

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 811 648**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/85** (2006.01)

**C12N 15/67** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.03.2014 PCT/US2014/023661**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.10.2014 WO14164869**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2014 E 14727377 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2020 EP 2971005**

54 Título: **Expresión de proteína biotecnológica mejorada que usa un activador CHEF1 híbrido**

30 Prioridad:  
**12.03.2013 US 201361777603 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**12.03.2021**

73 Titular/es:  
**AGC BIOLOGICS, INC. (100.0%)  
22021 20th Avenue SE  
Bothell, WA 98021, US**

72 Inventor/es:  
**CLARKE, HOWARD R.**

74 Agente/Representante:  
**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 811 648 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**

Expresión de proteína biotecnológica mejorada que usa un activador chef1 híbrido

Esta solicitud contiene, como parte separada de la descripción, una lista de secuencias en forma legible por ordenador (Nombre de archivo: 44744A\_SeqListing.txt; Tamaño: 37.528 bytes; Creado: 11 de marzo de 2014).

## 5 Referencia cruzada con solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud de patente provisional de EE.UU. nº de serie 61/777.603, presentada el 12 de marzo de 2013.

**Campo de la invención**

10 Esta invención está dirigida a vectores de expresión que comprenden una nueva combinación de activador-potenciador que aumenta la expresión de proteínas heterólogas y tiene aplicación práctica en el campo de la producción de proteínas biotecnológicas.

**Antecedentes de la invención**

15 El aumento de la expresión de proteínas biotecnológicas mediante mejoras en la transcripción, traducción, plegamiento y/o secreción de proteínas es una prioridad fundamental para optimizar el rendimiento durante el desarrollo de la estirpe celular. El sistema de expresión del factor 1- $\alpha$  de alargamiento de ovario de hámster chino (CHEF1) se ha utilizado ampliamente para crear estirpes celulares clínicas para producir proteínas biotecnológicas. El gen del factor 1- $\alpha$  de alargamiento (EF-1 $\alpha$ ) se expresa mucho en la mayoría de los tipos de tejidos, y EF-1 es una de las proteínas más abundantes en las células humanas (Beck *et al.*, *Molecular Systems Biology* 7: 549; 2011) Los vectores de expresión CHEF1 consiguen una expresión de proteína biotecnológica de alto nivel en células de ovario de hámster chino (CHO), así como en células que no son de hámster.

20 La expresión de CHEF1 se coordina con el crecimiento de tal manera que los aumentos del valor se deben a una mayor productividad volumétrica. Normalmente, la expresión de proteínas se inicia al principio en la fase exponencial de crecimiento y disminuye durante la fase estacionaria y el descenso. El vínculo entre la expresión de proteínas y el crecimiento celular es coherente con la regulación del gen EF-1 $\alpha$  natural, que se expresa constitutivamente para funcionar en complejos de proteínas ribosómicas. Se ha documentado que la expresión de EF-1 $\alpha$  aumenta en transformada (Sanders *et al.*, *Nucleic Acids Research* 20: 5907; 1992) y células estimuladas por mitógenos (Thomas y Thomas, *Journal of Cell Biology* 103: 2137; 1986), coherente con la expresión constitutiva de EF-1 $\alpha$  en células en crecimiento activo. Además del control de la transcripción en las células en crecimiento, el factor de crecimiento insulina regula la traducción de EF-1 $\alpha$  a través de la región no traducida de ARNm 5' (5'UTR) (Hammond y Bowman, *Journal of Biological Chemistry* 25: 17785; 1988; Proud y Denton, *Biochemical Journal* 328: 329; 1997) Este control de la traducción se consigue mediante la secuencia del Tracto de Polipirimidina (TOP) que se encuentra en el 5'UTR (Mariottini y Amaldi, *Molecular and Cellular Biology* 10: 816; 1990).

25 Se ha demostrado que los sistemas de expresión CHEF1 son capaces de alcanzar niveles más altos de expresión de proteínas que los vectores que emplean otros activadores utilizados habitualmente, como los activadores de citomegalovirus (CMV), EF-1 $\alpha$  humano y el virus Simian 40 (SV40) (Running Deer and Allison, *Biotechnology Progress* 20: 880; 2004) El activador de CMV es uno de los activadores más utilizados para la expresión de proteínas biotecnológicas. Por ejemplo, el sistema de glutamina sintetasa (GS) utiliza un activador de CMV murino o humano (Kalwy, S., "Towards stroger gene expression – a promoter tale", 19<sup>a</sup> reunión de la Sociedad Europea de Tecnología de Células Animales (ESACT), 2005). El plásmido pcDNA<sup>TM</sup> 3 de expresión comercial (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA) lleva un activador de CMV procedente del gen principal inmediato-inicial (IE) (Registro en GenBank nº K03104.1) descrito anteriormente (Boshart *et al.*, *Cell* 1985; 4:521) Otro activador de CMV frecuentemente utilizado procede de la cepa AD 169 de CMV humano (nº de registro en GenBank X17403.1), también conocido como virus del herpes humano 5.

35 Los vectores que contienen ADN regulador CHEF1 producen una expresión mejorada de proteínas biotecnológicas que es hasta 280 veces mayor que la de los plásmidos controlados por CMV (Running Deer y Allison, 2004). Se ha conseguido una mayor expresión de una variedad de proteínas de interés, incluidas las proteínas segregadas y unidas a la membrana, en diferentes estirpes celulares eucariotas, incluidas las células que no son de hámster, usando vectores dirigidos por CHEF1. Las eficiencias de transfección entre los vectores CHEF1 y CMV son comparables, pero los niveles de expresión en clones transfectados con vectores CHEF1 son generalmente uniformemente más altos. El documento WO2007/081336A1 describe un vector de expresión que comprende un primer elemento regulador, una secuencia activadora, una secuencia principal, una secuencia de clonación múltiple, una señal de poliadenilación y un segundo elemento regulador, en donde el primer y segundo elementos reguladores comprenden secuencias de un factor-1 de elongación de mamífero que puede ser factor de elongación-1 humano, de hámster chino, gato o chimpancé. La secuencia activadora puede comprender un activador de CMV.

50 A pesar del éxito demostrado de los vectores CHEF1 para impulsar la expresión de alto nivel de proteínas biotecnológicas, continúa habiendo necesidad de desarrollar mejores sistemas de expresión.

## Compendio de la invención

La descripción proporciona un vector de expresión para la expresión de alto nivel de proteínas biotecnológicas. El vector de expresión comprende elementos de ADN reguladores de la transcripción CHEF1 y un activador de CMV según la reivindicación 1.

5 En este documento se describe un vector de expresión que comprende ADN regulador de la transcripción 5' CHEF1'. El ADN regulador de la transcripción 5' CHEF1, expuesto en la presente memoria, comprende la SEC ID n°: 1. El ADN regulador de la transcripción 5' CHEF1, expuesto en la presente memoria, puede comprender el ADN situado entre la posición 1 y la posición 11.716 en la SEC ID n°: 1. El ADN regulador de la transcripción 5' CHEF1 puede comprender el ADN situado entre las posiciones 10.744 y 11.716 en la SEC ID n°: 1. El ADN regulador de la transcripción 5' CHEF1 puede comprender el ADN situado entre la posición 1 y la posición 4.057 en SEQ ID n°: 2.

10 Un vector de expresión, expuesto en la presente memoria, según la descripción comprende además el ADN regulador de la transcripción 3' CHEF1. El ADN regulador de la transcripción 3' CHEF1 puede comprender la SEC ID n°: 3. El ADN regulador de la transcripción 3' CHEF1 puede comprender el ADN situado entre la posición 1 y la posición 4.180 en la SEC ID n°: 3. El ADN regulador de la transcripción 3' CHEF1 puede comprender el ADN situado entre la posición 1 y la posición 209 en la SEQ ID n°: 3. El ADN regulador de la transcripción 3' CHEF1 puede comprender aproximadamente 4,2 kilobases.

15 El vector de expresión según la descripción comprende ADN regulador de la transcripción CHEF1 y un activador de CMV. En diversas realizaciones, el vector de expresión comprende ADN regulador de la transcripción CHEF1 y una secuencia de AdTPL. En varios aspectos, el vector de expresión comprende ADN regulador de la transcripción CHEF1, un activador de CMV y una secuencia de AdTPL.

20 En el vector de expresión según la descripción, se inserta un activador de CMV y/o una secuencia de AdTPL en el ADN regulador de la transcripción 5' CHEF1. Debidamente, el vector de expresión puede comprender ADN dispuesto en la SEQ ID n°: 1, una o más bases entre la posición 1 y la posición 11.716 en la SEQ ID n°: 1, se eliminan/reemplazan con un activador de CMV y/o una secuencia AdTPL. Una o más bases entre la posición 10.512 y la posición 11.716 en SEQ ID n°: 1 pueden eliminarse y reemplazarse con un activador de CMV y/o secuencia AdTPL. Un vector de expresión según la descripción comprende uno o más de los polinucleótidos expuestos en SEQ ID n°: 6 y SEQ ID n°: 7.

25 En diversas realizaciones, un vector de expresión según la descripción comprende además un gen marcador seleccionable. Un vector de expresión, expuesto en la presente memoria, según la descripción puede comprender además un polinucleótido que codifica una proteína de interés que está operativamente unida al ADN regulador de la transcripción 5' CHEF1, el ADN regulador de la transcripción 3' CHEF1, el activador del CMV y/o la secuencia AdTPL.

30 La descripción también proporciona células anfitrionas transformadas, transducidas o transfectadas con un vector de expresión según la invención que comprende ADN regulador de la transcripción CHEF1 y un activador de CMV y/o una secuencia AdTPL según la reivindicación 1. En diversos aspectos, la célula anfitriona es una célula procarionta o eucariota. En varios aspectos, la célula anfitriona es una célula de hámster, y en diversas realizaciones, la célula anfitriona es una célula de ovario de hámster chino (CHO). En varios aspectos, la célula anfitriona es una célula de mamífero distinto del hámster. En diversas realizaciones, la célula anfitriona es una célula humana. El vector de expresión de la descripción que comprende ADN regulador de la transcripción CHEF1 en combinación con un activador de CMV y/o una secuencia de AdTPL consigue un aumento sinérgico en la capacidad de expresión de proteínas de las células anfitrionas.

## Breve descripción de los dibujos

35 La figura 1 muestra una cartografía del vector de expresión pDEF85 que comprende ADN regulador de la transcripción 5' y 3' CHEF1 y un activador de CMV. El activador de CMV reemplaza 1.217 nucleótidos (desde la posición 2.866 a la posición 4.083) del ADN 5' CHEF1 en el vector pDEF38 para crear pDEF85. Los genes indicadores GP1 y MAb1 se clonaron en las secuencias de clonación XhoI - XbaI para hacer los vectores de expresión pDEF85-GP1 y pDEF85-MAb1.

40 La figura 2 muestra una cartografía del vector de expresión pDEF86 que comprende ADN regulador de la transcripción 5' y 3' CHEF1, un activador de CMV y una secuencia AdTPL. El activador de CMV y la secuencia AdTPL reemplazan 1.217 nucleótidos (desde la posición 2.866 a la posición 4.083) del ADN 5' CHEF1 en el vector pDEF38 para crear pDEF86. Los genes indicadores GP1 y MAb1 se clonaron en las secuencias de clonación XhoI - XbaI para hacer los vectores de expresión pDEF86-GP1 y pDEF86-MAb1.

45 La figura 3 muestra la viabilidad de las células anfitrionas CHO transfectadas con el vector pDEF38-GP1, pDEF85-GP1 o pDEF86-GP1. Las células se recuperaron durante 2-3 días en medios CD-CIM1 más HT no seleccionados y se volvieron a poner en suspensión en medios de selección que carecían de HT (Paso 0). Las células se pasaron cada 2 a 3 días a medida que lo permitía el número de células. El número de pasos se proporciona en el eje x, y el porcentaje de viabilidad celular se muestra en el eje y.

- La figura 4 muestra la viabilidad y productividad de las células anfitrionas CHO transfectadas con el vector pDEF38-GP1, pDEF85-GP1 o pDEF86-GP1. Los grupos de transfección replicados se realizaron en modelos de producción de lotes alimentados 12 días y se alimentaron con Feed C los días 3, 5 y 7 y CB los días 0, 3, 5 y 7 en medios de base CD-CIM1. Las producciones se realizaron a 37°C y se cambiaron a 34°C el tercer día. La densidad de células viables, el porcentaje de viabilidad y la productividad se midieron los días 3, 5, 7, 10 y 12. La figura 4A muestra la densidad de células viables, con los días mostrados en el eje x y la densidad de células viables, medida en 10<sup>5</sup> células por mililitro, representada en el eje y. La figura 4B muestra el porcentaje de viabilidad, con los días mostrados en el eje x y el porcentaje de viabilidad celular representado en el eje y. La figura 4C muestra la productividad, con los días mostrados en el eje x y el valor de proteínas, en microgramos por mililitro, representados en el eje y.
- La figura 5 muestra la productividad específica de las células anfitrionas CHO transfectadas con el vector pDEF38-GP1, pDEF85-GP1 o pDEF86-GP1. El área celular integrada (ICA), medida en millones de células por mililitro multiplicada por el día, se muestra en el eje x y el valor de proteína, medido en microgramos por mililitro, se representa en el eje y. Los valores de productividad específica se calcularon en picogramos de proteína por célula por día como promedio durante todo el cultivo celular.
- La figura 6 muestra la productividad de las células anfitrionas CHO transfectadas con los vectores pDEF38-GP1, pDEF85-GP1 o pDEF86-GP1 cultivados en medios enriquecidos con BF1. Los grupos de transfección replicados se realizaron en modelos de producción de lotes alimentados de 12 días y alimentados con BF1 en medio base CD-CIM1 más CB los días 4, 6, 8, 10 y 12. Las producciones se realizaron a 37°C y se cambiaron a 34°C el día 3. Las muestras de valor se midieron los días 5, 7, 10 y 12. Los días se muestran en el eje x y el valor de proteína, medido en microgramos por mililitro, se representa en el eje y.
- La figura 7 muestra el crecimiento y la productividad de las células anfitrionas CHO transfectadas con el vector pDEF38-MAb1, pDEF85-MAb1 o pDEF86-MAb1 cultivadas en medios enriquecidos con BF1. Los grupos de transfección replicados se realizaron en modelos de producción de lotes alimentados de 12 días y se alimentaron con BF1 en medio base CD-CIM1 más CB los días 4, 6, 8, 10 y 12. Las producciones se realizaron a 37°C y se cambiaron a 32,5°C el día 5. Las muestras de valores de anticuerpos se midieron los días 7, 10, 12 y 14. La figura 7A muestra el crecimiento, mostrándose los días en el eje x y la densidad de células viables, medida en 10<sup>5</sup> células por mililitro, representada en el eje y. La figura 7B muestra la productividad, mostrándose los días en el eje x y los valores de proteínas, medidos en microgramos por mililitro, representados en el eje y.
- La figura 8 muestra el crecimiento y la productividad de las células anfitrionas CHO transfectadas con el vector pDEF38-MAb1 o pDEF85-MAb1. Doce clones seleccionados al azar que expresan MAb1 después de la transfección con pDEF38 o pDEF85 se realizaron en modelos de producción de lotes alimentados de 12 días y se alimentaron con BF1 en medios de base CD-CIM1 más CB los días 4, 6, 8, 10 y 12. Se realizaron las producciones a 37°C y se cambiaron a 32,5°C el día 5. La densidad de células viables y el valor de anticuerpos se midieron los días 4, 6, 11 y 13. La figura 8A muestra el crecimiento de cada clon, mostrándose los días en el eje x y la densidad de células viables, medida en 10<sup>5</sup> células por mililitro, representada en el eje y. La figura 8B muestra la productividad de cada clon, mostrándose los días en el eje x y los valores de anticuerpos, medidos en microgramos por mililitro, representados en el eje y.
- La figura 9 muestra la productividad de las células anfitrionas CHO transfectadas con el vector pDEF38-GP1 o pDEF85-GP1. Se seleccionaron ocho clones que expresaban GP1 después de la transfección con pDEF38-GP1 o pDEF85-GP1 usando citometría de flujo y se realizaron en un modelo de producción de lotes alimentados de 12 días. Los clones se alimentaron con BF1 en medio base CD-CIM1 más CB los días 4, 6, 8, 10 y 12. Las producciones se realizaron a 37°C y se cambiaron a 32,5°C el día 3. Los valores se midieron los días 5, 7, 10, 12 y 14. La figura 9A muestra la productividad de los clones transfectados con el vector pDEF38-GP1 de CHEF1, mostrándose los días en el eje x y el valor de proteína, medido en microgramos por mililitro, representado en el eje y. La figura 9B muestra la productividad de los clones transfectados con el vector pDEF85-GP1 del CHEF1-CMV, mostrándose los días en el eje x y el valor de proteína, medido en microgramos por mililitro, representado en el eje y.

#### Descripción detallada de la invención

La presente invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

- La presente descripción proporciona un vector de expresión que comprende una combinación de elementos de ADN reguladores para lograr una expresión proteica de alto nivel y una productividad mejorada en comparación con los vectores conocidos en el campo. La descripción también proporciona una célula anfitriona transformada con un vector de expresión descrito en la presente memoria. El vector de expresión de la descripción comprende ADN regulador de la transcripción CHEF1 combinado con un activador de CMV y/o una secuencia de AdTPL. El uso de elementos de ADN reguladores de la transcripción CHEF1 en un vector de expresión para lograr una expresión de alto nivel de proteínas biotecnológicas se ha descrito anteriormente (Patente de EE.UU. n° 5.888.809; Running Deer y Allison, 2004) Se ha demostrado que la expresión de proteínas de los vectores dirigidos por CHEF1 es significativamente mayor que la de los vectores controlados por el activador del CMV para una serie de proteínas diferentes y tipos de células anfitrionas, y el aumento puede ser mayor de 250 veces (Running Deer y Allison, 2004) . La secuencia AdTPL es una secuencia no codificante 5' de 200 nucleótidos que se encuentra en los ARNm víricos tardíos que mejora su

traducción (Logan, *PNAS* 81: 3655; 1984).

5 Considerando la expresión de proteína mejorada obtenida usando vectores controlados por CHEF1, la adición de regiones de control distintas de CHEF1, tales como un activador de CMV o una secuencia de AdTPL, a un vector de expresión de CHEF1 sería ilógica. La presencia de dichas regiones de control distintas de CHEF1 podría interrumpir la acción cooperativa de cada uno de los elementos reguladores de la transcripción CHEF1 y no cabría esperar que actuara en concierto con el ADN regulador CHEF1 para producir una expresión de proteína mejorada. Sin embargo, el vector de expresión de la presente descripción, que comprende ADN regulador de la transcripción CHEF1 y un activador de CMV y/o una secuencia AdTPL, sorprendentemente produce un aumento de la expresión de proteína en comparación con los vectores que comprenden solo regiones de control CHEF1.

10 Como se emplea en el presente documento, las siguientes definiciones pueden ser útiles para ayudar al profesional experto a comprender la descripción:

La expresión "vector de expresión" se refiere a cualquier molécula utilizada para transferir información de codificación a una célula anfitriona. En varios aspectos, el vector de expresión es un ácido nucleico, un plásmido, un cósmido, un virus o un cromosoma artificial.

15 La expresión "célula anfitriona" se refiere a una célula que ha sido transformada, transfectada o transducida por un vector de expresión que lleva un gen de interés, que luego es expresado por la célula. Una célula anfitriona es, en varios aspectos, una célula procarionota o eucarionota. En varios aspectos, la célula anfitriona es una célula bacteriana, una célula protista, una célula fúngica, una célula vegetal o una célula animal. La expresión también se refiere a la descendencia de la célula madre anfitriona, independientemente de si la descendencia es idéntica en genotipo o fenotipo a la madre, siempre que el gen de interés esté presente.

20 La expresión "activador de CMV" se refiere a secuencias de activador de CMV conocidas en la técnica. En varios aspectos, el activador de CMV es de cualquier origen, incluyendo murino (mCMV) o humano (hCMV). En varios aspectos, un hCMV procede de cualquier cepa de CMV. En varios aspectos, la cepa de CMV es AD169, Davis, Toledo o Towne. En diversas realizaciones de la descripción, el activador de CMV contiene el polinucleótido expuesto en la SEC ID n°: 4.

La expresión "secuencia de AdTPL" se refiere a la secuencia no codificante 5' de aproximadamente 200 nucleótidos presente en los ARNm víricos tardíos de adenovirus humano que se conoce en la técnica. En diversas realizaciones, la secuencia de AdTPL contiene el polinucleótido expuesto en la SEQ ID n°: 5.

30 La expresión "ADN regulador de la transcripción CHEF1" se refiere a secuencias no codificantes que contienen elementos reguladores que actúan en *cis* capaces de controlar la transcripción del gen CHEF 1, tal como la región activadora y elementos tales como potenciadores, aislantes y regiones de unión a la estructura/matriz.

La expresión "ADN regulador de la transcripción CHEF1 5'" se refiere al ADN, cuando está en la naturaleza, está situado en 5', es decir, aguas arriba, del codón de iniciación en el gen CHEF1 en el genoma del hámster chino.

35 La expresión "ADN regulador de la transcripción CHEF1 3'" se refiere al ADN, cuando en la naturaleza, está situado en 3', es decir, aguas abajo, del codón de terminación en el gen CHEF1 en el genoma del hámster chino.

Los términos "aproximadamente" y "alrededor de" se refieren a cantidades que están dentro del intervalo cercano de una cantidad de referencia. Con respecto a los polinucleótidos, una secuencia que es o está aproximadamente/alrededor de una longitud especificada está dentro del 5% de la longitud citada.

40 En varios aspectos, un vector de expresión según la descripción comprende ADN regulador de la transcripción CHEF1 y un activador de CMV y/o una secuencia de AdTPL. En varios aspectos, el ADN regulador de la transcripción CHEF1 comprende ADN regulador de la transcripción CHEF1 5' y/o ADN regulador de la transcripción CHEF1 3'.

45 El ADN regulador de la transcripción CHEF1 5' expuesto en la presente memoria, comprende el polinucleótido expuesto en la SEQ ID n°: 1. La descripción también proporciona ADN regulador de la transcripción CHEF1 5' que es al menos 99%, al menos 98%, al menos 97%, al menos 96%, al menos 95%, al menos 94%, al menos 93%, al menos 92%, al menos 91%, al menos 90%, al menos 85%, al menos 80%, al menos 75% o al menos un 70% idéntico al polinucleótido expuesto en la SEQ ID n°: 1. El ADN regulador de la transcripción CHEF1 5' expuesto en la presente memoria, comprende el ADN situado entre la posición 1 y la posición 11.716 de la SEQ ID n°: 1, es decir, una porción de la SEQ ID n°: 1. La descripción también proporciona ADN regulador de la transcripción CHEF1 5' que es al menos 99%, al menos 98%, al menos 97%, al menos 96%, al menos 95%, al menos 94%, al menos 93%, al menos 92%, al menos 91%, al menos 90%, al menos 85%, al menos 80%, al menos 75% o al menos 70% idéntico al ADN situado entre la posición 1 y la posición 11.716 en la SEQ ID n°: 1. El ADN regulador de la transcripción CHEF1 5' puede comprender ADN situado entre la posición 10.744 y la posición 11.716 en la SEC ID n°: 1. La descripción también proporciona ADN regulador de la transcripción CHEF1 5' que es al menos 99%, al menos 98%, al menos 97%, al menos 96%, al menos 95%, al menos 94%, al menos 93%, al menos 92%, al menos 91%, al menos 90%, al menos 85%, al menos 80%, al menos 75% o al menos 70% idéntico al ADN situado entre la posición 10.744 y la posición 11.716 en la SEQ ID n°: 1. Como se expuso en la presente memoria, el ADN regulador de la transcripción CHEF1 5'

puede comprender el polinucleótido expuesto en la SEC ID nº: 2. Como se expuso en la presente memoria también proporciona ADN regulador de la transcripción 5' CHEF1 que es al menos 99%, al menos 98%, al menos 97%, al menos 96%, al menos 95%, al menos 94%, al menos 93%, al menos 92%, al menos 91%, al menos 90%, al menos 85%, al menos 80%, al menos 75% o al menos 70% idénticos al polinucleótido expuesto en la SEQ ID nº: 2. Como se expuso en la presente memoria, el ADN regulador de la transcripción CHEF1 5' puede comprender ADN situado entre la posición 1 y la posición 4.057 de la SEC ID nº: 2, es decir, una porción de la SEC ID nº: 2. La descripción también proporciona ADN regulador de la transcripción CHEF1 5' ADN que es al menos 99%, al menos 98%, al menos 97%, al menos 96%, al menos 95%, al menos 94%, al menos 93%, al menos 92%, al menos 91%, al menos 90%, al menos 85%, al menos 80%, al menos 75% o al menos 70% idénticos al ADN situado entre la posición 1 y la posición 4.057 de la SEQ ID nº: 2.

Como se expuso en la presente memoria, el vector de expresión además puede comprender ADN regulador de la transcripción 3' CHEF1. El ADN regulador de la transcripción 3' CHEF1 puede comprender el polinucleótido expuesto en la SEC ID nº: 3. El ADN regulador de la transcripción 3' CHEF1 expuesto en la presente memoria, puede ser al menos 99%, al menos 98%, al menos 97%, al menos 96%, al menos 95%, al menos 94%, al menos 93%, al menos 92%, al menos 91%, al menos 90%, al menos 85%, al menos 80%, al menos 75% o al menos 70% idéntico al polinucleótido expuesto en la SEQ ID nº: 3. El ADN regulador de la transcripción 3' CHEF1 puede comprender el ADN situado entre la posición 1 y la posición 4.180 en la SEQ ID nº: 3, es decir, una porción de la SEQ ID nº: 3. La descripción también proporciona ADN regulador de la transcripción 3' CHEF1 que es al menos 99%, al menos 98%, al menos 97%, al menos 96%, al menos 95%, al menos 94%, al menos 93%, al menos 92%, al menos 91%, al menos 90%, al menos 85%, al menos 80%, al menos 75% o al menos 70% idéntico al ADN situado entre la posición 1 y la posición 4.180 en SEQ ID nº: 3, es decir, una porción de SEQ ID nº: 3. El ADN regulador de la transcripción 3' CHEF1 puede comprender ADN situado entre la posición 1 y la posición 209 en la SEQ ID nº: 3. El ADN regulador de la transcripción 3' HEF expuesto en la presente memoria, puede ser al menos 99%, al menos 98%, al menos 97%, al menos 96%, al menos 95%, al menos 94%, al menos 93%, al menos 92%, al menos 91%, al menos 90%, al menos 85%, al menos 80%, al menos 75% o al menos 70% idéntico al ADN situado entre la posición 1 y la posición 209 en SEQ ID nº: 3. El ADN regulador de la transcripción 3' CHEF1 puede comprender aproximadamente 4,2 kilobases.

El vector de expresión expuesto en la presente memoria puede comprender elementos de ADN regulador de la transcripción CHEF1 y un activador de CMV. El activador de CMV expuesto en la presente memoria, puede comprender el polinucleótido expuesto en la SEQ ID nº: 4. La descripción también proporciona un activador de CMV que es al menos 99%, al menos 98%, al menos 97%, al menos 96%, al menos 95%, al menos 94%, al menos 93%, al menos 92%, al menos 91%, al menos 90%, al menos 85%, al menos 80%, al menos 75% o al menos 70% idéntico al polinucleótido expuesto en la SEQ ID nº: 4. En varios aspectos, el vector de expresión que comprende ADN regulador de la transcripción 5' CHEF1 y un activador de CMV comprende el polinucleótido expuesto en la SEQ ID nº: 6. La descripción también proporciona un vector que comprende ADN regulador de la transcripción 5' CHEF1 y un activador de CMV idéntico al polinucleótido expuesto en la SEQ ID nº: 6. El vector de expresión expuesto en la presente memoria, comprende ADN regulador de la transcripción CHEF1 y una secuencia AdTPL. En varios aspectos, la secuencia AdTPL comprende el polinucleótido expuesto en la SEC ID nº: 5. El vector de expresión expuesto en la presente memoria, comprende ADN regulador de la transcripción 5' CHEF1, un activador de CMV y una secuencia AdTPL. El vector de expresión expuesto en la presente memoria, comprende ADN regulador de la transcripción 5' CHEF1, un activador de CMV, y una secuencia de AdTPL comprende el polinucleótido expuesto en la SEC ID nº: 7. La descripción también expone un vector que comprende ADN regulador de la transcripción 5' CHEF1, un activador de CMV, y una secuencia de AdTPL que es al menos 99%, al menos 98%, al menos 97%, al menos 96% o al menos 95% idéntica al polinucleótido expuesto en la SEQ ID nº: 7.

Se inserta un activador de CMV y/o una secuencia de AdTPL en el ADN regulador de la transcripción 5' CHEF1 en un plásmido de expresión según la descripción. Un vector de expresión expuesto en la presente memoria comprende ADN expuesto en la SEQ ID nº: 1, en donde una o más bases entre la posición 1 y la posición 11.716 de la SEQ ID nº: 1 se eliminan y reemplazan por un activador de CMV y/o una secuencia de AdTPL. La región proximal del activador 5' CHEF1 se reemplaza por un activador de CMV y/o una secuencia de AdTPL. Por ejemplo y sin limitación, una o más bases entre la posición 10.512 y la posición 11.716 de la SEC ID Nº: 1 se eliminan y se reemplazan por un activador de CMV, una secuencia de AdTPL o un activador de CMV y una secuencia de AdTPL.

El vector de expresión según la descripción comprende además un polinucleótido que codifica una proteína de interés. El polinucleótido puede estar operativamente unido al ADN regulador de la transcripción 5' CHEF1, el ADN regulador de la transcripción 3' CHEF1, el activador de CMV y/o la secuencia de AdTPL. El vector de expresión es útil para cualquier proteína y se espera que proporcione una expresión de proteína mayor que CHEF1 o CMV solo. En varios aspectos, el vector de expresión comprende además un gen marcador seleccionable para la identificación de células transformadas. Los ejemplos de genes marcadores seleccionables adecuados incluyen, pero no se limitan a, neomicina fosfotransferasa (npt II), higromicina fosfotransferasa (hpt), dihidrofolato reductasa (dhfr), zeocina, fleomicina, gen de resistencia a bleomicina (ble), gentamicina acetiltransferasa, estreptomycin fosfotransferasa forma mutante de acetolactato sintasa (als), bromoxinil nitrilasa, fosfinotricin acetil transferasa (bar), enolpiruvilshikimato-3-fosfato (EPSP) sintasa (aro A), molécula del receptor de tirosina cinasa específica de músculo (MuSK-R), superóxido de cobre-zinc dismutasa (sod1), metalotioneínas (cupl, MT1), beta-lactamasa (BLA), puromicin N-acetil-transferasa (pac), blastidicin acetil transferasa (bls), blastidicin desaminasa (bsr), histidinol deshidrogenasa (HDH), N-succinil-5-

aminoimidazol-4-carboxamida ribotida (SAICAR) sintetasa (ade1), argininosuccinato liasa (arg4), beta-isopropilmalato deshidrogenasa (leu2), invertasa (suc2), orotidina-5'-fosfato (OMP) descarboxilasa (ura3) y ortólogos de cualquiera de los anteriores.

5 La descripción también proporciona células anfitrionas transformadas, transducidas o transfectadas con un vector de expresión de la invención que comprende ADN regulador de la transcripción CHEF1 y un activador de CMV y/o una secuencia de AdTPL. En varios aspectos, la célula anfitriona es una célula procariota o eucariota. En varios aspectos, la célula anfitriona es una célula de hámster. En varios aspectos, la célula de hámster es una célula CHO. En diversas realizaciones, la célula anfitriona es una célula de mamífero destinto de hámster, y en diversos aspectos, la célula es una célula humana.

10 Un plásmido de expresión según la descripción se describe con más detalle en el siguiente ejemplo. El ejemplo sirve solo para ilustrar la invención y no pretende limitar el alcance de la invención de ninguna manera.

### Ejemplo

15 *Secuencia génica y vectores de expresión* - Los fragmentos de ADN que codifican el activador de CMV (SEQ ID nº: 4) y el activador de CMV-AdTPL (SEQ ID nº: 5) se sintetizaron químicamente y se clonaron en pDEF38, un vector de expresión CHEF1 descrito previamente (Running Deer y Allison, 2004), creando el vector activador CHEF1-CMV denominado pDEF85 (figura 1) y el vector activador CHEF1-CMV-AdTPL denominado pDEF86 (figura 2). Los vectores derivados que expresan una fusión de glucoproteína-Fc (GP1) y un anticuerpo IgG1 (MAb1) se crearon utilizando técnicas habituales de biología molecular (Maniatis *et al.*, *J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. 545, 1982) y se denominaron pDEF38-GP1, pDEF85-GP1, pDEF86-GP1, pDEF38-MAb1, pDEF85-MAb1 y pDEF86-MAb1.

20 *Construcción de estirpe celular* - Los vectores de expresión pDEF38-GP1, pDEF85-GP1, pDEF86-GP1, pDEF38-MAb1, pDEF85-MAb1 y pDEF86-MAb1 se transfectaron individualmente en células CHO DG44 mediante métodos habituales de electroporación, se cultivaron durante dos días en medios no seleccionados que contienen hipoxantina y timidina (HT), y a continuación se seleccionaron durante aproximadamente dos semanas en medios que carecen de HT. Las poblaciones de células seleccionadas, o grupos de transfección, se expandieron y se dividieron en cultivos modelo de producción para evaluar la productividad y también se dividieron simultáneamente en cultivos para la clonación de células individuales.

30 *Modelos de producción* - Se realizaron modelos de producción de lotes alimentados a pequeña escala para evaluar la productividad del cultivo (valor) siguiendo los procesos habituales de fabricación de productos biológicos. Los cultivos se inocularon a densidades de siembra de 0,5 millones de células por mililitro en matraces de agitación de medios químicamente definidos (CD-CIM1, CMC Biologics, Bothell, WA) que carecen de HT. Los cultivos se realizaron durante 3 a 5 días a 37°C y luego se cambiaron a temperaturas más bajas (30°C a 34°C) para ralentizar el crecimiento y favorecer la producción. Los cultivos se alimentaron con los complementos Balanced Feed 1 (BF1, CMC Biologics), Efficient Feed C (Feed C, Life Technologies, Grand Island, NY) o Cell Boost (CB, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) para prolongar la salud del cultivo. Las muestras para el valor y las densidades celulares se recogieron los días 3, 5, 7, 10, 12, 14 y 16. El estudio se concluyó del día 12 al 16. Los sobrenadantes de la cosecha se filtraron a través de filtros de 0,2 micrómetros y luego se analizaron para determinar la producción de GP1 o MAb1 por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de Proteína A.

40 *Clonación de estirpes celulares* - Grupos de transfección seleccionados que expresan GP1 y MAb1 se diluyeron para sembrar células aisladas en cada uno de los pocillos de placas de 96 pocillos. Se tomaron imágenes de las placas desde la inoculación hasta dos semanas para identificar estirpes celulares monoclonales que se originan a partir de células aisladas. Los pocillos que contenían colonias monoclonales se expandieron y se eligieron al azar o se seleccionaron usando citometría de flujo para identificar células muy expresadas de cada grupo de transfección. Las estirpes celulares se expandieron para crecer en cultivo en suspensión y se dividieron en cultivos modelo de producción para evaluar la productividad.

45 *Citometría de flujo* - El análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) se realizó con células de crecimiento normal del día 2 que se cosecharon y se tiñeron con anticuerpo fluorescente anti-IgG1 Fc (RPE) para detectar la expresión biotecnológica de GP1 y MAb1.

### Resultados y exposición

50 Las estirpes celulares estables que expresan la proteína indicadora GP1 o MAb1 se hicieron usando los vectores de expresión pDEF38, pDEF85 y pDEF86 usando métodos habituales de selección DHFRr. Los grupos de transfección se seleccionaron en medios que carecían de hipoxantina y timidina (HT) sin usar metotrexato. Las viabilidades celulares disminuyeron en los medios que carecían de HT y luego se recuperaron a medida que las células con vectores DHFR crecieron en la población. Los cultivos de transfección disminuyeron inicialmente desde aproximadamente 10% a aproximadamente 30% de viabilidad y luego alcanzaron más de 90% de viabilidad alrededor del día 12 (Paso 6). El crecimiento de células transfectadas con un vector CHEF1-CMV (pDEF85-GP1) o un vector CHEF1-CMV-AdTPL (pDEF86-GP1) en comparación con las células transfectadas con un solo vector CHEF1 (pDEF38-GP1) mostró una recuperación similar para los montajes que expresan GP1, con un crecimiento constante

de alta viabilidad después del período de recuperación (figura 3). Se obtuvieron resultados similares para estirpes celulares que expresan anticuerpos (datos no mostrados).

Se colocaron grupos de transfección directamente en modelos de producción o se avanzó en la clonación de células aisladas y luego las estirpes celulares clonales se compararon en modelos de producción. La figura 4 demuestra que el crecimiento del modelo de producción del matraz en agitación alimentado por lotes era comparable para los grupos que expresan GP1 (figura 4A); sin embargo, la expresión de proteínas (valor) en la cosecha, normalmente de 12 a 16 días desde la inoculación, fue significativamente diferente. Los valores de cosecha del día 12 para los vectores de expresión CHEF1-CMV o CHEF1-CMV-AdTPL (pDEF85 y pDEF86) fueron mucho mayores que para el vector CHEF1 estándar (pDEF38) (figura 4C). La cantidad de proteína GP1 biotecnológica producida a partir de transfectantes agrupados en matraces en agitación alimentados por lotes de los vectores CHEF1-CMV o CHEF1-CMV-AdTPL fue aproximadamente el doble del vector CHEF1 estándar. El crecimiento de los grupos CHEF1-CMV y CHEF1-CMV-AdTPL alcanzó su punto máximo un poco antes y mostró una disminución más rápida de la viabilidad (figura 4B). No estaba previsto que la caída de la viabilidad mejorara la expresión y, en cambio, podría ser perjudicial. Experimentos posteriores demostraron que mejorar la viabilidad final aumentaba el valor para los cultivos CHEF1-CMV.

El aumento en el valor observado con los vectores CHEF1-CMV y CHEF1-CMV-AdTPL fue el resultado de una mayor productividad específica, como se ve en la figura 5. La productividad específica se calculó en picogramos de proteína por célula por día en promedio durante toda la duración del cultivo. Hubo una ligera diferencia de expresión entre los montajes CHEF1-CMV (pDEF85) y CHEF1-CMV-AdTPL (pDEF86), lo que indica una posible ventaja de la adición de la secuencia AdTPL con respecto a la productividad específica. Las productividades específicas en picogramos por célula por día (PCD) se muestran en la Tabla 1. La productividad específica lograda usando los vectores CHEF1-CMV o CHEF1-CMV-AdTPL fue más de dos veces mayor que la productividad específica del vector CHEF1.

**Tabla 1**

Productividad específica		
Vector	Activador	PCD
pDEF38	CHEF1	2,4
pDEF85	CHEF1-CMV	6,7
pDEF86	CHEF1-CMV-AdTPL	7,4

Se confirmó la expresión mejorada con los vectores CHEF1-CMV y CHEF1-CMV-AdTPL usando diferentes proteínas indicadoras y diversas condiciones de producción de lotes alimentados. Las células cultivadas en medios de base CD-CIM1 enriquecidos con CB que fueron alimentados con un complemento patentado BF1 los días 4, 6, 8, 10 y 12 demostraron características de productividad de GP1 similares en comparación con las células enriquecidas con medios comerciales (Feed C). La figura 6 muestra que los cultivos del vector CHEF1-CMV y CHEF1-CMV-AdTPL habían aumentado los valores de GP1 sobre el vector CHEF1 de referencia en el proceso BF1.

La producción de anticuerpos (MAb1) que utiliza los vectores CHEF1-CMV y CHEF1-CMV-AdTPL se probó también en el proceso BF1. Los grupos de transfección de MAb1 se crearon con la misma metodología que los grupos GP1 y, una vez recuperados completamente de la selección, se introdujeron en modelos de producción con matraces en agitación alimentados por lotes. Como se muestra en la figura 7, los grupos CHEF1-CMV y CHEF1-CMV-AdTPL MAb1 produjeron anticuerpos de valores mayores que las referencias pDEF38 después del día 12. La curva de productividad en los grupos de transfección que expresan anticuerpos fue novedosa en comparación con la producción de glucoproteínas porque la productividad de anticuerpos aumentó drásticamente a medida que las células entraban en la fase estacionaria. Se observó un valor inicial menor (Día 7) para los grupos de MAb1 CHEF1-CMV y CHEF1-CMV-AdTPL en comparación con el grupo de MAb1 CHEF1 a medida que los cultivos celulares crecían activamente, seguido de rápidos aumentos en la productividad para los cultivos de CHEF1-CMV y CHEF1-CMV-AdTPL a medida que el crecimiento se desaceleró y finalmente disminuyó después del día 10 (figura 7B). Aun cuando la densidad de células viables disminuyó (figura 7A), la productividad aumentó hasta el día 14 en los grupos CHEF1-CMV y CHEF1-CMV-AdTPL, mientras que comenzó a disminuir en el grupo CHEF1, aunque las viabilidades terminales por ciento del día 14 fueron similares para todos los cultivos (aproximadamente 80% viable, datos no mostrados).

Se desarrollaron cultivos clonales a partir de grupos de transfección que expresan tanto a GP1 como a MAb1. Las estirpes celulares monoclonales se identificaron mediante imágenes de placas de dilución reducida y luego se expandieron en cultivo en suspensión. Se seleccionaron al azar doce cultivos clonales de MAb1 de cada uno de los grupos de transfección pDEF38-MAb1 y pDEF85-MAb1 y se realizaron en modelos de producción en matraces agitados alimentados por lotes. La producción de anticuerpos del activador de CHEF1 clonal (pDEF38-MAb1) coincidió con las curvas del grupo de transfección, mostrando una mayor expresión que los clones pDEF85-MAb1 durante la fase de crecimiento y luego una producción más lenta a medida que los cultivos entraron en la fase estacionaria (figura 8B). La producción de anticuerpos a partir de los clones del vector CHEF1-CMV (pDEF85-MAb1) parecía muy similar a la del grupo de transfección, en donde la mayoría de la expresión de anticuerpos se produjo después del día 6 después de que el crecimiento exponencial se ralentizó y las células pasaron a la fase estacionaria (figura 8A).

Se seleccionaron estirpes celulares clonales que expresan GP1 usando un análisis basado en FACS para detectar la expresión de GP1 al principio en el desarrollo. Más de 100 clones de cada uno de los grupos de transfección pDEF38-GP1 y pDEF85-GP1 se seleccionaron y clasificaron por fluorescencia media FACS. Los ocho principales cultivos que expresan GP1, basados en el análisis FACS de cada conjunto, se examinaron además en modelos de producción alimentados por lotes usando medios de base CD-CIM1 y alimentaciones BF1 (figura 9). Los valores promedio y las productividades específicas, mostradas en la tabla 2 y la tabla 3, indicaron que la expresión del activador de CHEF1-CMV (pDEF85-GP1) era mucho mayor que la del activador de CHEF1 solo (pDEF38-GP1) y fue impulsada por un aumento en productividad específica

Tabla 2

Valor medio de glucoproteínas		
	pDEF38-GP1	pDEF85-GP1
Día 12	760 (n=8)	1199 (n=8)
Día 14	735 (n=8)	1456 (n=8)

Tabla 3

Productividad específica		
	pDEF38-GP1	pDEF85-GP1
Promedio	6,4 (n=8)	15,0 (n=8)
Intervalo	2,7 a 13,6	10,6 a 20,1

Como se demostró en el ejemplo anterior, los nuevos vectores de expresión CHEF1-CMV y CHEF1-CMV-AdTPL aumentaron la expresión tanto de la glucoproteína como del anticuerpo en grupos estables de transfección de células CHO. Las estirpes celulares clonales estables procedían de los grupos CHEF1-CMV y CHEF1-CMV-AdTPL también mostraron una expresión de proteína mejorada en comparación con el grupo de activadores de CHEF1. El aumento de la expresión en las estirpes celulares clonales CHEF1-CMV y CHEF1-CMV-AdTPL produjo una mayor productividad específica en comparación con el activador de CHEF1, lo que indica que la combinación del ADN regulador de la transcripción CHEF1 con un activador de CMV aumentó la capacidad de expresión celular y no solo mejoró el rendimiento del crecimiento. El patrón de expresión de los montajes CHEF1-CMV difería del activador CHEF1 solo, y la expresión máxima se produjo más tarde, durante la fase estacionaria del crecimiento celular, lo que indica que la regulación por parte del activador CHEF1-CMV era diferente a la del CHEF1 solo y poseía características únicas de producción de proteínas biotecnológicas. La expresión temporal retardada de la proteína de CHEF1-CMV en comparación con CHEF1 solo es prueba de que los elementos reguladores combinados alteran la expresión dependiente del crecimiento de CHEF1, presentando así un mecanismo novedoso para controlar la producción de proteínas CHEF1. La expresión de alto nivel lograda a partir de una combinación de CHEF1 y CMV es inesperada considerando los descubrimientos anteriores en donde el activador de CHEF1 superó al activador de CMV (Running Deer y Allison, 2004). Conseguir una mayor productividad específica, combinada con el cambio temporal observado en la expresión, es beneficioso porque las condiciones de alimentación del cultivo pueden optimizarse para el crecimiento y producción bifásicos en los procesos de fabricación biológica. Un vector de expresión según la descripción que comprende ADN regulador de la transcripción CHEF1 y un activador de CMV y/o una secuencia de AdTPL, por lo tanto, proporciona una opción mejorada para lograr un alto valor y productividad en los sistemas de expresión de proteínas biotecnológicas.

#### Listado de secuencias

<110> CMC Icos Biologics

Clarke, *et al.*

<120> EXPRESIÓN MEJORADA DE PROTEÍNA BIOTECNOLÓGICA EMPLEANDO UN ACTIVADOR HÍBRIDO DE CHEF1

<130> 31351/44744A

<140> 61/777,603

<141> 12-03-2013

<160> 7

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 11716

<212> ADN

ES 2 811 648 T3

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 1

ctagaagata tatttgaaat ctttactatt ttgttttctg aaatcacagg acaggggctt	60
tgctcttcag cctcgtgggc tctgatactt ttctccacat ataaagctag ttatTTTTGG	120
tggatgccat tgagcattta ttattctagt ccagacacag tcagcaaaag ctgctatatg	180
ttgactgaaa ttaagtcaat taaggaaatg aggcaataat gtatgacagt acaggtaaag	240
gatctgcagt ggctcacagg tgacagacac acaaattgac gtggggggag aagcaccttt	300
TTTTGGGGGG ggctggttag tttggagttt tgtttattcc ttccttcctt ccttcctttc	360
ttcttcctt ccttcctt ccttccttc cttccttctt tccttccttc cttccttctt	420
tccttccttc ctttctttct ttctttcttt ctttctttct ttctttcttt ctttctgttt	480
ttgtgtattg ctgtgtttta gacaggatct cactatgtag tcctggctgg cctggaactt	540
actatgtaga ccatgctggc ctcagattca cagacacctg tctactcttg cttttttgag	600
gaatgagatt gaatgtatgc accatgaccg atcaggtttt gctgttgttt tagccaggct	660
tgcttaaaat gcaatgtaaa ccttcagcat taggctcctg ggttctagga ttatagtagg	720
tgtaagccat catgccacgc ttgtcactgg tcttaaagat atttatttat tttatgtgta	780
taattttttg cctgtgtgta tgtctgtgca caccatgcat gcctggtgac cgtggagcta	840
aaagagacac tcggaattgg agttgtatta gattgtgagc cgctctgtgg gtgctggaaa	900
ttaaactgtg tcctcaagaa aagcagctag tcctcttaac tgcttagcca tctctctagc	960
cctgtccata ttttcaaata gaataattga actgaaagta cctctctgac tattggtttc	1020
aggattgtac agaataattt gtctgcaatg tcattttaat aaattctgca tacttattgg	1080
aaaacacttt tttttaaaac taaactaaaa ttatctttga tacttttctc tctcatcaat	1140
atccacttcc cttcattttt ctatattttc agtaccgggg attaaatacc aaggttcttt	1200

ES 2 811 648 T3

taaatactag attttagcta tgactgtacc tcatacaaaa cctcttgtca gctgtcaaga	1260
ggtttgatga tcccctgggt cttgttgttg tttgaggttg ttgtttgagc cctgccctgg	1320
ctttcctaga actcacagt tagaccagta tgaacttga ctcacagtga gcgtccaccc	1380
acctgacct gccttctgag tgctgggact aaaggtgtga accaacattg caggcaggag	1440
gattcttgat tctttgagag tctgttatta gaaaaagatg ctctaagaat ttaactataa	1500
taacaccag ctgagacctg gttttctctc atgacatatg caaagtttg gtgtttttt	1560
tcaaccaact ctggaaggt cctttggcag caggaatagc ttgctaattg atataaggaa	1620
gcagatggta ctagaaaaac agcaacaact aaaaaagata ccatacttcg aaagaaaaa	1680
gataaatgac atttaaccac agagcacaag tgtgtgtgac aagattttag aattaagggt	1740
gactgtttat gttgctttta aaagacatgt aatttcggga tgggtgtggc acacgccttt	1800
aatcccagca ctccgggagc agaggcaggt ggatctctgt gagttcgaga ccagcttgg	1860
ctacaagagc gagttccagg acagcctcca aagccataga gaaaccctgt ctcaacatcc	1920
ccccccaaa aaaaagaatt aggggaactg attatgttgc tttttaaaag acatgtaact	1980
ttcgtagtgg tgggtggcaca tgcctttaat cccagcactt ggggtggcaa ggccaggcaga	2040
tctctgagtg ttttaaggaca acctgggtta tatagtgaga atctgttctg tcttttaaaa	2100
aggatgatgt tcaactgtaca acctctgaca attatttagt atgttttcat attaccagtt	2160
actttttttt gtttgtttg tttttcgaga cagagacagg gtttctctgt gtagctttgg	2220
agcctatcct ggcactcgct ctggagacca ggggtggcctc gaactcacag agatccgcct	2280
gcctctgcct tccgagttct gggattaaag gcgtaaccca ccaacgcccg gctaccagtt	2340
acttttaaat gtttataaatt gccaggtgggt gatcgtgcat gcttttaatc ccagaacttg	2400
gaaggcagag gcaggcctgt gagtttgagg ccagcctgggt ataaagggt agttccagga	2460
cagctagggc tattacacag agaaactctg tttcaaaaa acaaacagaa aaacaacaac	2520
aatttataat taaaaagata cgaatgagtt tttctggact gactcaaaat aatgtcataa	2580
aacatacaaa ttgagagtag tctttcctca gaagtctat aggcacatgt cttcctagct	2640
aacaattgta caatgtcact ttatgtcatg gcatattgga actgtgaggt agacgctaag	2700
aataaggagc catctgcctt gtagattcgc ttgagagatc tacaactgcc agttgtcttg	2760
aagtctgaac aaagcaagt gtagccttg cccctaatta tcaggctcca gaaatactgc	2820
tagtttcatt atgccagacc ccatctgaat tctaattctt tgctagacc cgatagagtc	2880
ccctcccc aaaaaaaga ttgacaagat gcagtaaatg aaaacagtac ggtgatatgc	2940
tgtattttat tattttgtgt aaaaatagca atacttcaca aaagaatgca tatgcttatg	3000
tataaactat tgtggcgtat ccaactgatc aggcacaaggc ctgaagaaaa gatagacaca	3060
gacagaaagc tggggattgg ctggctctgg ctcctctgat gagaagctgc agcaaccaga	3120

ES 2 811 648 T3

aagctcgtgt gtttattcta aagagctgaa tagggaggcg ggttactcag tacagagaaa 3180  
caagaagaca gagtttacag tatacagctg gaccaaggag acaggtgtag ctaatctgag 3240  
taggaactct ctctctgtag gggagaattc tctaggctat aaatatgagg gtggagtcaa 3300  
aagctttggt ggacattttt tttttttttt aactctgtca acacttggac tcagtattcc 3360  
tccaggaaag atttgctatc tttgcttaca tggccctgcc tatgtcatca ataacattc 3420  
gctcagggct tcctctgctc ccaacgctaa tgcttgcaac ttctgcatct ctaaaatggt 3480  
ggtagtgaga ctgcattata gactgcaaat ttttaagagac ggccttccac acaggtgggc 3540  
cgatttttag ttggattatc agttcaaaac attatttaat tgcctcctcc cctctctgtc 3600  
tctgactctg tctctctttc ggtggtttgt tttgttttta tatagggttg gactatgtag 3660  
tttctatata gaacaagtgt gccttgaact cacagagagc cacctgcctc tgcctccaaa 3720  
tgctgggatt aaagtcctgt gccaccactt cctggcctaa tcctactctt ttatttattt 3780  
attttatgtg tatatatgtc tgcttatatg tctgtgtgaa agtgtcagat cccctggaac 3840  
tgggtttaca gacagttgtg agctgcaatg tgggtgctgg ggattgaacc tgaatcttct 3900  
ggaagagcag ccagtgccct taactgttga gccatccctc cagtccctct aatcctactc 3960  
tgaataatcc aaagtcactt tggctttgca ctccctgtaat tccagcacct aggggctgga 4020  
ggccagaagt tttggtgttt aaggccaatt ttggttactt agggagtcca aggtcagctc 4080  
cagttacatg agaagagga agaaagcagg gagaaggaga gaggttaaga atatgaaaat 4140  
gtgagaatct ggaagtaagg ccttgtgtag ccagaacagc tctttacagc tgagctgcat 4200  
atccagctct ataaaatcct tttcaaaatc tgagtaagta cggtgagtct gagtgagcac 4260  
ggtgcagcag gactatattc ccagtattta agaagttgtt tgggaagagcc cctgttcaaa 4320  
accagcctga ctatgtagtg aggaaatcat tttctttttg ttgttgttgt tctgttttgt 4380  
ttgagacagg gtttcttggg gtagtcttgg ctgtcctgga ctctctgtag acagggctgg 4440  
tcttcaactc atagagataa cacctacaat gcctcctgag ggctggtgtg tgtgtgtgtg 4500  
tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtagata tagtctcaac 4560  
aaagtcagtt tttagcactg attttagtaa aaagcatagc gaatctgctg taacatgaag 4620  
caggggagga ggagccaaaa tgaagtaagg ttgcactcta aatgccggtt gcacaaaaca 4680  
tgcttttaat gaatccctat ataaccagtc ttttcgaagc aaagcacttg aacctttcca 4740  
tcctccaggt gtcttctgca gactgaggac acacgaaact gaccttaggt ggggggcggg 4800  
tggaggggtg gcctgggcca cctcattctt gggagaacag aaatggctct cggtgaggca 4860  
ggtgtaagc aggtgactg gcgacaagga gacgcttca cccacccgc gggggaaagg 4920  
gaggggatgg gaaaggtggg gaggggatgg gaggggtggg gaggggaggg gaggggaggg 4980

ES 2 811 648 T3

gaggggaggg gaggggaggg gactgcgggg cctcccaacc cccgaagcg gaagtggctc 5040  
cctgccaaga gctcaggctg tggccagtgt ctaccagaaa tacgtaaaca ttgagtctcc 5100  
tgggctaaaa ggtatctaca cttaaacacg agactcacga tttcactttc tggatagaa 5160  
aatcccagcc attatctaac ttaaggatca ccttaagtta ggttacttag aaactaagga 5220  
gtcttgtgtg atttttcttt ttctttctga tatcttagat agcatcctcc atatggcgtt 5280  
tataaagtgt atgctctcat tctttaatat ctaagaaaag acctacattc taggatagct 5340  
tcgggaggag tgattcaact tttggatatt tctttctgc ctttctttct tagcataacc 5400  
ataatatgag ctgtacctgg tgacacaggc gtgtcagctg cccgggatgc tgcccgggat 5460  
gctgaggcaa gaccatctca agctgggcaa tttagcaaga ccctgtctca aaacacaaag 5520  
caaagcaggg tgcgaaaccc acagttgaaa tcgtagcact tagtaagaaa agggctaggc 5580  
tatgtgaaac tgcctcaaaa ttcaagggac taaaatattt tttactgca ctagaatata 5640  
gatacaatgc tggcttagca tgtgcaagga cctaggttca gtctccacta tcaacaaca 5700  
acagtaataa cagtaacagt ggcgaaaata aacggctgaa tctcattttt gtttcaagag 5760  
caattttgta tcaatttgtg acttaattat atttagaatg ttggattttt ttttaacca 5820  
taggcaaaag cttaagacat atttcaatca ggaaaagtac tttcatcag ctgtggaaat 5880  
atagtttctt aaagaaatgc aacactggac atacacacaa acacacctct ataagacagt 5940  
ttgcattag tccatatatt ttaaaaatta gattcactca ttttatttta aaagtgttc 6000  
cttacaggta tgtatgtgca ccattgccc attttgtact caggaaggtc aggagaaggc 6060  
acagtcccc aggaactgaa gttacagaag gttggagggt tttgagccat cacatgggtt 6120  
ctgggaattg aacctgggtc ctggcaaaa gctgctctta actgctgagc catatctcca 6180  
gcccttattt ttacataggc tctctctatg tagtcctgac tgttttagaa ctgatatgt 6240  
aggccaggct agcctcgaac tcatagagat ccttctgct ctgcttctg agtgggttac 6300  
ctttggaggc cagagacatc aggttcccc gaaaatggga actgaacttg tatgttcagc 6360  
aagaccggtt aaataaatgc tcttaagggc tggttcctct ctccagccct tatttttatt 6420  
cttttttaat tatatgtagg tgtgttatat gtctgcactg tagatttgtg ccaaggaatg 6480  
caggtgcctt gggaggccca aggtgttggg tccccaaaga ctgggagctg atcttctgcc 6540  
ctctggaaga acagcaagtg ctcttcacca ctgagccatt tctccagccc tgtctttta 6600  
ttgttctttt tgtttttttg agacaggctt tctctgtgta gccttggctg tctggatct 6660  
ttctctgtag accaggctgg cctcaaattg aactgaaagc atatctctaa tcattagttt 6720  
caggattgta cagaatcatt ctgcatactt ctgggaaatt accttttttt ttttttaac 6780  
tagaatcctc tttgatgctt ttctttttca ctaatatcta ctgtaatttt tccccattc 6840  
tttcagtact ggggattaaa tatcaagact ctctttaagg attagatttt agccttgatt 6900

ES 2 811 648 T3

ctggacctca tataaaactt tcaaaaagctc aaccttcagt gttcaggact gaagaagact	6960
agtcgcagtt gctagagtgc ttgcctagca tttgtgaagc gtgggttggg ttcctcagca	7020
ctgtattaac accatgcatg gagatgaatg cctgtatcct cagcacttga gaggtagagg	7080
cgggggaatc agaaatccaa ggttatcctc agttacataa tgagtttgag gtcagcctag	7140
gctatatgag gctctgtctc aagaaaacaa actagccagg tggttgtttg tttgattaaa	7200
ggcacacgcc tttaatccca gcacttggga ggcagagaca ggccgatctc tgtgagttca	7260
aggccagtct ggtctccaga gtaagtgcc ggataggctc caaagctaca cagagaaacc	7320
atgtctcgaa aaacccaaaa aagaaagaaa gaaaacaaac aaacaaatag aacagaacaa	7380
aggccagacc cccaagcttg ggaggcagag tcaagaggat ttctgaggcc agcatagtaa	7440
gttctaggcc agccagggct gcatagtaaa atccctcaga aaacaaacaa gtaacacaca	7500
acaaataggg ctggagagat ggatcaacag ttaagagcac ttggttctct tgcagaggac	7560
agttcagttc ccagcgcoca gatcaggcag cacacaacat tctgtagtag ctagctccag	7620
gagacctgac accctgacct ctgaggacac caggcacaca cgttgtgcat agaaacagat	7680
gcaggcaaaa catccacaca tataaaacaa aaaattaaaa ccaataaac tcctaaactt	7740
ttggtctttc ttgaatcttc aatccctcag gttatgaaat aatcatttat gcagtaaaa	7800
atgtgccatt cttggttcca ggtgtggtga tgattcgggg aagcagaagc aggcatctct	7860
ctgtgaatga ggccagcctg gtctacaaag tgagtcccag gacagtcagg cctgttacac	7920
agagaaacct tgaaaaaaaa aagataatat gtactgttgt attaccccaa tatataaggc	7980
taaaccatta gaagcacaac actgttaagt acggaaaata atatctagtg tggtagagtt	8040
actactacta taatacacta atatagctgt gggaaactag ttccaaagat gaattactaa	8100
ccagtgtttc caaggaaata aatgaaagca gagagattag ttctattgct agtgtttcat	8160
tttcgtatat ttcttacaat ttctcttggt acaaataggc actagggtat caagataatt	8220
ttaacgactg gctgagaacc ctagaaaatc tctgtgaaaa agggatttgt gaaatgagag	8280
agggtaatgt ggccattata gaaaaggctt ttgtgtgcct tgcatgcata gaccctgtgt	8340
ttgatctctt aacaccctcc ttgaccagaa aaagcttctg tggatagaaa atgattagtt	8400
atatatactt ttagggaaac gtagttctgg attctttggt tacaattaac agaattaagt	8460
gcaaacaag ccagaaacct cctgataaat gagaaaacct gcttgtagaa ggttgaagg	8520
ctctgtaata taggaattag gagaaaagaa acctgtgtgg tggggcacgt ctgtaatccc	8580
agcattggga agtagaggtg gaagattaga aatcaaaggc cagcctcagc aacacagtga	8640
gtttgaggcc accctgaact acatcagggt ctgtctcctt tctttttttt tttttttct	8700
tttctttttt tggtttctct gtgtagtttt ggagcctatc ctggcactag ctctgaagag	8760

ES 2 811 648 T3

caggctggcc tcgaactcag agatcagcca gcctctgctg ggattaaagg tatgcaccac 8820  
 caacgcccc ggttttgtct caaacaaca aaaataacat caggaggtgg tgagagggct 8880  
 cagtggctac aggcattctc tgcaaagcct gactctgagt tggatccttt agagctacat 8940  
 ggttgagggg agagaactga ctctggaag gtgtcctctg gtccccacac atagctatac 9000  
 acagcatgtg cattcacaca cactaaataa tgctatTTTT aaaaaatta aaaacaaca 9060  
 cagtttgggt tgtgaaaact agaactagat aataggtaa aatcaagtat catgtaaatt 9120  
 tgctttcaac tcatcccaa atttgtttta tatttcagtt tttttccttc cttagcttgac 9180  
 tgtggagtct tgtccggaag caaatagttc ctttgcatg cccacatgtg gacaccggac 9240  
 agtaggtcct caaatgctcc ttattaggtt ggttcaataa tatcaattgt ttgttactag 9300  
 gcagtgatgt tgtacatctg gaggagatct cttgagccca taatcaggtt attaggaata 9360  
 aatactctaa ggctaaaaat gtagcttagt gataagagtg ctgtcctggg gtgctgagac 9420  
 cctcggttcc atctccaca ccccatattc cattacaaa taccttttca ccgtccctag 9480  
 cattaagaaa caaaacaaca aagaagtttt tctttcttct gagatcctgc cgggagaggc 9540  
 atttaaaact ggccagggcc aaaaaaaaa aaaaaaaaaag aaaaaaaga aaagaaaaca 9600  
 ggctagggcc ggcctgggtg cgcacgcctt taatccagc acgcaggagg cagagggcagg 9660  
 gcggatctct gtgagtttga ggtcagcctg gtctacctag tgagtttcag ggcaccagc 9720  
 gctaaagaga ctgtctcaaa acaaaaacag ccacacaatc agaaccacag caaaacgcag 9780  
 ttatgatcct tggaaactgta ggaatgaca gcatttaaat aataggacga gccatttttg 9840  
 agaagctctg atttcacaag tgtcagggat gggctctggg cgagtaagat tgctaatgct 9900  
 ggctctaaa tgagaccacg tggagttgat tagattcttt tcatgttctt cgtgctctat 9960  
 caaataactg taccaaaata cacacacaca cacacacaca cacaatgcgc gcacacacaa 10020  
 aatccttttt tagcttaaga agcccagaat cagaagtaa gctaactgtg ggacttaagt 10080  
 attattctga acggaactcc cagggcgtga agcgcgcttc aggttccag agaagcagct 10140  
 ggcgctggat ggaatgaacc aagagggcag cacaggggca gatccgtcga gctctcggcc 10200  
 accgagctga gcccttaggt tctggggctg ggaaggttcc ctaggattgt gcacctctcc 10260  
 cgcgggggac aagcagggga tggcggggct gacgtcggga ggtggcctcc acgggaaggg 10320  
 acaccggat ctcgacacag ccttggcagt ggagtcagga agggtaggac agattctgga 10380  
 cgcctcttg gccagtcctc accgccccac ccccgatgga gccgagagta attcatacaa 10440  
 aaggagggat cgccttcgcc cctgggaatc ccagggaccg tcgctaaatt ctggccggcc 10500  
 tcccagcccg gaaccgctgt gcccggccag cgcggcggga ggagcctcgc cctagggcgg 10560  
 atcgcgggtc ggcgggagag cacaagccca cagtccccgg cgggtgggga ggggcgcgct 10620  
 gagcgggggc ccgggagcca gcgcggggca aactgggaaa gtggtgtcgt gtgctggctc 10680

ES 2 811 648 T3

cgccctcttc cagagggtgg gggagaacgg tataaaagtg cggtagtcgc gttggacggt 10740  
ctttttcgca acgggtttgc cgtcagaacg caggtgagtg gcgggtgtgg cctccgcggg 10800  
cccgggctcc ctcccttgag cggggtcgga ccgccgtgcy ggtgtcgtcg gccgggcttc 10860  
tctgcgagcg tccccccct ggatggccgg ctgtgcggga gggcgagggg gggaggcctg 10920  
gcggcgccc cggagcctcg cctcgtgtcg ggcgtgaggc ctagcgtggc ttccgccccg 10980  
ccgctgtcca ccgcgccgc gctttgctgt ctgcccgct gccctcgatt gcctgccgc 11040  
ggcccgggcc aacaaagga gggcgtggag ctggctggta gggagccccg tagtccgcat 11100  
gtcgggcagg gagagcggca gcagtcgggg gggggaccgg gcccgccgt ccgcagcac 11160  
atgtccgacg ccgcctggac gggtagcggc ctgtgtcctg ataaggcggc cgggcggtgg 11220  
gttttagatg ccgggttcag gtggccccgg gtccccggcc ggtctggcca gtacccccgta 11280  
gtggcctagc tccgaggagg gcgagcccgc ccgcccgca ccagttgctg gcgcgaaag 11340  
atggccgctc ccgggccctg tagcaaggag ctcaaatgg aggacgcggc agcccggcgg 11400  
agcggggcgg gtgagtcacc cacacaaag aagaggcct tgcccctcgc cggccgctgc 11460  
ttcctgtgac ccggtggtgt accggccgca ctacagtcac ccggggcgt ctttcggagc 11520  
accgctggcc tccgctgggg gaggggatct gtctaattggc gttggagttt gctcacattt 11580  
ggtgggtgga gactgtagcc aggcagcct ggccatggaa gtaattcttg gaatttccc 11640  
atthtgagtt tggagcgaag ctgattgaca aagctgctta gccgttcaa ggtattcttc 11700  
gaactttttt ttttaag 11716

<210> 2

<211> 4057

<212> ADN

5 <213> *Cricetulus griseus*

<400> 2

gtgcatagaa acagatgcag gcaaacatc cacacatata aaacaaaaa ttaaaccaa 60  
taaaactcct aaacttttgg tctttcttga atcttcaatc cctcaggtta tgaataaatc 120  
atthtgagcag tcaaaaattt gccattcttg ttgccaggtg tggatgatgat tccgggaagc 180  
agaagcaggc agatctctgt gaatgaggcc agcctggtct acaaagtgag tcccaggaca 240  
gtcaggcctg ttacacagag aaaccttgaa aaaaaaaga taatatgtac tgttgattata 300  
cccaatata taaggctaaa ccattagaag cacaacactg ttaagtacgg aaaataatat 360  
ctagtgtggt acagttacta ctactataat aactaatat agctgtggga aactagttcc 420  
aaagatgaat tactaaccag tgtttccaag gaaataaatg aaagcagaga gattagttct 480  
attgctagtg tttcattttc gtatatttct tacaatttct cttgttacia ataggcacta 540  
gggtatcaag ataattttaa cgactggctg agaaccctag aaaatctctg tgaaaaaggg 600

ES 2 811 648 T3

atttgtgaaa tgagagaggg taatgtggcc attatagaaa aggccttttgt gtgccttgca	660
tgcatagacc ctgtgtttga tctcttaaca ccctccttga ccagaaaaag cttctgtgga	720
tagaaaatga ttagttatat atacttttag ggaaacgtag ttctggattc tttggttaca	780
attaacagaa ttaagtgcaa acaaagccag aaacctcctg ataaatgaga aaacctgctt	840
gtagaaggtt gtaaggctct gtaatatagg aattagagaa aaagaaacct gtgtggtggg	900
gcacgtctgt aatcccagca ttgggaagta gaggtagaag attagaaatc aaaggccagc	960
ctcagcaaca cagtgagttt gaggccaccc tgaactacat caggttctgt ctcttttctt	1020
tttttttttt ttttcttttc tttttttggt ttctctgtgt agttttggag cctatcctgg	1080
cactagctct gaagagcagg ctggcctcga actcagagat cagccagcct ctgctgggat	1140
taaaggtatg caccaccaac gcccagggtt ttgtctcaaa caaacaaaaa taacatcagg	1200
aggtggtgag agggctcagt ggtcacaggc attctctgca aagcctgact ctgagttgga	1260
tccttagag ctacatggtt gaggaagag aactgactcc tggaaaggtgt cctctggtcc	1320
ccacacatag ctatacacag catgtgcatt cacacacact aaataatgct atttttaaaa	1380
aaattaaaaa caacaacagt ttgggttggt aaaactagaa ctagataata ggtaagaatc	1440
aagtatcatg taaatttgc tccaactcat cccaaaattt gttttatatt tcagtttttt	1500
tccttcctag cttgactgtg gagtcttctc cggaagcaaa tagttccttt gcagatccca	1560
catgtggaca ccggacagta ggtcctcaaa tgctccttat taggttggtt caataatc	1620
aattgtttgt tactaggcag tgatgttgta catctggagg agatctcttg agcccataat	1680
caggttatta ggaataaata ctctaaggct aaaaatgtag cttagtgata agagtgcctg	1740
cctggtgtgc tgagaccctc ggttccatct ccacaacccc atattccatt acaaaatacc	1800
ttttcacctg ccctagcatt aagaacaaa acaacaaaga agtttttctt tcttctgaga	1860
tcctgcccgg agaggcattt aaaactggcc agggccaaaa aaaaaaaaaa aaaaagaaaa	1920
aaaagaaaag aaaacaggct agggccggca tgggtggcga cgcctttaat ccagcacgc	1980
aggaggcaga ggcaggcgg atctctgtga gtttgaggtc agcctggtct acctagtgag	2040
tttcagggca ccagggcta aagagactgt ctcaaaaaca aaacagccac acaatcagaa	2100
ccacagcaaa acgcagttat gatccttga actgtaggaa tgacaagcat ttaaataata	2160
ggacgagcca tttttgagaa gctctgattt cacaagtgtc agggatgggc tctgggcgag	2220
taagattgct aatgctggcc tctaataagag accacgtgga gttgattaga ttcttttcat	2280
gttcctcgtg ctctatcaaa taactgtacc caaatacaca cacacacaca cacacacaca	2340
atgcgcgcac acacaaaatc cttttttagc ttaagaagcc cagaatcaga agtaaagcta	2400
actgtgggac ttaagtatta ttctgaacgg aactcccagg gcgtgaagcg cgcttcaggc	2460

ES 2 811 648 T3

ttccagagaa gcagctggcg ctggatggaa tgaaccaaga ggccagcaca ggggcagatc 2520  
 cgtcagagctc tcggccaccg agctgagccc ttaggttctg gggctgggaa gggtcacctag 2580  
 gattgtgcac ctctcccgcg ggggacaagc agggggatgg cggggctgac gtcgggaggt 2640  
 ggcctccacg ggaagggaca cccggatctc gacacagcct tggcagtgga gtcaggaagg 2700  
 gtagggacag attctggacg ccctcttggc cagctcctca ccgccccacc cccgactgga 2760  
 gccgagagta attcatacaa aaggagggat cgccttcgcc cctgggaatc ccagggaccg 2820  
 tcgctaaatt ctggccggcc tcccagcccg gaaccgctgt gcccgcccag cggggcggga 2880  
 ggagcctgcg cctagggcgg atcgcgggtc ggcgggagag cacaagccca cagtccccgg 2940  
 cgggtggggga ggggcgcgct gagcgggggc ccgggagcca gcgcggggca aactgggaaa 3000  
 gtggtgtcgt gtgctggctc cgccctcttc ccgaggggtg gggagaacgg tataaaagtg 3060  
 cggtagtcgc gttggacgtt ctttttcgca acgggtttgc cgtcagaacg cagggtgagtg 3120  
 gcgggtgtgg cctccgcccg ccggggetcc ctcccttgag cggggctcggg ccgccgtgcg 3180  
 ggtgtcgtcg gccgggcttc tctgcgagcg ttcccgcctt ggatggcggg ctgtgcggga 3240  
 gggcgagggg gggaggcctg gcggcggccc cggagcctcg cctcgtgtcg ggcgtgaggc 3300  
 ctagcgtggc ttccgccccg ccgcgtgccca ccgcggccgc gctttgctgt ctgcccggct 3360  
 gccctcgatt gcctgcccgc ggccccggcc aacaaaggga gggcgtggag ctggctggtg 3420  
 gggagccccg tagtccgcat gtcgggcagg gagagcggca gcagtcgggg gggggaccgg 3480  
 gccgccccgt ccgcagcac atgtccgacg ccgcctggac gggtagcggc ctgtgtcctg 3540  
 ataagcggc cgggcgggtg gtttttagat ccgggttcag gtggccccgg gtcccggccc 3600  
 ggtctggcca gtaccccgta gtggcttagc tccgaggagg gcgaggcccg ccgcccggc 3660  
 accagttgcg tgcgcggaaa gatggccgct cccgggccct gtagcaagga gctcaaaatg 3720  
 gaggacgcgg cagcccggcg gagcggggcg ggtgagtcac ccacacaaag gaagagggcc 3780  
 ttgccctcgc ccggccgctg ctccctgtga ccccgtggtg taccggccgc acttcagtca 3840  
 ccccgggcgc tctttcggag caaccgtggc ctccgctggg ggaggggatc tgtctaattg 3900  
 cgttgaggtt tgctcacatt tgggtgggtg agactgtagc caggccagcc tggccatgga 3960  
 agtaattctt ggaatttgc cattttgagt ttggagcgaa gctgattgac aaagctgctt 4020  
 agccgttcaa aggtattctt cgaacttttt ttttaag 4057

<210> 3  
 <211> 4180  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 3  
 tccatttaag tttaatagtg aaagactggt taatgataac aatgcatcgg aaaaccttca 60

ES 2 811 648 T3

ggaggaag agaatgtttt gtggaacatt tttgtgtgtg tggcagtttt aagttattag 120  
 ttttcaaat cagtactttt taatggaaac aacttgacca aaaatctgtc acagaatttt 180  
 gagaccatt aaaatacaag tttaatgaga agtctgtctc tgttaatgct gaagtcatta 240  
 ctaagtgctt agcttagcaa ggtatgtgga tgcccatttg tgttccaagg gattggactg 300  
 ttcacacagga cccagagctg agtttcaagg gctcaagaga tggcttatta cctgtgggtg 360  
 tcttgaaggt tctggttggg acaaattagg aatgtttttg gcagacatgg tgactacctt 420  
 catctgggtg agttcagttg atttgtcttg agcctttggg gtttacacaa gtaaatgaca 480  
 tcatacagtt agtgtattgt tagtgaatat taatatatga ggcaggcttt gctctagcaa 540  
 ttttagaact agttttcagg aaagggttca tcttgtgcat tggatgtttg attctatcac 600  
 ttagagttta aactgaaagt gctcaagagg ttttatttag gctgggatat aaataagcct 660  
 ttctgtagct tgtaatggta tcaggaattht aaaaggccat ctggggcaca aagattaagc 720  
 agaaaaggta gaaggtgaga ttgggggact ttgagtactt cacacacttt aatgtgtgag 780  
 tgcttttagt catatagtac aactgccaga taagggtcatc cacatctgat tgtttggaag 840  
 gcaccttgtg gtttctggga attcagaatt gggagaaaaa tgctcccaac cgtgaagcc 900  
 cttgtaatc tgcaggtgtt ttatttagca ggagataagg acaaaaagtt atagtgtgga 960  
 gttggttgag ttggtagatg tcattacaac aggtggtctt aaattgggtt aggagtact 1020  
 ttgaaatacc tgggccataa gcaaagtggc attttcacct ttcaggagaa actggtacac 1080  
 ttatccattc tatagtgcac gcttgttcaa ttgggtgat gactaaaccg gtgactaaag 1140  
 gtttgcagc ataaatggat ggggtttagg cagacgttga ggaattacta tacctgcaag 1200  
 gagtcattgc ctgatctgcc tggaaaaggg caggattgag tctcagaacg tgtacacat 1260  
 aggatatgga aaaatttgtc acgcctagca ttcaacttag tgggttagcg ccacctactg 1320  
 gcactttaa agcttagcat agaggagcat gtgtgttagg agctcggatg ggatccaggg 1380  
 cctcaagggt tgcagtataa taaaagccct ttaccaaat aactacatac cagcatacat 1440  
 cagtccttta gtgttgaaa acagaagga aagctaatat atatagtctt tgetttattt 1500  
 aagtctagct gattacgtgt ttggttgcca gtgtgactag tctggagtgt aatttgcct 1560  
 cagacacgta aaatggaatt tgggattcac aacactctag tatgaggac ctaatggcct 1620  
 gtaccaggca caaacgtgtc tataaactac acaaacgaa ggaatttaca ggaattagga 1680  
 aggtattctt aacattaaaa cattatgggc attttaaaaa aagctttgac aggatttctt 1740  
 tgtcatggct gtccctggagc tagttgtgta gaccagctg ggctgaaatc ttgtctgcct 1800  
 gcctggcttg gacacttttt tattatgtat acaacattct gcttccatgt atatctgcac 1860  
 attagaagac ggcaccagat ctctaatgg atggttgtga gccaccatgt ggttgcctgg 1920  
 aattgaactc aggacctctg gaagagcagt gctcttaacc tctgagccat ctccagcccc 1980

ES 2 811 648 T3

agcttgggca catttttaat ggctgggaaa tcaaaccccc taggccttct gtcagtaatg 2040  
 aagggccttt ggctaccgag agtaggattt aaggttattc ggagctgcag gtctgcctca 2100  
 gtgcagggtt gggagtccag catcttagaa aatgcagtga agccaagctg agctatatatt 2160  
 tgtttaaaaa aaaaataagt gggtaaagtg ctgctgagcc tgatgaccaa gctgggacac 2220  
 aagtagaaga acataggcca atgctctata ttaaagcat gggtcatttt taatgctctt 2280  
 gagaaggcta tgcctacact actctcagcc accgcagcgt gtttaatta aactagtttg 2340  
 gaaatcttct ttgggggtaa gctatttaac ctagtgcctt ggcaggata ctactgaact 2400  
 ctctctctca ttctcttttg ttttttaaga atttcagtca ggctcaggca gcccttaaac 2460  
 ttgtgattaa gcctgagaac agttacgatt atgagcctat tagtataccg atcaatatgt 2520  
 gaatcttttt gggatggggg tcaggcctcc ctgcctccca aatactggga ctaaaggctg 2580  
 caccaccaca acctggctct tgaataactt ttctacattt tttggggggc atgggtggga 2640  
 gagcagggtt tctctgtatt agccctggct ctctggaac tctgtagacc aggctattct 2700  
 tgagctcaga ttagcctgtc tctgcctcct aaattctggg attaaagggtg tgtgctactg 2760  
 ctgcctggct acaaagacat tttttttttt cttaaattta aaaacaaaag tggttctttt 2820  
 agaagggtgg ttggtgttgg cacatactcc aagcactcag gttttgagtt tgtcccagga 2880  
 atgaagactg cactactgcc gccctccct ggtaagggtt acacagagaa atcctatttg 2940  
 gagcctatcc tggtaactcg ctctgtagac caggctggcc tcgaactcaa gagaaccacc 3000  
 tgcctctgaa tgctggattt aagggcaggc accaccaaca cccagcctaa aaaatgtctt 3060  
 ttttttaag attttttttt ttttttttac agaataaaca ttctgtttac aatattctgc 3120  
 ttctatgtat atctgcacac tagaagaggg caccgatct cataatggat ggttgtgagc 3180  
 caccaagtgg ttgctgggaa ttgaaactcag aacctctgga agagcagtca gtgctcttaa 3240  
 cctctgagcc atctctccag cccctaaaaa tggctcttga gatagggtct caagtagttt 3300  
 gagactgagt tggctatata aacaaggctg gcacatagca ccatgtacag ctgggtttag 3360  
 tttacatggg gtgtttttgt ctctggaggc aggaggatca tttgagcata gggagttaat 3420  
 agtgaggtea tgttttatct actcttctga attgagaact aagctgatgc aaagcaagtt 3480  
 tgactgaaga agtccagttt atgagaacaa ggggtgaaac taatgtgtca aagatggcct 3540  
 tgcattgttt ttagatgatg acccagtcac ttgggaatta ctggatgtgt aagacctata 3600  
 tcttgacagg agtgaacagt gtcttatagg tcctatatga aagaaatgag acataccat 3660  
 tttgtttccc ctaagaattc acttttctca acctggttca tgctatttag gttattttac 3720  
 ttgcaaatcc taggtgctcc cttaccagct attgcttatg tggcaccaa gtcactcact 3780  
 cccatgattt gcaagtctct gggaaactcc atgacaacct agaatagcaa ctcaaataca 3840  
 tttctcagt accaatcttg aagaaaaaat attttgcaaa atagctgtat ggatgggtac 3900  
 taaatagtga ggttatctcc agaaggccta tgaagaatta aggttgagtt cagttgagtt 3960  
 cagcagcaag ttaagggtc atccattttt gtacagtgtt ttctattac ggtaagtgtt 4020  
 ttgcctgcag gaatatctgt accacatgct tgcctggtag ctatatcggc cagaagaggg 4080  
 ctttggatcc tctggacttg aattacagat gggatttagc caccatttag gtgctgggaa 4140  
 ttgaaaccaa gtcctctgga agaacagcaa gtgatcgagt 4180

ES 2 811 648 T3

<210> 4  
 <211> 676  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

5 <400> 4  
 gttgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacggggtca ttagttcata 60  
 gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggcccgcct ggctgaccgc 120  
 ccaacgacct cgcgccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag 180  
 ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta aactgcccac ttggcagtac 240  
 atcaagtgta tcatatgcc agtacgcccc ctattgacgt caatgacggg aaatggcccc 300  
 cctggcatta tgcccagtag atgaccttat gggactttcc tacttggcag tacatctacg 360  
 tattagtcat cgctattacc atgggtgatgc ggttttggca gtacatcaat gggcgtggat 420  
 agcggtttga ctacgggga tttccaagtc tccaccccat tgacgtcaat gggagtttgt 480  
 tttggacca aatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa caactccgcc ccattgacgc 540  
 aaatgggagg taggcgtgta cgggtggagg tctatataag cagagctcgt ttagtgaacc 600  
 gtcagatcgc ctggagacgc catccacgct gttttgacct ccataagaaga caccgggacc 660  
 gatccagcct ccggac 676

<210> 5  
 <211> 173  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Polinucleótido sintético  
 <400> 5  
 actctcttcc gcatcgctgt ctgcgagggc cagctgttgg gctcgcgggt gaggacaaac 60  
 tcttcgaggc ctttccagta ctcttgatc ggaaaccgct cggcctccga acggtactcc 120  
 gccaccgagg gacctgagcg agtccgcatc gaccggatcg gaaaacctct oga 173

<210> 6  
 <211> 3527  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polinucleótido sintético  
 <400> 6

ES 2 811 648 T3

gtgcatagaa acagatgcag gcaaaacatc cacacatata aaacaaaaaa ttaaaaccaa	60
taaaaactcct aaacttttgg tctttcttga atcttcaatc cctcaggtta tgaaataatc	120
atztatgcag tcaaaaattt gccattcttg ttgccagggtg tggatgatgat tcggggaagc	180
agaagcaggc agatctctgt gaatgaggcc agcctggctc acaaagtgag tcccaggaca	240
gtcaggcctg ttacacagag aaaccttgaa aaaaaaaga taatatgtac tgttgtatta	300
ccccaatata taaggctaaa ccattagaag cacaacactg ttaagtacgg aaaataatat	360
ctagtgtggt acagttacta ctactataat aactaatat agctgtggga aactagtcc	420
aaagatgaat tactaaccag tgtttccaag gaaataaatg aaagcagaga gattagtct	480
attgctagtg tttcattttc gtatatttct tacaatttct cttgttaca ataggcacta	540
gggtatcaag ataattttaa cgactggctg agaaccctag aaaatctctg tgaaaaagg	600
atgtgtgaaa tgagagaggg taatgtggcc attatagaaa aggcttttgt gtgccttgca	660
tgcatagacc ctgtgtttga tctcttaaca ccctccttga ccagaaaaag cttctgtgga	720
tagaaaaatga ttagtatat atacttttag ggaaacgtag ttctggattc tttggttaca	780
attaacagaa ttaagtgcaa acaaagccag aaacctcctg ataaatgaga aaacctgctt	840
gtagaagggt gtaaggctct gtaatatagg aattaggaga aaagaaacct gtgtggtggg	900
gcacgtctgt aatcccagca ttgggaagta gaggtagaag attagaaatc aaaggccagc	960
ctcagcaaca cagtgagttt gaggccacc tgaactacat caggttctgt ctcctttctt	1020
tttttttttt ttttcttttc ttttttgggt ttctctgtgt agttttggag cctatcctgg	1080
cactagctct gaagagcagg ctggcctcga actcagagat cagccagcct ctgctgggat	1140
taaaggtatg caccaccaac gcccagggtt ttgtctcaaa caaacaaaa taacatcagg	1200
agggtgtgag agggctcagt ggtcacagc attctctgca aagcctgact ctgagttgga	1260
tcctttagag ctacatggtt gaggaagag aactgactcc tggagggtgt cctctggtcc	1320
ccacacatag ctatacacag catgtgcatt cacacacact aaataatgct attttataaa	1380
aaattaaaaa caacaacagt ttgggttggtg aaaactagaa ctagataata ggtaagaatc	1440
aagtatcatg taaatttgc tccaactcat cccaaaattt gttttatatt tcagtttttt	1500
tccttcttag cttgactgtg gagtcttgc cggaagcaaa tagttccttt gcagatccca	1560
catgtggaca cgggacagta ggtcctcaaa tgctccttat taggttggtt caataatac	1620
aattgtttgt tactaggcag tgatgttgta catctggagg agatctcttg agcccataat	1680
caggttatta ggaataaata ctctaaggct aaaaatgtag cttagtgata agagtgcttg	1740

ES 2 811 648 T3

cctggtgtgc tgagaccctc ggttccatct ccacaacccc atattccatt acaaaatacc 1800  
 ttttcaccgt ccctagcatt aagaaacaaa acaacaaaga agtttttctt tcttctgaga 1860  
 tcctgcccgg agaggcattt aaaactggcc agggccaaaa aaaaaaaaaa aaaaagaaaa 1920  
 aaaagaaaag aaaacaggct agggccggca tgggtggcgca cgcctttaat cccagcacgc 1980  
 aggaggcaga ggcagggcgg atctctgtga gtttgaggtc agcctggtct acctagttag 2040  
 tttcagggca cccagggcta aagagactgt ctcaaaaaca aaacagccac acaatcagaa 2100  
 ccacagcaaa acgcagttat gatccttggc actgtaggaa tgacaagcat ttaaataata 2160  
 ggacgagcca tttttgagaa gctctgattt cacaagtgtc agggatgggc tctgggcgag 2220  
 taagattgct aatgctggcc tctaaatgag accacgtgga gttgattaga ttcttttcat 2280  
 gttcctcgtg ctctatcaaa taactgtacc caaatacaca cacacacaca cacacacaca 2340  
 atgcgcgcac acacaaaatc cttttttagc ttaagaagcc cagaatcaga agtaaagcta 2400  
 actgtgggac ttaagtatta ttctgaacgg aactcccagg gcgtgaagcg cgcttcaggc 2460  
 ttccagagaa gcagctggcg ctggatggaa tgaaccaaga ggccagcaca ggggcagatc 2520  
 cgtcgagctc tcggccaccg agctgagccc ttaggttctg gggctgggaa gggtccttag 2580  
 gattgtgcac ctctcccggc ggggacaagc aggggatggc ggggctgacg tcgggaggtg 2640  
 gcctccacgg gaagggacac ccggatctcg acacagcctt ggcagtggag tcaggaaggg 2700  
 taggacagat tctggacgcc ctcttggcca gtcctcaccg cccaccccc gatggagccg 2760  
 agagtaattc atacaaaagc agggatcgcc ttcgcccctg ggaatcccag ggaccgctgc 2820  
 taaattctgg ccggcctccc agcccgggaa cgttgacatt gattattgac tagttattaa 2880  
 tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agccatata tggagttccg cgttacataa 2940  
 cttacggtaa atggcccgc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt gacgtcaata 3000  
 atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag 3060  
 tatttacggt aaactgcccc cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacgccc 3120  
 cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgccagta catgacctta 3180  
 tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac catggtgatg 3240  
 cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg atttccaagt 3300  
 ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg ggactttcca 3360  
 aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatgggcg gtaggcgtgt acggtgggag 3420  
 gtctatataa gcagagctcg tttagtgaac cgtcagatcg cctggagacg ccatccacgc 3480  
 tgttttgacc tccatagaag acaccgggac cgatccagcc tccggac 3527

<210> 7

<211> 3634

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 7

ES 2 811 648 T3

gtgcatagaa acagatgcag gcaaaacatc cacacatata aaacaaaaaa ttaaaaccaa	60
taaaactcct aaacttttgg tctttcttga atcttcaatc cctcaggtta tgaaataatc	120
atztatgcag tcaaaaattt gccattcttg ttgccaggtg tggatgatgat tcggggaagc	180
agaagcaggc agatctctgt gaatgaggcc agcctggtct acaaagtgag tcccaggaca	240
gtcaggcctg ttacacagag aaaccttgaa aaaaaaaga taatatgtac tgttgtatta	300
ccccaatata taaggctaaa ccattagaag cacaacactg ttaagtacgg aaaataatat	360
ctagtgtggt acagttacta ctactataat aactaataat agctgtggga aactagtcc	420
aaagatgaat tactaaccag tgtttccaag gaaataaatg aaagcagaga gattagtct	480
attgctagtg tttcattttc gtatatttct tacaatttct cttgttaca ataggcacta	540
gggtatcaag ataattttaa cgactggctg agaaccctag aaaatctctg tgaaaaagg	600
atgtgtgaaa tgagagaggg taatgtggcc attatagaaa aggcttttgt gtgccttgca	660
tgcatagacc ctgtgtttga tctcttaaca ccctccttga ccagaaaaag cttctgtgga	720
tagaaaaatga ttagtatat atacttttag ggaaacgtag ttctggattc tttggttaca	780
attaacagaa ttaagtgcaa acaaagccag aaacctcctg ataaatgaga aaacctgctt	840
gtagaagggt gtaaggctct gtaatatagg aattaggaga aaagaaacct gtgtggtggg	900
gcacgtctgt aatcccagca ttgggaagta gaggtagaag attagaaatc aaaggccagc	960
ctcagcaaca cagtgagttt gaggccacc tgaactacat caggttctgt ctctttctt	1020
tttttttttt ttttcttttc ttttttgggt ttctctgtgt agttttggag cctatcctgg	1080
cactagctct gaagagcagg ctggcctcga actcagagat cagccagcct ctgctgggat	1140
taaaggatat caccaccaac gcccaggtt ttgtctcaa caacaaaaa taacatcagg	1200
agggtgtgag agggctcagt ggtcacagc attctctgca aagcctgact ctgagttgga	1260
tccttagag ctacatggtt gaggaagag aactgactcc tgaaggtgt cctctggtcc	1320
ccacacatag ctatacacag catgtgcatt cacacacact aaataatgct attttataa	1380
aaattaaaa caacaacagt ttgggttgtg aaaactagaa ctagataata ggtaagaatc	1440
aagtatcatg taaatttget ttcaactcat ccaaaaattt gttttatatt tcagttttt	1500
tccttcttag ctgactgtg gagtcttgc cggaagcaa tagttcctt gcagatcca	1560
catgtggaca cgggacagta ggtcctcaa tgctccttat taggttggtt caataatac	1620
aattgtttgt tactaggcag tgatgttgta catctggagg agatctcttg agccataat	1680

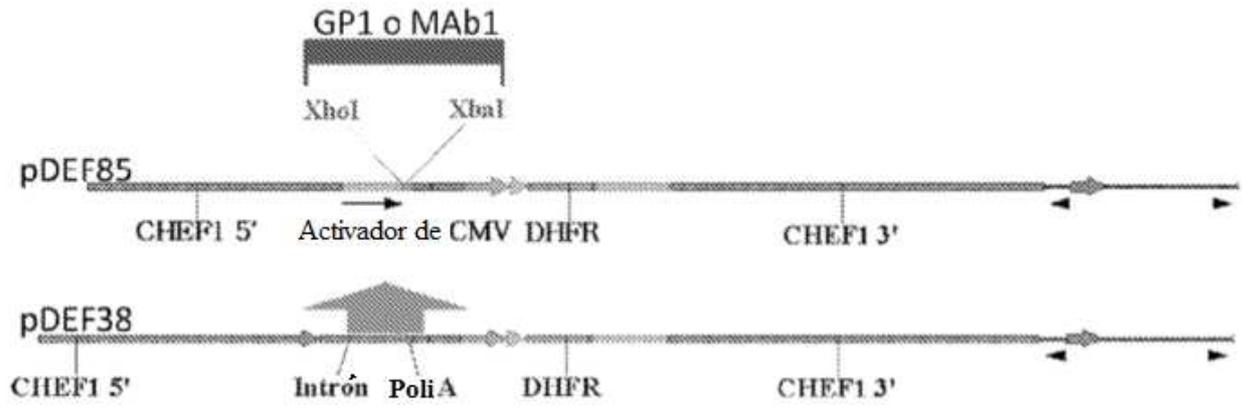
ES 2 811 648 T3

caggttatta ggaataaata ctctaaggct aaaaatgtag cttagtata agagtgcctg 1740  
 cctggtgtgc tgagaccctc gggtccatct ccacaacccc atattccatt acaaaatacc 1800  
 ttttcacCGT ccctagcatt aagaaacaaa acaacaaaga agtttttctt tcttctgaga 1860  
 tcctgcccgg agagggcattt aaaactggcc agggccaaaa aaaaaaaaaa aaaaagaaaa 1920  
 aaaagaaaag aaaacaggct agggccggca tgggtggcga cgcctttaat cccagcacgc 1980  
 aggaggcaga ggcagggcgg atctctgtga gtttgaggtc agcctggtct acctagttag 2040  
 tttcagggca cccagggcta aagagactgt ctcaaaaaa aacagccac acaatcagaa 2100  
 ccacagcaaa acgcagttat gatccttggga actgtaggaa tgacaagcat ttaaataata 2160  
 ggacgagcca tttttgagaa gctctgattt cacaagtgtc agggatgggc tctgggcgag 2220  
 taagattgct aatgctggcc tctaatagag accacgtgga gttgattaga ttcttttcat 2280  
 gttcctcgtg ctctatcaaa taactgtacc caaatacaca cacacacaca cacacacaca 2340  
 atgcgcgcac acacaaaatc cttttttagc ttaagaagcc cagaatcaga agtaaagcta 2400  
 actgtgggac ttaagtatta ttctgaacgg aactcccagg gcgtgaagcg cgcttcaggc 2460  
 ttccagagaa gcagctggcg ctggatggaa tgaaccaaga ggccagcaca ggggcagatc 2520  
 cgctcagctc tcggccaccg agctgagccc ttaggttctg gggctgggaa gggctccctag 2580  
 gattgtgcac ctctcccgcg ggggacaagc aggggatggc ggggctgacg tcgggaggtg 2640  
 gcctccacgg gaagggacac ccgatctcg acacagcctt ggcagtggag tcaggaaggg 2700  
 taggacagat tctggacgcc ctcttggcca gtctcaccg ccccaacccc gatggagccg 2760  
 agagtaattc atacaaaag agggatcgcc ttgcgccctg ggaatcccag ggaccgtcgc 2820  
 taaattctgg ccggcctccg cggcccgaa cgttgacatt gattattgac tagttattaa 2880  
 tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agccatata tggagtccg cgttacataa 2940  
 cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgccatt gacgtcaata 3000  
 atgacgtatg ttccatagc aacgccaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag 3060  
 tatttacggg aaactgccc cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacgccc 3120  
 cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta catgacctta 3180  
 tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac catggtgatg 3240  
 cggttttggc agtacatcaa tggcgtgga tagcggttt actcacgggg atttccaagt 3300  
 ctccacccca ttgacgtcaa tgggagttt ttttggcacc aaaatcaac ggactttcca 3360  
 aatgtcgtg acaactccgc ccattgacg caaatggcg gtaggcgtgt acgggtggag 3420  
 gtctatataa gcagagctcg tttagtgaac cgtcatgatc actctcttcc gcategctgt 3480  
 ctgcgagggc cagctgttgg gctcggggtt gaggacaaac tcttcgggtt ctttccagta 3540  
 ctcttgatc gaaaaccgct cggcctccga acggtactcc gccaccgag gacctgagcg 3600  
 agtccgcatc gaccggatcg gaaaacctct cgaa 3634

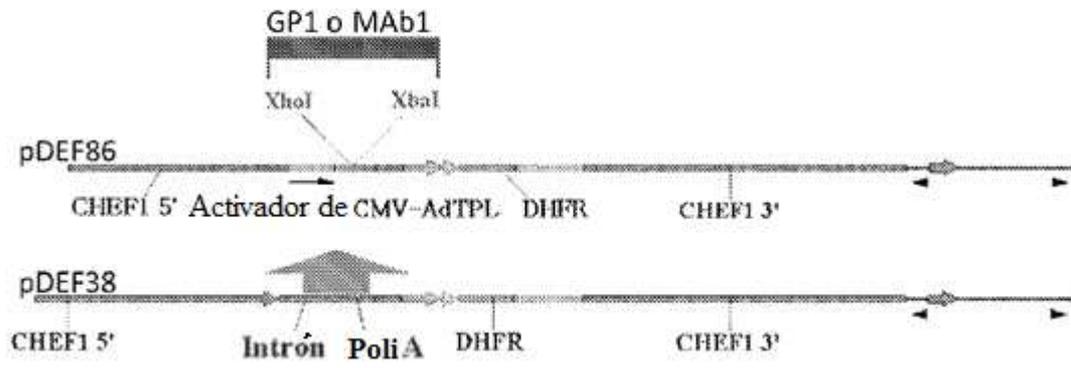
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un vector de expresión que comprende ADN regulador de la transcripción del factor 1 $\alpha$  de elongación de hámster chino (CHEF1) 5' y un activador de citomegalovirus (CMV) que comprende: (1) Secuencia ID n<sup>o</sup>: 6; o (2) Secuencia ID n<sup>o</sup>: 7, en donde dicho vector de expresión presenta al menos dos veces mayor productividad específica en comparación con un vector de expresión de referencia que tiene el ADN regulador de la transcripción CHEF1 5' pero que no comprende el activador de citomegalovirus (CMV).
2. El vector de expresión de cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende la Secuencia ID n<sup>o</sup>: 6.
3. El vector de expresión de cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende la Secuencia ID n<sup>o</sup>: 7.
- 10 4. El vector de expresión de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un gen marcador seleccionable.
5. Una célula anfitriona transformada, transducida o transfectada in vitro con un vector de expresión según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
6. La célula anfitriona de la reivindicación 5, en donde la célula anfitriona es una célula eucariota.
- 15 7. La célula anfitriona de la reivindicación 5 o 6, en donde la célula anfitriona es una célula de ovario de hámster chino (CHO), opcionalmente una célula DG44 de CHO.
8. La célula anfitriona de la reivindicación 5 o 6, en donde la célula anfitriona es una célula de mamífero distinto del hámster, opcionalmente una célula humana.

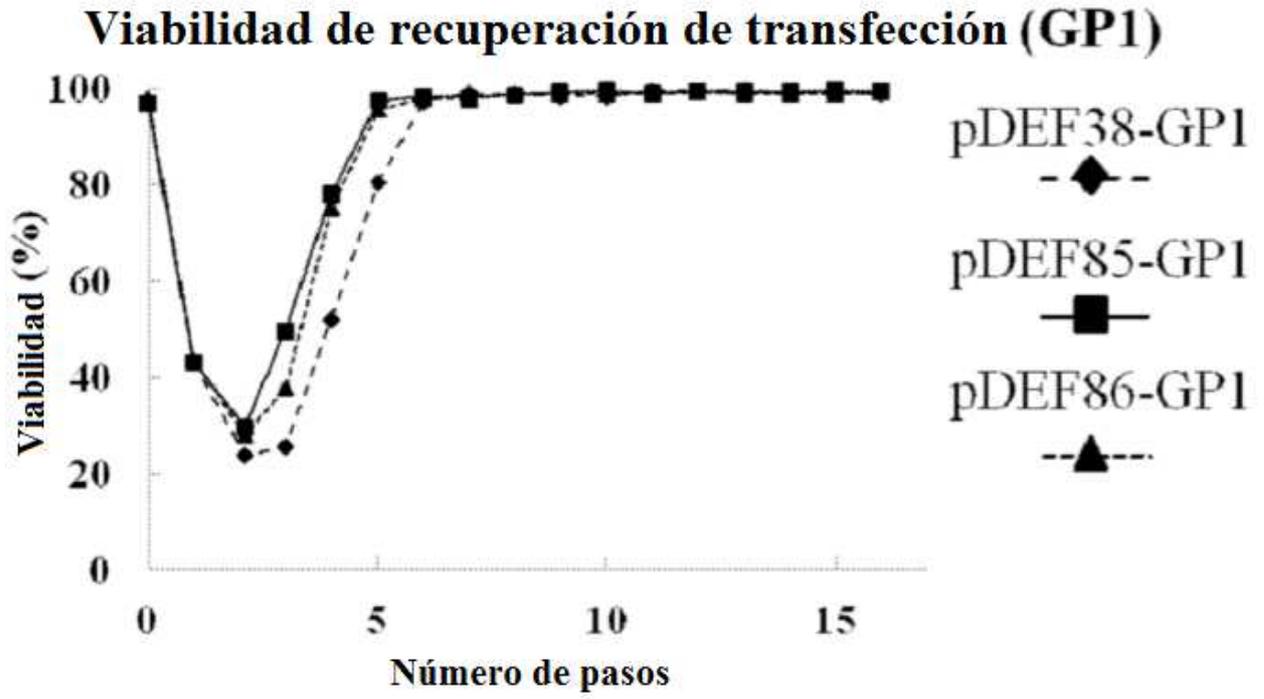
**Figura 1**



**Figura 2**

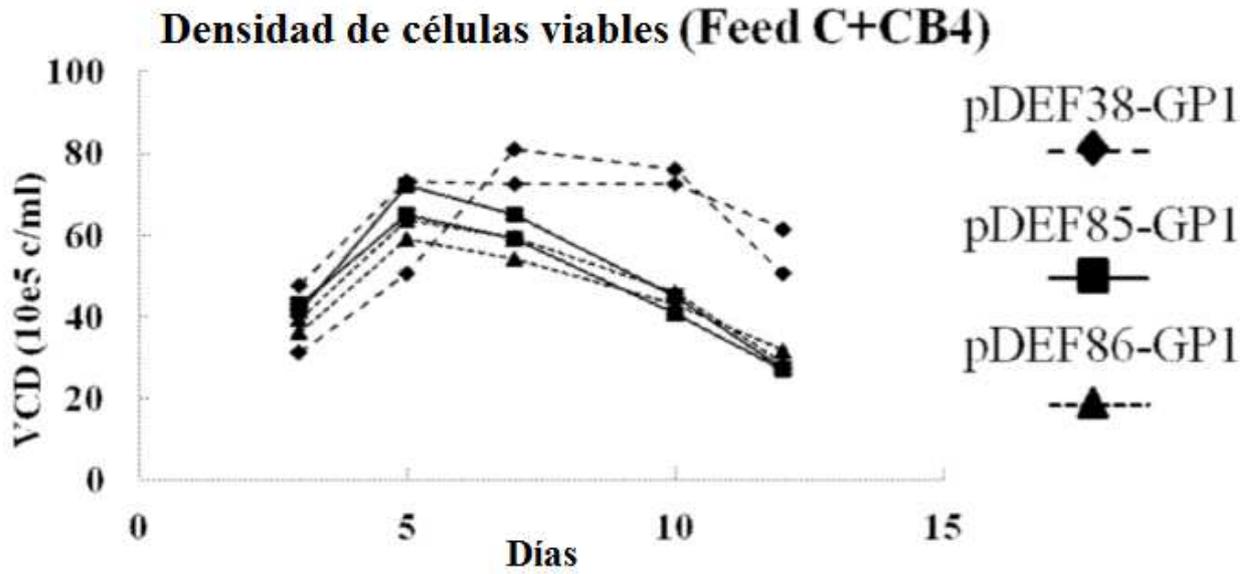


**Figura 3**



**Figura 4**

**Figura 4A**



**Figura 4B**

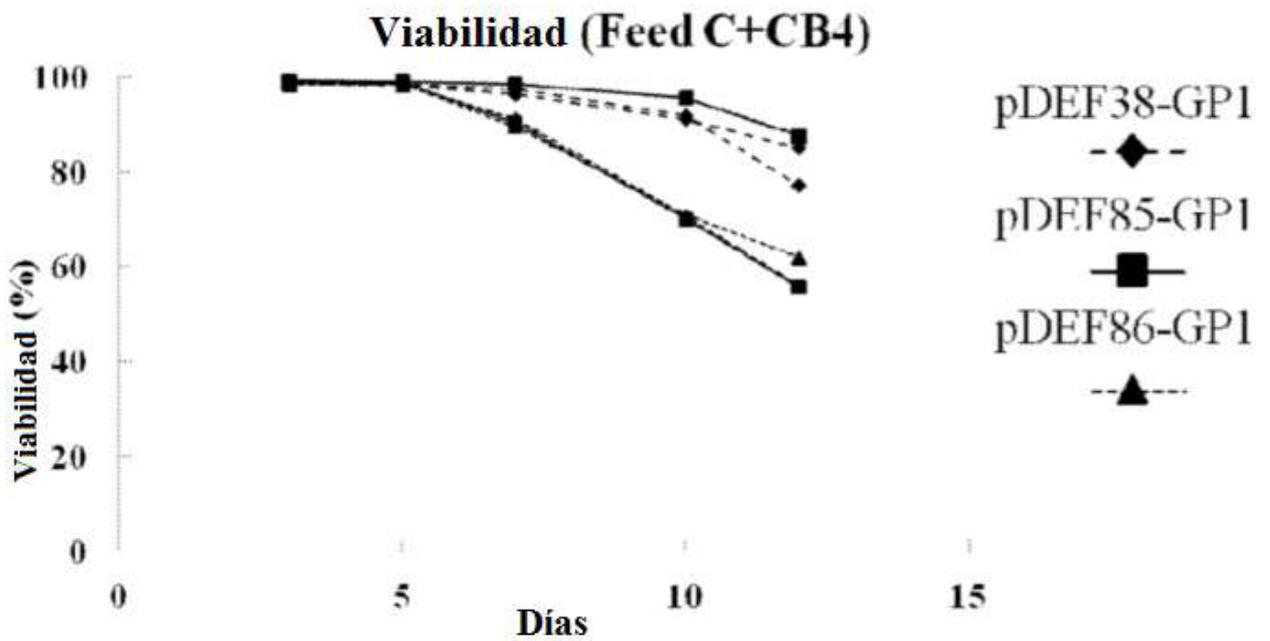
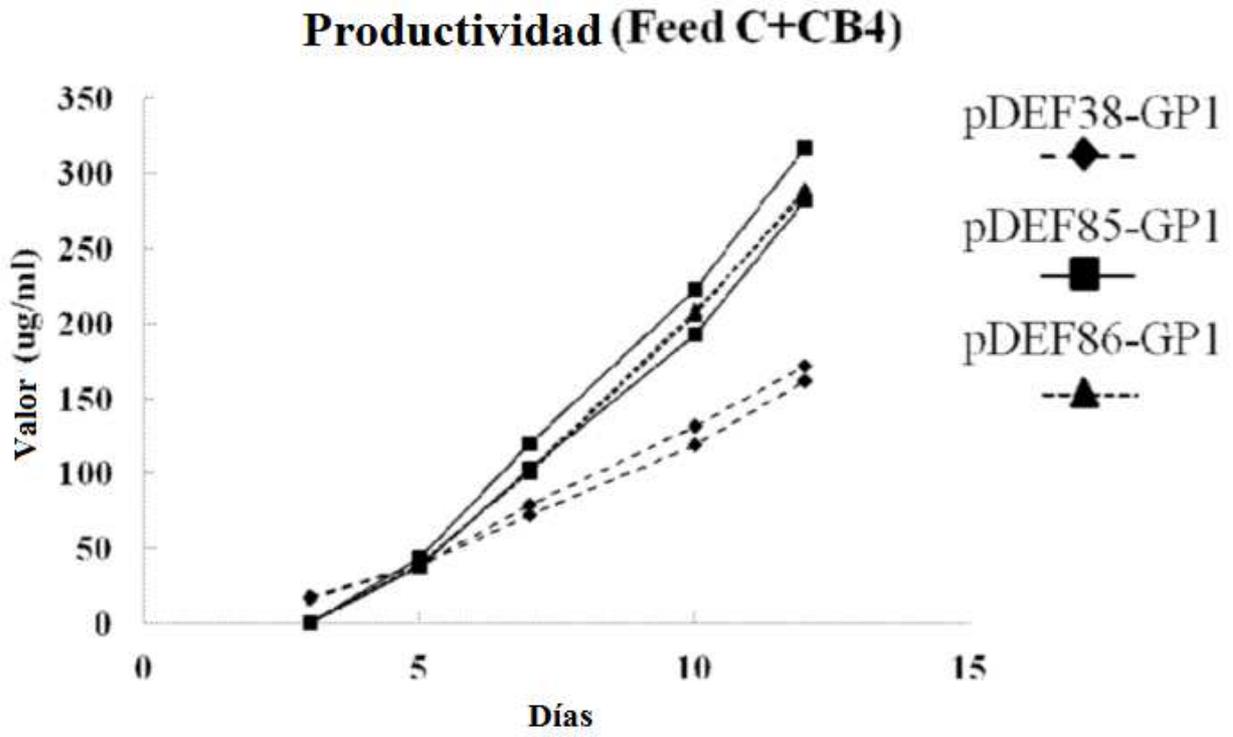
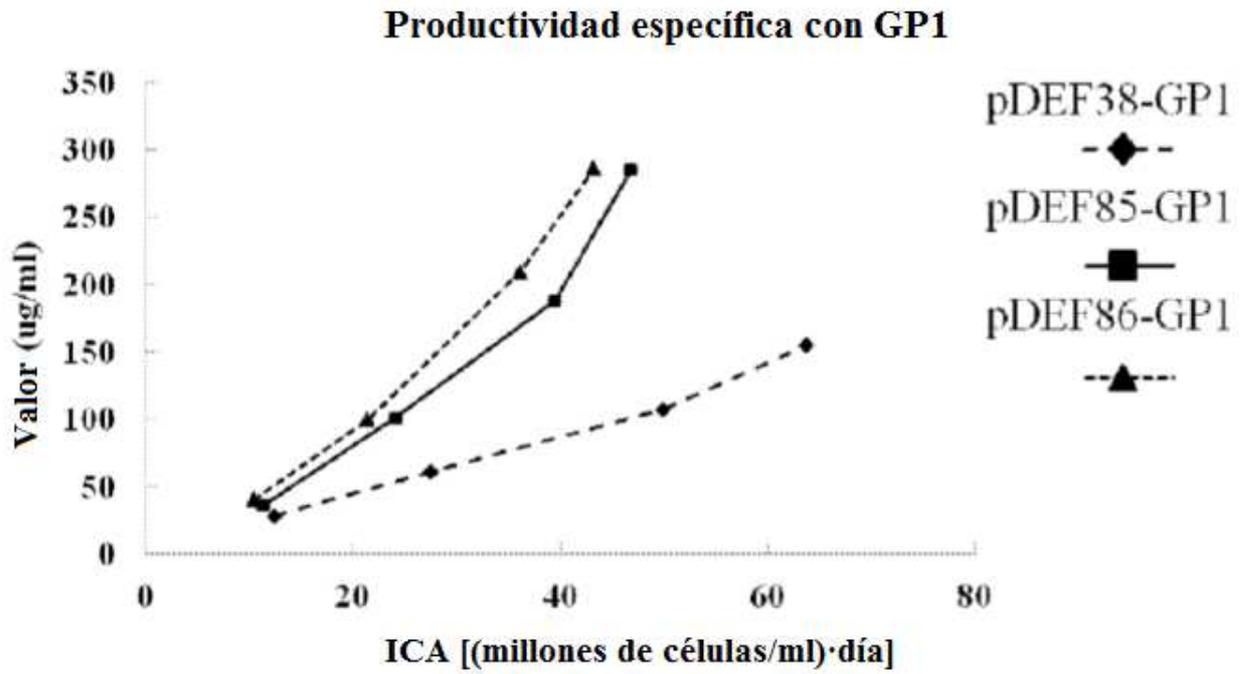


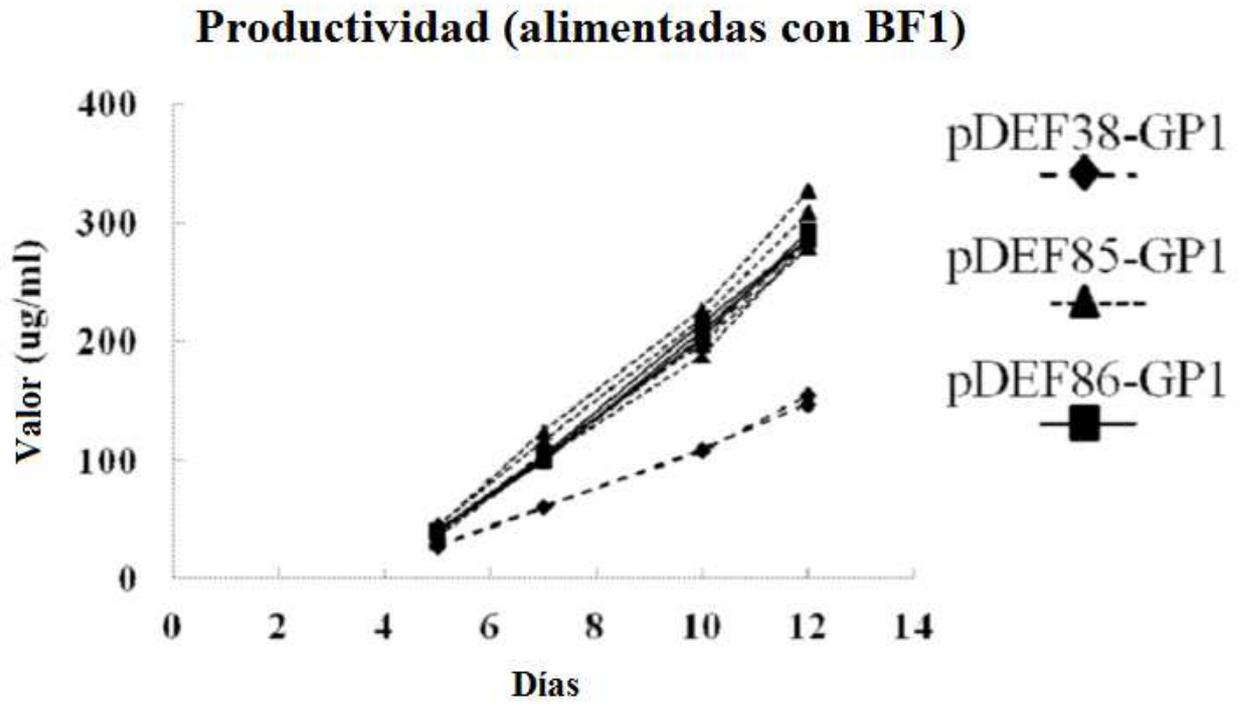
Figura 4C



**Figura 5**



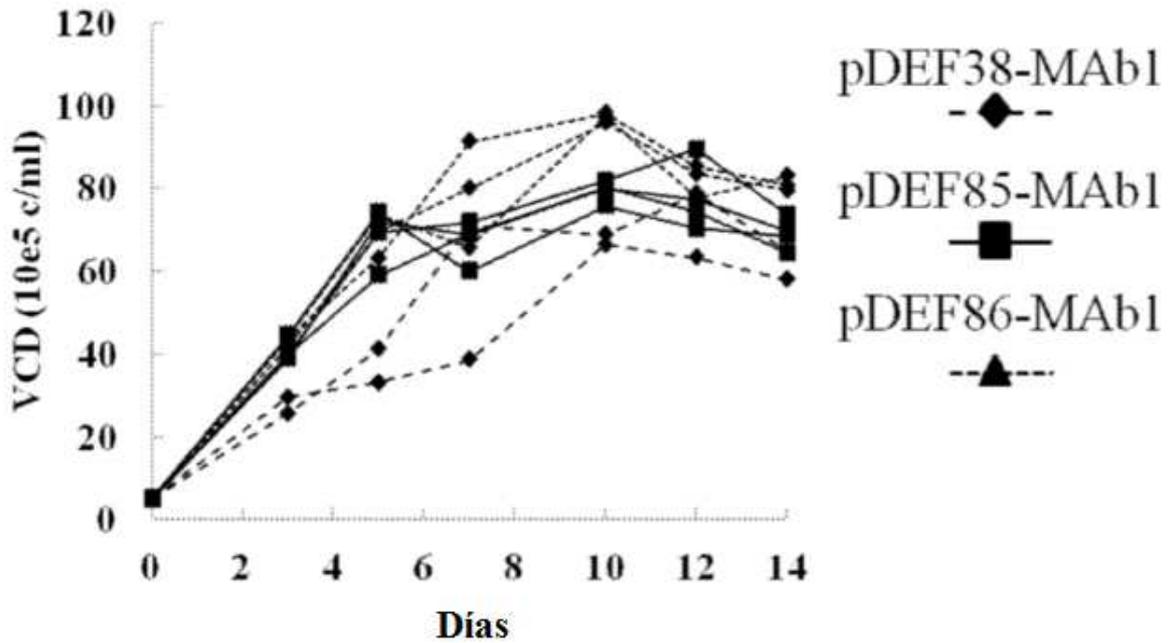
**Figura 6**



**Figura 7**

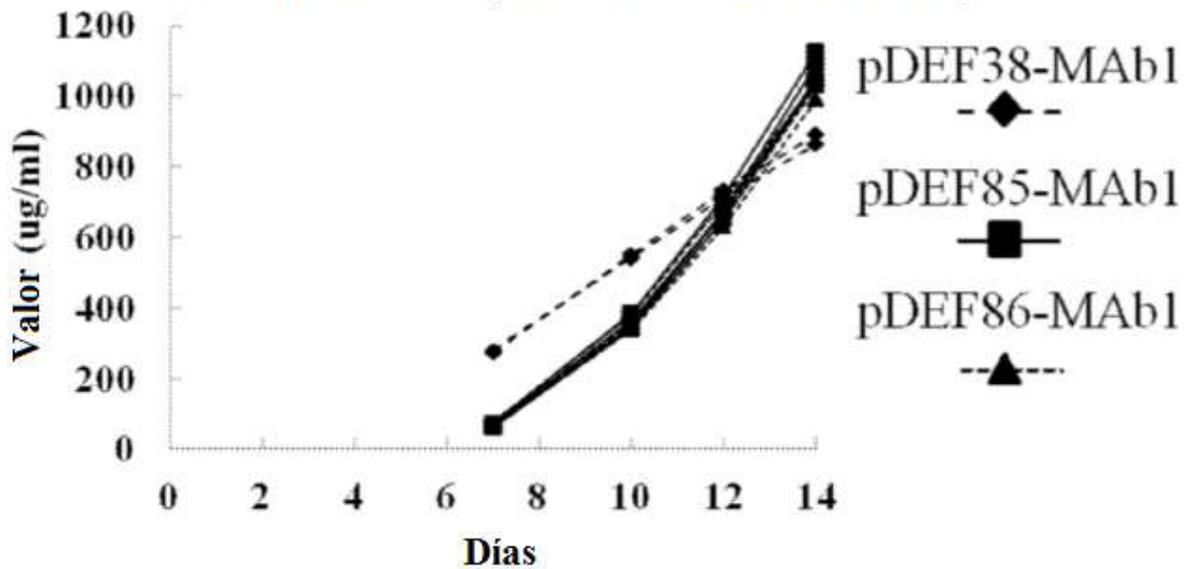
**Figura 7A**

**Densidad de células viables (alimentadas con BF1)**



**Figura 7B**

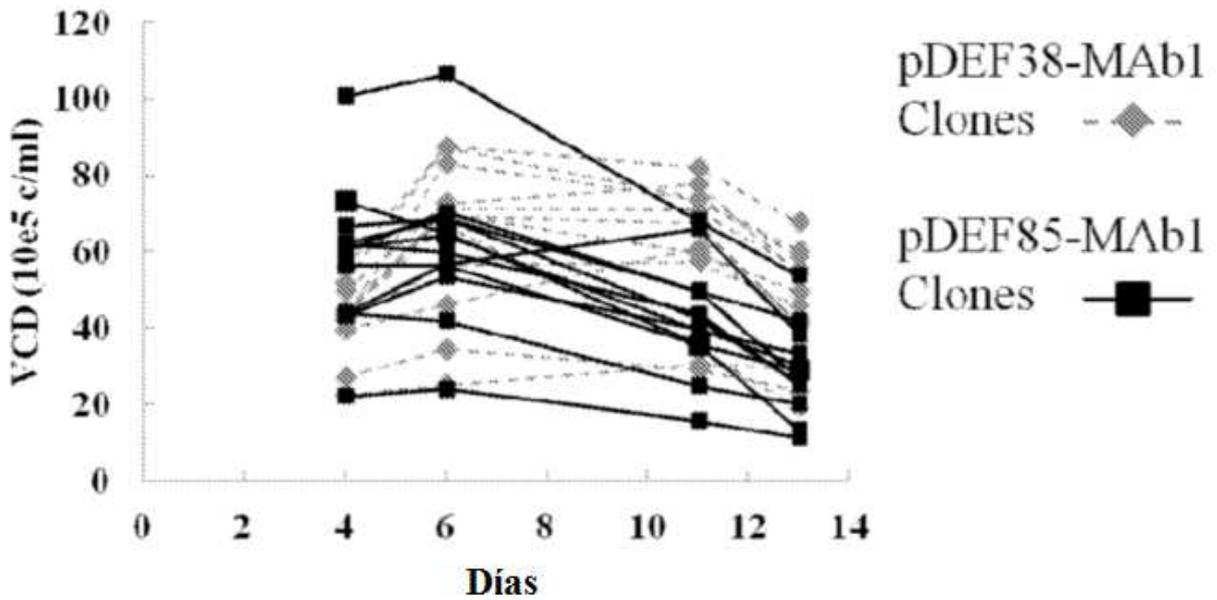
**Productividad (alimentadas con BF1)**



**Figura 8**

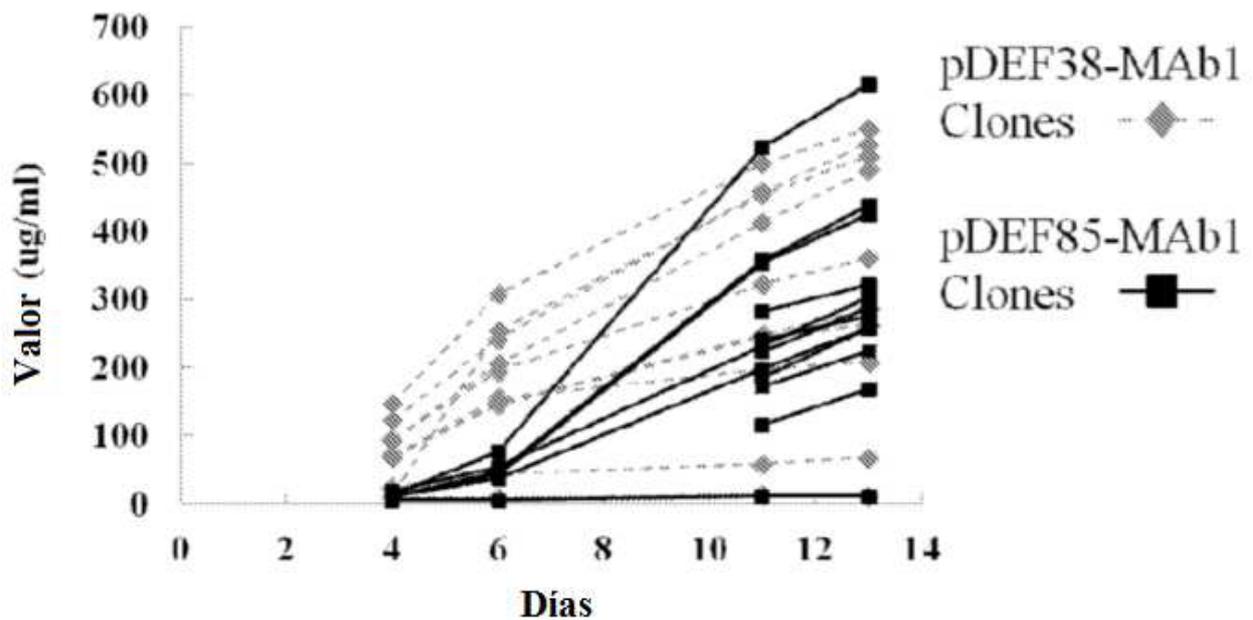
**Figura 8A**

**Densidad de células viables (Clones: BF1)**



**Figura 8B**

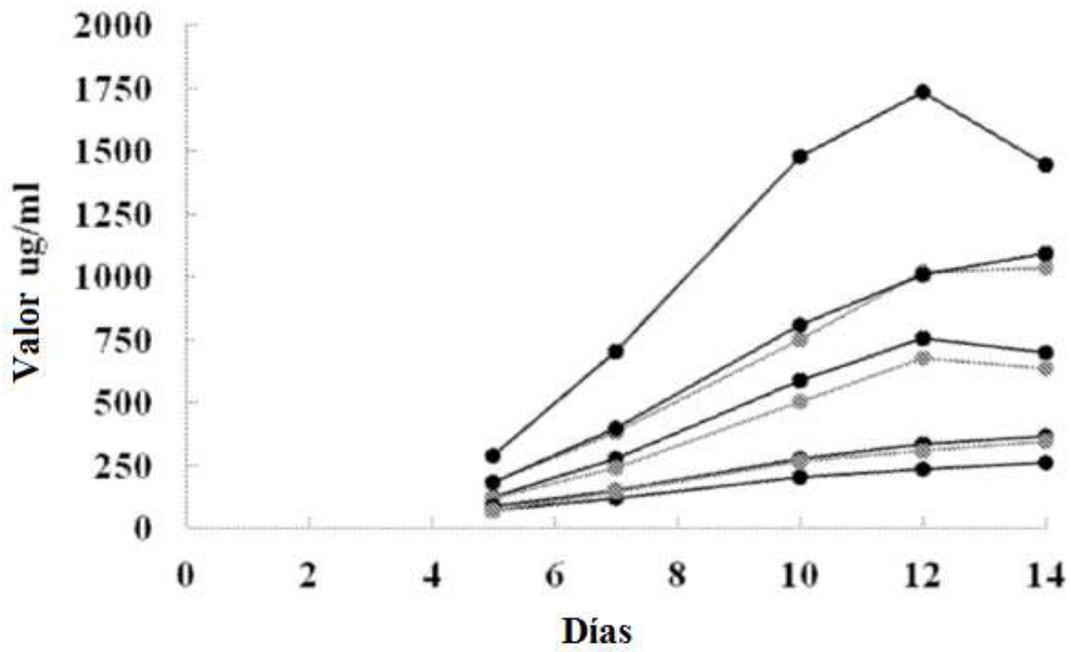
**Productividad (Clones: BF1)**



**Figura 9**

**Figura 9A**

**Productividad del clon pDEF38-GP1**



**Figura 9B**

**Productividad del clon pDEF85-GP1**

