggc cgaagcagcg ttggtgcagt gcacggcaga tacacttgct 10020
gatgcggtgc tgattacgac cgctcacgcg tggcagcatc aggggaaaac cttatttatc 10080
agccggaaaa cctaccgat tgatggtagt ggtcaaatgg cgattaccgt tgatggtgaa 10140
gtggcgagcg atacaccgca tccggcggcg attggcctga actgccagct ggcgcaggtg 10200
gcagagcggg taaactggct cggattaggc ccgcaagaaa actatcccga ccgccttact 10260
gccgcctggt ttgaccgctg ggatctgcca ttgtcagaca tgtatacccc gtacgtcttc 10320
ccgagcgaaa acggtctgcg ctgcgggacg cggaattga attatggccc acaccagtgg 10380
cgcgcgact tccagttcaa catcagccgc tacagtcaac agcaactgat ggaaaccagc 10440
catcgccatc tgctgcacgc ggaagaaggc acatggctga atatcgacgg tttccatag 10500
gggattggtg gcgacgactc ctggagcccg tcagtatcgg cggaattcca gctgagcgcc 10560
ggtcgtctacc attaccagtt ggtctggtgt caaaaataat aataaccggg caggccatgt 10620
ctgcccgtat ttcgctgaag gaaatccatt atgtactatt taaaaaacac aaacttttgg 10680
atgttcggtt tattcttttt cttttacttt tttatcatgg gagcctactt cccgtttttc 10740
ccgatttggc tacatgacat caaccatata agcaaaaagt atacgggtat tatttttggc 10800
gctattttctc tgttctcgct attattccaa ccgctgtttg gtctgctttc tgacaaactc 10860
ggctcgagct gtgccttcta gttgccagcc atctgttgtt tgcccctccc ccgtgccttc 10920
cttgaccctg gaaggtgcca ctcccactgt cctttcctaa taaaatgagg aaattgcatc 10980
gcattgtctg agtaggtgtc attctattct ggggggtggg gtggggcagg acagcaaggg 11040

ES 2 611 402 T3

ggaggattgg gaagacaata gcaggcatgc tggggatgcg gtgggctcta tggcttctga 11100
 ggcggaaaga accagctggg gctctagcta gcatatacct gcagggaatt cctaaacaga 11160
 gcaattaggt aagaaaatga aagaaaaggt atccaattat gaaggaagaa gtaaaactat 11220
 ttctatttgc agatgacatg actgtataca aagaaaatcc caaataatcc acacaaaaac 11280
 tagtagagtt aataagcaaa ttcaacaaat ttcagggtac aaaatcagtt gtgtttctat 11340
 acacaaaacc acaatgaaca ataaaaaaag gaaactaaga aaacaatttc ctttataata 11400
 acatcccaaa gaataaaata catgggacta aatttaacca aggaagtga agaattgtac 11460
 actaaaaacc acaaataatt gctgattaaa tggaaagatg tcccatgttc acggataggg 11520
 atacttaata ttgttaaag gcaatacttc ccaaagcaat ctatagattc aatgcaatct 11580
 ctgtcaaaat ttcaaatggt cttctttgct gaaatggaaa agccaatcct aaaattcata 11640
 tgtaattcca taggatccaa aaaagcaaaa ccaatattga aatagaaaaa caaagttgga 11700
 gtacttacac ttctcaattt caaaacttac aagctacagt aattaaaca gcatggcaaa 11760
 ggcataagga tagacatatg gatcaatgga atagattcag agtccagaaa taaacacaac 11820
 atttatggcc atttgatttt tgataaggat tgtcaagggg gtcttgaaca ttcagtgggg 11880
 aaagaataat atcttcaaca agtggtgctg gaacaattgg atagccatgt gcaaaatact 11940
 ctagtagact cctaccttat gtcacataca ataattaatt taaaataaat caatcctaaa 12000
 tataagggcc aaaaccataa aactcttaga agaaaacagc cgtaatcttc atggtttctg 12060
 atttgtcaat ggattcttaa atttgacacc aaaagcacia gcaacaaaag ataaaattga 12120
 tacatttgaa tgcataaaat ttttttaatt tgcacatgaa atgacaatat caagaaaatg 12180
 aaaagacaat ctgcagaatg ggagaaaata tttacaagcc acatatctga taagggctga 12240
 gtatccagaa tatatacaa actcttccag ctcaacaatg aaaacaaaaa caacgcaatt 12300
 ttaagaatgg gcaaaggact tgaatcaaca tttctccaaa gaagatatgc gaataaccag 12360
 caaacacatg aagtgatgct caacatcatt actcataaag gaaatgtgaa tcaaaacct 12420
 atgacatact actttacacc cattaggatg aagataataa ttttaaata acaagtgtca 12480
 gcaaggatgc agagaaatag gaactttcct atgttgctga taagcaatgc aaaaggatac 12540
 aaccactgtg gaaaacagtt tggtggttcc ttaaaaaatt aaaaatagga ttattgtata 12600
 actcagaaat tccaaaagta tatatatttg gtatatatcc aaaagaactg aaaacatatt 12660
 gttcatgcag aaatttgtac acaaatgctt attattgctg cattagctac aatagccaaa 12720
 agatgaaaac aacccaaatg tccattgaca gatgaacaaa taacttgtgg tataaacata 12780
 caatgggaat attatttttc catcaaaaag aacgaatact ggcatgtgct acagcttgta 12840
 tgaatctcag aaacattatt acaagtgaat gtagccagcc acaacaggcc atgtattgtg 12900
 tgattccgtt tatatgaaat atccagaggt ggtggttgca gattttgaat gtgctaaatg 12960

ES 2 611 402 T3

tcaactgaatt	gaataacttta	aaatggttaa	ttgtatgta	tgtgaatfff	acctcaatff	13020
tttaaatggg	tcataaactt	atgtttagca	taatcccctt	ttaatffftaa	aaaatgcaga	13080
tattacatga	gaaaaaatgt	gctagagcat	atffcaagac	attaaagatg	gffatcagtg	13140
aatgatgaga	aattaggtaa	tgffftattat	fffcgctffg	ctaaaattat	ffaaaaatta	13200
cttgcatatt	aaatffftta	atgcctagga	aagaaagact	atagffgtat	tgactaagat	13260
ttctacgagc	atggggaaaa	tgcttaatff	gtagggftaa	tcaaggataa	aataaattgc	13320
attgtatgta	caatgtgatc	ccaagtatff	aaaacacact	gcttatggta	acagfcagfc	13380
tgtgggagac	aggftaaaaa	gtgatatffft	cccttcctac	tctccaaatt	ffcttaacaa	13440
acatatatta	tgactataat	cagaaaaaat	tatfffttaa	acgtctacta	tggggcaagc	13500
taggffcaaa	aaatagaagt	ffgataaatg	tagffggctt	gctatfgaca	aggaagacgt	13560
ttacactgga	atfcgggccc	gaatfcctaa	acagagcaat	taggtaagaa	aatgaaagaa	13620
aaggffatcca	attatgaagg	aagaagtaaa	actatffctta	fffgcagatg	acatgactgt	13680
atacaaagaa	aatcccaaat	aatccacaca	aaaactagta	gagfftaataa	gcaaattcaa	13740
caaatffcag	ggtacaaaaat	cagffgtgff	tctatacaca	aaccacaaat	gaacaataaa	13800
aaaaggaaac	taagaaaaca	atffcctffta	taataacatc	ccaaagaata	aaatacatgg	13860
gactaaatff	aaccaaggaa	gtgaaagaat	gttactactaa	aaaccacaaa	taattgctga	13920
ffaaatggaa	agatgtccca	gtffcacgga	tagggatact	taatattgff	aaatggcaat	13980
actffccaaa	gcaatctata	gattcaatgc	aatctctgtc	aaaatffcaa	atggfcctct	14040
ffgctgaaat	ggaaaagcca	atcctaaaaat	tcatatgtaa	ffccatagga	ffcaaaaaag	14100
caaaaccaat	attgaaatag	aaaaacaaag	ffggagfacct	tacactfftc	aatffcaaaa	14160
cttacaagct	acagtaatta	aaacagcatg	gcaaaggcat	aaggatagac	atatggatca	14220
atggaataga	ffcagagfcc	agaaataaac	acaacatffta	tgfccattffg	atfffttgata	14280
aggatffgca	agggggffctt	gaacatffcag	tggggaaaga	ataatatctt	caacaagffg	14340
tgctggaaca	atffgatagc	catgtgcaaa	atactctagt	agactccctac	cttatgtcac	14400
atacaataat	taatfftaaaa	taaatcaatc	ctaaatataa	gggccaaaaac	cataaaactc	14460
fftagaagaaa	acaggcgtaa	tctffcatggf	ffctgattffg	ffcaatggatt	cttaaatffg	14520
acacccaaaag	cacaagcaac	aaaagataaa	atffgatacat	ffgaaatgcat	aaaatffftff	14580
taatfffgcac	atgaaatgac	aatatcaaga	aaatgaaaag	acaatctgca	gaatggggaga	14640
aaatatfftac	aagccacata	tctgataagg	gctgagfatac	cagaatatat	aacaaactct	14700
ffccagctcaa	caatgaaaac	aaaaacaacg	caatffftaag	aatgggcaaa	ggactffgaaat	14760
caacatffct	ccaaagaaga	tatgcgaata	accagcaaac	acatgaaagf	atgctcaaca	14820

ES 2 611 402 T3

tcattactca	taaaggaaat	gtgaatcaaa	accatatgac	atactacttt	acaccatta	14880
ggatgaagat	aataatttta	aaataacaag	tgtcagcaag	gatgcagaga	aataggaact	14940
ttcctatggt	gctgataagc	aatgcaaaag	gatacaacca	ctgtggaaaa	cagtttggtg	15000
gttccttaaa	aaattaataa	taggattatt	gtataactca	gaaattccaa	aagtatatat	15060
atttggtata	tatccaaaag	aactgaaaac	atattggtca	tgcagaaatt	tgtacacaaa	15120
tgcttattat	tgctgcatta	gctacaatag	ccaaaagatg	aaaacaaccc	aatgtccat	15180
tgacagatga	acaataaact	tgtggtataa	acatacaatg	ggaatattat	ttttccatca	15240
aaaagaacga	atactggcat	gtgctacagc	ttgtatgaat	ctcagaaaca	ttattacaag	15300
tgaatgtagc	cagccacaac	aggccatgta	ttgtgtgatt	ccgtttatat	gaaatatcca	15360
gaggtggtgg	ttgcagattt	tgaatgtgct	aatgtcact	gaattgaata	ctttaaaatg	15420
gttaattgta	tgttatgtga	atthttacctc	aatthtttaa	atgggtcata	aacttatggt	15480
tagcataatc	cccttttaat	tttaaaaaat	gcagatatta	catgagaaaa	aatgtgctag	15540
agcatatthc	aagacattaa	agatggttat	cagtgaatga	tgagaaatta	ggtaatgtht	15600
attatthtcg	ctthtgctaaa	attatthtaa	aattacttgc	atattaaatt	thttaatgcc	15660
taggaaagaa	agactatagt	tgtattgact	aagatthcta	cgagcatggg	gaaaatgctt	15720
aatthgtagg	gttaatcaag	gataaaataa	attgcattgt	atgtacaatg	tgatcccaag	15780
tatthaaaac	acactgctta	tggtaacagt	cagtctgtgg	gagacaggtt	aaaaagtgat	15840
atthtccctt	cctactctcc	aaatthtctt	aacaaacata	tattatgact	ataatcagaa	15900
aaaattatth	thaaaacgtc	tactatgggg	caagctaggt	tcaaaaaata	gaagthtgat	15960
aatgtagtht	ggcttgctat	tgacaaggaa	gacgthtaca	ctggaatthc	gccatcatgg	16020
ccatatagcg	atcgctatat	gctagcgata	acaatthcac	acaggaaaca	gctatgacca	16080
tgattacgcc	aagctctagc	tagaggctga	cggtaatggc	agggcctgcc	gccccgacgt	16140
tggtgcgag	ccctgggcct	tcacccgaac	ttgggggggtg	gggtggggaa	aaggaagaaa	16200
cgcgggcgta	ttggcccaa	tggggtctcg	gtggggtatc	gacagagtgc	cagccctggg	16260
accgaacccc	gcgthtatga	acaaacgacc	caacacccgt	gcgthttatt	ctgtctthtt	16320
attgccgtca	tagcgcggtt	tccttccggt	attgtctcct	tcogtgthtc	agttagcctc	16380
ccccgtthta	actcattact	aaccggthtt	agtctthctt	ctcgtagact	tcaaacttat	16440
acttgatgcc	thtttctctc	tggacctcag	agaggacgcc	tgggtattct	gggagaagtt	16500
tatatttccc	caaatcaatt	tctgggaaaa	acgtgtcact	thcaaattcc	tgcatgatcc	16560
ttgtcacaaa	gagtctgagg	tggcctgggt	gattcatggc	thcctggtaa	acagaactgc	16620
ctccgactat	ccaaacctag	tctactthac	ttgccaattc	cggttgthca	ataagthtta	16680
aggcatcatc	caaactthtg	gcaagaaaat	gagctcctcg	tggtggtthct	thgagthctc	16740

ES 2 611 402 T3

tactgagaac tatattaatt ctgtccttta aaggctcgatt cttctcagga atggagaacc 16800
 aggttttctcct acccataatc accagattct gtttaccttc cactgaagag gttgtggtca 16860
 ttcttttgaa gtacttgaac tcgttcctga ggggaggcca gggtaggtct ccgttcttgc 16920
 caatccccat attttgggac acggcgacga tgcagttcaa tggtcgaacc atgatggcgc 16980
 gaaacgatcc tcatcctgtc tcttgatcag atccgaaaat ggatatacaa gctcccggga 17040
 gctttttgca aaagcctagg cctccaaaaa agcctcctca ctacttctgg aatagctcag 17100
 aggcagaggc ggcctcggcc tctgcataaa taaaaaaaaat tagtcagcca tggggcggag 17160
 aatgggcgga actgggcgga gttaggggcg ggatgggcgg agttaggggc gggactatgg 17220
 ttgctgacta attgagatgc atgctttgca tacttctgcc tgctggggag cctggggact 17280
 ttccacaccc taactgacac acattccaca g 17311

<210> 4

<211> 14887

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vector pCLS09G1f4

<220>

<221> gen

10 <222> (3926)..(6354)

<220>

<221> promotor

<222> (6575)..(7269)

<220>

15 <221> gen

<222> (7372)..(10599)

<220>

<221> gen

<222> (10651)..(10853)

20 <220>

<221> gen

<222> (11146)..(13574)

ES 2 611 402 T3

<400> 4

cacgtagtgg gccatcgccc tgatagacgg tttttcgccc tttgacgttg gagtccacgt	60
tctttaatag tggactcttg ttccaaactg gaacaacact caaccctatc tcggtctatt	120
cttttgattt ataagggatt ttggggattt cggcctattg gttaaaaaat gagctgattt	180
aacaaaaatt taacgcgaat taattctgtg gaatgtgtgt cagttagggt gtggaaagtc	240
cccaggctcc ccagcaggca gaagtatgca aagcatgcat ctcaattagt cagcaaccag	300
gtgtggaaag tccccaggct ccccagcagg cagaagtatg caaagcatgc atctcaatta	360

ES 2 611 402 T3

gtcagcaacc atagtcccgc ccctaactcc gcccatcccg cccctaactc cgcccagttc 420
 cgcccattct ccgccccatg gctgactaat tttttttatt tatgcagagg ccgaggccgc 480
 ctctgcctct gagctattcc agaagtagtg aggaggcttt tttggaggcc taggcttttg 540
 caaaaagctc ccgggagctt gtatatccat tttcggatct gatcaagaga caggatgagg 600
 atcgtttcgc atgattgaac aagatggatt gcacgcaggt tctccggccg cttgggtgga 660
 gaggctattc ggctatgact gggcacaaca gacaatcggc tgctctgatg ccgccgtggt 720
 ccggctgtca gcgcaggggc gcccggttct ttttgtcaag accgacctgt ccggtgcctt 780
 gaatgaactg caggacgagg cagcgcggct atcgtggctg gccacgacgg gcgttccttg 840
 cgcagctgtg ctcgacgttg tcaactgaagc ggggaaggac tggtctgctat tgggcgaagt 900
 gccggggcag gatctcctgt catctcacct tgctcctgcc gagaaagtat ccatcatggc 960
 tgatgcaatg cggcggctgc atacgcttga tccggctacc tgcccattcg accaccaagc 1020
 gaaacatcgc atcgagcgag cacgtactcg gatggaagcc ggtcttgtcg atcaggatga 1080
 tctggacgaa gagcatcagg ggctcgcgcc agccgaactg ttcgccaggc tcaaggcgcg 1140
 catgcccgac ggcgaggatc tcgtcgtgac ccatggcgat gcctgcttgc cgaatatcat 1200
 ggtggaaaat ggccgctttt ctggattcat cgactgtggc cggctgggtg tggcggaccg 1260
 ctatcaggac atagcgttgg ctaccctga tattgtgaa gagcttggcg gcgaatgggc 1320
 tgaccgcttc ctcgtgcttt acggtatcgc cgtcccgat tcgcagcgca tcgccttcta 1380
 tcgccttctt gacgagttct tctgagcggg actctggggg tcgcgaaatg accgaccaag 1440
 cgacgcccaa cctgccatca cgagatttcg attccaccgc cgccttctat gaaaggttgg 1500
 gcttcggaat cgttttccgg gacgccggct ggatgatcct ccagcgcggg gatctcatgc 1560
 tggagttctt cgcccacccc aacttgttta ttgcagctta taatggttac aaataaagca 1620
 atagcatcac aaatttcaca aataaagcat ttttttcaact gcattctagt tgtggtttgt 1680
 ccaaactcat caatgtatct tatcatgtct gtataccgtc gacctctagc tagagcttgg 1740
 cgtaatcatg gtcatagctg tttcctgtgt gaaattgtta tccgctcaca attccacaca 1800
 acatacgagc cggaagcata aagtgtaaag cctgggggtgc ctaatgagtg agctaactca 1860
 cattaattgc gttgcgctca ctgcccgctt tccagtcggg aaacctgtcg tgccagctgc 1920
 attaataaat cggccaacgc gcggggagag gcggtttgcg tattgggcgc tcttccgctt 1980
 cctcgtcac tgactcgtg cgctcggctc ttcggctgcg gcgagcggtc tcagctcact 2040
 caaaggcggg aatacgggta tccacagaat caggggataa cgcaggaaag aacatgtgag 2100
 caaaaaggcca gcaaaaaggc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata 2160
 ggctccgccc ccctgacgag catcacaanaa atcgacgctc aagtcagagg tggcgaacc 2220

ES 2 611 402 T3

cgacaggact ataaagatac caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg cgctctcctg 2280
 ttccgaccct gccgcttacc ggatacctgt ccgcctttct cccttcggga agcgtggcgc 2340
 tttctcaatg ctcacgctgt aggtatctca gttcgggtgta ggtcgttcgc tccaagctgg 2400
 gctgtgtgca cgaaccccc gttcagcccg accgctgcgc cttatccggt aactatcgtc 2460
 ttgagtccaa cccggttaaga cacgacttat cgccactggc agcagccact ggtaacagga 2520
 ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta cagagttctt gaagtgggtg cctaactacg 2580
 gctacactag aaggacagta tttggtatct gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa 2640
 aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg ggtttttttg 2700
 tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct ttgatctttt 2760
 ctacggggtc tgacgctcag tggaaacgaaa actcacgtta agggattttg gtcatgagat 2820
 tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaa atgaagtttt aatcaatct 2880
 aaagtatata tgagtaaact tggctgaca gttaccaatg cttaatcagt gaggcacct 2940
 tctcagcgat ctgtctatct cgttcaccca tagttgcctg actccccgtc gtgtagataa 3000
 ctacgatac gaggggctta ccatctggcc ccagtgcctgc aatgataccg cgagaccac 3060
 gctcaccggc tccagattta tcagcaataa accagccagc cgggaagggc gagcgcagaa 3120
 gtggtcctgc aactttatcc gcctccatcc agtctattaa ttggtgccgg gaagctagag 3180
 taagtagttc gccagttaat agtttgcgca acgttggtgc cattgctaca ggcatcgtgg 3240
 tgtcacgctc gtcgtttggg atggcttcat tcagctccgg tccccaacga tcaaggcgag 3300
 ttacatgac ccccatggtg tgcaaaaaag cggtttagctc cttcgggtcct ccgatcgttg 3360
 tcagaagtaa gttggccgca gtggtatcac tcatggttat ggcagcactg cataattctc 3420
 ttactgtcat gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca accaagtcac 3480
 tctgagaata gtgtatgcgg cgaccgagtt gctcttgccc ggcgtcaata cgggataata 3540
 ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct tcggggcgaa 3600
 aactctcaag gatcttaccg ctggtgagat ccagttcgat gtaaccact cgtgcacca 3660
 actgatctc agcatctttt actttacca gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc 3720
 aaaatgccgc aaaaaaggga ataagggcga cacggaaatg ttgaatactc atactcttcc 3780
 tttttcaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct catgagcggg tacatatttg 3840
 aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac 3900
 ctgacgtcga cggatcggga gatctgaatt cctaaacaga gcaattaggt aagaaaatga 3960
 aagaaaagggt atccaattat gaaggaagaa gtaaaactat ttctatttgc agatgacatg 4020
 actgtataca aagaaaatcc caaataatcc acacaaaaac tagtagagtt aataagcaaa 4080
 ttcaacaaat ttcagggtag aaaatcagtt gtgtttctat acacaaacc acaatgaaca 4140

ES 2 611 402 T3

ataaaaaaag gaaactaaga aaacaatttc ctttataata acatcccaaa gaataaaata	4200
catgggacta aatttaacca aggaagtgaa agaattgtac actaaaaacc acaataatt	4260
gctgattaaa tggaaagatg tcccatgttc acggataggg atacttaata ttgttaaag	4320
gcaatacttc ccaaagcaat ctatagattc aatgcaatct ctgtcaaaat ttcaaaggt	4380
cttctttgct gaaatggaaa agccaatcct aaaattcata tgtaattcca taggatccaa	4440
aaaagcaaaa ccaatattga aatagaaaaa caaagttgga gtacttacac ttctcaattt	4500
caaaacttac aagctacagt aattaaaca gcatggcaaa ggcataagga tagacatatg	4560
gatcaatgga atagattcag agtccagaaa taaacacaac atttatggcc atttgatttt	4620
tgataaggat tgtcaagggg gtcttgaaca ttcagtgggg aaagaataat atcttcaaca	4680
agtgggtgctg gaacaattgg atagccatgt gcaaaatact ctagtagact cctaccttat	4740
gtcacataca ataattaatt taaaataaat caatcctaaa tataagggcc aaaaccataa	4800
aactcttaga agaaaacagg cgtaatcttc atggtttctg atttgtcaat ggattcttaa	4860
atgtgacacc aaaagcacia gcaacaaaag ataaaattga tacatttgaa tgcataaaat	4920
ttttttaatt tgcacatgaa atgacaatat caagaaaatg aaaagacaat ctgcagaatg	4980
ggagaaaata tttacaagcc acatatctga taagggctga gtatccagaa tatataacia	5040
actcttccag ctcaacaatg aaaacaaaaa caacgcaatt ttaagaatgg gcaaaggact	5100
tgaatcaaca tttctccaaa gaagatatgc gaataaccag caaacacatg aagtgatgct	5160
caacatcatt actcataaag gaaatgtgaa tcaaaacat atgacatact actttacacc	5220
cattaggatg aagataataa ttttaaaata acaagtgtca gcaaggatgc agagaaatag	5280
gaactttcct atgttgctga taagcaatgc aaaaggatac aaccactgtg gaaaacagtt	5340
tggtggttcc ttaaaaaatt aaaaatagga ttattgtata actcagaaat tccaaaagta	5400
tatatatttg gtatatatcc aaaagaactg aaaacatatt gttcatgcag aaatttgtac	5460
acaaatgctt attattgctg cattagctac aatagccaaa agatgaaaac aaccctaatg	5520
tccattgaca gatgaacaaa taacttgtgg tataaacata caatgggaat attatTTTTT	5580
catcaaaaag aacgaatact ggcattgtct acagcttgta tgaatctcag aaacattatt	5640
acaagtgaat gtagccagcc acaacaggcc atgtattgtg tgattccgtt tatatgaaat	5700
atccagaggt ggtggttgca gattttgaat gtgctaaatg tcaactgaatt gaactttta	5760
aatgggttaa ttgtatgta tgtgaatttt acctcaattt tttaaatggg tcataaactt	5820
atgtttagca taatcccctt ttaattttta aaaaatgcaga tattacatga gaaaaaatgt	5880
gctagagcat atttcaagac attaaagatg gttatcagtg aatgatgaga aattaggtaa	5940
tgtttattat tttcgctttg ctaaaattat ttaaaaatta cttgcatatt aaatttttta	6000

ES 2 611 402 T3

atgcctagga aagaaagact atagttgtat tgactaagat ttctacgagc atggggaaaa 6060
tgcttaattt gtagggtaa tcaaggataa aataaattgc attgtatgta caatgtgatc 6120
ccaagtattt aaaacacact gcttatggta acagtcagtc tgtgggagac aggttaaaaa 6180
gtgatatttt cccttcctac tctccaaatt ttcttaacaa acatatatta tgactataat 6240
cagaaaaaat tattttttaa acgtctacta tggggcaagc taggttcaaa aaatagaagt 6300
ttgataaatg tagttggcctt gctattgaca aggaagacgt ttacactgga attcagatct 6360
cccgatcccc tatggctgac tctcagtaca atctgctctg atgccgcata gttaagccag 6420
tatctgctcc ctgcttgtgt gttggaggtc gctgagtagt gcgagcagcaa aatttaagct 6480
acaacaaggc aaggcttgac cgacaattgc atgaagaatc tgcttagggt taggcgtttt 6540
gcgctgcttc gcgatgtacg ggccagatat acgcgctgac attgattatt gactagttat 6600
taatagtaat caattacggg gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcggtaca 6660
taacttacgg taaatggccc gcctggctga ccgcccaacg acccccgcc attgacgtca 6720
ataatgacgt atgttcccat agtaacgcc aatagggactt tccattgacg tcaatgggtg 6780
gagtatttac ggtaaactgc ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtacg 6840
ccccctattg acgtcaatga cggtaaattg cccgcctggc attatgcca gtacatgacc 6900
ttatgggact ttcctacttg gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatggtg 6960
atgcggtttt ggcagtacat caatgggcgt ggatagcggg ttgactcacg gggatttcca 7020
agtctccacc ccattgacgt caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt 7080
ccaaaatgtc gtaacaactc cgccccattg acgcaaattg gcggtaggcg tgtacgggtg 7140
gaggctctata taagcagagc tcgttttagtg aaccgtcaga tcgcctggag acgccatcca 7200
cgctgttttg acctccatag aagacaccgg gaccgatcca gcctccggac tctagaggat 7260
cgaaccctta agcttctcgc gcaacctatt ttcccctcga acacttttta agccgtagat 7320
aaacaggctg ggacacttca catgagcgaa aaatacatcg tcacctggga catgttgacg 7380
atccatgcac gtaaactcgc aagccgactg atgccttctg aacaatggaa aggcattatt 7440
gccgtaagcc gtggcggtct ggtaccggtg ggtgaagacc agaaacagca cctcgaactg 7500
agccgcgata ttgccagcg tttcaacgcg ctgtatggcg agatcgatcc cgtcgtttta 7560
caacgtcgtg actgggaaaa ccctggcggtt acccaactta atcgccttgc agcacatccc 7620
cctttcgcca gctggcgtaa tagcgaagag gccgcacagc atcgccttc ccaacagttg 7680
cgcagcctga atggcgaatg gcgctttgcc tggtttccgg caccagaagc ggtgccggaa 7740
agctggctgg agtgcgatct tctgaggcc gatactgtcg tcgtcccctc aaactggcag 7800
atgcacggtt acgatgcgcc catctacacc aacgtgacct atcccattac ggtcaatccg 7860
ccgtttgctc ccacggagaa tccgacgggt tgttactcgc tcacatttaa tgttgatgaa 7920

ES 2 611 402 T3

agctggctac	aggaaggcca	gacgcgaatt	atTTTTgatg	gcgttaactc	ggcgtttcat	7980
ctgtggtgca	acgggcgctg	ggtcggttac	ggccaggaca	gtcgtttgcc	gtctgaattt	8040
gacctgagcg	catttttacg	cgccggagaa	aaccgcctcg	cggtgatggt	gctgcgctgg	8100
agtgacggca	gttatctgga	agatcaggat	atgtggcggg	tgagcggcat	ttcccgtagc	8160
gtctcgttgc	tgcataaacc	gactacacaa	atcagcgatt	tccatggtgc	cactcgtttt	8220
aatgatgatt	tcagccgctg	tgtactggag	gctgaagttc	agatgtgcgg	cgagttgctg	8280
gactacctac	gggtaacagt	ttctttatgg	cagggtgaaa	cgcaggtcgc	cagcggcacc	8340
gcgcctttcg	gcggtgaaat	tatcgatgag	cgtggtgggt	atgccgatcg	cgtcacacta	8400
cgtctgaacg	tcgaaaaccc	gaaactgtgg	agcgcggaaa	tcccgaatct	ctatcgtgcg	8460
gtggttgaac	tgcacaccgc	cgacggcacg	ctgattgaag	cagaagcctg	cgatgtcggg	8520
ttccgcgagg	tgcggttga	aaatggtctg	ctgctgctga	acggcaagcc	gttgcctgatt	8580
cgaggcggtta	accgtcacga	gcatcatcct	ctgcatggtc	aggcatgga	tgagcagacg	8640
atggtgcagg	atatcctgct	gatgaagcag	aacaacttta	acgccgtgcg	ctgttcgcat	8700
tatccgaacc	atccgctgtg	gtacacgctg	tgcgaccgct	acggcctgta	tgtggtggat	8760
gaagccaata	ttgaaacca	cggcatggtg	ccaatgaatc	gtctgaccga	tgatccgctg	8820
tggctaccgg	cgatgagcga	acgcgtaacg	cgaatggtgc	agcgcgatcg	taatcaccgg	8880
agtgtgatca	tctggtcgtc	ggggaatgaa	tcaggccacg	gcgctaata	cgacgcgctg	8940
tatcgctgga	tcaaactctg	cgatccttcc	cgcccgggtg	agtatgaagg	cggcggagcc	9000
gacaccacgg	ccaccgatat	tatttgcccg	atgtacgcgc	gcgtggatga	agaccagccc	9060
ttcccggctg	tgccgaaatg	gtccatcaaa	aaatggcttt	cgctacctgg	agagacgcgc	9120
ccgctgatcc	tttgcaata	cgcccacgct	atgggtaaca	gtcttggcgg	tttcgctaaa	9180
tactggcagg	cgtttcgtca	gtatccccgt	ttacagggcg	gcttcgtctg	ggactgggtg	9240
gatcagtcgc	tgattaaata	tgatgaaaac	ggcaaccctg	ggtcggctta	cggcgggtgat	9300
tttggcgata	cgccgaacga	tcgccagttc	tgtatgaacg	gtctggtctt	tgccgaccgc	9360
acgccgatc	cagcgtgac	ggaagcaaaa	caccagcagc	agtttttcca	gttccgttta	9420
tccgggcaaa	ccatcgaagt	gaccagcgaa	tacctgttcc	gtcatagcga	taacgagctc	9480
ctgcaactgga	tgggtggcgt	ggatggtaag	ccgctggcaa	gcggtgaagt	gcctctggat	9540
gtcgtctcac	aaggtaaaca	gttgattgaa	ctgcctgaac	taccgcagcc	ggagagcgcc	9600
gggcaactct	ggctcacagt	acgcgtagtg	caaccgaacg	cgaccgatg	gtcagaagcc	9660
gggcacatca	gcgcctggca	gcagtggcgt	ctggcgghaaa	acctcagtg	gacgctcccc	9720
gcccgtctcc	acgccatccc	gcatctgacc	accagcgaaa	tggatttttg	catcgagctg	9780

ES 2 611 402 T3

ggtaataagc gttggcaatt taaccgccag tcaggctttc tttcacagat gtggattggc 9840
 gataaaaaac aactgctgac gccgctgcgc gatcagttca cccgtgcacc gctggataac 9900
 gacattggcg taagtgaagc gacccgcatt gaccctaacg cctgggtcga acgctggaag 9960
 gcggcgggcc attaccaggc cgaagcagcg ttgttgcaat gcacggcaga tacacttgct 10020
 gatgcggtgc tgattacgac cgctcacgcg tggcagcatc aggggaaaac cttatatttc 10080
 agccggaaaa cctaccggat tgatggtagt ggtcaaattg cgattaccgt tgatggtgaa 10140
 gtggcgagcg atacaccgca tccggcgcgg attggcctga actgccagct ggcgcaggta 10200
 gcagagcggg taaactggct cggattaggc cgcgaagaaa actatcccga ccgccttact 10260
 gccgcctggt ttgaccgctg ggatctgcca ttgtcagaca tgtatacccc gtacgtcttc 10320
 ccgagcgaaa acggtctgcg ctgcgggacg cgcgaattga attatggccc acaccagtgg 10380
 cgcgcgact tccagttcaa catcagccgc tacagtcaac agcaactgat ggaaaccagc 10440
 catcgccatc tgctgcacgc ggaagaaggc acatggctga atatcgacgg tttccatatg 10500
 gggattggtg gcgacgactc ctggagcccg tcagtatcgg cgggaattcca gctgagcgcc 10560
 ggtcgctacc attaccagtt ggtctggtgt caaaaataat aataaccggg caggccatgt 10620
 ctgcccgtat ttgcgtaag gaaatccatt atgtactatt taaaaaacac aaacttttgg 10680
 atgttcggtt tattcttttt cttttacttt tttatcatgg gagcctactt cccgtttttc 10740
 ccgatttggc tacatgacat caaccatata agcaaaaagt atacgggtat tatttttgcc 10800
 gctattttctc tgttctcgct attattccaa ccgctgtttg gtctgctttc tgacaaaactc 10860
 ggctcgagct gtgccttcta gttgccagcc atctggtggt tgccccctcc ccgtgccttc 10920
 cttgaccctg gaaggtgcca ctcccactgt cttttcctaa taaaatgagg aaattgcatc 10980
 gcattgtctg agtaggtgtc attctattct ggggggtggg gtggggcagg acagcaaggg 11040
 ggaggattgg gaagacaata gcaggcatgc tggggatgcg gtgggctcta tggcttctga 11100
 ggcggaaaga accagctggg gctctagcta gcatatacct gcaggggaatt cctaaacaga 11160
 gcaattaggt aagaaaatga aagaaaagg atccaattat gaaggaagaa gtaaaactat 11220
 ttctatttgc agatgacatg actgtatata aagaaaatcc caaataatcc acacaaaaac 11280
 tagtagagtt aataagcaaa ttcaacaaat ttcagggtac aaaatcagtt gtgtttctat 11340
 acacaaaacc acaatgaaca ataaaaaaag gaaactaaga aaacaatttc ctttataata 11400
 acatcccaaa gaataaaata catgggacta aatttaacca aggaagtga agaattgtac 11460
 actaaaaacc acaataaatt gctgattaaa tggaaagatg tcccatgttc acggataggg 11520
 atacttaata ttgttaaag gcaatacttc ccaaagcaat ctatagattc aatgcaatct 11580
 ctgtcaaaat ttcaaatggt cttctttgct gaaatggaaa agccaatcct aaaattcata 11640
 tgtaattcca taggatccaa aaaagcaaaa ccaatattga aatagaaaaa caaagttgga 11700

ES 2 611 402 T3

gtacttacac	ttctcaattt	caaaacttac	aagctacagt	aattaaaca	gcatggcaaa	11760
ggcataagga	tagacatatg	gatcaatgga	atagattcag	agtccagaaa	taaacacaac	11820
atztatggcc	atztatgttt	tgataaggat	tgtcaagggg	gtcttgaaca	ttcagtgggg	11880
aaagaataat	atcttcaaca	agtggtgctg	gaacaattgg	atagccatgt	gcaaaatact	11940
ctagtagact	cctaccttat	gtcacataca	ataattaatt	taaaataaat	caatcctaaa	12000
tataagggcc	aaaaccataa	aactcttaga	agaaaacagg	cgtaatcttc	atggtttctg	12060
atztatcaat	ggattcttaa	atztatgacc	aaaagcacia	gcaacaaaag	ataaaattga	12120
tacatttgaa	tgataaaaat	ttttttaatt	tgacacatgaa	atgacaatat	caagaaaatg	12180
aaaagacaat	ctgcagaatg	ggagaaaata	tttacaagcc	acatatctga	taagggctga	12240
gtatccagaa	tatataacia	actcttccag	ctcaacaatg	aaaacaaaaa	caacgcaatt	12300
ttaagaatgg	gcaaaggact	tgaatcaaca	tttctccaaa	gaagatatgc	gaataaccag	12360
caaacacatg	aagtgatgct	caacatcatt	actcataaag	gaaatgtgaa	tcaaaacat	12420
atgacatact	actttacacc	cattaggatg	aagataataa	ttttaaaata	acaagtgtca	12480
gcaaggatgc	agagaaatag	gaactttcct	atggtgctga	taagcaatgc	aaaaggatac	12540
aaccactgtg	gaaaacagtt	tggtggttcc	ttaaaaaatt	aaaaatagga	ttattgtata	12600
actcagaaat	tccaaaagta	tatatatttg	gtatatatcc	aaaagaactg	aaaacatatt	12660
gttcatgcag	aaatttgtag	acaaatgctt	attattgctg	cattagctac	aatagccaaa	12720
agatgaaaac	aacccaaatg	tccattgaca	gatgaacaaa	taacttgtgg	tataaacata	12780
caatgggaat	attatttttc	catcaaaaag	aacgaatact	ggcatgtgct	acagcttgta	12840
tgaatctcag	aaacattatt	acaagtgaat	gtagccagcc	acaacaggcc	atgtattgtg	12900
tgattccggt	tatatgaaat	atccagaggt	ggtggttgca	gattttgaaat	gtgctaaatg	12960
tcactgaatt	gaatacttta	aaatggttaa	ttgtatgtta	tgtgaatttt	acctcaattt	13020
tttaaatggg	tcataaactt	atgttttagca	taatccccct	ttaattttaa	aaaatgcaga	13080
tattacatga	gaaaaaatgt	gctagagcat	atztatcaagac	attaaagatg	gttatcagtg	13140
aatgatgaga	aattaggtaa	tgtttattat	tttcgctttg	ctaaaattat	ttaaaaatta	13200
cttgcatatt	aaatttttta	atgcctagga	aagaaagact	atagttgtat	tgactaagat	13260
ttctacgagc	atggggaaaa	tgcttaattt	gtaggggttaa	tcaaggataa	aataaattgc	13320
atztatatga	caatgtgatc	ccaagtattt	aaaacacact	gcttatggta	acagtcagtc	13380
tgtgggagac	aggttaaaaa	gtgatatttt	cccttcctac	tctccaaatt	ttcttaacia	13440
acatatatta	tgactataat	cagaaaaaat	tatttttaaa	acgtctacta	tggggcaagc	13500
taggttcaaa	aaatagaagt	ttgataaatg	tagttggctt	gctattgaca	aggaagacgt	13560

ES 2 611 402 T3

ttacactgga attcgggccc tatatggcca tcatggccat atagcgatcg ctatatgcta 13620
 gcgataacaa tttcacacag gaaacagcta tgaccatgat tacgcccaagc tctagctaga 13680
 ggtcgacggt aatggcaggg cctgccgccc cgacgttggc tgcgagccct gggccttcac 13740
 ccgaacttgg ggggtggggg ggggaaaagg aagaaacgcg ggcgtattgg cccaatggg 13800
 gtctcgggtg ggtatcgaca gagtgccagc cctgggaccg aaccccgcgt ttatgaacaa 13860
 acgacccaac acccgtgcgt tttattctgt ctttttattg ccgtcatagc gcgggttcc 13920
 tccggtattg tctccttccg tgtttcagtt agcctcccc gtttaaactc attactaacc 13980
 ggttttagtc tttcttctcg tagacttcaa acttatactt gatgcctttt tcctcctgga 14040
 cctcagagag gacgcctggg tattctggga gaagtttata tttcccaaaa tcaatttctg 14100
 ggaaaaacgt gtcactttca aattcctgca tgatccttgt cacaaagagt ctgaggtggc 14160
 ctggttgatt catggcttcc tggtaaacag aactgcctcc gactatccaa accatgtcta 14220
 ctttacttgc caattccggt tgttcaataa gtcttaaggc atcatccaaa cttttggcaa 14280
 gaaaatgagc tcctcgtggt ggttctttga gttctctact gagaactata ttaattctgt 14340
 cctttaaagg tcgattcttc tcaggaatgg agaaccaggt tttcctacc ataatcacca 14400
 gattctgttt accttccact gaagagggtg tggtcattct ttggaagtac ttgaactcgt 14460
 tcctgagcgg aggccagggg aggtctccgt tcttgccaat ccccatattt tgggacacgg 14520
 cgacgatgca gttcaatggt cgaaccatga tggcgcgaaa cgatcctcat cctgtctctt 14580
 gatcagatcc gaaaatggat atacaagctc cggggagctt tttgcaaaaag cctaggcctc 14640
 caaaaaagcc tcctcactac ttctggaata gctcagaggc agaggcggcc tcggcctctg 14700
 cataaataaa aaaaattagt cagccatggg ggggagaatg ggcggaactg ggcggagtta 14760
 ggggcgggat gggcggagt aggggcggga ctatggttgc tgactaattg agatgcatgc 14820
 tttgcatact tctgcctgct ggggagcctg gggactttcc acaccctaac tgacacacat 14880
 tccacag 14887

<210> 5

<211> 30

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador Cs5S300F

<400> 5

attctcagc acctccttaa ttttctccc 30

<210> 6
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
5 <220>
<223> cebador Cs5S300R
<400> 6
ccaggcagcc aaagatcagt agttgtgtg 30
<210> 7
10 <211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> cebador 2kCspSF
15 <400> 7
tggttccttc attgaaaag gaaaacac 28
<210> 8
<211> 27
<212> ADN
20 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> cebador 2kCspSR
<400> 8
tccgctgagg ctgtgccac agccacc 27
25 <210> 9
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
30 <223> cebador CspSF
<400> 9

ggatccatt ctccttgatg tactaat 27
 <210> 10
 <211> 28
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador CspSR
 <400> 10
 gaattcaaac aactcaatag caagaaac 28
 10 <210> 11
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> cebador Bg5MF-100F-NheI
 <400> 11
 aattgctagc ttgtattctg ttcgtgagg caaggttt 38
 <210> 12
 <211> 38
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador Bg5MR-100R-XhoI
 <400> 12
 25 aattctcgag tcctctcta tggggctca aatgcct 38
 <210> 13
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> cebador V6_F

ES 2 611 402 T3

<400> 13

aagcttggat ccgaattcat cgatggccgg ccggtaccct cgagctgtgc cttctagttg 60
ccagc 65

<210> 14

<211> 30

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador V6_R

<400> 14

10 gctagctaga gcccagctg gttcttccg 30

<210> 15

<211> 46

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> cebador PsvApaDraF

<400> 15

aaaattgggc cccactacgt gctgtggaat gtgtgtcagt tagggt 46

<210> 16

20 <211> 43

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador PsvKzDHR

25 <400> 16

tggtogaacc atgatggcgc gaaacgatcc tcatcctgtc tct 43

<210> 17

<211> 43

<212> ADN

30 <213> Secuencia Artificial

ES 2 611 402 T3

<220>
<223> cebador DHKzPsvF
<400> 17
ggatcgttc gcgcatcat gggtcgacca ttgaactgca tcg 43
5 <210> 18
<211> 43
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
10 <223> cebador TKNheNdeR
<400> 18
tgtgtgcata tggctagcga taacaattc acacaggaaa cag 43
<210> 19
<211> 72
15 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> reforzador
<400> 19
gggtgtggaaa gtccccaggc tccccagcag gcagaagtat gcaaagcatg catctcaatt 60
20 agtcagcaac ca 72
<210> 20
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
25 <220>
<223> cebador NhAsE1F
<400> 20
aattgctagc atatagcgat cgcgaggac agcttccgac agcagggccca gg 52
<210> 21
30 <211> 75

- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> cebador BbPsSbNhE1R
- 5 <400> 21
- aattgctagc atatacctgc aggtatatgg gcccatatag ctgaggttga atgagaatat 60
- cactgtccca gacac 75
- <210> 22
- <211> 37
- <212> ADN
- 10 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> cebador galHinF
- <400> 22
- aattaagctt ctcgcaac ctatttccc ctgcaac 37
- 15 <210> 23
- <211> 37
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 20 <223> cebador galXhoR
- <400> 23
- aattctcgag ccgagttgt cagaaagcag accaaac 37
- <210> 24
- <211> 51
- 25 <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> cebador NhSbE1F
- <400> 24
- 30 aattgctagc atatacctgc aggttgaatg agaatacac tgtccagac a 51

ES 2 611 402 T3

<210> 25
<211> 80
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
5 <220>
<223> cebador NhAsSfPsE1R
<400> 25
aattgctagc atatagcgat cgctatatgg ccatgatggc catatagggc ccaggacagc 60
ttccgacagc agggccaggc 80
<210> 26
10 <211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> cebador cs3sSbf1F
15 <400> 26
aattcctgca ggggatccca ttctcctga tgtactaat 39
<210> 27
<211> 38
<212> ADN
20 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> cebador cs3sPsp1R
<400> 27
aattgggcc gaattcaaac aactcaatag caagaac 38
25 <210> 28
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
30 <223> cebador cs5sSbf1F

<400> 28
aattcctgca ggaattcct aaacagagca attaggtaag 40
<210> 29
<211> 37
5 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> cebador cs5sPsp1R
<400> 29
10 aattggccc gaattccagt gtaaactgtc tcctgt 37
<210> 30
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
15 <220>
<223> cebador glmSbf1F
<400> 30
aattcctgca ggtgtattc tgttcgtga ggcaaggtt 40
<210> 31
20 <211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> cebador glmPsp1R
25 <400> 31
aattggccc ttctctcta tggggctca aatgtcct 38
<210> 32
<211> 37
<212> ADN
30 <213> Secuencia Artificial
<220>

- <223> cebador cs3sPsp2F
<400> 32
aattgggcc g gatccatt ctcttgatg tactaat 37
<210> 33
- 5 <211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> cebador cs3sSfi2R
- 10 <400> 33
aattggccat gatggccgaa tcaaacaac tcaatagcaa gaaac 45
<210> 34
<211> 38
<212> ADN
- 15 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> cebador cs5sPsp2F
<400> 34
aattgggcc gaattcctaa acagagcaat taggtaag 38
- 20 <210> 35
<211> 44
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
- 25 <223> cebador cs5sSfi2R
<400> 35
aattggccat gatggccgaa ttccagtga aacgtctcc ttgt 44
<210> 36
<211> 38
- 30 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> cebador cs5sBg13F
 <400> 36
 aattagatct gaattcctaa acagagcaat taggtaag 38

5 <210> 37
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

10 <223> cebador cs5sBg13R
 <400> 37
 aattagatct gaattccagt gtaaactgtct tccttgt 37
 <210> 38
 <211> 25

15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador IE1ATGF
 <400> 38

20 atgggggtgc acgaatgtcc tgcct 25
 <210> 39
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> cebador IE1TGAR
 <400> 39
 tcattctgtcc cctgtcctgc aggct 26
 <210> 40

30 <211> 18
 <212> ADN

ES 2 611 402 T3

<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> cebador M13R
<400> 40
5 gaaacagcta tgacatg 18
<210> 41
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
10 <220>
<223> cebador IA1g1R
<400> 41
ctcattcaag ctgcatgttt cattacagcc cgtcgtgat 39
<210> 42
15 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> cebador M13F
20 <400> 42
cagggtttc ccagtcacga 20
<210> 43
<211> 39
<212> ADN
25 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> cebador IA1g1F
<400> 43
atcacgacgg gctgtaatga aacatgcagc ttgaatgag 39
30 <210> 44
<211> 42

- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> cebador IA1G2R
- 5 <400> 44
cacatgcagc tgcagtgct cattcacctg ggaagagttg ac 42
- <210> 45
- <211> 42
- <212> ADN
- 10 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> cebador IA1G2F
- <400> 45
gtcaactctt cccagtgaa tgagacctg cagctgcatg tg 42
- 15 <210> 46
- <211> 41
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 20 <223> cebador IEIKzATGHinF
- <400> 46
aattaagctt gccacatgg gggcgcacga atgtcctgcc t 41
- <210> 47
- <211> 36
- 25 <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> cebador IE1TGAXhoR
- <400> 47
- 30 aattctcgag tcactgtcc cctgtctgc aggct 36
- <210> 48

ES 2 611 402 T3

<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
5 <223> cebador NhAsfF
<400> 48
aattgctagc atataggcgc gcccaactga ttagggatg ggttcacgta g 51
<210> 49
<211> 73
10 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> cebador NhCIPaPsf1R
<400> 49
aattgctagc atataatcga ttatatttaa ttaaatatag gccccttgag tgttgttcca 60
15 gtttgaaca aga 73
<210> 50
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
20 <220>
<223> cebador cs3sAsc1F
<400> 50
aattggcgcg ccggatcca ttctcctga tgtactaat 39
<210> 51
25 <211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> cebador cs3sPsp1R
30 <400> 51

ES 2 611 402 T3

aattgggcc gaattcaaac aactcaatag caagaaac 38

<210> 52

<211> 40

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador cs5sAsc1F

<400> 52

10 aattggcgcg ccgaattcct aaacagagca attaggttaag 40

<210> 53

<211> 37

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> cebador cs5sPsp1R

<400> 53

aattgggcc gaattccagt gtaaactgtct tcctgt 37

<210> 54

20 <211> 61

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador V1_F

25 <400> 54

aagcttcctc agcatcgatg gccggccgga tccctgtgcc ttctagttgc cagccatctg 60

t 61

<210> 55

<211> 30

<212> ADN

30 <213> Secuencia Artificial

ES 2 611 402 T3

<220>
<223> cebador V1_R
<400> 55
tagagcccca gctggttctt tccgcctcag 30
5 <210> 56
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
10 <223> cebador V2_F
<400> 56
gaattctgta caggtacccc tgcaggctcg agctgtgcct tctagttgcc agccatctgt 60
60
<210> 57
<211> 30
15 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> cebador V2_R
<400> 57
20 tagagcccca gctggttctt tccgcctcag 30
<210> 58
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
25 <220>
<223> cebador PcmvAgeF
<400> 58
aatctgaccg gtgtaggcg tttgcgctg cttcgcg 37
<210> 59
30 <211> 51

ES 2 611 402 T3

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador BGHNheDraR

5 <400> 59

ttactacact acgtggatcg agctagctag agccccagct ggttctttcc g 51

<210> 60

<211> 63

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador HlssF

<400> 60

ctcttcttgg tagcaacagc tacaggtgtc cactccgagg tccaactggt cgaaagcggg 60

gga 63

15 <210> 61

<211> 40

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> cebador H1TGAXhoR

<400> 61

aattctcgag tcattaccc ggagacaggg agaggctctt 40

<210> 62

<211> 63

25 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador H1ssEcoF

<400> 62

ES 2 611 402 T3

aattgaattc gccacatgg gatggagctg tatcatcctc ttcttggtag caacagctac 60
agg 63
<210> 63
<211> 63
<212> ADN
5 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> cebador H2ssF
<400> 63
ctcttcttgg tagcaacagc tacaggtgtc cactccgata tccagatgac ccagagtccc 60
tct 63
10 <210> 64
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
15 <223> cebador H2TGABamR
<400> 64
aattgatcc tcaacactct ccctgttga agctcttgt 40
<210> 65
<211> 63
20 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> cebador H2ssHinF
<400> 65
aattaagctt gccacatgg gatggagctg tatcatcctc ttcttggtag caacagctac 60
25 agg 63

REIVINDICACIONES

1. Un vector de expresión para células animales, que comprende:
 - (a) una estructura 5' o región de unión a la matriz (5'-SAR) del gen de la serina proteasa B citotóxica (CSP-B);
 - (b) un promotor operable en células animales; y
 - (c) una secuencia de poliadenilación.
2. El vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el vector de expresión comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que va a ser expresada.
3. El vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la 5'-SAR está presente en dos copias.
4. El vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el promotor operable en las células animales es un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor tardío del adenovirus, un promotor 7.5K del virus vacuna, un promotor del virus 40 de simio (SV40), un promotor de SV40E1, un promotor tk del virus del herpes simple (HSV), un promotor del virus sincitial respiratorio (RSV), un promotor del factor 1- α de elongación (EF1-a), un promotor de metalotioneína, un promotor de β -actina, un promotor del gen de interleuquina 2 humana (IL-2), un promotor del gen del interferón (IFN) humano, un promotor del gen de IL-4 humana, un promotor del gen linfotóxica humana, o un promotor del gen del factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos humanos (GM-CSF).
5. El vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la secuencia de poliadenilación es una secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovino, una secuencia de poliadenilación de timidina quinasa (TK) derivada de HSV, o una secuencia de poliadenilación derivada de SV40.
6. El vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las células animales son células de ovario de hámster chino (CHO), células VERO, células HeLa, células WI38, células de riñón de hámster bebé (BHK), células COS o células de riñón de canino Madin-Darby (MDCK).
7. El vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la proteína es una hormona, citoquina, anticuerpo, aptámero peptídico, adnectina, Affibody, avímero, o un dominio de Kunitz.
8. El vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la proteína es eritropoyetina (EPO), un análogo de EPO, o un anticuerpo del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (anti-HER2).
9. Una célula animal transfectada con el vector de expresión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
10. Un método para preparar una proteína recombinante, que comprende incubar la célula animal transfectada de la reivindicación 9.
11. El vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 3, en el que las dos copias de la 5'-SAR están presentes consecutivamente en el vector.
12. El vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 11, en el que las dos copias de la 5'-SAR están presentes consecutivamente secuencia abajo de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína que se va a expresar.

35

Fig. 1

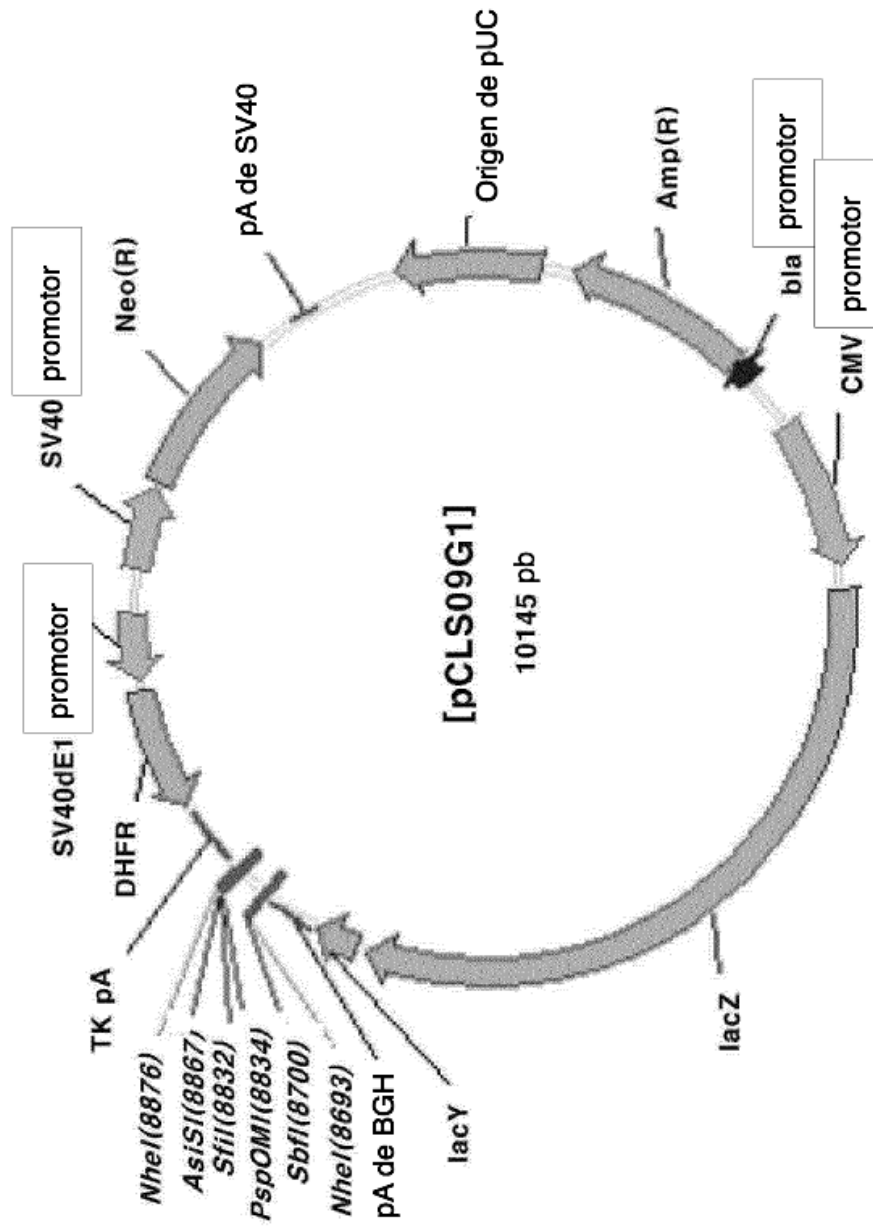


Fig. 2b

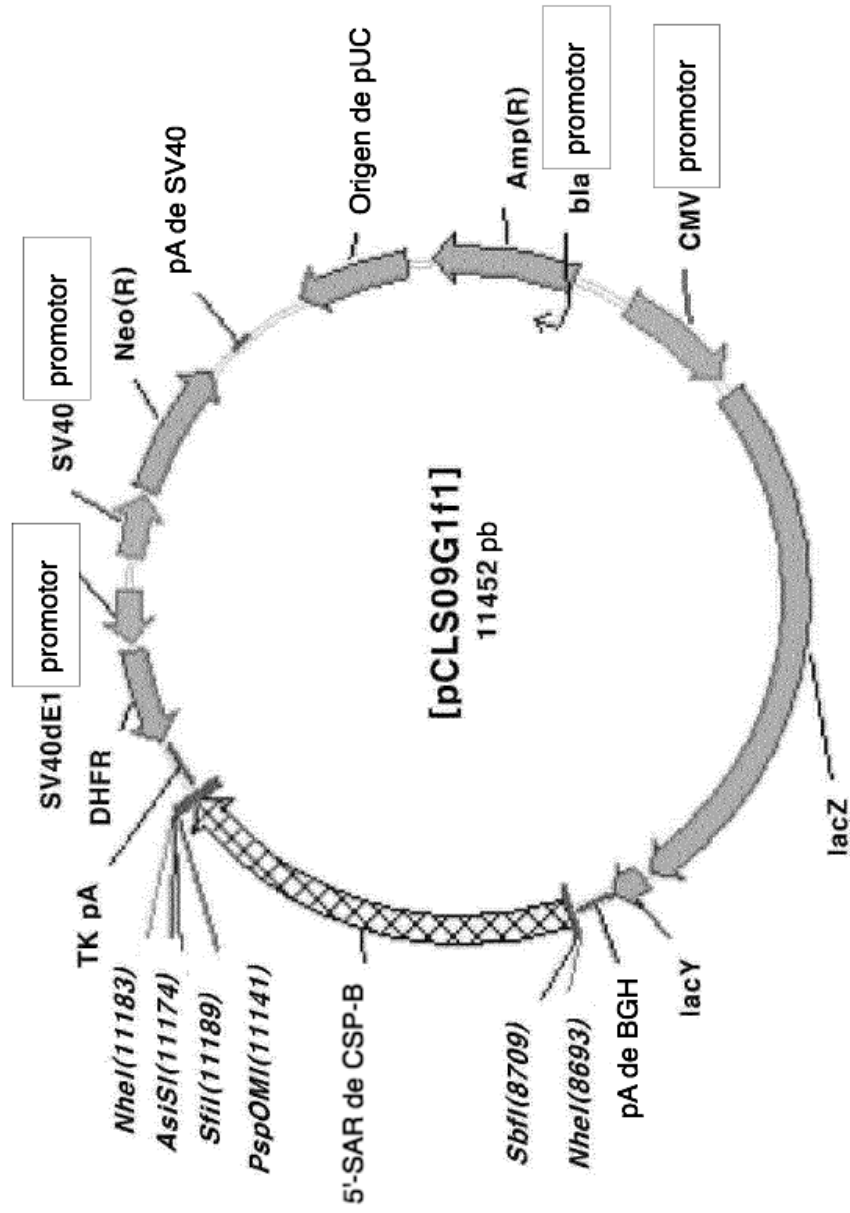


Fig. 2c

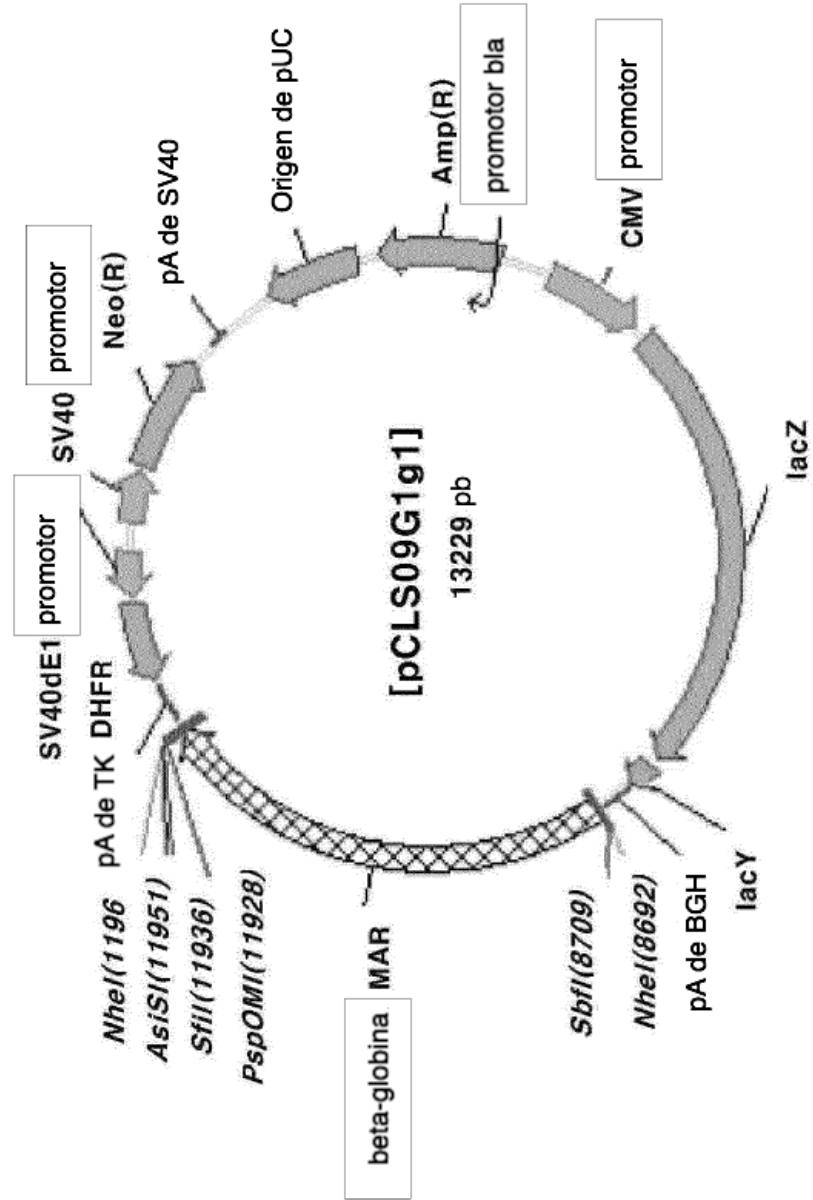


Fig. 3a

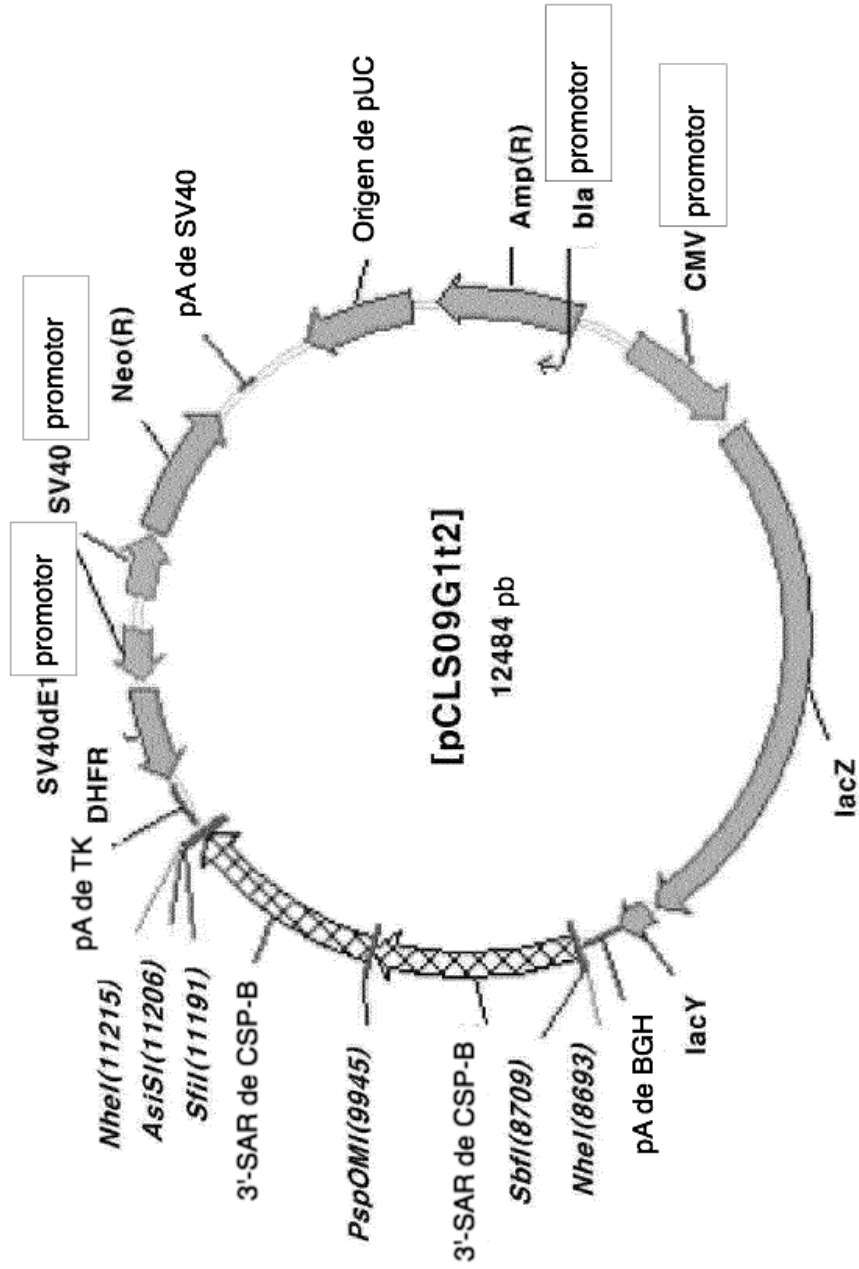


Fig. 3b

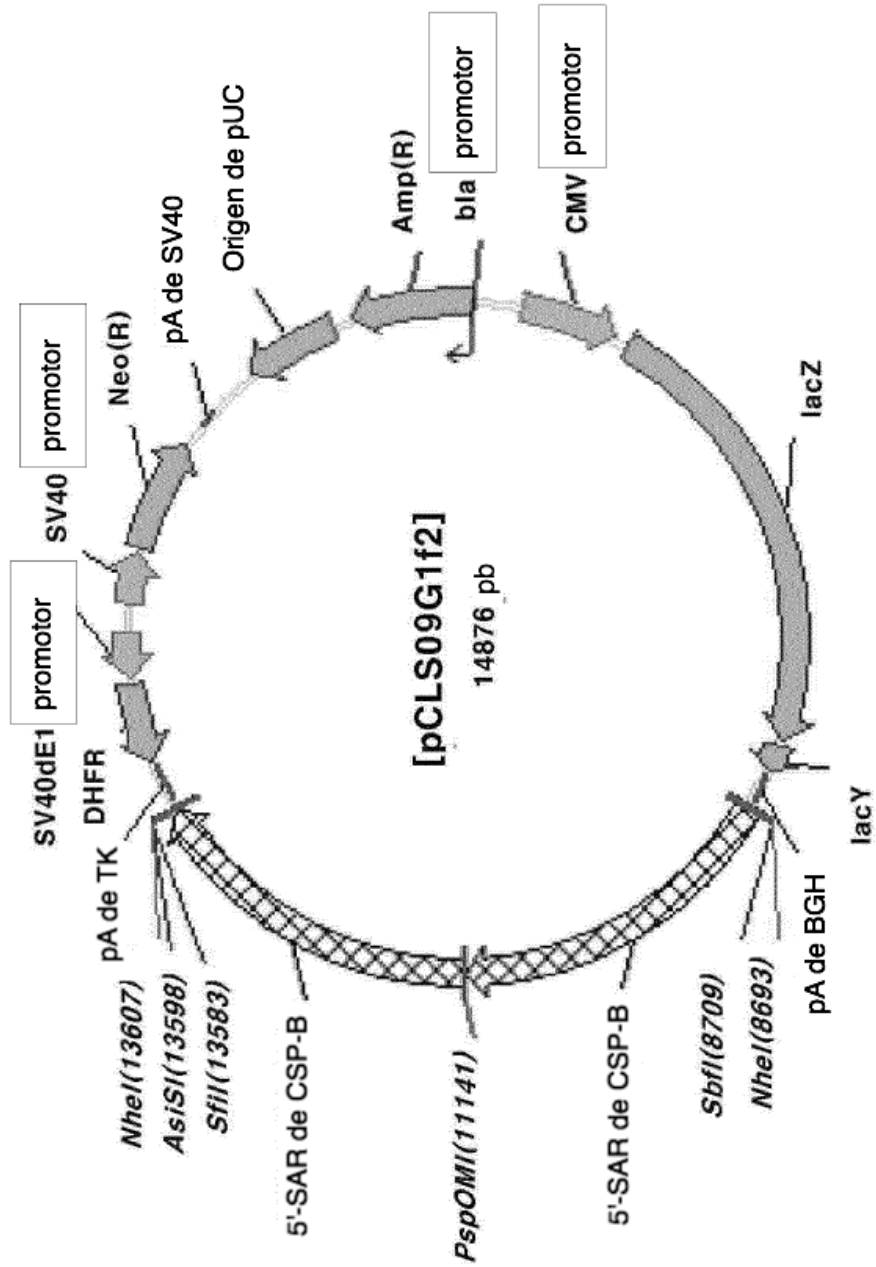


Fig. 3c

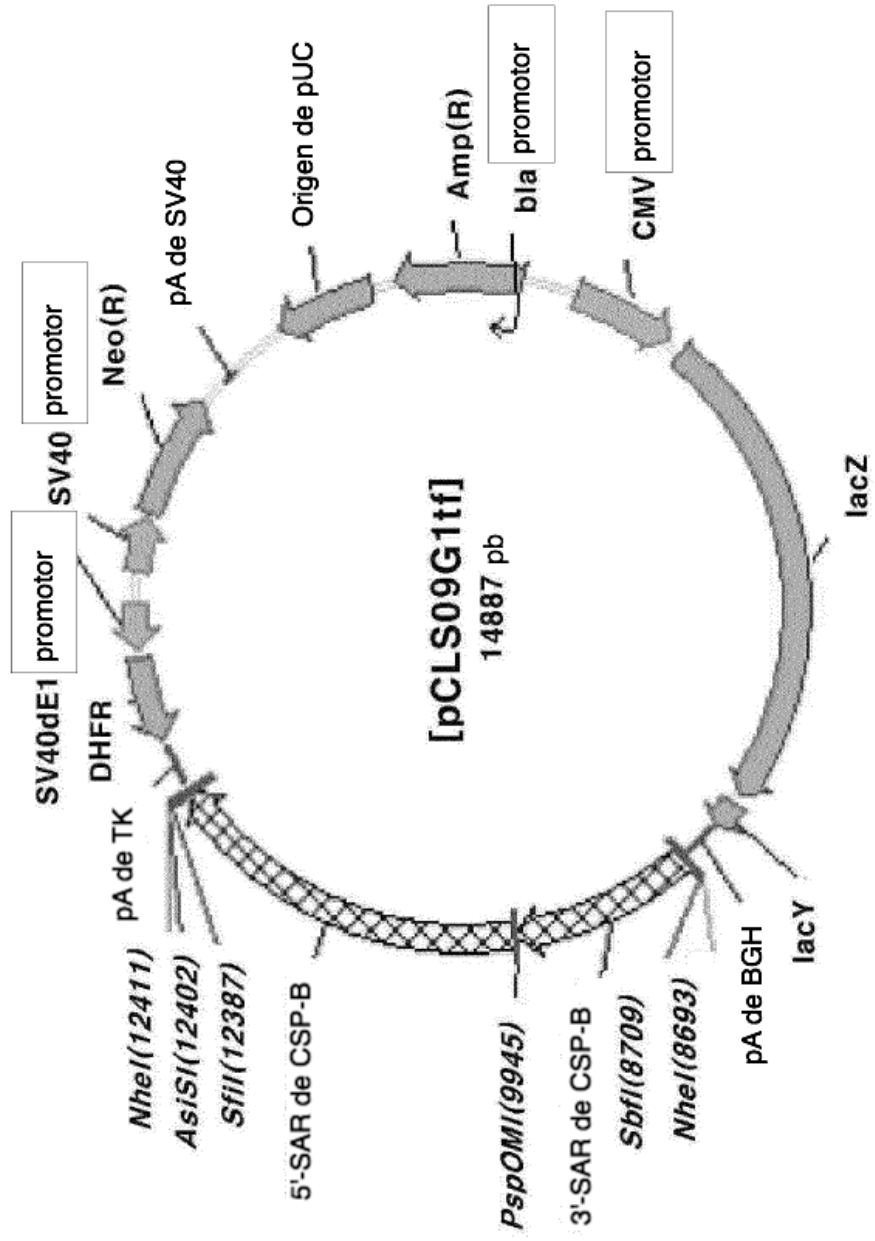


Fig. 3d

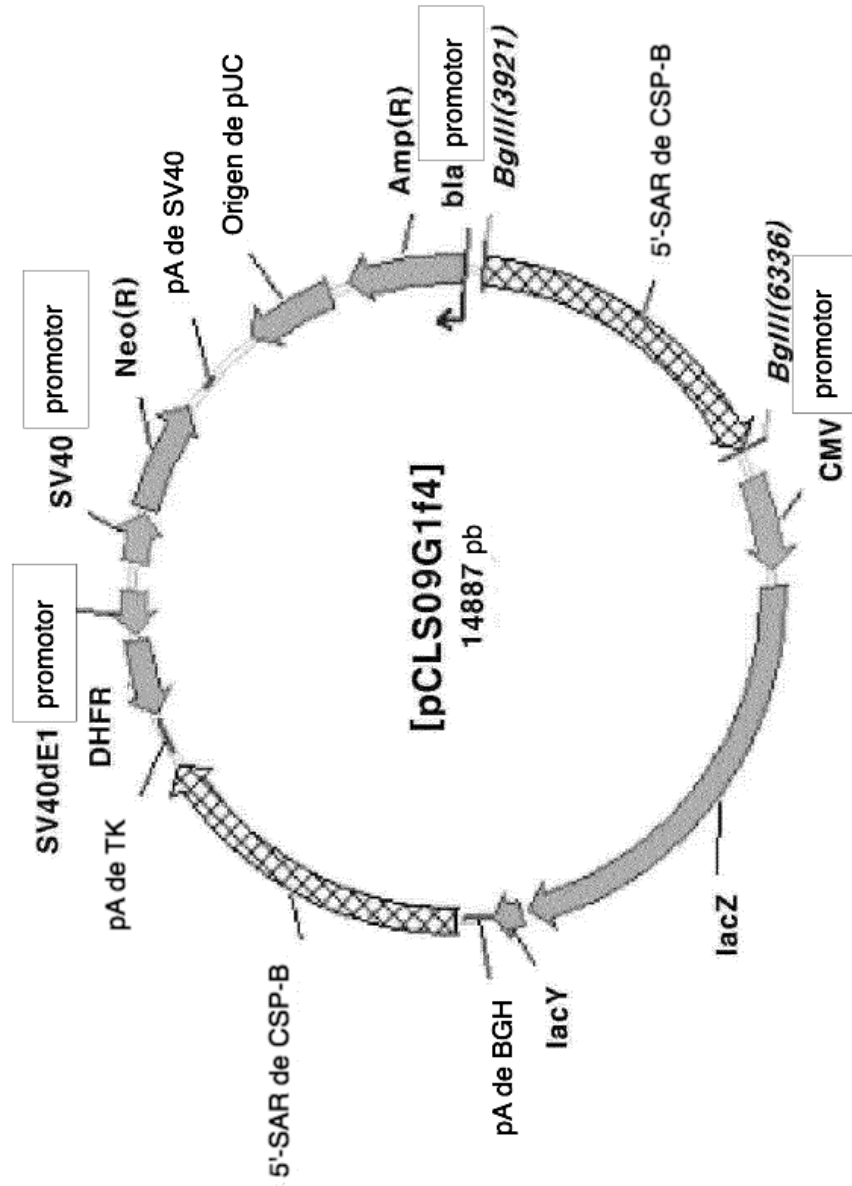


Fig. 4

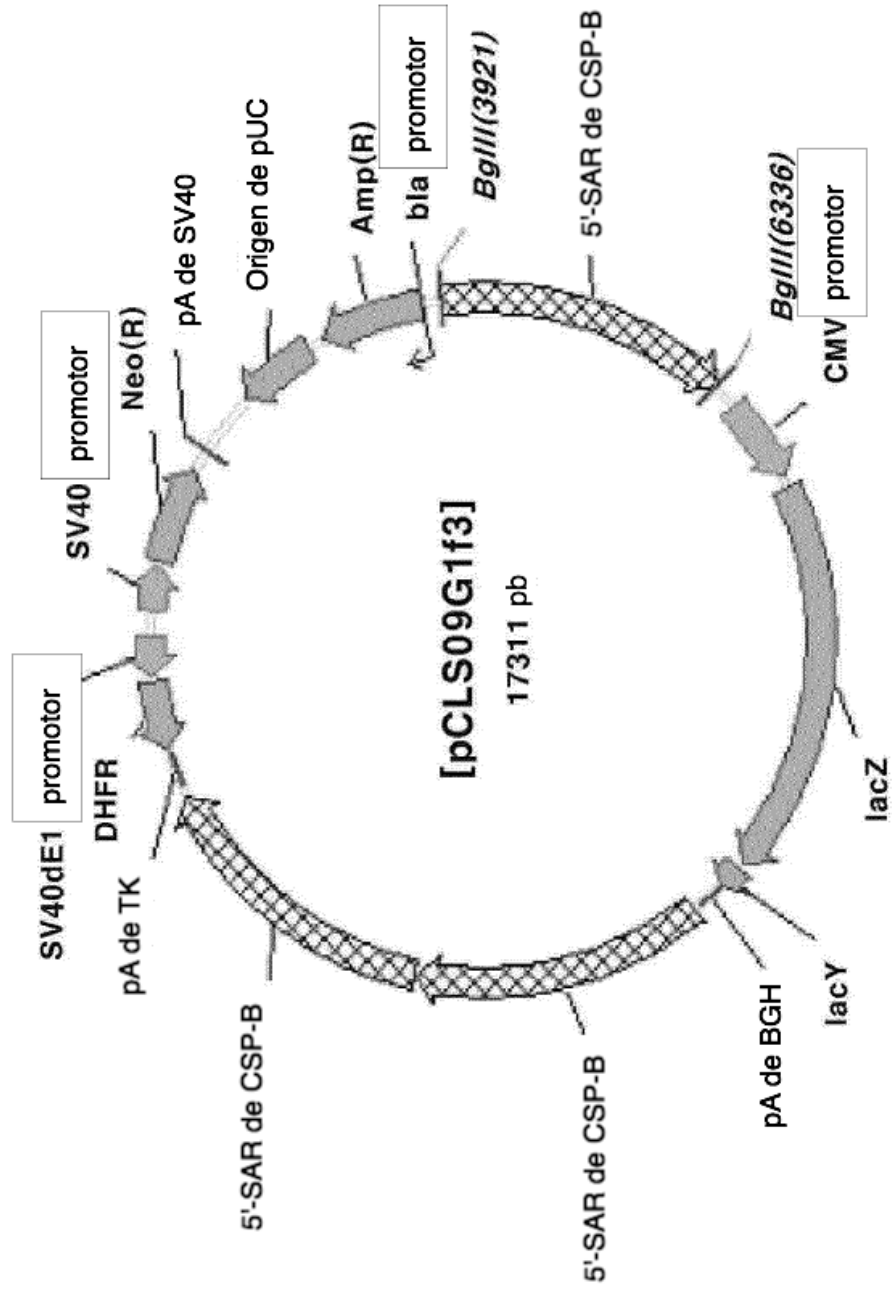


Fig. 5a

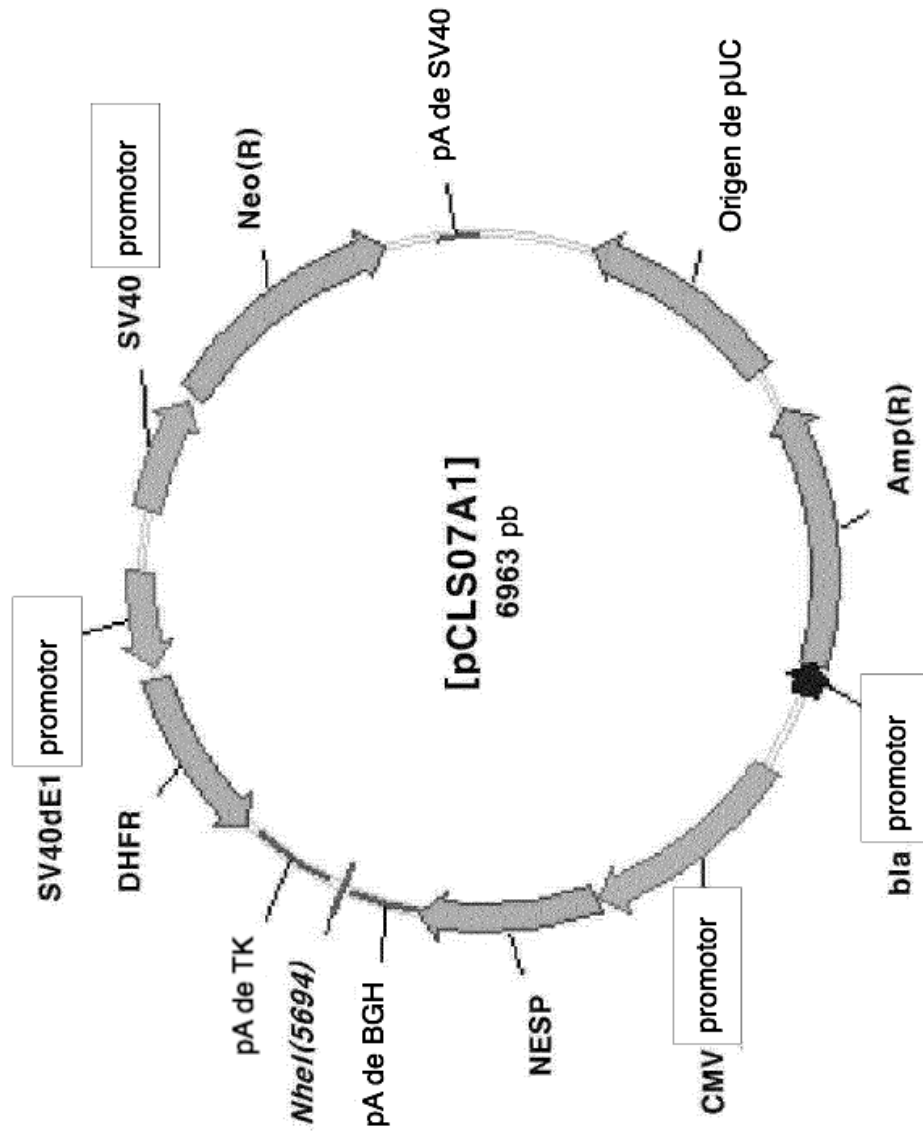


Fig. 5b

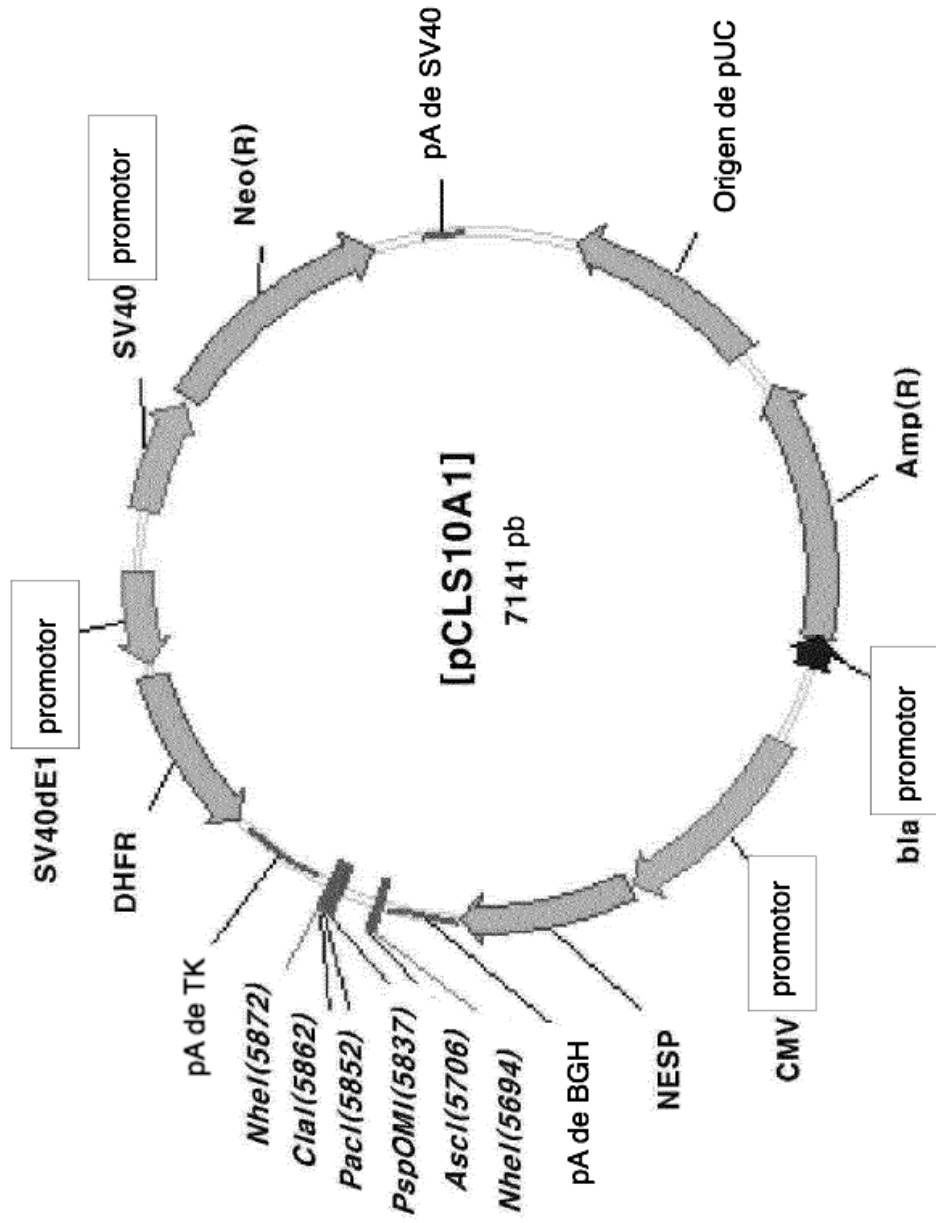


Fig. 6a

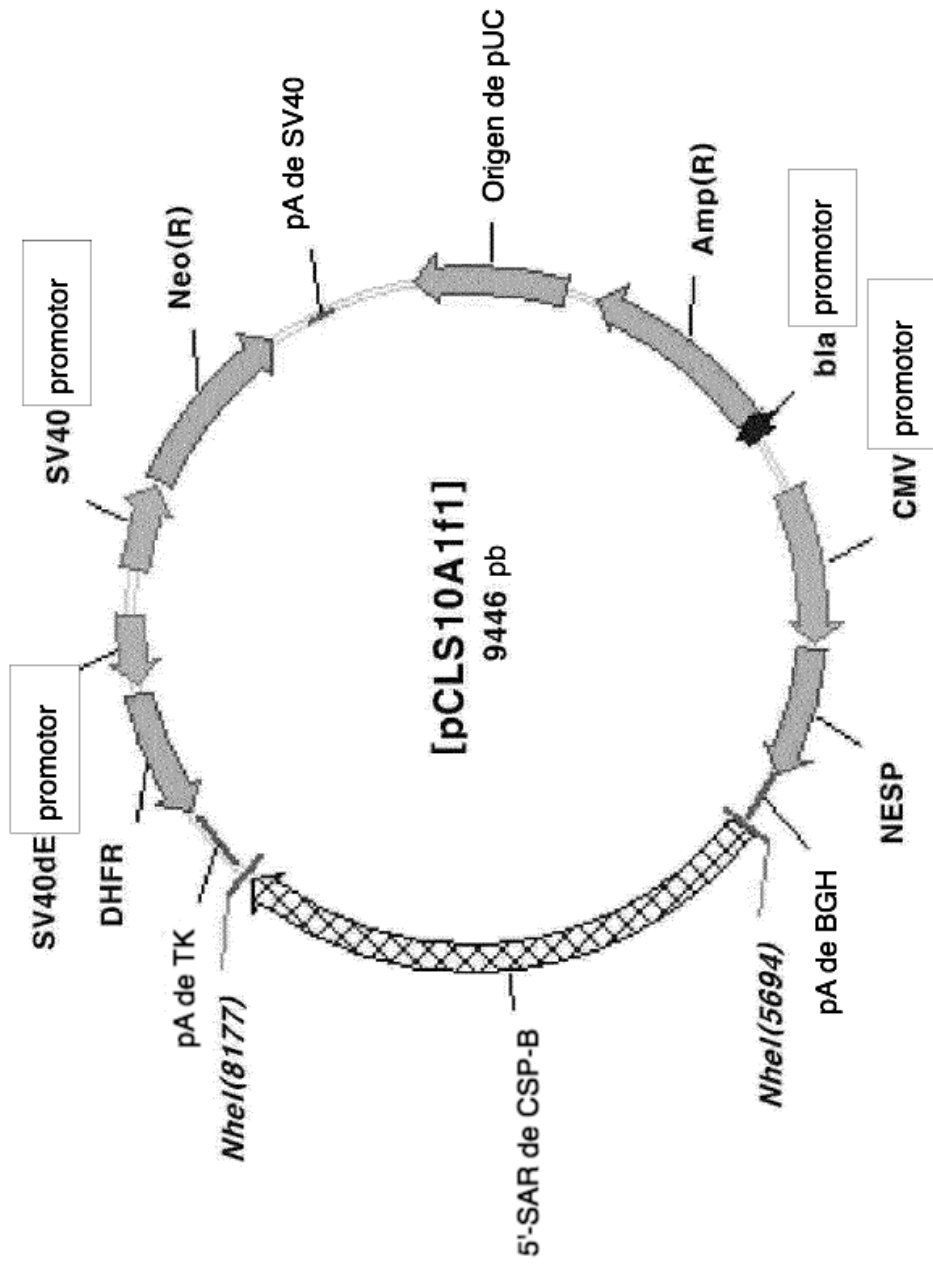


Fig. 6b

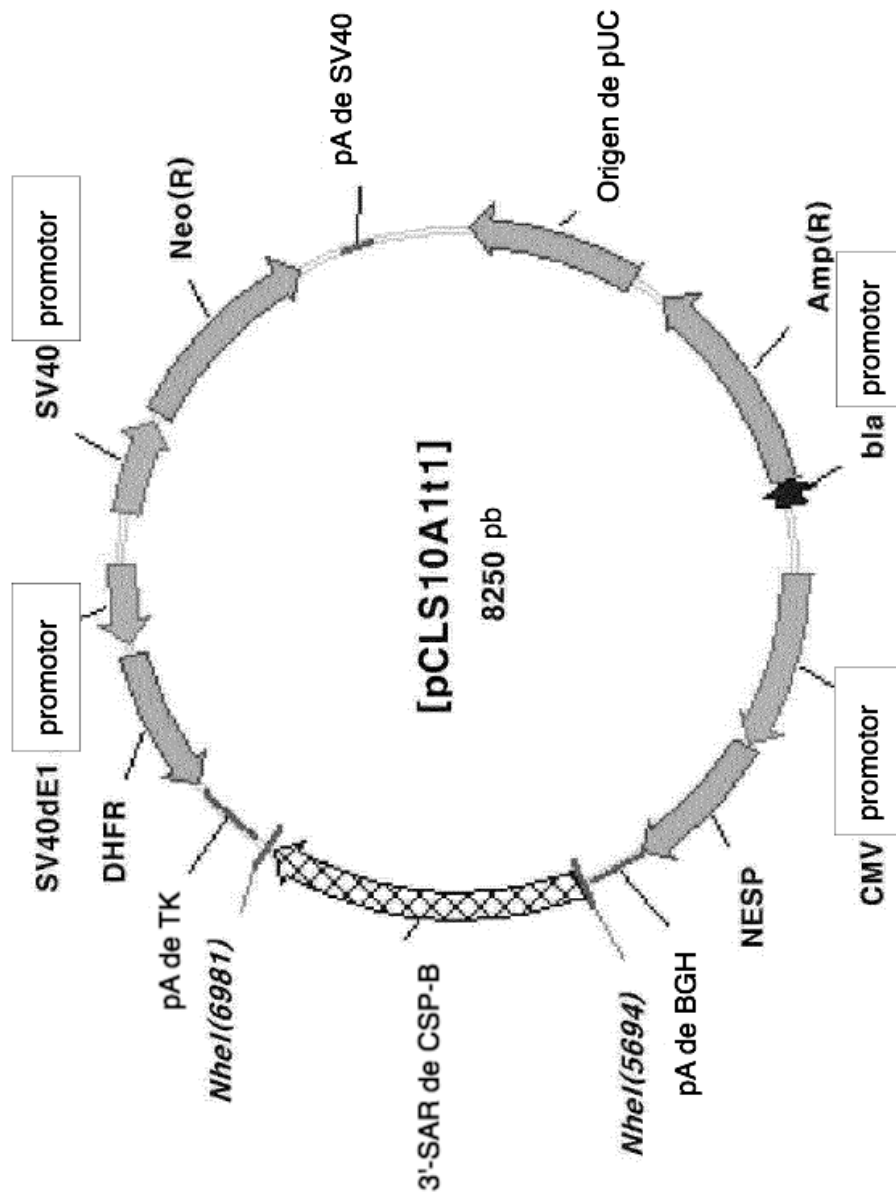


Fig. 7

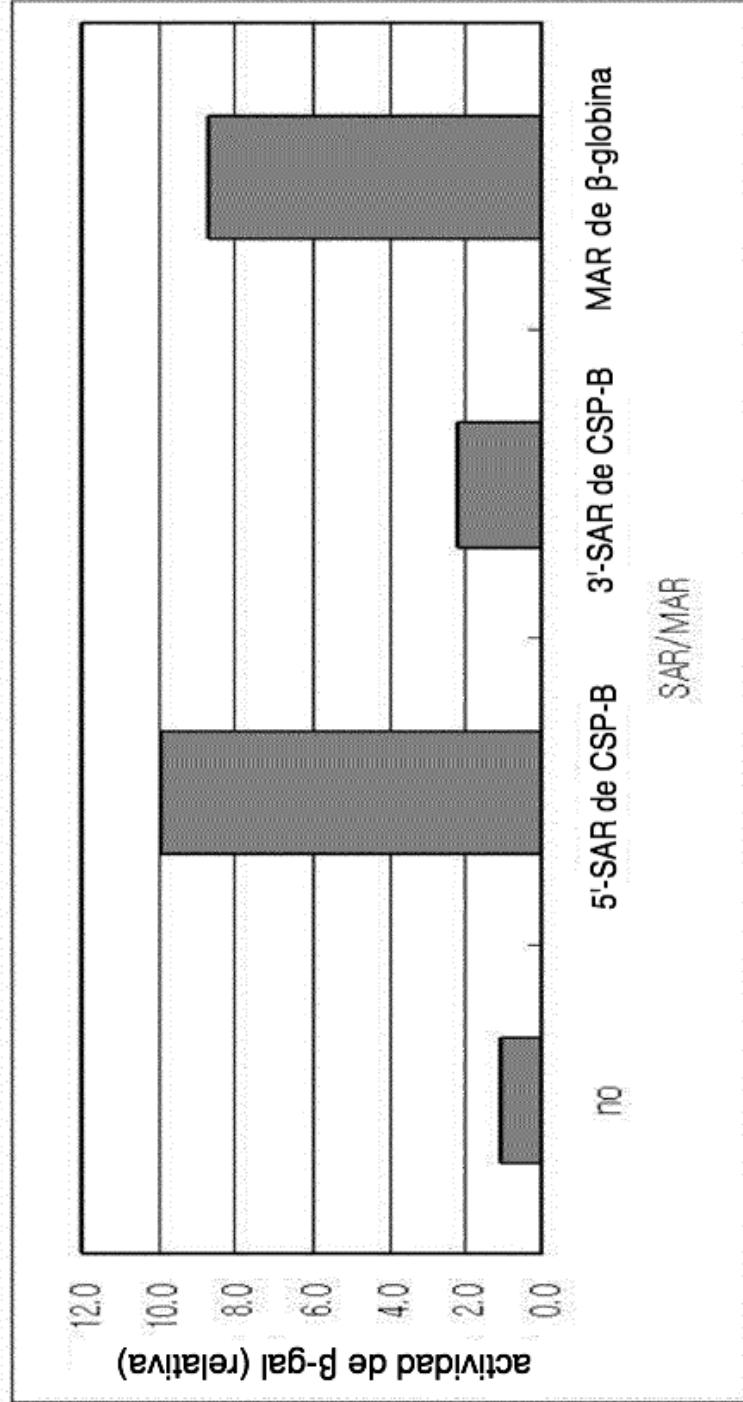


Fig. 8

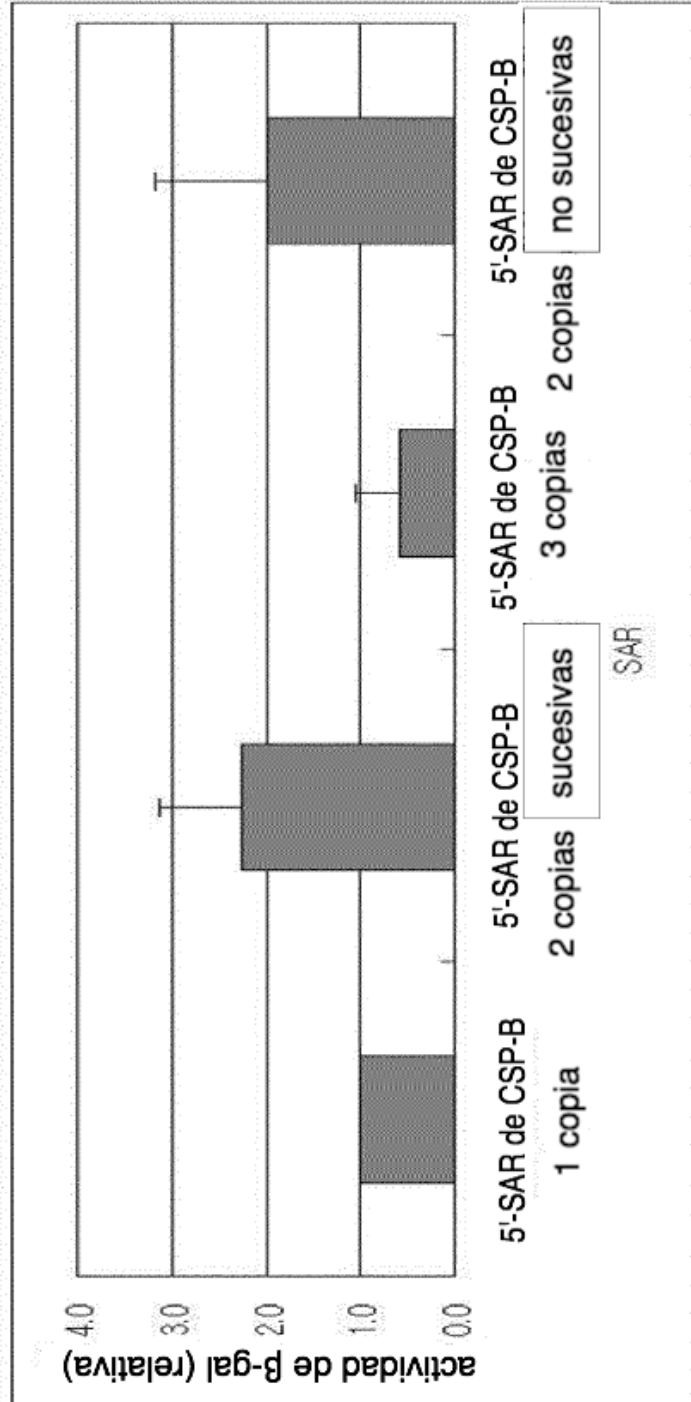


Fig. 9

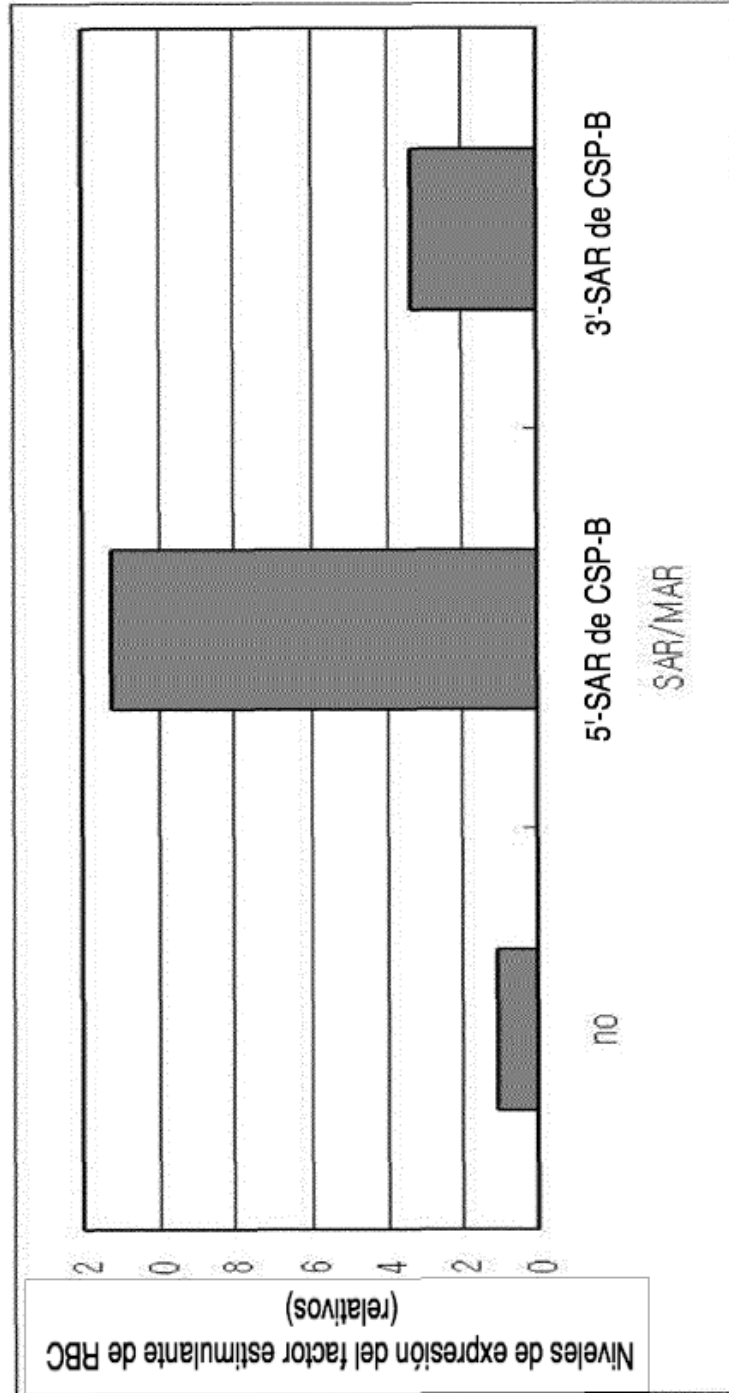


Fig. 10

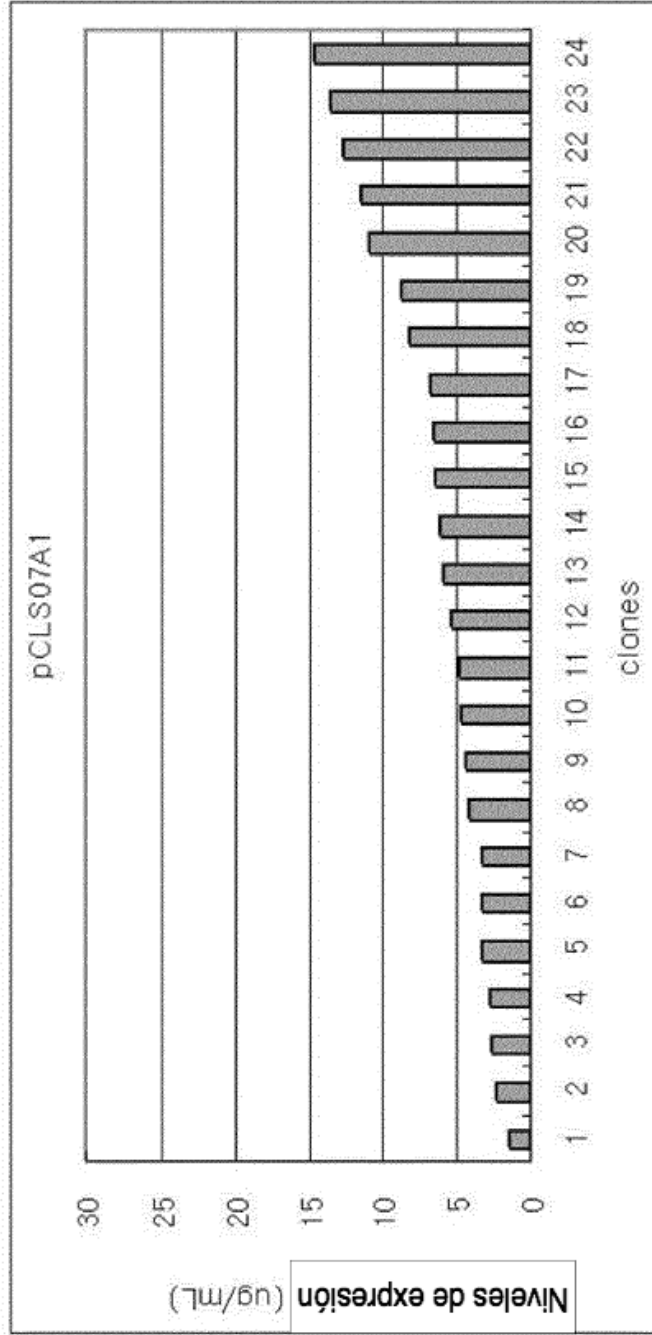


Fig. 11

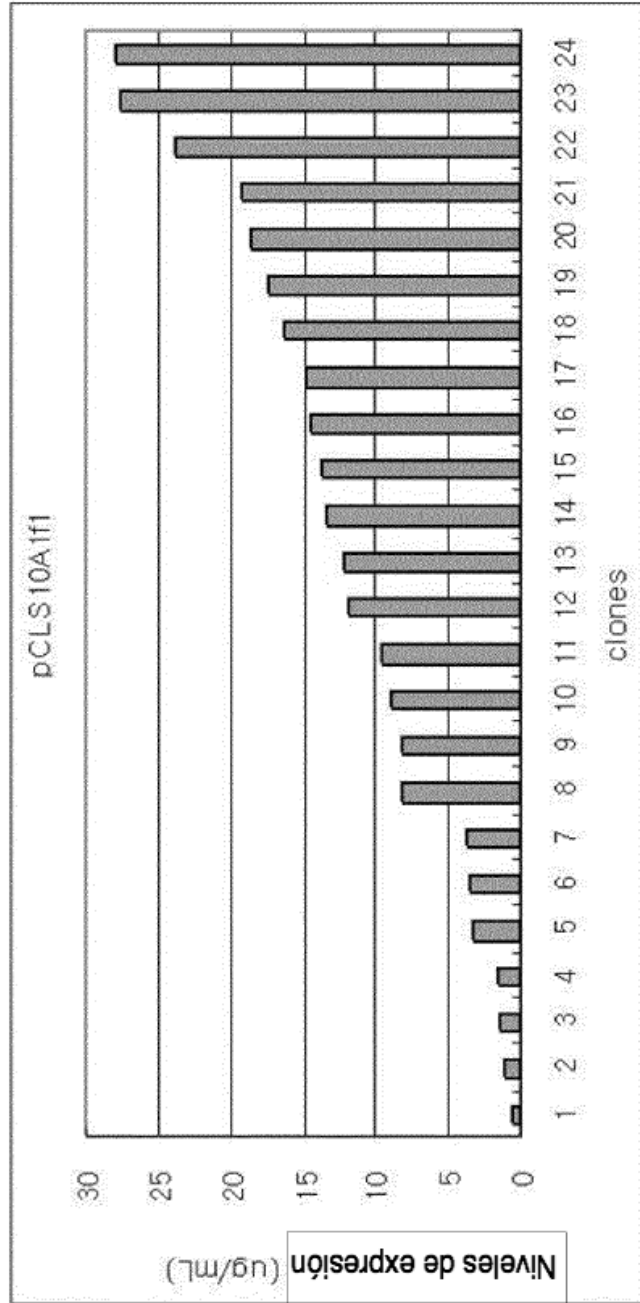


Fig. 12a

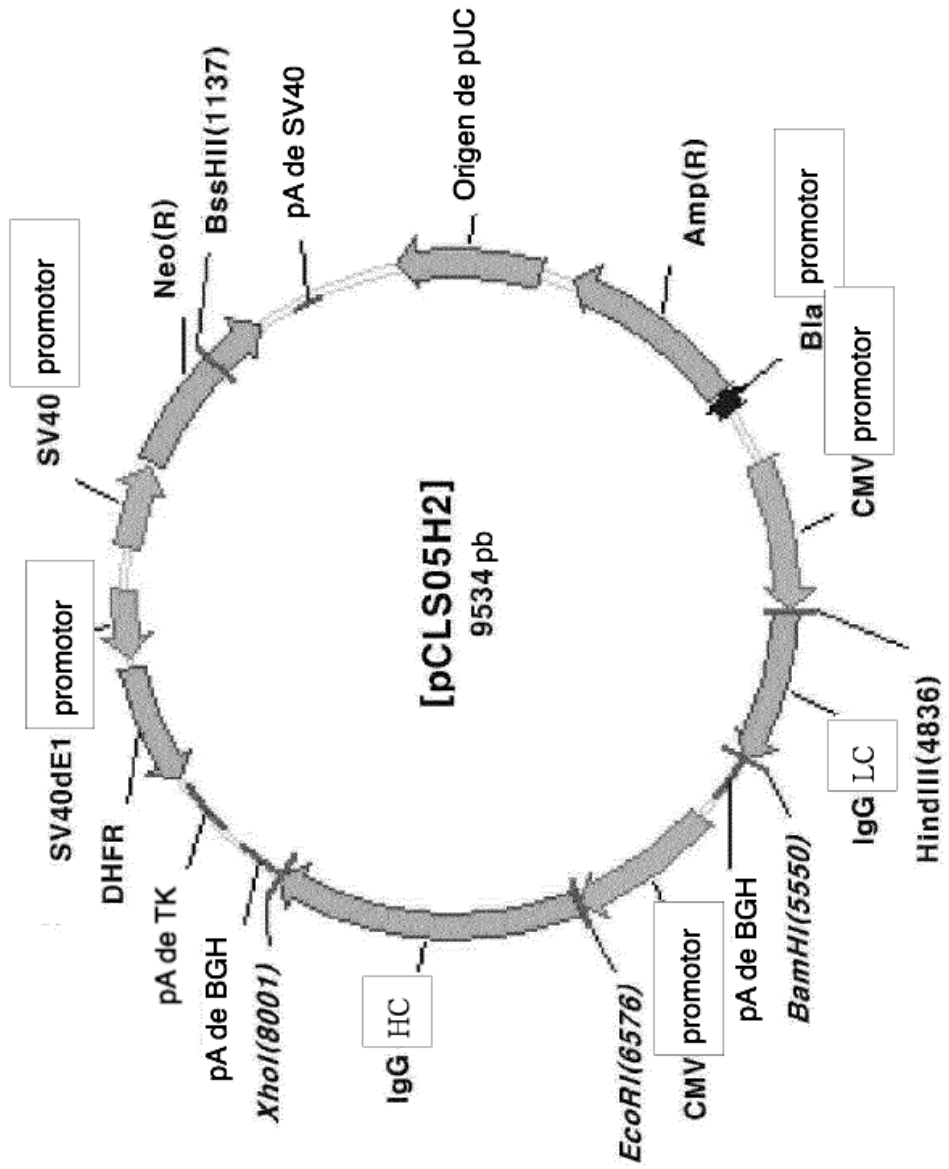


Fig. 12b

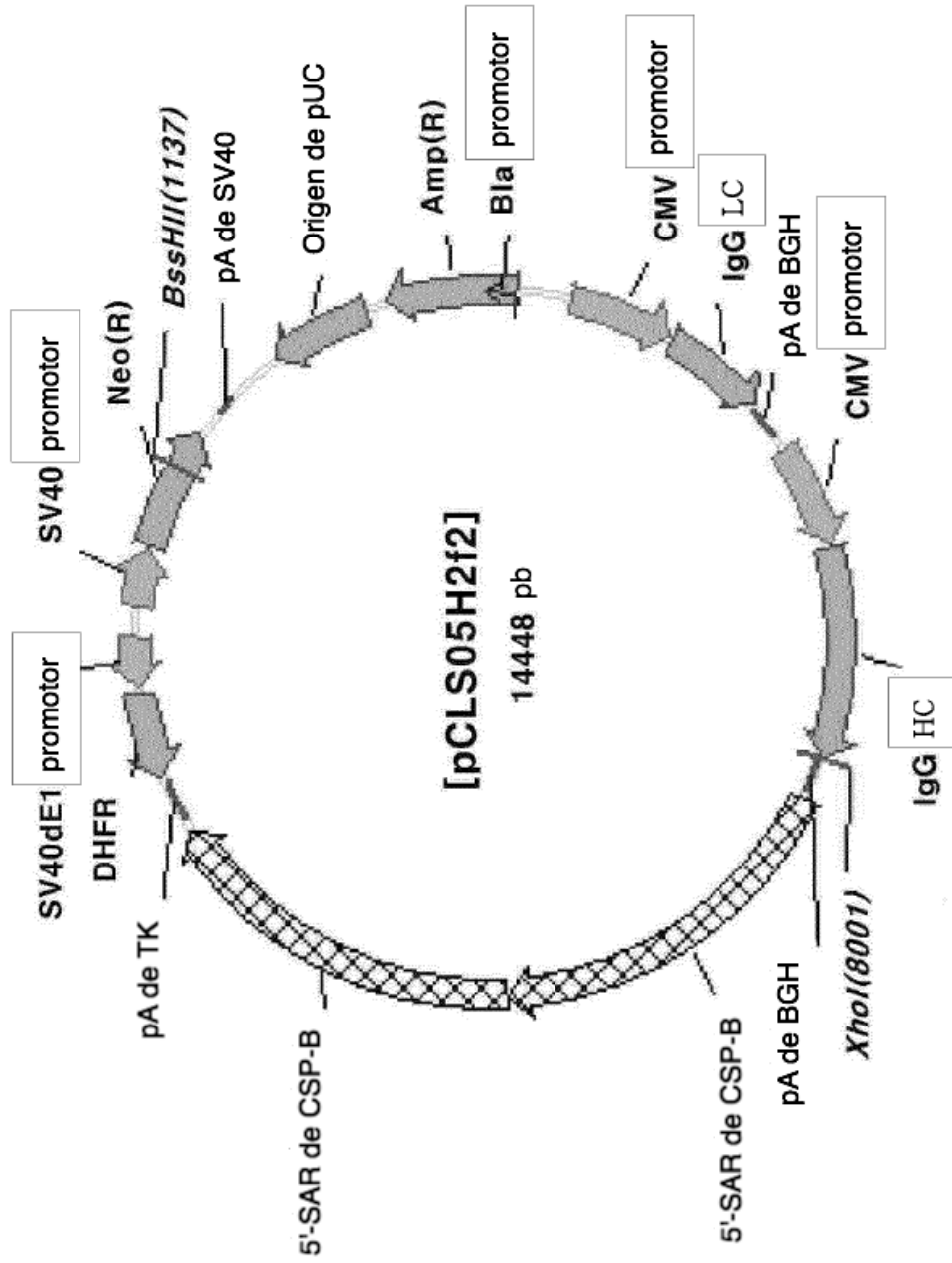


Fig. 13

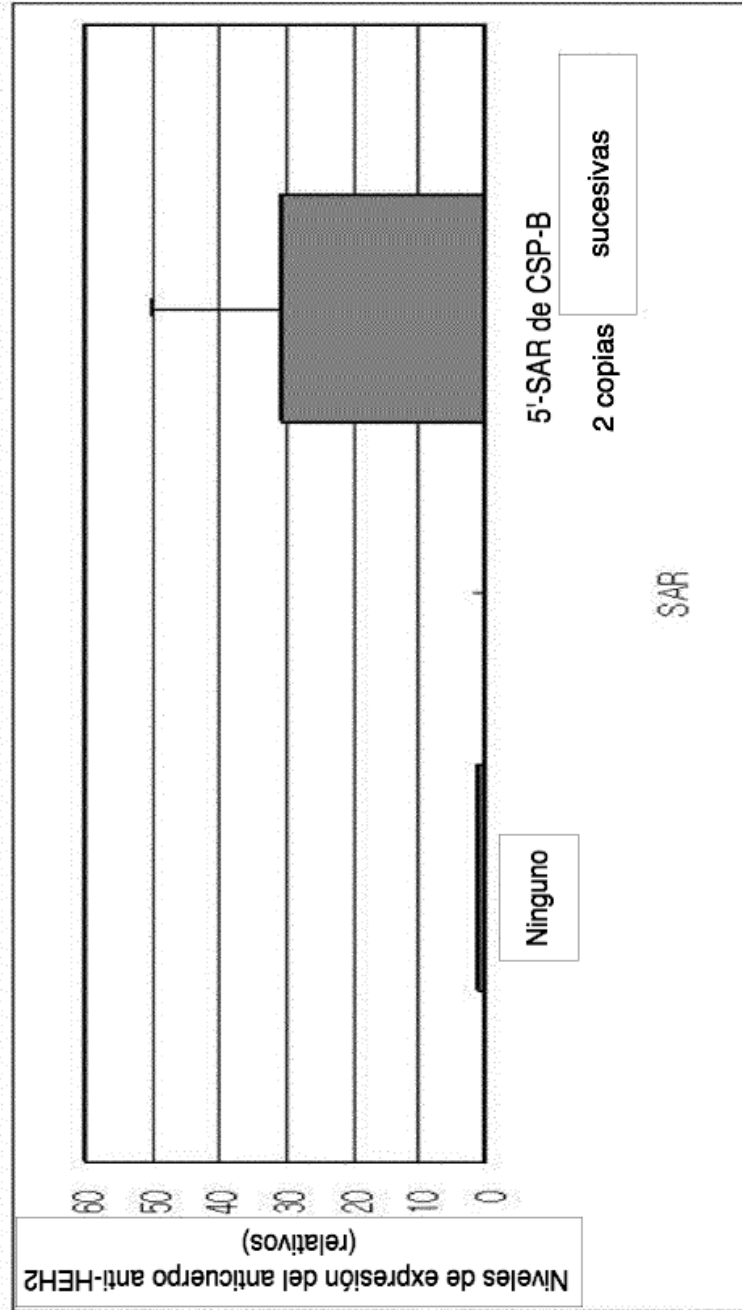


Fig. 14

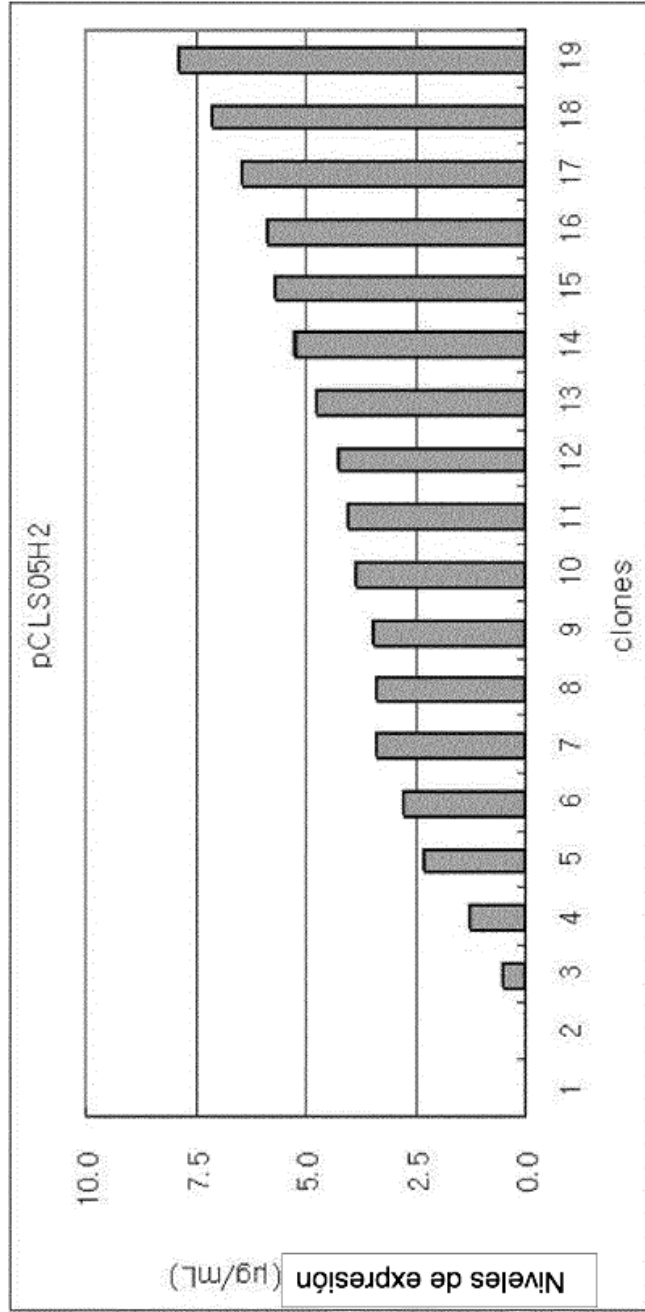


Fig. 15

