



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 258 809**

⑤① Int. Cl.:
C12N 15/12 (2006.01)
C12N 15/65 (2006.01)
C12N 15/67 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
C12N 15/90 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C07K 14/505 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **98122807 .5**
⑧⑥ Fecha de presentación : **01.12.1998**
⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **0919619**
⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **02.06.1999**

⑤④ Título: **Optimización de células para la activación endógena del gen.**

③⑩ Prioridad: **01.12.1997 EP 97121075**

④⑤ Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.09.2006

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.09.2006

⑦③ Titular/es: **Roche Diagnostics GmbH**
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, DE

⑦② Inventor/es: **Honold, Konrad;**
Holtzsche, Thomas y
Stern, Anne

⑦④ Agente: **Isern Jara, Jorge**

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

Optimización de células para la activación endógena del gen.

5 La invención se refiere a un método para la optimización de la expresión o manifestación de un gen en las células. Un primer aspecto hace referencia a un método para modificar la expresión de un gen específico (objetivo) presente de forma endógena en una célula eucariótica introduciendo una secuencia de control heterológica de la expresión y de un modo opcional algo de gen de amplificación en el genoma de la célula por medio de una recombinación homóloga, así como al recorte del ADN externo insertado realizado a través de una recombinasa específica del lugar, y a su
10 sustitución por otras secuencias de heterológicas de control de la expresión o/y de los genes de amplificación.

La expresión de un gen en una célula puede efectuarse de forma constitutiva, por ejemplo, en los denominados genes Housekeeping, o bien de forma regulada. La expresión regulada es especialmente necesaria para los genes, los cuales deben ser expresados únicamente en un estadio de desarrollo determinado de la célula o bien en un cambio de
15 las condiciones ambientales.

La expresión se regula a nivel de transcripción a través del promotor unido de forma operativa a la secuencia de ácido nucleico codificada, cuya actividad puede ser controlada a través de represores y activadores. Un enlace de los represores o de los activadores a las secuencias de ácido nucleico no codificadas del gen puede producir una disminución o un aumento de la actividad del promotor (L. Stryer, Biochemie, capítulo 12, Spectrum der Wissenschaft, Verlagsgesellschaft, Heidelberg, 1990). La cantidad de represores o de activadores contenidos en una célula es regulada de nuevo por los factores como, por ejemplo, las condiciones ambientales. Un ejemplo de activadores son los factores que inducen hipoxia (HIF), que son inducidos por una oferta de O₂ reducida y conducen a una elevada expresión del gen de eritropoyetina (Blanchard K.L. y cols., Hypoxic induction of the human erythropoietin gene: Cooperation between the promotor and enhancer, each of which contains steroid receptor response elements, (1992), Mol. Cell. Biol. 12, 5373-5385; Wang G.L. y Semenza G.L., Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia, (1993), J. Biol. Chem., 268, 21513-21518; Wang G.L., Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension, (1995), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 5510-5514).
20

Además, la cantidad de una proteína expresada o manifestada depende de la estabilidad del ARNm. En un sector lateral 3' de un ARNm se localizan secuencias de reconocimiento para los enzimas desintegrados del ARNm, que influyen en la estabilidad del ARNm y por tanto en la magnitud de la expresión (Shaw G. y Kamen R., A conserved AU sequence from the 3' untranslated Region of GM-CSF mRNA mediates Selective mRNA Degradation, Cell (1986), 659-667). El periodo de semidesintegración del ARNm se correlaciona pues con la cantidad de proteína expresada.
25 Un tercer nivel de la regulación de la expresión es la traslación.

La expresión de un gen se basa por tanto en unos mecanismos de regulación complejos, que pueden ser muy diferentes en cada caso.

30 Las proteínas pueden obtenerse con ayuda de la tecnología del ADN recombinante, que aprovecha los conocimientos de la regulación de la expresión (Sambrook u cols., 1989 Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Col Spring Harbor). Para ello se emplean vectores que contienen una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína correspondiente bajo el control de un promotor adecuado, así como otras secuencias necesarias para la expresión de la proteína y para la replicación del vector. El vector se introduce entonces mediante un método conocido en una célula anfitriona, la célula se cultiva y la proteína recombinante puede obtenerse a partir de la célula o del medio de cultivo.
40

Como células anfitrionas se pueden emplear las células procarióticas o eucarióticas. Las procarióticas, en particular las células de *E. coli*, no son problemáticas en lo que se refiere a su manipulación, pero presentan una serie de inconvenientes en una expresión recombinante de proteínas eucarióticas.
45

Los procariotes y eucariotes se distinguen por una vía de procesamiento de la expresión, en las condiciones del medio celular así como en el "Chaperon" que interviene en el tratamiento de la proteína. Por eso pueden aparecer diferencias decisivas en una proteína eucariótica fabricada en los procariotes en comparación con la proteína nativa correspondiente. Por ejemplo, la muestra de plegamiento de la proteína y la actividad de la proteína varían. Además las proteínas en una célula procariótica generalmente no se glicosilan. Una muestra de glicosilación correcta equivale en muchos casos, por ejemplo en la síntesis de proteínas para una fórmula farmacéutica a una característica decisiva para la eficacia y la tolerancia.
50

Las proteínas glucosiladas son fabricadas pues por medio de células anfitrionas eucarióticas o líneas celulares, por ejemplo CHO (Chinese Hamster Ovary). A pesar de la utilización de las células eucarióticas pueden aparecer cambios en la proteína fabricada de forma recombinante debido a las diferentes especies, por ejemplo, en la expresión de una proteína humana en células no humanas, lo que hace que esta no se pueda utilizar en muchas aplicaciones.
55

60 Para la fabricación recombinante de proteínas las células anfitrionas ocasionales o transitorias o bien estables son transfeccionadas con vectores de expresión, donde se emplean células transfeccionadas estables especialmente en un método de fabricación muy técnico.
65

La integración casual poco específica de las secuencias del vector de expresión en el genoma de la célula puede llevar a células con un rendimiento de producción escaso o a unas propiedades celulares inestables. Por ejemplo, puede disminuir el rendimiento de producción en el transcurso del proceso de producción o bien la capacidad de las células de expresar la proteína recombinante puede perderse del todo.

Un método para el incremento de la expresión del gen es la amplificación del gen, en la cual una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína se acopla a un gen de amplificación. A través de una etapa de selección se consigue una replicación de ambas secuencias, que conduce a una expresión elevada (Schimke R.T.Ed)(1982), Gene amplifikation, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY).

Como gen de amplificación puede emplearse por ejemplo un ácido nucleico codificado para una dihidrofolatoreductasa (DHFR)(Kaufmann R.J.,Sharp P.A.(1982), Amplifikation and expression of sequences cotransfected with a modular dihydrofolatereductase complementary DNA gene, J.Mol.Biol..159:601ff).

Mediante una etapa de selección llevada a cabo con metotrexato se obtienen células que son resistentes frente al metotrexato y que contienen en su genoma la secuencia de ácido nucleico en una amplificación de 20 hasta 50 veces codificada para una DHFR y acoplada con ella (R. Knippers, 1982, Moleculare Genetik, Thieme, Stuttgart).

Un método de amplificación del gen de este tipo se lleva a cabo del modo mas eficaz con una célula negativa DHFR. La JP-62265992 describe, por ejemplo, una célula negativa humana DHFR. Sin embargo, en esta célula no se halla ningún indicio de una integración específica del lugar de un vector de expresión por medio de una recombinación homologa y una amplificación de esta secuencia.

Incluso al llevar a cabo un proceso de amplificación del gen pueden aparecer los inconvenientes anteriormente indicados como, por ejemplo la inestabilidad de las células, debido a la casual integración del vector de expresión en el genoma.

Únicamente en caso de una integración específica del lugar del ADN externo en un locus genético seleccionado a través de una recombinación complementaria, se pueden evitar las inconvenientes descritos. Los métodos correspondientes son conocidos y se conocen como Gentergeting (WO 90/11354; WO 91/09955). Por lo que la célula es transfeccionada con un vector, que contiene un gen marcador de selección positivo, flanqueado por secuencias de ácido nucleico, que son complementarias a las secuencias de un gen locus, en las que el vector debe integrarse en el genoma de la célula. Entre las secuencias complementarias del ácido nucleico se halla otra secuencia de control de la expresión heterológica, para incrementar la expresión del gen objetivo o específico en la célula, y si se diera el caso, un gen de amplificación, para incrementar el numero de copias del gen objetivo.

Un inconveniente del método de Gentergeting conocido hasta el momento consiste en que la fabricación de células con propiedades, que facilitan la fabricación de una proteína deseada en una cantidad y calidad suficientes para los fines comerciales, frecuentemente esta relacionada con un gasto elevado. En particular la elección de secuencias de control de la expresión optimas o/y genes de amplificación para la expresión de una proteína objetivo deseada requiere a menudo un numero considerable de series de ensayo para la recombinación complementaria, las cuales debido al costoso procedimiento del aislamiento de clones, en los cuales ha tenido lugar el suceso de recombinación deseado, están unidas a un gasto muy elevado.

La recombinación complementaria se puede emplear también para interrumpir la expresión de determinados genes en una célula y para efectuar estudios de funcionamiento de las proteínas. Para ello se producen ratones Knockout de manera que para un gen que codifica la proteína que se va a investigar en las células madre embrionales se desconecta o interrumpe a través de la recombinación complementaria. Tras efectuar otras etapas del proceso se obtienen los ratones, los cuales debido a la inactivación de ambos alelos de este gen no pueden expresar ninguna proteína funcional antes del inicio de su desarrollo (Thomas K.R.,Capecchi M.R.,(1987), Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells, Cell 51:503-512).

Para interrumpir o desconectar un determinado gen específico de tiempo y tejido, y para investigarlo puede emplearse el sistema Cre-Lox. Para ello se introduce un fragmento flanqueado por dos secuencias lox-P a través de una recombinación complementaria en el genoma de una célula y seguidamente puede recortarse de nuevo del genoma a través de una Cre-Recombinasa expresada en la célula (Sauer B, Henderson N(1989): Site-specific DNA recombination at loxPsites placed into the genome of mammalian cells. Nuc Acid Res 17: 147-161;Sauer B, Hederson N.(1990), Targeted insertion of exogenous DNA into the eukaryotic genome by the Cre recombinase, New Biol..5:441-449). En la tecnología actual no existe ninguna alusión a la utilización del sistema Cre-Iox o bien de otro sistema de recombinasa específico del lugar para la integración específica de secuencias de control de la expresión o bien genes de amplificación en el genoma de las células eucarióticas para la modificación de la expresión genética endógena.

El cometido en el que se basaba la presente invención consistía en preparar un método nuevo para la optimización de la activación genética endógena por medio de la recombinación complementaria, en el cual se eliminaran al menos parcialmente los inconvenientes de la tecnología actual.

Este cometido se resuelve al preparar un método nuevo y unos vectores que faciliten una optimización de la potencia de expresión del gen en las células eucarióticas. Un primer aspecto de la invención se refiere a un método para alterar la expresión de una secuencia de ácido nucleico presente de forma endógena en una célula eucariótica, que se caracteriza porque

- a) la célula es transfeccionada con un primer vector, que comprende
 - (i) una secuencia de control de la expresión heterológica y si se diera el caso un gen de amplificación,
 - (ii) un gen marcador de selección positivo
 - (iii) al menos dos secuencias objetivo que flanquean las secuencias (i) y(ii) para una recombinasa específica del lugar,
 - (iv) las secuencias de ADN que flanquean las secuencias (i),(ii) y (iii), que son complementarias a un segmento de ácido nucleico en un genoma de la célula, para permitir una recombinación complementaria,
- b) la célula transfeccionada es cultivada en unas condiciones, en las cuales se efectúa una recombinación complementaria del vector, y
- c) se consigue la célula obtenida según el apartado (b)

Con el método conforme a la invención se prepara una célula que presenta un gen endógeno en un acoplamiento operativo con una secuencia de control de la expresión heterológica y si se diera el caso con un gen de amplificación, donde estas secuencias son flanqueadas por secuencias objetivo para una recombinasa específica del lugar, por ejemplo, la Cre-Recombinasa. Esta célula es sorprendentemente adecuada para investigaciones sobre la optimización de la expresión del gen objetivo, puesto que debido a la existencia de las secuencias objetivo para la recombinasa específica del lugar es posible una sustitución simple de la primera secuencia de control de la expresión heterológica o bien/y del primer gen de amplificación a través de una segunda secuencia de control de la expresión heterológica o/y de un segundo gen de amplificación.

La denominación "recombinasa específica del lugar" conforme a la presente invención engloba proteínas y complejos proteínicos, que permiten los almacenamientos de ADN en una secuencia de ADN específica, que incluye recombinasas específicas del lugar del tipo de integrasas o resolvasas-invertasas (Stark y cols., Trends.Genet.8(1992), 432-439; Abremski y Hoess, Protein Engineering 5(1992), 87-91;Khan *et al.*,Nucleic Acids Res.19(1991), 851-860) y la recombinación específica del lugar conciliada por las endonucleasas codificadas por los intrones (Perrin y cols. EMBO J.12(1993), 2939-2947). Las proteínas de recombinasa preferidas se eligen del grupo formado por la FLP-recombinasa de episoma de 2 μ de *Saccaromyces cerevisiae* (por ejemplo, Falco y cols., Cel 29(1982), 573-584;Cox, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 80(1983)4223-4227;Konsolaki y cols.,New Biologist 4(1992), 551-557), la Cre-recombinasa de *E.coli* Paguen P1 (por ejemplo, Sauer y Henderson(1989)*supra*), la R-recombinasa de *Zygosaccharomyces rouxii* Plasmid pSR1(Matsuzaki y cols.,J.Bacteriol.172 (1990), 610-618), la A-recombinasa de *Kluveromyces drosophilium* Plasmid pKD1 (Chen y cols., Nucleic Acids Res.14(1986), 4471-4481), la A-recombinasa de *Kluveromyces waltii*-Plasmid pKW1 (Chen y cols.,J.Gen.Microbiol. 138(1992),337-345), de un componente del sistema de recombinación λ -Int (Landy, Annu Rev. Biochem.5(1989), 913-949) y de un componente del sistema de recombinación Gin del Phagen μ (Klippel y cols., EMBO J.12(1993), 1047-1057). Además las proteínas de fusión descritas en una patente europea EP-B-O 707 599 de una recombinasa específica del lugar y de un receptor nuclear o del dominio enlazado a los ligandos no también adecuadas. Se prefieren especialmente secuencias objetivo de la Cre-recombinasa, es decir secuencias loxP para el método conforme a la invención.

En contraposición a la fabricación recombinante de proteínas a través de la integración inespecífica del lugar de genes heterológicos y a las desventajas que ello implica, con el método conforme a la invención se aprovechan las ventajas de la activación del gen endógeno específico del lugar a través de la recombinación complementaria. Mediante una simple selección de las combinaciones adecuadas de secuencias de control de la expresión heterológicas y de los genes de amplificación se obtiene con elevada probabilidad un clon de fabricación optimizado con propiedades estables, que facilitan la fabricación de una proteína que en su estructura y actividad coincide ampliamente con la proteína nativa.

La elección de las secuencias complementarias apropiadas, que flanquean la secuencia de control de la expresión heterológica, el gen de amplificación, el gen marcador de selección positivo y las secuencias objetivo de la recombinasa, se produce por ejemplo según el método descrito en WO90/11354 y WO91/09955.

Además las secuencias complementarias pueden contener también modificaciones que conducen en a mutaciones en una proteína expresada, como por ejemplo, mutaciones puntuales, inserciones o/y deleciones o eliminaciones de algún aminoácido o del total de segmentos de aminoácidos.

Con el método conforme a la invención es posible, por tanto, modificar en una única etapa de proceso no solo la magnitud de la expresión de la secuencia endógena de ácido nucleico, sino que al mismo tiempo introducir una mutación en la zona codificada de la secuencia de ácido nucleico endógena. Por tanto el método conforme a la invención

se prefiere especialmente para la fabricación de proteínas para aplicaciones de medicamentos. Este tipo de proteínas no debe presentar ningún otro cambio en comparación con la proteína nativa, a excepción de las mutaciones para incrementar la actividad de la proteína.

5 Según la invención puede emplearse cualquier célula eucariótica, preferiblemente una célula de mamífero, en particular una célula humana. El método conforme a la invención puede llevarse a cabo con células no inmortalizadas, por ejemplo, fibroblastos, pero también con células inmortalizadas, por ejemplo, líneas celulares tumorales. Se prefieren células inmortalizadas.

10 Las soluciones y medios empleados en la realización del método conforme a la invención se eligen preferiblemente de manera que se presentan unas condiciones óptimas en la respectiva etapa del proceso. El cultivo de células se realiza con medios que contienen todas las sustancias necesarias para un crecimiento celular suficiente y si fuera preciso se tamponan. Las células se cultivan preferiblemente en un medio libre de suero. Se prefiere especialmente la célula Namalwa-, HT1080 o HeLa S3.

15 El método conforme a la invención facilita la optimización de la expresión de una secuencia de ácido nucleico presente de forma endógena en la célula, es decir, de un gen objetivo mediante la elección de una secuencia de control óptima de la expresión, de un gen de amplificación óptimo o bien/y a través de la elección de una combinación óptima de secuencia de control de la expresión y de gen de amplificación.

20 Como secuencia de control de la expresión heterológica se puede emplear cualquier secuencia de ácido nucleico, que tras su integración en el genoma de la célula influya en la expresión del gen objetivo. Esto incluye secuencias de ácido nucleico, que pueden aceptar las interacciones directas con componentes de transcripción, como por ejemplo los factores de iniciación de la transcripción o bien polimerasas de ARN y secuencias de ácido nucleico, cuya influencia en la transcripción se realiza a través de interacciones con activadores o represores. Preferiblemente la secuencia de control de la expresión heterológica engloba un promotor/intensificador, y se prefieren especialmente promotores virales y el mas preferido es el promotor CMV.

30 La secuencia de control de la expresión heterológica puede englobar también una secuencia no codificada 3'. Las secuencias no codificadas 3' pueden actuar sobre un ARNm de forma estabilizante o no estabilizante y aumentar o disminuir por tanto su tiempo de semidesintegración. Introduciendo una secuencia que estabiliza un ARNm puede incrementarse el tiempo de semidesintegración de un ARNm y por tanto el rendimiento de la proteína codificada por el mismo.

35 En una forma de ejecución preferida se aleja una secuencia de control del gen objetivo de la expresión endógena mediante la recombinación complementaria. Esto se prefiere especialmente cuando la secuencia endógena engloba una secuencia enlazada a un represor. Una acción que reduce la expresión puede presentar también una secuencia no codificada 3', que actúe de forma desestabilizante sobre el ARNm, de manera que se reduzca la cantidad de proteína trasladada.

40 Además el método conforme a la invención permite la elección de un gen de amplificación óptimo. El gen de amplificación se emplea preferiblemente en una forma expresable, es decir, en acoplamiento operativo con un promotor adecuado y se dispone en un vector de manera que tras la integración complementaria del vector en el genoma de la célula eucariótica se encuentre cerca del gen objetivo. La realización de una etapa de amplificación conduce a un aumento del numero de copias de gen objetivo en la célula. De este modo puede lograrse otro aumento de expresión de la secuencia de ácido nucleico endógeno. Ejemplos de genes de amplificación adecuados son la dihidrofolatoreductasa (DHFR), adenosindeaminasa, ornitindecarboxilasa o bien muteínas de este gen. Preferiblemente el gen de amplificación es un gen DHFR o una forma mutada del mismo (Simonsen y cols., Nucleic Acid Res.1988, 16(5):2235-2246), en particular en células, que contienen un gen DHFR endógeno.

50 Como marcador de selección positivo puede emplearse cualquier gen de resistencia adecuado para una célula eucariótica, que conduzca a un fenotipo seleccionable, como por ejemplo una resistencia de antibiótico. Preferiblemente el gen marcador de selección positivo es un gen de resistencia a la neomicina, canamicina, geneticina o higromicina. Preferiblemente el gen marcador de selección positivo se emplea en forma expresable, es decir en acoplamiento operativo con un promotor adecuado.

60 Si se emplea un gen marcador de selección negativo, se realiza normalmente además de la etapa de selección positiva una segunda etapa de selección negativa. Esto tiene la ventaja de que tras la realización de las etapas de selección los clones identificados contienen una proporción pequeña de clones falsos positivos, es decir de vectores integrados casualmente en el genoma. El gen marcador de selección negativo es preferiblemente un gen de timidina-quinasa (TK) o bien/y un gen de hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferasa (HGPRT).

Debido a la existencia de secuencias objetivo de la recombinasa específica del lugar pueden recortarse entre estas secuencias las secuencias de ácido nucleico localizadas del genoma de la célula mediante el uso de la recombinasa específica del lugar. Preferiblemente se recorta la secuencia de ácido nucleico del genoma localizada entre las secuencias objetivo mediante la activación transitoria de la correspondiente recombinasa en la célula. Esta activación transitoria de la recombinasa puede realizarse por ejemplo mediante

ES 2 258 809 T3

(a) La transfección de la célula con un segundo vector, que engloba una secuencia de ácido nucleico codificada para la recombinasa unida operativamente a una secuencia de control de la expresión activa o activable en esta célula y

(b) El cultivo de la célula así transfeccionada en las condiciones en las cuales la recombinasa se expresa y es activa y

(c) La obtención de la célula si ello fuera preciso.

Utilizando proteínas de fusión-receptor nuclear/recombinasa puede llevarse a cabo la activación transitoria de la célula incluso mediante la adición controlada del ligando para el receptor nuclear.

Tras eliminar el ADN presente entre las secuencias objetivo puede aprovecharse la secuencia objetivo restante, por ejemplo, la secuencias loxP para otras etapas del proceso.

En otra forma de ejecución preferida el método se caracteriza porque

(a) la célula es transfeccionada con un tercer vector, que engloba

(i) al menos se elige una secuencia de una segunda secuencia de control de la expresión heterológica y de un segundo gen de amplificación,

(ii) un gen marcador de selección positivo, que se diferencia preferiblemente del gen marcador de selección positivo del primer vector y

(iii) al menos dos secuencias objetivo de recombinasa que flanquean las secuencias (i) y (ii),

(b) la célula transfeccionada se cultiva en unas condiciones en las cuales se realiza una integración de la secuencia flanqueada por las secuencias objetivo en la secuencia objetivo en un genoma de la célula,

(c) se consigue la célula obtenida según el apartado (b) y

(d) si fuera necesario, las etapas (a) hasta (c) se repiten al menos una vez con las secuencias de control de la expresión variantes o/ y los genes de amplificación

Con el método conforme a la invención pueden comprobarse rápida y fácilmente muchas secuencias de control de la expresión, genes de amplificación o combinaciones de secuencias de control de la expresión y genes de amplificación. Se suprime por tanto la realización de una integración específica del lugar, costosa en precio y tiempo, para cada secuencia de control de la expresión heterológica o bien para cada gen de amplificación con el fin de averiguar un sistema óptimo de expresión/amplificación para cada uno de los genes objetivo.

El gen marcador de selección positivo se distingue por un tercer vector del de un primer vector, para simplificar el método de selección y minimizar el número de clones falsos positivos.

Las secuencias objetivo de recombinasa en un vector empleado según la invención pueden coincidir con secuencias objetivo que aparecen de forma natural o bien presentar mutaciones, que no alteren la eficacia de la recombinación específica del lugar.

Otro objetivo de la invención es un vector para la recombinación complementaria, en particular para la introducción específica del lugar de secuencias objetivo de recombinasa en el genoma de una célula, que comprende

(i) una secuencia de control de la expresión heterológica y si fuera preciso un gen de amplificación,

(ii) un gen marcador de selección positivo

(iii) al menos dos secuencias objetivo flanqueando las secuencias (i) y(ii) para una recombinasa específica del lugar,

(iv) las secuencias de ADN que flanquean las secuencias (i), (ii) y (iii) que son complementarias a un segmento de ácido nucleico en un genoma de una célula, para permitir una recombinación complementaria, y

(v) si fuera preciso un gen marcador de selección negativo.

Todos los vectores conforme a la invención contienen además los elementos de una secuencia necesarios para una propagación y un aumento de las células anfitrionas adecuadas, como por ejemplo el origen de la replicación, los genes marcadores de selección etc.

Otro objetivo de la presente invención es una célula eucariótica, preferiblemente una célula humana, que se obtiene a través de un método como el descrito. Esta célula, por ejemplo, una célula humana, se caracteriza preferiblemente porque

- 5 (a) contiene una secuencia de control de la expresión heterológica localizada en un cromosoma y si fuera preciso un gen de amplificación en acoplamiento operativo con una secuencia de ácido nucleico presente de forma endógena y donde
- (b) la secuencia localizada en un cromosoma esta flanqueada por secuencias objetivo de recombinasa

10

La invención se aclara mediante los ejemplos, las figuras y el protocolo de la secuencia siguientes.

Descripción de las figuras

15 Figura 1

- (A) muestra un vector para la recombinación complementaria que se emplea como primer vector. HR: secuencia complementaria, sec 1: primera secuencia de control de la expresión heterológica, R1: gen marcador de selección positivo, loxP: loxP-secuencia con orientación,
- 20 (B) muestra secuencias genómicas
 - (a) tras la recombinación complementaria realizada
 - 25 (b) tras el recorte catalizado por una Cre-recombinasa de una secuencia flanqueada por secuencias loxP,
- (C) muestra un vector para una integración intervenida por la Cre-recombinasa, que engloba una secuencia dispuesta entre las secuencias loxP,
- 30 (c) muestra secuencias genómicas tras la integración de un segundo vector en la secuencia loxP. R2: gen marcador de selección positivo, que se diferencia del R1, sec 2: segunda secuencia de control de la expresión heterológica.

Figura 2

- 35 (A) muestra un vector para la recombinación complementaria HR: secuencia complementaria, R-box: gen marcador de selección positivo y si se diera el caso negativo, loxP: secuencia loxP con orientación, HSV-tk: herpes simple-timidinkinasa;
- 40 (B) muestra un vector para la recombinación complementaria con una secuencia complementaria unilateral.

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Método para modificar la expresión de una secuencia de ácido nucleico presente de forma endógena en una
5 célula eucariótica, que se **caracteriza** porque

(a) La célula es transfeccionada con un primer vector, que comprende

(i) una secuencia de control de la expresión heterológica y si se diera el caso un gen de amplificación,

(ii) un gen marcador de selección positivo

(iii) al menos dos secuencias objetivo que flanquean las secuencias (i) y(ii) para una recombinasa específica del lugar,

(iv) las secuencias de ADN que flanquean las secuencias (i),(ii) y (iii), que son complementarias a un segmento de ácido nucleico en un genoma de la célula, para permitir una recombinación complementaria,

b) la célula transfeccionada es cultivada en unas condiciones, en las cuales se efectúa una recombinación complementaria del vector, y

c) se consigue la célula obtenida según el apartado (b)

2. Método conforme a la reivindicación 1, que se **caracteriza** porque, se emplean secuencias loxP como secuencias
25 objetivo de recombinasa.

3. Método conforme a una de las reivindicaciones anteriores, que se **caracteriza** porque, el vector comprende además un gen marcador de selección negativo, que está dispuesto por fuera de las secuencias complementarias según la reivindicación 1(a)(iv).

4. Método conforme a una de las reivindicaciones anteriores, que se **caracteriza** porque, la secuencia de ácido nucleico localizada entre las secuencias objetivo de recombinasa se recorta por la activación transitoria de una recombinasa del genoma de la célula, específica del lugar, que reconoce las secuencias objetivo.

5. Vector para la recombinación complementaria, que comprende

(i) una secuencia de control de la expresión heterológica y si fuera preciso un gen de amplificación,

(ii) un gen marcador de selección positivo

(iii) al menos dos secuencias objetivo flanqueando las secuencias (i) y(ii) para una recombinasa específica del lugar,

(iv) las secuencias de ADN que flanquean las secuencias (i), (ii) y (iii) que son complementarias a un segmento de ácido nucleico en un genoma de una célula, para permitir una recombinación complementaria, y

(v) si fuera preciso un gen marcador de selección negativo

6. Procedimiento conforme a una de las reivindicaciones 1 hasta 4, que se **caracteriza** porque

(a) la secuencia de ácido nucleico localizada entre las secuencias objetivo de recombinasa se recorta por la activación transitoria de una recombinasa del genoma de la célula, específica del lugar, que reconoce las secuencias objetivo,

(b) la célula es transfeccionada con otro vector, que comprende

(i) al menos una secuencia elegida de una segunda secuencia de control de la expresión y de un segundo gen de amplificación,

(ii) un gen marcador de selección positivo y

(iii) al menos dos secuencias objetivo de recombinasa que flanquean las secuencias (i) e (ii)

(c) la célula transfeccionada se cultiva en unas condiciones en las cuales se realiza una integración de la secuencia flanqueada por las secuencias objetivo en la secuencia objetivo en un genoma de la célula,

(d) se consigue la célula obtenida según (c)

ES 2 258 809 T3

(e) si fuera preciso se repiten las etapas b hasta d al menos una vez con unas secuencias de control de la expresión variables o/y unos genes de amplificación.

7. Célula eucariótica, preferiblemente célula humana, que se **caracteriza** porque,

(a) contiene una secuencia de control de la expresión heterológica localizada en un cromosoma y si fuera preciso un gen de amplificación en acoplamiento operativo con un gen endógeno y donde

(b) la secuencia localizada en el cromosoma es flanqueada por secuencias objetivo de recombinasa.

Fig. 1

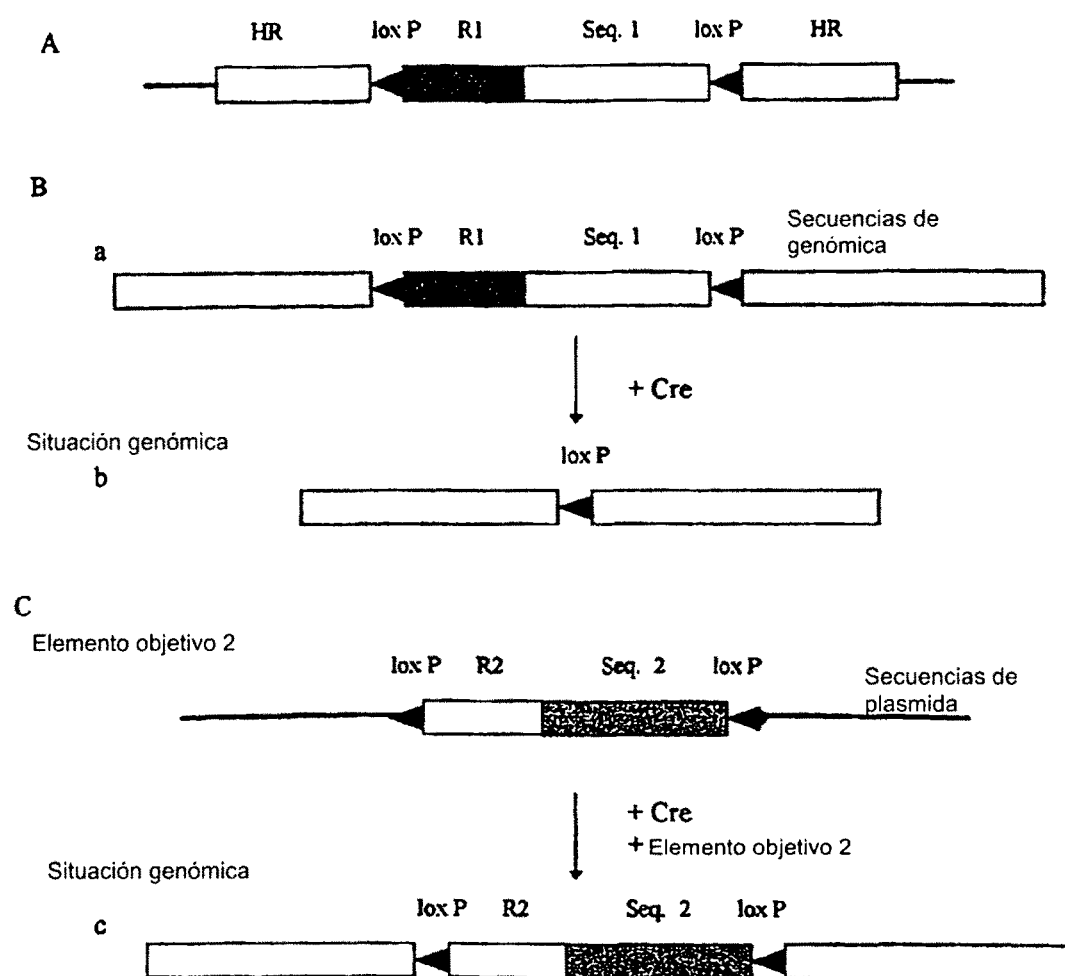
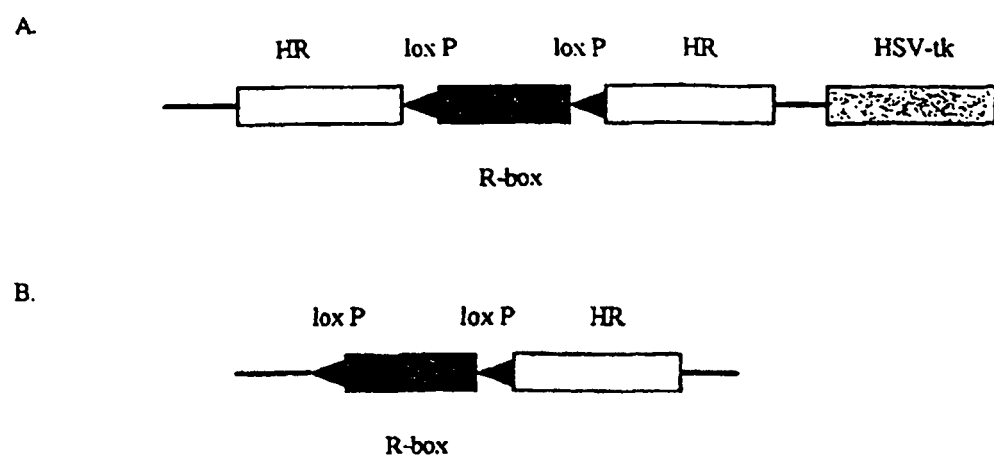


Fig. 2:



ES 2 258 809 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) DATOS GENERALES:

(i) Inscripción:

(a) Nombre: Boehringer Mannheim GMBH

(b) Calle: Sandhofer Strasse 112-132

(c) Lugar: Mannheim

(d) País: Alemania

(e) Código postal: D-68305

(ii) Nombre de la invención: Optimización de células para la activación genética endógena

(iii) Número de secuencias: 3

(iv) Versión legible del ordenador:

(a) Soporte de datos: Floppy Disk

(b) Ordenador: IBM PC compatible

(c) Sistema de funcionamiento: PC-DOS/MS-DOS

(d) Software: PatentIn Release nº1.0, versión 1.30(EPA)

(2) Datos respecto a la sec. ID nº 1:

(i) Características de la secuencia:

(a) Longitud: 53 pares de bases

(b) Tipo: nucleótido

(c) Forma de ramificación: ambas

(d) Topología: lineal

(xi) Descripción de la secuencia: Sec ID nº 1:

CCTCTCCTCT AGGCCCCGTGG GGCTGGCCCT GCACCGCCGA GCTTCCCGGG ATG

(2) Datos respecto a la Sec. ID nº 2:

(j) Características de la secuencia:

(a) Longitud: 43 pares de bases

(b) Tipo: nucleótido

(c) Forma de ramificación: ambas

(d) Topología lineal

(xi) Descripción de la secuencia: Sec ID nº 2:

CTACGTGCTG TCTCACACAG CCTGTCTGAC CTCTCGACCC TAC

(2) Datos respecto a la Sec. ID nº 3:

(k) Características de la secuencia:

(a) Longitud: 34 pares de bases

(b) Tipo: nucleótido

(c) Forma de ramificación: ambas

(d) Topología lineal

(xi) Descripción de la secuencia: Sec ID nº 3:

TATTGAAGCA TATTACATAC GATATGCTTC AATA