



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 098**

51 Int. Cl.:
C12N 15/69 (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01)
C12N 15/74 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06017245 .9**
96 Fecha de presentación : **13.09.1996**
97 Número de publicación de la solicitud: **1724354**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.11.2006**

54 Título: **Molécula de ADN circular con origen de replicación condicional, su procedimiento de preparación y su utilización en terapia génica.**

30 Prioridad: **15.09.1995 FR 95 10825**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.04.2011

73 Titular/es: **AVENTIS PHARMA S.A.**
20, avenue Raymond S.A
92160 Antony, FR

72 Inventor/es: **Crouzet, Joel y**
Soubrier, Fabienne

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 357 098 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

La presente invención se refiere a una nueva molécula de ADN con replicación condicional, utilizable en terapia génica o para la producción de proteínas recombinantes.

5 La terapia génica consiste en corregir una deficiencia o una anomalía introduciendo una información genética en la célula o el órgano afectado. Esta información puede introducirse bien sea in vitro en una célula extraída del órgano y a continuación reinyectada en el organismo, bien sea in vivo, directamente en el tejido considerado. Como se trata de una molécula de elevado peso molecular y de carga negativa, el ADN tiene dificultades para atravesar espontáneamente las membranas celulares fosfolípicas. Diferentes vectores se han pues utilizado a fin de permitir la transferencia del gen: vectores virales por una parte, vectores químicos y/o bioquímicos, naturales o sintéticos, por otra parte.

10 Los vectores virales (retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, son muy eficaces, especialmente para el paso de las membranas, pero presentan un cierto número de riesgos tales como la patogenicidad, la recombinación, la replicación, la inmunogenicidad,...

15 Los vectores químicos y/o bioquímicos permiten evitar estos riesgos (como referencia, véase Behr, 1993, Cotten et Wagner, 1993). Son por ejemplo cationes (fosfato de calcio, DEAE-dextrano ...) que actúan formando precipitados con el ADN, los cuales pueden ser "fagocitados" por las células. Igualmente puede tratarse de liposomas en los cuales el ADN se incorpora y que se fusionan con la membrana plasmática. Los vectores sintéticos de transferencia de genes son generalmente lípidos o polímeros catiónicos que complejan el ADN y forman con él una partícula que lleva cargas positivas en superficie. Como ejemplo ilustrativo de este tipo de vectores, se pueden citar especialmente dioctadecilamidoglicilispermina (DOGS, TransfectamTM) o cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA, Lipof4ectinTM).

20 Sin embargo, la utilización de vectores químicos y/o bioquímicos o de ADN desnudo implica la posibilidad de producir cantidades importantes de ADN de pureza farmacológica. En efecto, en las técnicas de terapia génica, el medicamento está constituido por el mismo ADN y es esencial poder fabricar, en cantidades adaptadas, los ADN que tengan propiedades apropiadas a un uso terapéutico en el hombre.

25 En el caso de la vectorología no viral, son plásmidos de origen bacteriano los que se utilizan. Los plásmidos generalmente utilizados en terapia génica llevan (i) un origen de replicación, (ii) un gen marcador tal como un gen de resistencia a un antibiótico (kanamicina, ampicilina...) y (iii) uno o varios transgenes con secuencias necesarias para su expresión (activador(es), promotor(es), secuencias de poliadenilación...).

Sin embargo, la tecnología actualmente disponible no da entera satisfacción.

30 Por una parte, queda un riesgo de diseminación en el organismo. Así una bacteria presente en el organismo puede, con una baja frecuencia, recibir este plásmido. Esto tiene tantas más probabilidades de pasar cuando se trata de un tratamiento de terapia génica in vivo en el cual el DNA puede diseminarse en el organismo del paciente y puede encontrarse en contacto con bacterias que infecten este paciente o bien bacterias de la flora comensal. Si la bacteria receptora del plásmido es una enterobacteria, tal como E. coli, este plásmido puede replicarse. Tal acontecimiento conduce entonces a la diseminación del gen terapéutico. En la medida en que los genes terapéuticos utilizados en tratamientos de terapia génica pueden codificar por ejemplo una linfoquina, un factor de crecimiento, un antioncogen, o una proteína cuya función falte en el hospedante y permite pues corregir un defecto genético, la diseminación de ciertos de estos genes podría tener efectos imprevisibles y preocupantes (por ejemplo sí una bacteria patógena adquiere el gen de un factor de crecimiento humano).

35 Por otra parte, los plásmidos utilizados generalmente en terapia génica no viral poseen también un marcador de resistencia a un antibiótico (ampicilina, kanamicina...). La bacteria que adquiera tal plásmido tiene pues una ventaja selectiva innegable ya que cualquier tratamiento antibiótico, que utilice un antibiótico de la misma familia que el que selecciona el gen de resistencia del plásmido, va a conducir a la selección del plásmido en cuestión. A esta consideración, la ampicilina forma parte de las β -lactamas que es la familia de antibióticos más utilizada en el mundo. La utilización de marcadores de selección en las bacterias que no sean genes de resistencia a los antibióticos será pues particularmente ventajosa. Evitaría la selección de bacterias que hallan podido recibir un plásmido que lleve tal marcador.

Es pues particularmente importante buscar como limitar al máximo la diseminación de genes terapéuticos y de genes de resistencia.

40 La presente invención tiene precisamente por objetivo proponer nuevas moléculas de ADN, utilizables en terapia génica o para la producción de proteínas recombinantes in vitro, que solo se replican en células que pueden complementar ciertas funciones de estos vectores no virales.

La invención se refiere igualmente a un método particularmente eficaz para la preparación de estas moléculas de ADN.

Las moléculas de ADN reivindicadas tienen como ventaja eliminar los riesgos asociados a una diseminación del plásmido, tales como (1) la replicación y la diseminación, que pueden implicar una sobreexpresión no controlada del gen terapéutico, (2) la diseminación y la expresión de genes de resistencia. La información genética contenida en las moléculas de ADN según la invención comprende en efecto el(los) gen(es) terapéutico(s) y las señales de regulación de su expresión, un origen de replicación condicional funcional que limita muy fuertemente el espectro del hospedante celular de este plásmido, un marcador de selección de tamaño reducido de preferencia diferente del gen que confiere la resistencia a un antibiótico y llegado el caso, un fragmento de ADN que permite la resolución de multímeros de plásmido. La probabilidad de que estas moléculas (y por tanto la información genética que contienen) sean transferidas a un microorganismo, y mantenidas de manera estable, es muy limitada.

Por último los vectores según la invención, igualmente designados miniplásmidos en razón de su estructura circular, de su tamaño reducido y de su forma superenrollada, presentan las ventajas suplementarias siguientes: En razón de su tamaño reducido con relación a los plásmidos derivados de ColE1 clásicamente utilizados, las moléculas de ADN según la invención tienen potencialmente una mejor biodisponibilidad in vivo. En particular, presentan capacidades de penetración y de distribución celulares mejoradas. Así, es reconocido que el coeficiente de difusión en los tejidos es inversamente proporcional al peso molecular (Jain, 1987). Igualmente, a nivel celular, las moléculas de elevado peso molecular tienen una peor permeabilidad a través de la membrana plasmática. Además, para el paso del plásmido al núcleo, indispensable para su expresión, el peso molecular elevado es igualmente un inconveniente, los poros nucleares imponen un límite de tamaño para la difusión hacia el núcleo (Landford et al., 1986). La reducción de tamaño de las partes no terapéuticas de la molécula de ADN (origen de replicación y gen de selección especialmente) según la invención permite igualmente disminuir el tamaño de las moléculas de ADN. La parte que permite la replicación y la selección de este plásmido en la bacteria (1,1 kb) está disminuido por un factor 3, contando por ejemplo 3 kb para el origen de replicación y el marcador de resistencia de la parte del vector. Esta disminución (i) de peso molecular y (ii) de carga negativa, confiere a las moléculas de la invención capacidades mejoradas de difusión y de biodisponibilidad tisulares, celulares y nucleares.

Más precisamente, la presente invención se refiere a una molécula de ADN en forma circular, útil en terapia génica, que comprende al menos una secuencia nucleica de interés, caracterizada porque la región que permite su replicación comprende un origen de replicación cuya funcionalidad en una célula hospedante requiere la presencia de al menos una proteína específica y extraña a dicha célula hospedante.

Esta molécula de ADN puede presentarse en forma mono o doble cadena y ventajosamente posee una forma superenrollada.

En el sentido de la presente invención, las células hospedantes utilizadas pueden ser de diversos orígenes. Puede tratarse de células eucariotas o procariotas. Según un modo de realización privilegiado de la invención, se trata de células procariotas.

Clásicamente, la replicación de los plásmidos bacterianos necesita la presencia de al menos una proteína codificada por el hospedante celular de tipo ARN polimerasa, Rnasa, ADN polimerasa... Por las razones ya expuestas anteriormente, no se puede eximir totalmente, con este tipo de replicación, eventuales riesgos de diseminación en el organismo tratado. Ventajosamente, la funcionalidad del origen de replicación de la molécula de ADN según la invención exige la presencia de una proteína específica y extraña a la célula hospedante. Esta característica tiene por interés reducir el espectro del hospedante del plásmido reivindicado a cepas específicas que expresan esta proteína iniciadora. La molécula de ADN, puesta a punto en el marco de la presente invención, posee pues ventajosamente un origen de replicación llamado condicional.

El origen de replicación condicional utilizado según la presente invención puede provenir de plásmidos o bacteriófagos, que comparten las características siguientes: contienen en su origen de replicación secuencias repetidas, o iterones y codifican al menos una proteína iniciadora de la replicación (Rep) que les es específica. Como ejemplo, se pueden citar los sistemas de replicación condicional de los plásmidos y bacteriófagos siguientes:

plásmido o bacteriófago	proteína iniciadora específica
RK2 (Stalker <u>et al.</u> , 1981)	TtfA
R1 (Ryder <u>et al.</u> , 1981)	RepA
pSC101 (Vockeand Bastia, 1983)	RepA
F (Murotsu <u>et al.</u> , 1981)	proteína E

plásmido o bacteriófago	proteína iniciadora específica
Rts1 (Itoh et al., 1982, 1987)	RepA
RSF1010 (Miao <u>et al.</u> , 1995)	RepC
P1 (Abeles <u>et al.</u> , 1984)	RepA
P4 (Flensburg y Calendar, 1987)	proteína alfa
lambda (Moore <u>et al.</u> , 1981)	proteína O
phi 82 (Moore <u>et al.</u> , 1981)	proteína O de phi 82
phi 80	proteína O de phi 80

Según un modo de realización preferido de la invención, el origen de replicación utilizado en las moléculas de ADN reivindicadas procede de un plásmido natural de *E. coli* llamado R6K.

5 Las funciones de replicación de R6K están reagrupadas en un fragmento de ADN de 5,5 kpb (figura 1) que comprende 3 orígenes de replicación α , β y γ (γ y β aseguran el 90% de la replicación) y un operón que codifica las proteínas iniciadoras de replicación π y la proteína Bis. La información genética mínima necesaria para el mantenimiento de este plásmido con su número de copias característico (15 copias por genoma) está contenida en dos elementos: .400 pdb del ori y el gen pir, cuyo producto es la proteína iniciadora π .

10 El ori γ puede estar dividido en dos partes funcionales : la parte-núcleo y el elemento activador (figura 1). La parte-núcleo, esencial para la replicación contiene los iterones (7 repeticiones directas de 22 pdb) donde se asocia la proteína x representada en SEQ ID N°1, y segmentos contiguos, dianas de proteínas del hospedante (IHF, DnaA).

Según un modo preferido de la invención, el origen de replicación del vector reivindicado está constituido en todo o en parte por este origen de replicación y del plásmido R6k y más preferentemente en todo o en parte por la SEQ ID N°1 o uno de sus derivados.

15 En el sentido de la presente invención, el término derivado designa cualquier secuencia que difiere de la secuencia considerada en razón de una degeneración del código genético, obtenido por una o varias modificaciones de naturaleza genética y/o química, así como cualquier secuencia que hibride con estas secuencias o fragmentos de ellas y cuyo producto posee la actividad indicada con respecto a la proteína iniciadora de la replicación, π . Por "modificación de naturaleza genética y/o química" se puede entender cualquier mutación, sustitución, delección, adición y/o modificación de uno o varios restos. El término derivado comprende igualmente las secuencias homólogas a la secuencia considerada, procedentes de otras fuentes celulares y principalmente de células de origen humano o de otros organismos, y que poseen una actividad del mismo tipo. Dichas secuencias homólogas se pueden obtener mediante experimentos de hibridación. Las hibridaciones pueden realizarse a partir de bancos de ácidos nucleicos, utilizando como sonda la secuencia nativa o un fragmento de esta, en condiciones de astringencia convencionales (Maniatis et al., Cf técnicas generales de biología molecular), o, de preferencia, en condiciones de astringencia elevadas.

25 El origen de replicación descrito anteriormente que presenta la ventaja de ser de tamaño muy limitado, es funcional únicamente en presencia de una proteína iniciadora específica, la proteína Pi, producto del gen pir (SEQ ID N°2). Al poder esta proteína actuar en trans, es posible disociar físicamente el ori gamma del gen pir, que podrá ser introducido en el genoma de la célula elegida como hospedante específico de estos plásmidos. Mutaciones en π pueden alterar sus funciones inhibitorias (Inuzuka et Wada, 1985) e implicar un aumento del número de copias de los derivados de R6K, hasta más de 10 veces el número de copias inicial. Estas sustituciones están todas incluidas en un dominio de 40 aminoácidos, que parece pues responsable del control por π del número de copias plasmídicas (figura 2).

30 Según un modo de realización ventajoso de la presente invención, la proteína π , expresada en la célula hospedante, resulta de la expresión del gen representado en SEQ ID N°2 o uno de sus derivados tales como están definidos anteriormente y más particularmente del gen pir 116 que comprende una mutación con relación al gen pir. Esta mutación corresponde a la sustitución de una prolina con una leucina. En este contexto, el número de copias de los derivados de R6K es del orden de 250 copias por genoma.

En las bacterias que portan mutaciones en el gen pir, la mutación pir-116 era ya conocida (Metcalf et al GENE, vol. 138, 1994, páginas 1-7 ; Pofsai et al NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 22, no. 12, 1994, páginas 2392-2398 ; Inuzika et al FEBS LETTERS, vol. 228, no. 1, páginas 7-11).

Además de un origen de replicación condicional tal como está definido anteriormente, las moléculas de ADN reivindicadas contienen una región que comprende uno (o varios) gen(es) que permiten asegurar la selección de la molécula de ADN en el hospedante elegido.

5 Puede tratarse de un marcador clásico de tipo gen que confiere una resistencia a un antibiótico, tales como kanamicina, ampicilina, cloranfenicol, estreptomycinina, espectinomycinina, lividomicina u otros.

Sin embargo, según un modo de realización privilegiado de la invención, esta región es diferente de un gen que confiere una resistencia a un antibiótico. Así puede tratarse de un gen cuyo producto es indispensable para la viabilidad del hospedante considerado, en condiciones de cultivos definidos. Puede ser por ejemplo:

- 10
- un gen que codifica un ARNt supresor, de origen natural o sintético. Se trata más preferentemente de un ARNt de codón ámbar (TAG)
 - un gen cuyo producto es necesario para el metabolismo de la célula, en ciertas condiciones de cultivo: gen que interviene en la biosíntesis de un metabolito (aminoácido, vitamina...), gen de catabolismo que permite asimilar una sustancia presente en el medio de cultivo (fuente de nitrógeno o de carbono particulares)...

15 Según un modo privilegiado de la invención, esta región contiene una casete de expresión de un gen que codifica un ARNt supresor de codones específicos. Este puede elegirse especialmente entre los que codifican las bases Fenilalanina, Cisteína, Prolina, Alanina e Histidina. Se trata más preferentemente de un ARNt supresor de codones ámbar (TAG).

20 En este caso particular, el sistema utilizado para seleccionar, en los hospedantes celulares, las moléculas de ADN objeto de la presente invención incluyen dos elementos: 1) en la molécula de ADN, un gen que codifica un ARN de transferencia supresor del codón ámbar (TAG) que constituye el marcador de selección, llamado gen (sup) y 2) un hospedante específico en el cual uno de los genes, esencial en ciertas condiciones de cultivo, contiene un codón ámbar TAG. Esta célula podrá crecer, en las condiciones de cultivo para las cuales el producto del gen que contiene el codón TAG es esencial, únicamente si el plásmido que permite la expresión de sup está presente en la célula. Las condiciones de cultivo constituyen pues la presión de selección de la molécula de ADN. Los genes sup utilizados pueden ser de origen natural (Glass et al., 1982) o provenir de construcción sintética (Normanly et al., 1986; Kleina et al., 1990).

25 Tal sistema ofrece una gran flexibilidad en la medida en que, siguiendo el gen que incluye una mutación ámbar, es posible determinar diferentes medios selectivos. En la bacteria *Lactococcus lactis*, por ejemplo, el codón ámbar está localizado en un gen de biosíntesis de purinas. Esto permite la selección del plásmido portador del gen que codifica el ARNt supresor cuando las bacterias se multiplican en la leche. Tal marcador tiene la ventaja de ser de tamaño muy reducido y de no contener secuencias "extrañas", que provengan de fagos o de transposones.

30 Según un modo de realización particular de la invención, la molécula de ADN comprende además un fragmento de ADN, diana de recombinasas específicas del sitio, que permite la resolución de múltiplos de plásmidos.

35 Así, tal fragmento, introducido en una molécula de ADN circular y cuyo origen de replicación es por ejemplo ori gamma permite resolver los múltiplos de tal plásmido. Tales múltiplos son especialmente observados cuando la molécula de ADN se prepara en una cepa que lleva un alelo mutado de pir que permite aumentar el número de copias de los derivados de R6K, como pir-116.

40 Esta recombinación puede realizarse gracias a diversos sistemas que implican la recombinación específica del sitio entre secuencias. Más preferentemente, la recombinación específica del sitio de la invención se obtiene por medio de secuencias de recombinación intramolecular específica que son capaces de recombinar entre ellas en presencia de proteínas específicas, generalmente designada recombinasa. En este caso preciso, se trata de las recombinasas XerC y XerD. Por esta razón, las moléculas de ADN según la invención comprenden generalmente además una secuencia que permite esta recombinación específica del sitio. El sistema de recombinación específica presente en las construcciones genéticas según la invención (recombinasas y sitio de reconocimiento específico) puede ser de diferentes orígenes. En particular, las secuencias específicas y las recombinasas utilizadas pueden pertenecer a diferentes clases estructurales, y especialmente a la familia resolvasa del transposón Tn3 ó a la familia de la integrasa del bacteriófago lambda. Entre las recombinasas que pertenecen a la familia del transposón Tn3, se pueden citar especialmente la resolvasa del transposón Tn3 ó de los transposones, Tn21 y Tn522 (Stark et al., 1992); la invertasa Gin del bacteriófago mu o también las resolvasas de plásmidos, tal como la del fragmento par de RP4 (Abert et al., Mol. Microbiol. 12 (1994) 131). Entre las recombinasas que pertenecen a la familia de la integrasa del bacteriófago λ , se pueden citar especialmente integrasa de los fagos lambda (Landy et al., Science 197 (1997) 1147), P22 y ϕ 80 (Leong et al., J. Biol. Chem. 260 (1985) 4468), HP1 de *Haemophilus influenzae* (Hauser et al., J. Biol. Chem. 267 (1992) 6859), integrasa Cre del fago P1, integrasa del plásmido pSAM2 (EP 350341) o también FLP recombinasa del plásmido 2μ y recombinasas XerC y XerD de *E. coli*.

55 Preferentemente, las moléculas de ADN objeto de la presente invención contienen el fragmento cer del plásmido natural de *E. coli* ColE1. El fragmento cer utilizado es un fragmento Hpall de 382 pb de ColE1 el cual ha mostrado que permitía, en cis, la resolución de múltiplos de plásmidos (Summers et al., 1984; Leung et al., 1985). También es

posible utilizar un fragmento HpaI-TaqI de tamaño más reducido (280 pb) o un fragmento más pequeño (alrededor de 220 pb), comprendido en el fragmento HpaI, y que posee las mismas propiedades (Summers y Sherratt, 1988). Esta resolución pasa por una recombinación intramolecular específica, que hace intervenir cuatro proteínas codificadas por el genoma de *E. coli*: ArgR, PepA, XerC et XerD (Stirling *et al.*, 1988,1989 ; Colloms *et al.*, 1990 ; Blakely *et al.*, 1993)

5 A esta consideración, es particularmente ventajoso utilizar todo o parte del fragmento *cer* de ColE1 o de uno de sus derivados tales como están definidos anteriormente.

10 Según una variante de puesta en práctica, las moléculas de ADN de la invención pueden comprender además una secuencia capaz de interactuar específicamente con un ligando. De manera preferencial, se trata de una secuencia capaz de formar, por hibridación, una triple-hélice con un oligonucleótido específico. Esta secuencia permite así purificar las moléculas de la invención por hibridación selectiva con un oligonucleótido complementario inmovilizado en un soporte (véase la solicitud WO 96/18744). La secuencia puede posicionarse en cualquier sitio de la molécula de ADN de la invención, siempre y cuando no afecte la funcionalidad del gen de interés y del origen de replicación.

15 Como molécula de ADN representativa de la presente invención, se puede muy particularmente reivindicar el plásmido pXL2774 y sus derivados. En el sentido de la invención se entiende por derivado cualquier construcción que derive del pXL2774 y que incluya uno o varios genes de interés distintos del gen luciferasa. Se pueden citar igualmente los plásmidos pXL3029 y 3030 que incluyen una casete de expresión de un gen terapéutico y una secuencia capaz de interactuar específicamente con un ligando.

La presente invención se refiere igualmente a la puesta a punto de un procedimiento, de construcciones de hospedantes celulares específicas, particularmente eficaces para la producción de estas moléculas de ADN terapéuticas.

20 Otro objetivo de la presente invención se refiere a un procedimiento de producción de molécula de ADN circular caracterizado porque se cultiva una célula hospedante que contiene al menos una molécula de ADN tal como está definida anteriormente y una proteína, expresada in situ o no, que condiciona la funcionalidad del origen de replicación de dicha molécula de ADN, específica y extraña a dicha célula hospedante, en condiciones que permiten la selección de células hospedantes transformadas por dichas moléculas de ADN.

25 Más preferentemente, la proteína que condiciona la funcionalidad del origen de replicación de la molécula de ADN está expresada in situ a partir de un gen correspondiente. El gen que codifica la proteína iniciadora de la replicación puede llevar un replicón anexo, compatible con los derivados del origen de replicación condicional utilizado o bien introducido en el genoma de la célula-hospedante por recombinación, gracias a un transposón, un bacteriófago o cualquier otro vector. En el caso particular de que el gen que expresa la proteína esté colocado en un replicón anexo, este último contiene igualmente una región promotora de la transcripción funcional en la célula, así como una región situada en 3', y que especifica una señal de fin transcripcional. En lo que se refiere a la región promotora, puede tratarse de una región promotora naturalmente responsable de la expresión del gen considerado cuando este es susceptible de funcionar en la célula. Puede igualmente tratarse de zonas de origen diferente (responsables de la expresión de otras proteínas, o incluso sintéticas). Especialmente, puede tratarse de secuencias promotoras de genes procariontes o bacteriófagos. Por ejemplo, puede tratarse de secuencias promotoras procedentes del genoma de la célula.

Como genes que codifican la proteína iniciadora de la replicación, podrían ser utilizados bien sea genes salvajes, bien sea alelos mutados que permiten obtener un número de copias aumentado de plásmidos (o derivados) específicos de la proteína iniciadora que condiciona la funcionalidad del origen de replicación utilizado en la molécula de ADN.

40 Tales mutantes han sido descritos especialmente para los plásmidos R6K (Inuzuka and Wada, 1985 ; Greener *et al.*, 1990), Rts1 (Terawaki and Itoh, 1985 ; Terawaki *et al.*, 1990 ; Zeng *et al.*, 1990), F (Seelke *et al.*, 1982 ; Hellsberg *et al.*, 1985 ; Kawasaki *et al.*, 1991), RK2 (Durland *et al.*, 1990 ; Haugan *et al.*, 1992, 1995), pSC101 (Xia *et al.*, 1991 ; Goebel *et al.*, 1991 ; Fang *et al.*, 1993).

45 En el caso particular de que la molécula de DNA utilizada posea un origen de replicación que derive del plásmido R6K, la proteína iniciadora es o deriva de la proteína π de este mismo plásmido. Es particularmente ventajoso expresar una forma mutada de esta proteína capaz de aumentar especialmente el número de copias iniciales. Para eso, el gen integrado a nivel de la célula hospedante está de preferencia representado por todo o parte de la secuencia representada en SEQ ID N°2 o uno de sus derivados y más preferentemente por el gen *pir116*. La mutación asociada, corresponde a la sustitución de una prolina con una leucina. Según un modo de realización particular de la invención, este gen *pir116* es directamente incorporado en el genoma de la célula hospedante.

50 Ventajosamente, uno de los genes del hospedante celular específico, indispensable en las condiciones de cultivo elegidas contiene un codón específico, reconocible por el ARNt supresor seleccionado a nivel de la molécula de ADN. Según un modo privilegiado de la invención, se trata de un codón ámbar TAG. En este caso particular, la célula podrá crecer, en las condiciones de cultivo para las cuales el producto del gen que contiene el codón TAG es esencial, únicamente si el plásmido que permite la expresión de *sup* está presente en la célula hospedante. Las condiciones de cultivo constituyen pues la presión de selección de la molécula de ADN.

- De preferencia, el gen que incluye el codón ámbar es un gen que interviene en la biosíntesis de un aminoácido, la arginina. Este gen, *argE*, codifica una N-acetilornitinasasa (Meinzel et al., 1992) e incluye en este caso un codón TAG que corresponde a una mutación puntual Gln-53 (CAG) -> TAG; la presión de selección del plásmido que lleva el gen sup está entonces asegurada por cultivo en medio mínimo M9 (Maniatis et al., 1989) Sin embargo este podría ser también, por ejemplo, un gen de biosíntesis de una vitamina, de una base nucleica o bien un gen que permita utilizar una fuente de carbono o de nitrógeno particular o cualquier otro gen cuya funcionalidad sea indispensable para la viabilidad celular en las condiciones de cultivo elegidas.
- La célula hospedante se elige de preferencia entre las cepas *E. coli* y re-presentada más preferentemente por la cepa *E. coli* XAC-1.
- Según un modo de realización particular de la invención, la célula hospedante utilizada en el procedimiento reivindicado es una célula de la cepa *E. coli* XAC-1, que comprende en su genoma el gen *pir116* y transformada por el plásmido pXL2774 o uno de sus derivados.
- Según una variante ventajosa de la invención, la célula hospedante utilizada en el procedimiento reivindicado es una célula procariota en la cual el gen *endA1* o un gen homólogo se inactiva. El gen *endA* codifica la endonucleasa I de *E. coli*. Esta enzima periplásmica posee una actividad de corte no específico del ADN doble cadena (Lehman, I.R., G. G. Roussos y E. A. Pratt (1962) *J. Biol. Chem.* 237:819-828 ; Wright M. (1971) *J. Bacteriol.* 107:87-94). Un estudio realizado sobre diferentes cepas de *Escherichia coli* (salvaje o *endA*) ha mostrado que la degradación del ADN plasmídico incubado en los extractos de estas cepas bacterianas existía en las cepas *endA+* pero no en los mutantes *endA* (Wnendt S. (1994) *BioTechniques* 17: 270-272). La calidad del ADN plasmídico aislado de cepas *endA+* o de mutantes *endA* ha sido estudiada por la sociedad Promega utilizando su sistema de purificación (Shoenfeld, T., J. Mendez, D. Storts, E. Portman, B.†Patterson, J. Frederiksen y C. Smith. 1995. Effects of bacterial strains carrying the *endA1* genotype on DNA quality isolated with Wizard plasmid purification systems. Promega notes 53). Su conclusión es la siguiente: la calidad del ADN preparado a partir de mutantes *endA* es globalmente mejor que la del ADN preparado en las cepas *endA+* ensayadas.
- La calidad de las preparaciones de ADN plasmídico está pues afectada por cualquier contaminación por esta endonucleasa (degradación del ADN a más o menos largo plazo).
- La delección o la mutación del gen *endA* puede considerarse sin problema en la medida en que los mutantes que ya no presentan esta actividad endonucleasa se comportan globalmente como las bacterias salvajes (Dürwald, H. And H. Hoffmann-Berling (1968) *J. Mol. Biol.* 34: 331-346).
- El gen *endA1* puede ser inactivado por mutación, delección total o parcial, ruptura, etc. La inactivación del gen *endA* de la cepa de *E. coli* elegida para producir los plásmidos pCOR puede más particularmente realizarse transfiriendo, gracias al bacteriófago P1, la delección $\Delta endA::TcR$ descrita por Cherepanov y Wackernagel (Cherepanov, P P. y W. Wackernagel. 1995. Gene disruption in *Escherichia coli* : TcR and KmR cassettes with the option of F1p-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* 158:9-14) o en intercambio de alelo salvaje presente en el genoma de la bacteria de interés con un alelo mutado o suprimido de *endA* y esto por recombinación homóloga. La utilización de este tipo de cepa en el marco de la presente invención permite ventajosamente mejorar la calidad del ADN producido.
- La invención se refiere igualmente a cualquier célula recombinante que contenga una molécula de ADN tal como está definida anteriormente. Puede tratarse de célula de orígenes diversos, de tipo eucariótico, procariótico...
- Estas células se obtienen por cualquier técnica conocida por el experto que permita la introducción de dicho plásmido en una célula dada. Puede tratarse especialmente de transformación, electroporación, conjugación, fusión de protoplastos o cualquier otra técnica conocida por el experto
- Las moléculas de ADN según la invención pueden utilizarse en cualquier aplicación de vacunación o de terapia génica y celular, para la transferencia de un gen a un organismo, un tejido o una célula dada, o para la producción de proteínas recombinantes *in vitro*.
- En particular, pueden utilizarse para una administración directa *in vivo*, o para la modificación de células *in vitro* o *ex vivo*, en vista de su implantación a un paciente.
- A esta consideración, otro objetivo de la presente invención se refiere a cualquier composición farmacéutica que comprenda al menos una molécula de ADN tal como está definida anteriormente. Esta molécula puede estar o no asociada a un vector químico y/o bioquímico de transfección. Puede tratarse especialmente de cationes (fosfato de calcio, DEAE-dextrano,...), de liposomas. Los vectores sintéticos asociados pueden ser lípidos o polímeros catiónicos. Se pueden citar como ejemplos de tales vectores DOGS (TransfectamTM) o DOTMA (lipofectinTM).
- Las composiciones farmacéuticas según la invención pueden formularse en vista a administraciones por vía tópica, oral, parenteral, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraocular, transdérmica, etc. De preferencia, el plásmido reivindicado se utiliza bajo una forma inyectable o en aplicación. Puede mezclarse con cualquier vehículo farmacéuticamente aceptable para una formulación inyectable, especialmente para una inyección directa a nivel del sitio

a tratar. Puede tratarse en particular de soluciones estériles, isotónicas, o de composiciones secas, principalmente liofilizadas, que, por adición según el caso de agua esterilizada o de suero fisiológico, permiten la constitución de solutos inyectables. Puede tratarse especialmente de tampones Tris o PBS diluidos en glucosa o cloruro de sodio. Una inyección directa en la región afectada del paciente es interesante ya que permite concentrar el efecto terapéutico a nivel de los tejidos afectados. Las dosis utilizadas pueden adaptarse en función de distintos parámetros, y especialmente en función del gen, del vector, del modo de administración utilizado, de la patología referida o también de la duración del tratamiento buscado.

Las moléculas de ADN de la invención pueden incluir uno o varios genes de interés, es decir uno o varios ácidos nucleicos (ADNc, ADNg, ADN sintético o semi-sintético, etc) cuya transcripción y eventualmente traducción en la célula diana generen productos que tengan un interés terapéutico, vacunal, agronómico o veterinario.

Entre los genes de interés terapéutico, se pueden citar más particularmente los genes que codifican enzimas, derivados sanguíneos, hormonas, linfoquinas: interleuquinas, interferones, TNF, etc (FR 9203120), factores de crecimiento, neurotransmisores o sus precursores o enzimas de síntesis, factores tróficos : BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, NT3, NT5, etc; apolipoproteínas: ApoAI, ApoAIV, ApoE, etc (FR 9305125), distrofina o una minidistrofina (FR 9111947), genes supresores de tumores: p53, Rb, Rap1A, DCC, k-rev, etc (FR 93 04745), genes que codifican factores implicados en la coagulación : Factores VII, VIII, IX, etc, genes suicidas: Timidina quinasa, citosina desaminasa, etc; o también todo o parte de una inmunoglobulina natural o artificial (Fab, ScFv, etc), un ARN ligando (WO 91/19813) etc. El gen terapéutico puede ser igualmente un gen o una secuencia antisentido, cuya expresión en la célula diana permite controlar la expresión de genes o la transcripción de ARNm celulares. Dichas secuencias pueden, por ejemplo, transcribirse en la célula diana en ARN complementarios de ARNm celulares y bloquear de esta manera su traducción en proteínas, según la técnica descrita en la patente EP 140 308.

El gen de interés puede ser también un gen vacunal, es decir un gen que codifica un péptido antigénico, capaz de generar en el hombre o el animal una respuesta inmunitaria, con vistas a la realización de vacunas. Puede tratarse principalmente de péptidos antigénicos específicos del virus de epstein barr, virus HIV, virus de la hepatitis B (EP 185 573), virus de la pseudo-rabia o también específicos de tumores (EP 259 212).

Generalmente, en las moléculas de ADN de la invención, el gen de interés terapéutico, vacunal, agronómico o veterinario contiene igualmente una región promotora de la transcripción funcional en la célula o el organismo diana, así como una región situada en 3', y que especifica una señal de fin transcripcional y un sitio de poliadenilación. En cuanto a la región promotora, puede tratarse de una región promotora naturalmente responsable de la expresión del gen considerado cuando este es susceptible de funcionar en la célula o el organismo referidos. Puede igualmente tratarse de zonas de origen diferente (responsables de la expresión de otras proteínas, o incluso sintéticas). Principalmente, puede tratarse de secuencias promotoras de genes eucariotas o virales. Por ejemplo, puede tratarse de secuencias activadoras surgidas del genoma de la célula diana. Entre los promotores eucariotas, se puede utilizar cualquier promotor o secuencia derivada que estimule o reprima la transcripción de un gen de forma específica o no, inductible o no, fuerte o débil. Puede tratarse en particular de promotores ubicuitarios (promotor de los genes HPRT, PGK, α -actina, tubulina, etc), promotores de los filamentos intermedios (promotor de los genes GFAP, desmina, vimentina, neurofilamentos, queratina, etc), promotores de genes terapéuticos (por ejemplo el promotor de los genes MDR, CFTR, Factor VIII, ApoAI, etc), promotores específicos de tejidos (promotor del gen piruvato-quinasa, vilina, proteína intestinal de enlace de los ácidos grasos, α -actina del músculo liso, etc) o también promotores que responden a un estímulo (receptor de las hormonas esteroides, receptor del ácido retinoico, etc) Incluso, puede tratarse de secuencias activadoras surgidas del genoma de un virus, tal como por ejemplo los activadores de los genes E1A y MLP de adenovirus, el activador precoz del CMV, o incluso el activador del LTR del RSV, etc. Además, estas zonas activadoras pueden ser modificadas por adición de secuencias de activación, de regulación, o que permitan una expresión específica para el tejido o mayoritaria.

Por otra parte, el gen de interés puede incluir igualmente una secuencia señal que dirija el producto sintetizado a las vías de secreción de la célula diana. Esta secuencia señal puede ser la secuencia señal natural del producto sintetizado, pero igualmente puede tratarse de cualquier otra secuencia señal funcional, o de una secuencia señal artificial.

Según el gen de interés, las moléculas de ADN de la invención pueden utilizarse para el tratamiento o la prevención de numerosas patologías, que incluyen enfermedades genéticas (distrofia, fibrosis cística, etc), enfermedades neurodegenerativas (alzheimer, parkinson, ALS, etc), cánceres, patologías asociadas a desórdenes de la coagulación o a dislipoproteinemias, patologías asociadas a infecciones virales (hepatitis, SIDA, etc), o en los campos agronómico y veterinario, etc.

Por otra parte, la presente invención se refiere igualmente a la utilización de moléculas de ADN con replicación condicional para la producción de proteínas recombinantes. Las bacterias pueden utilizarse para producir proteínas de orígenes diversos, eucariotas o procariotas. Entre las bacterias, E. coli constituye el organismo de elección para la expresión de genes heterólogos en razón de su fácil manipulación, del número importante de sistemas de expresión disponibles y de las cantidades importantes de proteínas que se pueden obtener. Se entiende que el sistema de la invención es utilizable en otros organismos, estando determinado el tropismo por la naturaleza del origen de replicación, como está indicado anteriormente. Para esta utilización, la secuencia nucleica de interés comprende una región

5 codificante bajo el control de señales de expresión apropiadas al hospedante elegido, en particular un hospedante procariota. Puede tratarse por ejemplo de los promotores Plac, Ptrp, PT7, Ptrc, Ptac, PL, PR, secuencia Shine-Dalgamo, etc. (este conjunto constituye la casete de expresión). La secuencia de ácido nucleico de interés puede ser cualquier secuencia que codifica una proteína que presente un interés en los campos de la farmacia, de la agroalimentación, de la química o de la agroquímica. Puede tratarse de un gen de estructura, de una secuencia de ADN complementaria, de una secuencia sintética o semisintética, etc.

10 La casete de expresión puede introducirse en el vector con replicación condicional objeto de la invención, que constituye así un vector con replicación condicional que permite la expresión de proteínas de interés en E. Coli. Este vector presenta varias ventajas: no utilización de antibiótico para seleccionar en la bacteria (menor coste, no necesidad de estudio en cuanto a la presencia en el producto final de antibiótico o de productos derivados potencialmente tóxicos), probabilidad prácticamente nula de diseminación del plásmido en la naturaleza (origen de replicación condicional), fermentación posible en medio totalmente definido. Los ejemplos presentados muestran las propiedades ventajosas de estos vectores condicionales para la producción de proteínas recombinantes.

15 La presente invención se describirá más completamente mediante los ejemplos siguientes, que se deben considerar como ilustrativos y no limitativos.

Legenda de las Figuras :

Figura 1: Organización funcional de la región de R6K implicada en la replicación..

Figura 2: Organización de los campos funcionales de la proteína π del plásmido R6K.

Figura 3: Representación del protocolo de introducción del gen pir en el genoma de E. coli XAC1.

20 Figura 4: Esquema de construcción de los vectores pXL2666, 2730 y 2754.

Figura 5: Construcción del pXL2774.

Figura 6: Cinética de crecimiento y de producción en fermentador de 2 L.

Figura 7: Cinética de crecimiento y de producción en fermentador de 800 L.

Figura 8: Construcción del pXL3056.

25 Figura 9: Visualización de la proteína aFGF producida por E. coli XAC-1pir-116 (pXL3056+PT7pol23) después de inducción. Los extractos celulares totales desnaturalizados se depositan en gel de poliacrilamida 12,5 %-SDS. M: marcador de masa molecular (Biorad, Low range). Cada banda está identificada por una flecha y una cifra que indica su masa en kDaltons. 1: XAC-1pir-116 (pXL3056+pUC4K) no inducido; 2: XAC-1pir-116 (pXL3056+pUC4K) inducido a 42°C; 3: XAC-1pir-116 (pXL3056+PT7pol23) clon 1, no inducido; 4: XAC-1pir-116 (pXL3056+PT7pol23) clon 1, inducido a 42°C; 5: XAC-1pir-116 (pXL3056+PT7pol23) clon 2, no inducido; 6: XAC-1pir-116 (pXL3056+PT7pol23) clon 2, inducido a 42°C; T1 : 1 μ g de aFGF purificado; t4: 4 μ g de aFGF purificado.

30 Figura 10: Esquema de construcción de los vectores pXL3029 y pXL3030.

I - MATERIALES Y MÉTODOS

35 A) Materiales

1) Medio de cultivo

Se han utilizado los medios completos LB, 2XTY y SOC, el medio mínimo M9 (Maniatis et al., 1989). Los medios gelosos se han obtenido por adición de 15 g de agar Difco. Además, si es necesario, estos medios se suplementan con antibióticos, ampicilina o kanamicina, a las concentraciones respectivas de 100 mg/l y de 50 mg/l. Los sustratos cromógenos X-Gal y X-Gluc se han utilizado a la concentración de 40 mg/l.

2) Cepas de E. coli, plásmidos y bacteriófagos

Las cepas de E. coli, los plásmidos y los bacteriófagos utilizados se han identificado respectivamente en los ejemplos a continuación.

B) Métodos

1) Manipulación del ADN

5 El aislamiento de ADN bacteriano (plasmídico, genómico) y fágico (forma replicativa de M13), las digestiones por las endonucleasas de restricción, las uniones de fragmentos de ADN, la electroforesis en gel de agarosa (en tampón TBE) y otras técnicas estándares se han realizado siguiendo las recomendaciones de los proveedores, para la utilización de enzimas, o de conformidad con los protocolos descritos en "Molecular Cloning: a Laboratory Manual" (Maniatis et al., 1989).

10 Los marcadores de tamaño de ADN utilizados durante las electroforesis son los siguientes: escala 1kpb (BRL) para los fragmentos lineales y el marcador de ADN superenrollado (Stratagène) para los plásmidos no digeridos

La secuenciación se realizó según la técnica de Sanger (Sanger et al., 1977) adaptada al método automatizado que utiliza dideoxinucleótidos fluorescentes y la Taq ADN polimerasa (PRISM Ready Reaction DyeDideoxy Terminator Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems).

15 Los oligodesoxinucleótidos utilizados (designados por "seq+nº", véase a continuación) han sido sintetizados en el sintetizador "Applied Biosystems 394 DNA/RNA Synthesizer" por el método de las fosforamiditas, utilizando grupos protectores β-cianoetilos (Sinha et al., 1984). Después de la síntesis, los grupos protectores se eliminan por tratamiento con amoníaco. Dos precipitaciones con butanol permiten purificar y concentrar el oligonucleótido (Sawadogo et al., 1991).

20 Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación por PCR:

SEQ ID Nº3	5'-GACCAGTATTAITATCTTAATGAG-3'
SEQ ID Nº4	5'-GTATTTAATGAAACCGTACCTCCC-3'
SEQ ID Nº 5:	5'-CTCTTTTAATTGTCGATAAGCAAG-3'
SEQ ID Nº 6:	5'-GCGACGTCACCGAGGCTGTAGCCG-3'

Las reacciones de PCR (Saiki et al., 1985) se realizaron en las condiciones siguientes, en un volumen total de 100 µl. La mezcla reaccionante comprende 150 ng de ADN genómico de la cepa a estudiar, 1 µg de cada uno de los 2 oligonucleótidos-iniciadores (24-mer), 10 µl de tampón 10XPCR, cuya composición es la siguiente "500 mM KCl, 0,1% de gelatina, 20 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl pH 7,5", y 2,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Amplitaq Perkin-Elmer).

25 Las condiciones de PCR, en el aparato Perkin-Elmer Cetus DNA Thermal Cycler, son las siguientes: 2 minutos a 91°C, 30 ciclos sucesivos de desnaturalización (1 min a 91°C), de hibridación (2 min. a 42°C) y de elongación (3 min a 72°C), y por último 5 min a 72°C. Los productos así obtenidos, digeridos o no por una enzima de restricción, se analizaron por electroforesis en gel de agarosa. El análisis de diferentes especies plasmídicas para las ADN topo-isomerasas se realizó según el protocolo siguiente: Las enzimas, purificadas en su laboratorio, se incubaron durante 1 hora a 37°C. Las mezclas reaccionantes (volumen total: 40 µl) tienen la composición siguiente : 150 ng de plásmido, 300 ng de ADN topo-isomerasa I, ó 150 ng de ADN girasa de E. coli, ó 160 ng de ADN topo-isomerasa IV de S. aureus y 20 µl de tampón específico de cada enzima. La composición de estos tampones está indicada a continuación:

para la ADN topo-isomerasa I : 50 mM Tris-HCl pH 7,7, 40 mM KCl,

1 mM DTT, 100 µg/ml SAB, 3 mM MgCl₂, 1 mM EDTA;

35 para la ADN topo-isomerasa IV : 60 mM Tris-HCl pH 7,7, 6 mM MgCl₂,

10 mM DTT, 100 µg/ml SAB, 1,5 mM ATP,

350 mM glutamato de potasio;

para la ADN girasa: 50 mM Tris-HCl pH 7,7, 5 mM MgCl₂,

1,5 mM ATP, 5 mM DTT, 100 µg/ml SAB, 20 mM KCl.

2) Transformación de *E. coli*

Se realizó en rutina según el método TSB (Transformation and Storage Buffer) descrito por Chung et Miller (1998). Para una cepa como TG1 (Gibson et al. 1984), la eficacia de transformación obtenida fue del orden de 10⁵–10⁶ transformantes por µg de pUC4K (Vieira et Messing; 1982). Cuando fue necesaria una eficacia de transformación más elevada, las bacterias se transformaron por electroporación según el protocolo preconizado por el fabricante del electroporador (Biorad). Este método permite alcanzar eficacias de 10⁸ a 10¹⁰ transformantes por µg de pUC4K.

3) Transfección celular mediada por un lipofectante catiónico

Las células utilizadas fueron fibroblastos murinos NIH 3T3, sembradas el día anterior en placas de 24 pocillos, con una densidad de 50000 células por pocillo. El medio de cultivo utilizado fue el medio DMEM, que contiene 4,5 g/l de glucosa, completado con 10% de suero de ternera fetal y 1% de disoluciones de glutamina 200 mM y de antibióticos (estreptomicina 5.103 u/ml, penicilina 5.103 µg/ml) (Gibco). El ADN plasmídico (1 µg en 25 µl de NaCl 9 ‰) se mezcló, volumen a volumen, con una suspensión de lipofectante. Se ensayaron cuatro relaciones "cargas del lipofectante/cargas del ADN" : 0, 3, 6 y 9. Estas relaciones se calcularon considerando que 1 µg de ADN plasmídico lleva 3,1 nmoles de cargas negativas y que el lipofectante incluye 3 cargas positivas por molécula. Después de un contacto de 10 minutos que permite la formación del complejo ADN/lípido, 50 µl de mezcla ADN-lipofectante se introdujeron en las células en medio de cultivo sin suero (500 µl). Las células se aclararon previamente 2 veces con este mismo medio. La inhibición de la transfección por el suero se evitó así. Después de incubación (2 horas a 37 °C en incubador con CO₂), se adicionó al medio 10 % de suero de ternera fetal. A continuación las células se pusieron a incubar durante 24 horas.

4) Medida de la actividad luciferasa de células eucariotas

Se efectuó 24 horas después de la transfección. La luciferasa cataliza la oxidación de la luciferina, en presencia de ATP, de Mg²⁺ y de O₂, con producción concomitante de un fotón. La emisión total de luz, medida con un luminómetro, es proporcional a la actividad luciferasa de la muestra. Los reactivos utilizados están suministrados por Promega (Luciferase assay system) y utilizados según el protocolo aconsejado. Después de la lisis de las células, la fracción insoluble de cada extracto se eliminó por centrifugación. La determinación se efectuó en 5 µl de sobrenadante, diluido o no en el tampón de lisis de las células.

5) Medida de la concentración proteica de los extractos celulares

Se efectuó según el método BCA (Pierce) utilizando ácido bicinconínico (Wiechelman et al., 1988). La escala-patrón de SAP se realizó en el tampón de lisis (cf III-B-4). Las muestras a determinar y las de la escala se pretrataron, volumen a volumen, con iodoacetamida 0,1 M/tampón Tris 0,1 M pH 8,2, durante 1 hora a 37°C. Este tratamiento permite evitar la interferencia, durante la determinación, del agente reductor (DTT) presente en el tampón de lisis. La lectura de la determinación se efectuó a 562 nm.

EJEMPLO 1:

Construcción de las cepas-hospedantes XAC-1pir y pir-116 por re-combinación homóloga.

La cepa utilizada fue la cepa *E. coli* XAC-1 (Normanly et al; 1980. 1980). Ventajosamente, el gen *argE* de esta cepa incluye una mutación Glutamina-53 (CAG) en el codón ámbar (TAG) (Meinzel et al., 1992). El gen *argE* pertenece al operón divergente *argECBH* y codifica una enzima de biosíntesis de la arginina, la N-acetilornitasa. XAC-1 no puede sintetizar la arginina y, como consecuencia, crece en medio mínimo. Esta auxotrofia será eliminada si la cepa contiene un plásmido que permita la expresión de un RNAt supresor. Entonces será posible, por cultivo en medio mínimo, seleccionar las bacterias que lleven tal plásmido. Para permitir la replicación de los plásmidos derivados de R6K, ha sido necesario introducir, por recombinación homóloga, el gen *pir* en el genoma de XAC-1. El gen *pir* (salvaje o mutado) se introduce en el locus *uidA* por intercambio entre el gen *uidA* salvaje y una copia interrumpida por el gen *pir* (o *pir-116*). El gen *uidA* codifica una β-glucuronidasa, enzima de hidrólisis de los β-glucurónidos. Este gen puede inactivarse sin problema ya que no es esencial para el crecimiento en los medios sintéticos clásicos, en los cuales los β-glucurónidos no se utilizan. Además, la actividad β-glucuronidasa puede seguirse gracias a un sustrato cromógeno, el X-Gluc, cuya hidrólisis libera un pigmento azul.

1) Construcción de un vector-suicida que lleva la casete "KmR-uidA::pir (o pir-116)

Hemos utilizado una estrategia que implica un solo hospedante bacteriano y que minimiza las modificaciones del genoma de la cepa de interés. El fago M13mp10 (Messing et Vieira; 1982) se utilizó como vector-suicida (Blum et al., 1989). Una mutación ámbar en el gen *II*, esencial para la replicación, reduce el espectro del hospedante de este M13 en

las cepas, tal como TG1 (sup E), que producen un ARNt supresor de ámbar; no se podrá pues replicar en las cepas de E. coli sup+, como XAC-1.

5 Las casetas BamHI de 3,8 kpb, que contienen el gen de resistencia a la kanamicina de Tn5 y *_uidA::pir* o *pir-116*, se purificaron, respectivamente, a partir de M13wm34 y 33 (Metcalf et al; 1994). Se clonaron en M13mp10 linealizado por BamHI. Los clones recombinantes se seleccionaron por extensión en medio gelosa LB +Km, después de electroporación en TG1 de las mezclas de unión. *La conformidad de los clones obtenidos se mostró por análisis del perfil de restricción y por secuenciación de la región correspondiente a la mutación pir-116.*

2) Introducción por recombinación homóloga de los genes *pir* o *pir-116* en el genoma de E. coli XAC-1

La estrategia adoptada y los diferentes ensayos implicados se presentan en la figura 3.

10 a) *Primer ensayo de recombinación*

15 La cepa XAC-1 se transformó por electroporación con 10, 100 ó 2000 ng de cada RF (*mp10-_uidA::pir* o *pir-116*). Un tercio de cada mezcla de expresión se extendió sobre cajas LB que contenían kanamicina y se incubaron la noche a 37°C. Los fagos *mp10-_uidA::pir* o *pir-116* no pueden replicarse en la cepa XAC-1 (sup+). *El marcador KmR solo se puede pues mantener por integración en el genoma de la bacteria, vía una recombinación homóloga con la copia salvaje del gen uidA.* Los resultados de las electroporaciones de XAC-1 se presentan en la tabla 1. La eficacia de transformación obtenida fue de 4.109 transformantes por µg de pUC4K.

CONSTRUCCIÓN	Número de colonias obtenidas con las cantidades de ADN transformado		
	10 ng	100 ng	2000 ng
M13mp10- <i>_uidA::pir</i>	1	41	146
M13mp10- <i>_uidA::pir-116</i>	0	16	124

TABLA 1

20 En las condiciones ensayadas, el número de integrantes crece de forma no lineal con la cantidad de ADN. Conociendo la eficacia de transformación y el tamaño de los RF (11,7 kpb), se puede tener una idea aproximativa de la proporción de recombinación. Considerando el punto de 100 ng, se obtiene una frecuencia de recombinación del orden de 10-6.

b) *Segundo ensayo de recombinación*

El segundo ensayo de recombinación será seleccionado a continuación por la resistencia de las cepas al desoxicolato (DocR).

25 Para hacerlo, se pusieron en cultivo 5 integrantes de cada construcción en medio 2XTY adicionado con 0,2 % de desoxicolato de sodio. Aparecieron dos poblaciones distintas. Ciertos clones dieron una turbidez bien visible después de alrededor de 8 horas a 37°C (dos clones para la construcción *pir* y tres para la construcción *pir-116*). Los otros clones dieron un cultivo denso solamente después de la noche a 37°C. Estaban casi todos Kms, como se esperaba. Para cada uno de los electroporantes estudiados, 50 descendientes Kms fueron estriados en LB adicionado de X-Gluc. Después de 48 horas a 37°C, los clones *UidA+* estaban azul pálido mientras que los que habían sufrido un reemplazamiento de alelo (caso n°1, figura 3), quedaron blancos en este medio (*UidA-*). La tabla 2 resume el análisis de los fenotipos de los recombinantes dobles obtenidos. De 18 a 30 % de los dobles recombinantes sufrieron un reemplazamiento de alelo.

Cepa	número de Kms entre los DocR	porcentaje de <i>UidA-</i> entre los Kms
XAC-1 <i>pir-2</i>	50/50	18
XAC-1 <i>pir-3</i>	50/50	24
XAC-1 <i>pir-4</i>	50/50	34
XAC-1 <i>pir-116-1</i>	50/50	32

Cepa	número de Kms entre los DocR	porcentaje de UidA- entre los Kms
XAC <i>pir-116-4</i>	35/50	30

TABLA 2

3) Control del carácter Pir+ de las cepas obtenidas por recombinación

5 A fin de asegurarse del carácter Pir+ de las cepas obtenidas por doble recombinación, hemos transformado tres clones de cada construcción por pBW30 (Metcalf et al., 1994). La obtención de transformantes para todas las cepas ensayadas permitió mostrar la funcionalidad de los genes *pir* y *pir-116* integrados en el genoma de XAC-1. En las mismas condiciones, no se obtuvo ningún transformante con la cepa parenteral XAC-1. Hemos seguido el estudio de 2 clones XAC-1pir (B y C) y 2 clones XAC-1pir-116 (E y D).

4) Control por amplificación por PCR de las cepas obtenidas por recombinación

10 *Para confirmar el reemplazamiento de alelo, hemos controlado por amplificación por PCR las regiones genómicas de una parte y de otra del locus uidA.* Cada pareja de oligonucleótidos está constituida de un oligonucleótido que corresponde a una región interna de *pir* y de un segundo oligonucleótido que corresponde a una región, próxima de *uidA* cromosómica, pero no comprendida en el fragmento que sirvió en la recombinación. La secuencia de este último oligonucleótido se determinó gracias a la secuencia ECOUIDAA de Genbank (número de acceso: M14641). Así hemos podido verificar el posicionamiento exacto del gen *pir* en el genoma de la bacteria. La naturaleza de los fragmentos amplificados, cuyo tamaño está conforme al que se podía prever, se confirmó por digestión con MluI.

EJEMPLO 2

Construcción de vectores plasmídicos derivados de R6K que llevan el marcador de selección sup Phe

20 Hemos construido vectores que incluyen el ori y de R6K y el gen de resistencia a la kanamicina (pXL2666). La observación de multímeros de pXL2666 en la cepa BW19610 (*pir-116*) 5 (Metcalf et al; 1993 nos llevó a estudiar el efecto del fragmento *cer* de ColE1 sobre este fenómeno. A continuación introdujimos en el vector ori γ -KmR-*cer* (pXL2730) la casete de expresión del ARNt supresor Fenilalanina (sup Phe). Este vector, pXL2760, sirve de base en la construcción de vectores utilizables en terapia génica.

1) Construcción y análisis de los vectores que incluyen el ori y de R6K y el gen de resistencia a la kanamicina

a) Construcciones

25 En el primer plásmido construido, pXL2666, el gen de resistencia a la ka-namicina proviene de pUC4K (Vieira et Messing; 1982) y el origen de replicación, contenido en el fragmento EcoRI-BamHI de 417 pdb, proviene del vector-suicida pUT-T7pol (Herrero et al; 1990) (figura 4). La transferencia de pXL2666 a las cepas BW19094 y 19610 (Metcalf et al; 1994) permitió mostrar que la cantidad de plásmido está muy aumentada en una cepa *pir-116*, con relación al mismo plásmido en una cepa *pir*. Sin embargo, el análisis por electroforesis de los plásmidos no digeridos muestra que este aumento corre parejo con la aparición de algunas formas multiméricas. Probablemente, este fenómeno esté relacionado con una recombinación intermolecular entre las múltiples copias del plásmido. También hemos construido pXL2730 clonando en pXL2666 el fragmento *cer* del plásmido natural de *E. coli* ColE1, el cual ha mostrado que permite, en *cis*, la resolución de dímeros de plásmidos (Summers and Sherrat, 1984). El fragmento utilizado corresponde a un fragmento HpaI de 382 pdb de ColE1 (Leung et al., 1985). Contiene un sitio de recombinación intermolecular específico; implica únicamente, para ser funcional, proteínas del hospedante de las cuales las recombinasas XerC y XerD, y los factores accesorios ArgR y PepA (Stirling et al., 1988, 1989; Colloms *et al.*, 1990). Para asegurarse que los efectos observados son debidos al fragmento *cer*, hemos construido también el plásmido control pXL2754 en el cual el fragmento *cer* está reducido de 165 pdb. Esta delección se ha mostrado como supresora de la acción de *cer* en la resolución de los multímeros (Leung et al., 1985). Las diferentes etapas de clonación que conducen a la construcción de estos plásmidos se presentan en la figura 4.

b) Análisis cuantitativo y cualitativo de las especies plasmídicas

- análisis por electroforesis en gel de agarosa

45 El análisis por electroforesis de los diferentes plásmidos construidos ha permitido la detección de diversas especies plasmídicas, variables según las cepas utilizadas. El tamaño de los plásmidos no digeridos se evaluó con relación al marcador de ADN superenrollado. En la cepa *pir* (BW19094), los plásmidos pXL2666, 2754 y 2730 están casi por

completo en forma monomérica. Las bandas por debajo de cada banda principal corresponden a diferentes topoisómeros, ligeramente menos superenrollados, como lo confirma el perfil observado después de la acción de la ADN girasa con pXL2730.

5 En el caso de la cepa pir-116 (BW19610), los perfiles son diferentes: se ha observado con los plásmidos pXL2666 y 2754 diferentes especies que van del monómero a los multímeros (2, 3 ó 4 unidades), siendo la forma mayoritaria el dímero. Después de la digestión por EcoRI, solo se encontró el ADN plasmídico lineal; estas especies plasmídicas corresponden bien sea a multímeros de plásmidos, bien sea a topo-isómeros diversos. Sin embargo, el tamaño de las formas está determinado después del marcador de ADN superenrollado siendo un producto entero de este del plásmido monómero, es bastante probable que se trate de multímeros. La formación de multímeros es muy probablemente 10 imputable a la mutación pir-116, aunque las dos cepas BW19094 y BW19610 no sean estrictamente isogénicas (BW19610 es recA). El perfil obtenido con pXL2730 es diferente: aunque formas multiméricas sean aún visibles, la forma mayoritaria es la forma monomérica. El fragmento cer puede pues facilitar la resolución de los multímeros de plásmido que hemos construido y esto de forma independiente de recA, en BW19610.

•análisis después del tratamiento con las ADN topo-isomerasas

15 A fin de descartar la hipótesis según la cual las formas observadas en las cepas que llevan el alelo pir-116 serán topo-isomerasas particulares, cada preparación de plásmido se sometió a la acción de ADN topo-isomerasas. Las actividades de las diferentes enzimas, en las condiciones experimentales fueron las siguientes: *relajamiento del ADN por la ADN topo-isomerasa I de E. coli*, *superenrollamiento negativo del ADN relajado por la ADN girasa de E. coli*, y *desenredamiento de los ADN entrelazados y relajamiento del ADN superenrollado por la ADN topo-isomerasa IV de S. aureus*. La acción de la ADN topo-isomerasa IV permitió mostrar que las formas plasmídicas de elevado peso molecular no resultan del enredamiento de varias moléculas de plásmidos; en este caso, entonces deben ser convertidas en la especie monomérica. La funcionalidad del enzima está evidentemente controlada en una preparación de ADN de 20 quinetoplastos, compuesta de moléculas de ADN enredadas (no mostrado). La actividad de relajamiento es también visible ya que se obtienen especies que migran menos que en los testigos no tratados. La acción de la ADN girasa permitió convertir los topoisómeros ligeramente relajados en la especie más superenrollada extraída de la bacteria (monómero o dímero principalmente). Además, permitió verificar que los ADN preparados están mayoritariamente en forma superenrollada. Las muestras así tratadas permiten confirmar los resultados anteriores en cuanto a las especies mayoritarias para cada construcción. La ADN topo-isomerasa I tiene bien relajado el ADN pero de forma parcial. Esto 25 podría ser debido al hecho de que los plásmidos estudiados no incluyen más que unas pocas zonas de cadena sencilla, con las cuales esta enzima se relaciona preferentemente (Roca, 1995).

2) Introducción del marcador de selección sup Phe en pXL2730

Hemos utilizado la casete de expresión del gen del ARNt supresor sintético (Phe) (Kleina et al., 1990). Este introduce en la cadena polipeptídica en formación una Fenilalanina en respuesta a un codón TAG. Además, permite la producción en XAC-1 de una proteína ArgE suficientemente activa para permitir un buen crecimiento en medio carente en arginina. En 35 el plásmido pCT-2-F (Normanly et al., 1986), sup Phe se expresa de manera constitutiva a partir de un promotor sintético derivado de la secuencia del promotor del gen lpp de E. coli, Plpp. Al principio de este gen, la parada de la transcripción está asegurada por el terminador sintético del operón rrnC de E. coli, TrmC (Normanly et al., 1986). Las diferentes etapas de clonación están indicadas en la figura 5.

40 Las diferentes subclonaciones se realizaron en XAC-1. La funcionalidad de la casete de expresión del ARNt supresor está así controlada gracias a la actividad β -galactosidasa de esta cepa que solo existe si hay supresión del codón ámbar del gen lacZu118am. La última etapa consiste en la introducción de la casete de expresión de sup Phe en pXL2730. Los resultados obtenidos con el fragmento cer (B-1-b) nos han hecho elegir este plásmido antes que pXL2666. Hemos conservado el gen de resistencia a la kanamicina por facilidades de clonación posterior, especialmente para disponer de un localizador de la diana suplementario durante la clonación final (perdida de KmR).

45 EJEMPLO 3:

Validación del vector plasmídico para aplicaciones en terapia génica por transfección de fibroblastos murinos.

1) Construcción del vector informador pXL2774

A fin de ensayar la validez en terapia génica del sistema de producción de ADN plasmídico, hemos introducido en pXL2760 un gen informador, utilizable en las células eucariotas. Hemos utilizado el gen luc que codifica la luciferasa de 50 Photinus pyralis ya que el ensayo de medida de bioluminiscencia es muy sensible, lineal en una amplia escala y el ruido de fondo debido a la actividad endógena de las células eucariotas es muy débil. El gen luc está bajo control de las secuencias promotoras-amplificadoras de un gen precoz del citomegalovirus humano (promotor CMV) que permite una expresión con proporción elevada. En 3' de luc se encuentra una región no traducida, que proviene del virus SV40, que contiene la señal de poliadenilación (poli(A)+). Después de una clonación intermedia que permite aumentar el número

de sitios de restricción disponibles, la casete “promotor CMV-luc-poli(A)+” se introdujo en el vector mínimo ori γ -cer-sup Phe (pXL2760) en lugar del marcador KmR. El plásmido que resultó se llamó pXL2774. La figura 6 recoge las diversas etapas de clonación. Las mezclas de uniones se transformaron por electroporación en XAC-1pir-116. La incubación que permite a las bacterias la expresión de los marcadores de selección se efectúa en medio rico (medio SOC); ha sido necesario lavar las células dos veces con medio M9 antes de la extensión. Esto permitió eliminar el medio residual que habría implicado un ruido de fondo del cultivo en medio mínimo. El medio elegido para extender las células electroporadas fue el medio mínimo M9, que permitió seleccionar las bacterias que expresan un ARNt supresor y entonces la presencia de nuestros plásmidos. La adición de X-Gal permite, por la coloración azul, visualizar la expresión del ARNt supresor. Las cajas se analizaron después de alrededor de 20 horas a 37°C. La ausencia de colonias en el testigo sin ADN nos aseguró que la selección fue correcta, incluso con siembras densas. Todos los clones examinados por restricción (8) llevan un plásmido, que corresponde al perfil esperado. El plásmido así construido, pXL2774, se preparó a partir de un clon cultivado en un litro de medio líquido M9 (alrededor de 18 horas a 37°C), por una técnica que recurre entre otras cosas a un intercambio de iones (kit Promega, MegaPreps). La cantidad de ADN recogida fue de 2 mg.

2) Análisis del vector informador pXL2774 transfectado en las células de mamíferos

La capacidad de pXL2774 para transfectar células eucariotas y permitir la expresión de la luciferasa se evaluó por transfección en los fibroblastos murinos NIH 3T3. El vector elegido como referencia fue el plásmido pXL2622 (se trata del plásmido pGL2 de Promega cuyo promotor SV40 se reemplazó por el promotor CMV) que lleva la misma casete de expresión de la luciferasa que pXL2774, pero en un replicón diferente. Es un derivado de ColE1, de 6,2 kpb, que lleva el gen de resistencia a la ampicilina. Este plásmido nos sirvió de testigo. Las actividades luciferasa (expresada en RLU, o unidades relativas de luminiscencia) están indicadas en la tabla 3.

Los mejores resultados se obtuvieron con una relación “cargas lipofectante/cargas ADN” de 6; en estas condiciones, pXL2622 y 2774 parecen equivalentes.

	pXL2622			pXL2774		
relaciones de cargas	RLU/ μ g de proteínas y por pocillo	Valor medio	Coefficiente de variación (%)	RLU/ μ g de proteínas y por pocillo	Valor medio	Coefficiente de variación (%)
	0,0			0,0		
0	0,0	no detectable		0,0	no detectable	
	0,0			0,0		
	$9,9 \cdot 10^6$			$3,310^6$		
3	$6,2 \cdot 10^6$	$7,6 \cdot 10^6$	22	$2,9 \cdot 10^5$	$2,9 \cdot 10^6$	13
	$6,6 \cdot 10^6$			$2,4 \cdot 10^6$		
	$1,2 \cdot 10^7$			$9,4 \cdot 10^6$		
6	$1,5 \cdot 10^7$	$1,5 \cdot 10^7$	19	$9,9 \cdot 10^6$	$1,0 \cdot 10^7$	7
	$1,9 \cdot 10^7$			$1,1 \cdot 10^7$		
	$9,5 \cdot 10^6$			$1,1 \cdot 10^7$		
9	$7,5 \cdot 10^6$	$1,0 \cdot 10^7$	26	$8,3 \cdot 10^6$	$6,4 \cdot 10^6$	13
	$1,4 \cdot 10^7$			$6,5 \cdot 10^6$		

TABLA 3

EJEMPLO 4

Verificación del carácter de vector suicida en E. coli de los plásmidos pCOR

El carácter no replicativo de los plásmidos derivados de R6K tipo pCOR se verificó por una experiencia de electroporación en E. coli JM109 (Yanisch-Perron et al., 1985) de los plásmidos pUC4K (ori ColEI- KmR, (Vieira et Messing, 1982) y pXL2730 (ori gamma de R6K-KmR, véase el ejemplo 2). El electroporador utilizado fue Gene Pulser Biorad y las células JM109 electrocompetentes se prepararon y utilizaron según el protocolo del fabricante (Bacterial electro-transformation and pulse controller instruction manual. catalog number 165-2098). Las células electrotransformadas se extendieron en medio LB adicionado de kanamicina (50 mg/l) e incubadas la noche a 37°C. Los resultados obtenidos se presentan a continuación.

10 Resultados:

Plásmido	cantidad transformada (ng)	número de transformantes	Eficacia (número de transformantes/ng de plásmido)
pUC4K	0,01	>>2000	>2 105
pXL2730	5	0	0

Estos resultados muestran que hay como mínimo 5 log de diferencia entre la eficacia de transformación de un derivado de ColEI (pUC4K) con relación a un derivado de R6K (pXL2730) en una cepa que no expresa el gen pir. En una cepa pir+ como XAC-1pir-116, la eficacia de electrotransformación de plásmidos derivados de R6K alcanza o sobrepasa clásicamente los 108 transformantes/por µg de plásmido.

15 EJEMPLO 5:

Producción de ADN plasmídico por cultivo de alta densidad de la cepa E.coli XAC-1pir-116 (pXL2774): Procedimiento de fermentación.

5.1. Cepas : Producción en E.coli XAC-1pir-116 (ejemplo 1), de un plásmido mínimo, pXL2774; Este plásmido comprende los elementos siguientes: ori R6K-cer-tRNA^{sup}Phe y una casete de expresión del gen informador luc bajo control del promotor CMV (ejemplo 3) Se ha desarrollado un procedimiento con alta productividad para la producción de este tipo de plásmidos.

5.2. Medios y condiciones de cultivo:**a) Medio de crecimiento:**

. Composición del medio definido utilizado para los cultivos inóculo (g/l): Na₂HPO₄ 6, KH₂PO₄ 3, NaCl 0,5, NH₄Cl 1, NH₄H₂PO₄ 3, glucosa 5, MgSO₄ 7H₂O 0,24, CaCl₂ 2H₂O 0,015, tiamina HCl 0,010

. Composición del medio complejo utilizado para los cultivos en retroalimentación (g/l): KH₂PO₄ 8, K₂HPO₄ 6,3, Na₂HPO₄ 1,7, (NH₄)₂SO₄ 0,74, NH₄Cl 0,12, extracto de levadura 3, glucosa 2, MgSO₄ 7H₂O 2,4 g/l, CaCl₂ 2H₂O 0,015, tiamina 0,010, disolución de sales (Fe, Mn, Co, Zn, Mo, Cu, B, Al).

. Composición del medio definido para los cultivos en retroalimentación medio idéntico al medio complejo pero el extracto de levadura se reemplazó por 2,5 g/l de NH₄Cl.

b) Condiciones de cultivo en retroalimentación:

Estudios en fermentadores de 2 litros (Setric France) que contenían 1l de medio se realizaron con el fin de definir las condiciones óptimas de crecimiento y de producción de ADN plasmídico. El fermentador se sembró con 80 ml de un cultivo inóculo procedente del principio de la fase estacionaria de crecimiento.

Durante la fermentación, el pH se controló y ajustó automáticamente entre 6,9 y 7,0 con amoníaco al 10% (p/v); la temperatura se mantuvo a 37°C; la aireación se fijó a 75 l/h (1,1 vvm) bajo una presión de 0,2 bares y el oxígeno disuelto se controló a 40 % de la saturación de aire por retroacción en la velocidad de agitación y, si fuese necesario, por enriquecimiento con oxígeno puro.

Todos los parámetros (pH, temperatura, agitación, OD, O₂ y CO₂ en los gases efluentes) se recogieron y se calcularon en línea por intermedio de una interfase HP3852 conectada a un Hewlett-Packard 9000.

5 La composición de base del medio de alimentación fue la siguiente: fuente de carbono 50 %, sulfato de magnesio 0,7 %, tiamina 0,02 %, para el medio complejo, se añadió extracto de levadura a una concentración comprendida de preferencia entre 5 y 10 %.

A fin de adaptar las condiciones de cultivo a los fermentadores de 800 litros, se realizaron secuencias de producción que incluyen dos cultivos inoculo sucesivos, a escala del laboratorio: inoculo I en erlenmeyer agitado e inoculo II en fermentador de 2 litros (cultivos discontinuos), seguido por un cultivo de producción en retroalimentación, en fermentador de 7 litros..

10 **5.3. Resultados**

15 Diferentes condiciones de cultivo se estudiaron en medio complejo, en medio definido, y a diferentes proporciones de crecimiento. En todos los casos, después de un cultivo inicial discontinuo de la cepa bacteriana y consumo de la fuente de carbono, el medio de alimentación se añadió al fermentador gracias a una bomba peristáltica acoplada a un perfil de adición pre-programado. Este perfil se dedujo de experiencias anteriores en las cuales la proporción de alimentación retroalimenta bien sea a la proporción de oxígeno disuelto, bien sea a la proporción de crecimiento constante.

Además, de forma que se extrapolen sin dificultad las condiciones de fermentación de 2 litros a un fermentador de 800 l sin sobreoxigenación del medio, la demanda máxima de oxígeno al final del cultivo se fijó en 2,5-3 mM/min. Para ello, la proporción de crecimiento del microorganismo se redujo, si fuese necesario, por acción en el caudal de alimentación de la carga complementaria.

20 Como muestra la Tabla 4, se obtuvieron muy buenos resultados a la vez en medio complejo y en medio definido, bien sea a escala del laboratorio o a escala de un fermentador de 800 litros; las cinéticas de crecimiento y de producción de ADN plasmídico son además del todo comparables (cf. figuras 6 y 7).

	Medio complejo		Medio definido
	Fermentador de 2 o 7l	Fermentador de 800l	Fermentador de 2l
duración de la fermentación (horas)	40	39	48
µh-1	0,130	0,132	0,124
DO (600nm)	114	100	94
X g/l	44	37	30
ADN plasmídico (mg/l medio)	115	100	100
ADN plasmídico (mg/gX)	2,6	2,7	3, 3
X=biomasa (peso de células secas)			

TABLA 4

Los resultados globales resaltan que:

- 25
- el cambio de escala del fermentador de 2 litros al de 800 litros puede efectuarse sin ningún problema,
 - el oxígeno consumido está fuertemente correlacionado con la biomasa producida (1,08 g 0,2 g de biomasa producida),
 - el plásmido es estable durante al menos 50 generaciones sin presión de selección,
 - se puede obtener una biomasa elevada, superior a 40 g de células secas/ litro, en medio complejo,

- la producción de ADN plasmídico alcanza los 100 mg de ADN superenrollado/l de medio,
 - existe una muy buena correlación entre la producción de ADN y la biomasa: se puede estimar la producción en (1mg de ADN plasmídico/unidad de DO, o bien 2,7 mg de ADN plasmídico/g de biomasa), y esto sea cual sea la duración de la fermentación,
- 5
- la utilización de un medio definido permite también alcanzar una biomasa (30 g de células secas/l) y una producción de ADN plasmídico (100 mg/l) elevadas, y esto sin ninguna pérdida de productividad.

EJEMPLO 6:

Transferencia de pXL2774 en las células animales, in vitro e in vivo.

6.1. Transferencia in vitro de pXL2774 en las células animales

- 10 La capacidad del plásmido mínimo pXL2774 para transfectar diferentes líneas celulares se ensayó in vitro, tanto en células de origen humano como de origen murino. El plásmido pXL2784 se utilizó como testigo. Contiene la misma casete de expresión eucariota (promotor CMV-luciferasa-poliA) que pXL2774 pero es un derivado de ColE1 de 6,4 kb que comprende el gen que confiere la resistencia a la kanamicina en E. coli.

Las células ensayadas fueron las siguientes:

Células	Tipo	Ref Atcc/refBibliográfica
3LL	Carcinoma pulmonar de ratón	
NIH 3T3	Fibroblastos de embrión de ratón	CCL92
293	Células renales de embrión humano transformadas por el adenovirus tipo 5	CRL1573
HeLa	Carcinoma humano de cuello de útero	CCL2
Caco-2	Adenocarcinoma humano de colon	HTB37
H460	Carcinoma humano de pulmón no de células pequeñas	HTB177
ECV 304	Células endoteliales humanas de cordón umbilical	Taklahashi et al., 1990

- 15 Las condiciones de transfección fueron las siguientes :

J-1: Siembra de las células a la densidad de 100000 células por pocillo de 2 cm² (placa de 24 pocillos) en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium) suplementado con 10 % de suero de ternera fetal (SVF).

- 20 J-3: Transfección de las células, por 10 µl de una disolución de transfección que contiene: 0,5 µg de ADN, 150 mM, NaCl, 5% glucosa y 3 nmoles de lipofectante RPR120535 por µg de ADN, en 250 µl de medio de cultivo, adicionado o no de 10 % de SVF. Después de una incubación de 2 horas, el medio se reemplazó con 500 µl de medio DMEM adicionado de 10 % de SVF.

J-4: Renovación del medio de cultivo

- 25 J-5: Lavado de las células con PBS después lisis con 100 µl de tampón de lisis Promega (Promega Cell Lysis Buffer E153 A). La determinación de la actividad luciferasa se efectuó en un luminómetro Lumat LB 9501 (Berthold) en 10 µl de lisado, con una duración de integración de 10 segundos. El reactivo utilizado fue el de Promega (Promega Luciferase Assay Substrate). Los resultados, recogidos en las tablas siguientes, están expresados en RLU (Relative Lights Unit) por 10 µl de lisado (media de medición en 4 pocillos). Los coeficientes de variación (CV) están también indicados.

Los resultados de transfecciones en ausencia de suero se presentan a continuación.

TIPOS CELULARES				
	NIH 3T3	3LL	293	
pXL 2774	37 763 380	559 270	1 884 200	RLU
	16	25	73	CV
pXL2784		113 764	1 723 546	RLU
		24	101	CV

TIPOS CELULARES

TIPOS CELULARES				
	HeLa	CaCo2	H460	ECV304
pXL 2774	11 000 000	1 108 422	1 459 501	36450
	15	14	5	23
pXL2784	557 930	93 610	7 563	168 795
	87	40	11	40

Los resultados de transfecciones en presencia de suero (10 %) se presentan a continuación:

TIPOS CELULARES

TIPOS CELULARES			
	NIH 3T3	3LL	293
pXL2774	50612590	56b 377	992500
	12	18	59
pXL2784	12 693 780	436704	2 300 000
	38	12	47

5

TIPOS CELULARES

TIPOS CELULARES			
	HeLa	H460	ECV304
pXL 2774	9490000	857385	18 021
	25	16	30
pXL2784	1 508 480	433 023	32074
	23	27	47

Estos resultados hacen resaltar la capacidad de pXL2774 para transfectar, in vitro, de forma eficaz diferentes tipos celulares de origen tanto murino como humano. La expresión del gen informador luc permitió mostrar que su eficacia de

transfección es al menos tan buena como la de un plásmido “clásico”, derivado de ColEI, que lleva la misma casete de expresión de la luciferasa. .

6.2. Transferencia in vivo, en el animal (ratón), de pXL2774

a) Modelo 1: ADN desnudo en el músculo tibial craneal de ratón

5 El ADN plasmídico desnudo en disolución en “glucosa 5 %, NaCl 150 mM”, se inyectó en el músculo tibial craneal del ratón OF1. Los músculos se quitaron 7 días después de la inyección, se picaron, se homogeneizaron en 750 µl de tampón de lisis (Cell Lysis Buffer Promega E153A) después se centrifugaron a 20000 × g durante 10 minutos.

10 La determinación de la actividad luciferasa se realizó en 10 µl de sobrenadante después de la adición de 50 µl de reactivo (Promega Luciferase Assay Substrate). La lectura se efectuó en el luminómetro Lumat LB9501 (Berthold) con una duración de integración de 10 segundos.

Los resultados se presentan en la Tabla a continuación.

Plásmido	pXL2784	pXL 2774	pXL2784	pXL 2774
número de músculos:	8	8	10	10
volumen inyectado (µl):	30	30	33	33
µg de ADN/músculo	19	13,5	10	6,25
RLU (para 10 µl)				
Valor medio	80 922	471 733	35329	30569
Desviación típica	104 573	402 602	37041	35774

Estos resultados indican que un plásmido con replicación condicional como pXL2774 es muy capaz de transfectar células musculares de ratón in vivo y esto con una eficacia comparable, incluso superior a la de un plásmido “clásico”, derivado de ColE1, que lleva la misma casete de expresión del gen de la luciferasa.

15 b) Modelo 2: modelo tumoral 3T3 HER2

El modelo fue el siguiente:

- Ratón de tipo Swiss/desnudo hembras adultas
- Tumores experimentales inducidos después de la inyección de 107 células 3T3 HER2 por vía subcutánea a nivel del costado.
- La inyección de la mezcla de transfección se realizó 7 días después de la inyección de las células

Disoluciones inyectadas: El ADN es primero solubilizado en el tampón. Después de la adición de todos los productos, la mezcla contiene, además del ADN, NaCl (150 mM) y D-Glucosa 5 % en agua o tampón HEPES 5 mM.

25 • Dos días después de la inyección, el tejido tumoral se quitó, se pesó después se picó y se homogeneizó en 750 µl tampón de lisis (Promega Cell Lysis Buffer E153 A). Después de la centrifugación (20000 g durante 10 minutos), se tomaron 10 µl de sobrenadante que permitieron la evaluación de la actividad luciferasa. Esta actividad se determinó por medición de la emisión luminosa total obtenida después de la mezcla con 50 µl de reactivo (Promega Luciferase Assay Substrate) en un luminómetro Lumat LB 9501 (Berthold) con una duración de integración de 10 segundos.

30 La actividad resultante se expresó en RLU (Relative Lights Units) estimada en la totalidad del sobrenadante de lisis tumoral.

Resultados :

Tampón	Plásmido			Resultado RLU/tumor		+/n
	referencia	µg/ tumor	[ADN] final de la sol.iny.	media	Desviación típica	
HEPES	pXL2784	10	0,5 µg/µl	744 150	682 434	6/6
	<u>pXL2774</u>	10	0,5 µg/µl	1 016 380	1 322 500	5/6
H2O	pXL2784	24	0,6 µg/µl	2 906 073	1 745 857	8/8
	<u>pXL 2774</u>	16,8	0,4 µg/µl	4 292 043	4 995 187	6/6
H2O	pXL2784	7,5	0,3 µg/µl	702 554	552 207	6/7
	<u>pXL2774</u>	5	0,2 µg/µl	3 413 430	4 000 875	6/6

Estos resultados indican que un plásmido con replicación condicional, como pXL2774, es muy capaz de transfectar células musculares de ratón in vivo y esto con una eficacia al menos comparable con la de un plásmido "clásico", derivado de ColE1, que lleva la misma casete de expresión del gen de la luciferasa. Estas diferentes experiencias han permitido demostrar que los plásmidos con replicación condicional, y más particularmente pXL2774, presentan efectivamente las características de transfección de células animales indispensables en una utilización en terapia génica. Más precisamente, se ha mostrado :

- 5 1) la capacidad de pXL2774 de transfectar eficazmente, in vitro, diferentes tipos celulares, de origen humano o murino;
- 10 2) la capacidad de pXL2774 de transfectar, in vivo, el músculo del ratón;
- 3) la capacidad de pXL2774 de transfectar, in vivo, células tumorales implantadas en el ratón

Las experiencias de electrotransformación, de fermentación y de transfección han permitido pues validar los plásmidos con replicación condicional como vector utilizables en terapia génica mostrando

- 15 i) que no se replican de forma detectable en una cepa de E. coli que no expresa el gen pir (origen de replicación condicional)
- ii) que pueden ser producidos a una escala compatible con una producción industrial, en un medio que puede ser totalmente definido y que no contiene antibióticos;
- iii) que estos plásmidos pueden transfectar, in vitro y sobretodo in vivo células de mamíferos.

EJEMPLO 7:

- 20 Producción de Proteínas recombinantes in vitro

7.1. Construcción del vector de expresión

A fin de mostrar que es factible tal enfoque, hemos construido un vector de expresión según los criterios descritos anteriormente (ejemplos 2 y 3). Este vector, pXL3056, contiene:

- 25 1) la parte bacteriana que comprende el origen de replicación condicional (ori gamma), el fragmento cer de ColE1 y el gen que asegura la selección en la bacteria (sup)
- 2) la casete de expresión, basada en el sistema descrito por Studier (Studier et al., 1990), comprende el promotor del gen 10 del bacteriófago T7, el operador lacO, el gen que codifica el aFGF 154 (acidic Fibroblast Growth, factor o

factores de crecimiento ácido de los fibroblastos, forma que incluye 154 aminoácidos) (Jaye et al., 1986), terminador TF del bacteriófago T7. Esta casete de expresión es idéntica a la que está presente en el plásmido pXL2434 descrita en la solicitud WO96/08572.

5 La construcción de pXL3056 se presenta en la figura 8. El fragmento Eco RI-BglIII de pXL2434 (1,1kb) que contiene la casete de expresión de aFGF se clonó en el vector con replicación condicional pXL2979 (fragmento purificado de 1,1 kb) en los sitios BglIII y EcoRI para generar pXL3056

pXL2979 resulta de la unión de 3 fragmentos: i) fragmento Accl-XbaI de pXL2730 (0,8 kb, que aporta ori gamma y cer) ii) fragmento NarI-Sall de pXL2755 (0,18 kb, que aporta el gen sup Phe) iii) fragmento Sall-SpeI de pXL2660 (1,5 kb que aporta el gen que confiere la resistencia a la kanamicina).

10 pXL2660 resulta de la clonación del fragmento PstI de 1,2 kb de pUC4K (Vieira et Messing, 1982) en pMTL22 (Chambers et al., 1988) linealizado por PstI..

7.2. Obtención de la cepa de expresión

15 El plásmido pXL3056 se introdujo por transformación en la cepa XAC-1pir-116. La cepa resultante se transformó a continuación con el plásmido PT7pol23 (Mertens et al., 1995), a 30°C. A fin de expresar el gen de interés bajo control del promotor T7, la bacteria debe contener, en su genoma, sobre un plásmido o un bacteriófago, una casete que permita la expresión del ARN polimerasa del bacteriófago T7. En el ejemplo descrito, hemos utilizado el plásmido PT7pol23, compatible con los derivados de R6K tal como pXL3056, y que permite la expresión inductible para la temperatura del ARN polimerasa bacteriófago T7. Sin embargo también se puede considerar lisogenizar la cepa XAC-1pir-116 por lambda D3 (Studier et al., 1990) a fin de conservar solo un plásmido e inducir la producción de la ARN polimerasa de T7 antes por IPTG que por la temperatura..

7.3. Expresión del aFGF

25 La cepa XAC-1pir-116 (pXL3056 + PT7pol23) se cultivó a 30°C, en medio mínimo M9 adicionado de 0,2 % de casaminoácidos (DIFCO) y de kanamicina (25 µg/ml), hasta una densidad óptica de 600 nm de 0,6-1. A continuación la mitad del cultivo se colocó a 42°C (inducción de la ARN polimerasa de T7) mientras que la otra mitad se dejó a 30°C (testigo negativo). La misma experiencia se realizó con la cepa XAC-1pir-116 (pXL3056 + pUC4K) que constituye un testigo de expresión del aFGF en ausencia de ARN polimerasa de T7.

Los resultados obtenidos se presentan en la figura 9. Muestran que la producción de aFGF es comparable o superior a la observada con BL21(DE3) (pXL2434) (WO96/08572) lo que muestra bien los potenciales de los plásmidos con replicación condicional para la expresión de proteínas recombinantes in vitro, especialmente en E. Coli.

30 EJEMPLO 8:

Construcción de un vector pCOR que expresa una proteína p53 salvaje o híbrida.

Este ejemplo describe la construcción de vectores con replicación condicional según la invención que contienen un ácido nucleico que codifica una proteína p53. Estos vectores son utilizables para restaurar una actividad de tipo p53 en las células deficientes (mutadas, eliminadas), tal como especialmente las células tumorales.

35 La casete de expresión eucariota contiene los siguientes elementos:

1) promotor precoz CMV "immediate early" (posiciones -522 a +72) seguido de la secuencia líder del gen de la timidina-quinasa del virus herpes simple tipo I (posición -60 a +1 del gen, haciendo referencia a la secuencia del artículo McKnight, S. † L. (1980) Nucleic Acids Res. 8: 5949-5964);

40 2) un ácido nucleico que codifica la proteína p53 salvaje o para una variante de p53 tal como está descrito en la demanda PCT/FR96/01111 (variante V325K = V325 con una secuencia Kozak en el ATG);

3) la secuencia de poliadenilación poliA de SV40.

45 Estos elementos se colocaron en forma de un fragmento Ascl-XbaI en el vector pCOR pXL2988 entre los sitios BssHII y SpeI. pXL2988 es idéntico al pXL279 (ejemplo 7.1) excepto la presencia de un elemento suplementario, una secuencia capaz de formar una triple hélice de ADN compuesta de 17 veces el trinucleótido GAA, colocada al lado del origen de replicación gamma.

Los plásmidos resultantes se llamaron pXL3029 y 3030 (Figura 10).

La funcionalidad de estas construcciones se verificó in vitro en células p53-SAOS2 en cultivo por medición de la actividad del activador transcripcional de p53 o p53 superWT.

Bibliografía

- Alting-Mees, M. A., J. A. Sorge, y J. M. Short. 1992. *Methods Enzymol.* 216:483-495.
- 5 Blum, P., D. Holzschu, H. S. Kwan, D. Riggs, y S. Artz. 1989. *J. Bacteriol.* 171: 538-546.
- Brosius, J. 1989. *Methods Enzymol.* 216:469-483.
- Chambers, S. P., S. E. Prior, D. A. Barstow, y N. P. Minton. 1988. *Gene* 68:139-149.
- Chung, C. T., y R. H. Miller. 1988. *Nucleic Acids Res.* 16:3580.
- Colloms, S. D., P. Sykora, G. Szatmari, y D. J. Sherrat. 1990 *J. Bacteriol.* 172:6973-6980.
- 10 Datta, N., y P. Kontomichalou. 1965. *Nature* 208:239-241.
- Dickely, F., D. Nilsson, E. B. Hansen, y E. Johansen. 1995. *Mol. Microbiol.* 15:839-847.
- Filutowicz, M., S. Dellis, I. Levchenko, M. Urh, F. Wu, y D. York. 1994. *Prog. in Nucleic Acid Res. and Mol. Biol.* 48:239-273.
- Gibson, T. J. 1984. Ph.D Thesis. University of Cambridge.
- 15 Greener, A., M. Filutowicz, M. McEachern, y D. Helinski. 1990. *Mol. Gen. Genet.* 224:24-32.
- Herrero, M., V. de Lorenzo, y K. N. Timmis. 1990. *J. Bacteriol.* 172: 6557-6567.
- Hodgson, C. P. 1995. *Bio/Technology* 13:222-225.
- Inuzuka, M., y Y. Wada. 1985. *EMBO J.* 4:2301-2307.
- Jaye, M. et al., (1986) *Science* 233: 541-5.
- 20 Kleina, L. G., J. M. Masson, J. Normanly, J. Abelson, y J. H. Miller. 1990. *J. Mol. Biol.* 213:705-717.
- Kowalczykowski, S. C., y A. K. Eggleston. 1994. *Annu. Rev. Biochem.* 63:9991-10043.
- Leung, D. W., E. Chen, G. Cachianes, y D. V. Goeddel. 1985. *DNA* 4:351-355.
- Maniatis, T., E. F. Fritsch, y J. Sambrook. 1989. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Meinzel, T., E. Schmitt, Y. Mechulam, y S. Blanquet. 1992. *J. Bacteriol.* 174: 2323-2331.
- 25 Mertens, N., E. Remaut y W. Fiers. (1995) *Bio/Technology* 13:175-179.
- Messing, J., y J. Vieira. 1982. *Gene* 19: 269-276.
- Metcalf, W. W., W. Jiang, y B. L. Wanner. 1994. *Gene* 138:1-7.
- Miller, V. L., y J.J. Mekalanos. 1988. *J. Bacteriol.* 170: 2575-2583.
- 30 Normanly, J., J. M. Masson, L. G. Kleina, J. Abelson, y J. H. Miller. 1986. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:6548-6552.
- Normanly, J., L. G. Kleina, J. M. Masson, J. Abelson, y J. H. Miller. 1990. *J. Mol. Biol.* 213: 719-726.
- Roca, J. 1995. *TIBS* 20:156-160.
- Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, y N. Arnheim. 1985. *Science* 230:1350-1354.
- 35 Sanger, F., S. Nicklen, y A. R. Coulson. 1977. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467.
- Sawadogo, M., y M. W. Van Dyke. 1991. *Nucleic Acids Res.* 19: 674.
- Scott, J. R. 1984. *Microbiol. Rev.* 48:1-23.

Simoes, D. A., M. Dal Jensen, E. Dreveton, M. O. Loret, S. Blanchin-Roland, J. L. Uribelarrea, y J. M. Masson. 1991. Ann. N. Y. Acad. Sci. 646:254-258.

Simon, R., U. Priefer, y A. Pühler. 1983. Bio/Technology 1:784-791.

Sinha, N. D., J. Biernat, J. McManus, y H. Köster. 1984. Nucleic Acids Res. 12:4539-4557.

5 Stirling, C. J., G. Stewart, y D. J. Sherrat. 1988. Mol. Gen. Genet. 214:80-84.

Stirling, C. J., S. D. Colloms, J. F. Collins, G. Szatmari, y D. J. Sherrat. 1989. EMBO J. 8:1623-1627.

Studier, F. W., A. H. Rosenberg., J. J. Dunn, y J. W. Dubendorff (1990). Methods Enzymol 185: 60-89.

Summers, D. K., y D. J. Sherrat. 1984. Cell 36:1097-1103.

Takahashi, K., Y. Sawasaki, J. Hata, K. Mukai y T. Goto.(1990) In Vitro Cell Dev. Biol. 26: 265-74

10 Vieira, J., y J. Messing. 1982. Gene 19:259-268.

Wiechelman, K., R. Braun, y J. Fitzpatrick. 1988. Anal. Biochem. 175:231-237.

Yanisch-Perron, C. Vieira. y J. Messing (1985) Gene 33: 103-119 13

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIONES GENERALES:

15 (i) SOLICITANTE:

(A) NOMBRE: RHONE POULENC RORER S.A.

(B) CALLE: 20, Avenue Raymond Aron

(C) CIUDAD: ANTONY

(E) PAÍS: FRANCIA

20 (F) CÓDIGO POSTAL: 92165

(G) TELÉFONO: 40.91.69.22

(H) TELEFAX: (1)40.91.72.96

(ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Molécula de ADN circular con origen de replicación condicional, su procedimiento de preparación y su utilización en terapia génica

25 (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 6

(iv) FORMA LEGIBLE EN ORDENADOR:

(A) TIPO DE SOPORTE: Cinta

(B) ORDENADOR: PC compatible con IBM

(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS

30 (D) PROGRAMA INFORMÁTICO: PatentIn Release nº 1.0, versión nº 1.30 (OEB)

(2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 389 pares de bases

(B) TIPO: nucleótido

(C) NÚMERO DE CADENAS: simple

5 (D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 1:

TGTCAGCCGT TAAGTGTTC TGTGTCAC TGAGAGGCTC TAAGGGCTTC	60
TCAGTGCGTT ACATCCCTGG CTTGTTGTC ACAACCGTT AACCTTAAA GCTTTAAAAG	120
CCTTATATAT TCTTTTTTTT CTTATAAAC TTAAACCTT AGAGGCTATT TAAGTTGCTG	180
ATTTATATTA ATTTTATTGT TCAAACATGA GAGCTTAGTA CGTGAAACAT GAGAGCTTAG	240
TACGTTAGCC ATGAGAGCTT AGTACGTTAG CCATGAGGCT TTAGTTCGTT AAACATGAGA	300
GCTTAGTACG TTAACATGA GAGCTTACTA CGTGAAACAT GAGAGCTTAG TACGTACTAT	360
CAACAGCTTG AACTGCTGAT CTTCAGATC	389

(2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID NO: 2:

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 960 pares de bases

(B) TIPO: nucleótido

(C) NÚMERO DE CADENAS: simple

(D) CONFIGURACIÓN: lineal

15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 2:

TATACAGAAT GATGAGGTTT TTTTATGAGA CTCAAGGTCA TGATGGACGT GAACAAAAA	60
ACGAAAATTC GCCACCGAAA CGAGCTAAAT CACACCCTGG CTCAACTTCC TTTGCCCGCA	120
AAGCGAGTGA TGTATATGGC GCTTGCTCCC ATTGATAGCA AAGAACCTCT TGAACGAGG	180
CGAGTTTTCA AAATTAGGGC TGAAGACCTT GCAGCGCTCG CCAAAATCAC CCCATCGCTT	240
GCTTATCGAC AATTAAAAGA GGGTGGTAAA TTAAGTGGTG CCAGCAAAAT TTCGCTAAGA	300
GGGGATGATA TCATTGCTTT AGCTAAAGAG CTTAACCTGC CCTTTACTGC TAAAACTCC	360
CCTGAAGAGT TAGATCTTAA CATTATTGAG TGGATAGCTT ATTCAAATGA TGAAGGATAC	420
TTGTCTTTAA AATTCCACAG AACCATAGAA CCATATATCT CTAGCCTTAT TGGGAAAAA	480
AATAAATTC CAACGCAATT GTTAACGGCA AGCTTACGCT TAAGTAGCCA GTATTCATCT	540
TCTCTTTATC AACTTATCAG GAAGCATTAC TCTAATTTA AGAAGAAAAA TTATTTTATT	600
ATTCCCGTTG ATGAGTTAAA GGAAGAGTTA ACAGCTTATA CTTTTCATAA AGATGGAAAT	660
ATTGAGTACA AATACCCTGA CTTTCCTATT TTTAAAAGGG ATGTGTTAAA TAAAGCCATT	720
GCTGAAATTA AAAAGAAAC AGAAATATCG TTTGTTGGCT TCACTGTTC TGA AAAAGAA	780
GGAAGAAAAA TTAGTAAGCT GAAGTTCGAA TTTGTCGTTG ATGAAGATGA ATTTTCTGGC	840
GATAAAGATG ATGAAGCTTT TTTTATGAAT TTATCTGAAG CTGATGCAGC TTTTCTCAAG	900
GATTTAATG AAACCGTACC TCCCAAAAAA GCTAAGGGGT GATATATGGC TAAAATTAC	960

(2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 24 pares de bases
- (B) TIPO: nucleótido
- (C) NÚMERO DE CADENAS: simple
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

10 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 3:

GACCAGTATT ATTATCTTAA TGAG 24

(2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: nucleótido

(C) NÚMERO DE CADENAS: simple

(D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

5 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 4:

GTATTTAATG AAACCGTACC TCCC 24

(2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

10 (B) TIPO: nucleótido

(C) NÚMERO DE CADENAS: simple

(D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 5:

15 CTCTTTAAT TGTCGATAAG CAAG 24

(2) INFORMACIONES SOBRE LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: nucleótido

20 (C) NÚMERO DE CADENAS: simple

(D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

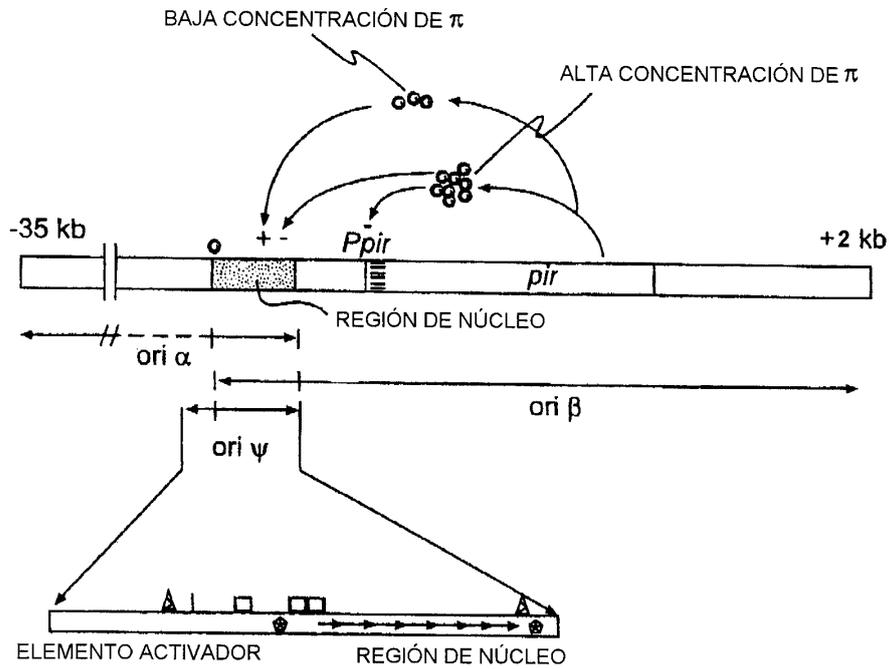
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 6:

GCGACGTCAC CGAGGCTGTA GCCG 24

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una célula procariota hospedante recombinante que comprende una proteína iniciadora de replicación, codificada por un gen incorporado en el genoma de la célula, que activa un origen de replicación condicional portado por una molécula de ADN de forma circular, útil en terapia génica, que comprende una región promotora de la transcripción y al menos una secuencia nucleica de interés cuya traducción y opcionalmente la traducción en la célula diana generan productos que tienen un interés terapéutico, vacunal, agronómico o veterinario, caracterizada por que
- 10 a. la región que permite su replicación comprende un origen de replicación condicional procedente de un plásmido o de un bacteriófago cuya funcionalidad en una célula procariota hospedante requiere la presencia de al menos una proteína iniciadora de replicación específica de dicho plásmido o bacteriófago y extraña a dicha célula procariota hospedante,
- b. dicha molécula de ADN no incluye dicha proteína iniciadora de replicación,
- c. dicha molécula de ADN incluye un marcador de selección, y
- d. dicha molécula de ADN no se disemina en la célula hospedante en ausencia de dicha proteína iniciadora de replicación.
- 15 2. Una célula procariota hospedante recombinante según la reivindicación 1, caracterizada por que dicho origen de replicación condicional de dicha molécula de ADN circular procede de un plásmido o bacteriófago que posee un origen de replicación, representado por varios iterones, y que codifica al menos una proteína específica, que condiciona la funcionalidad de su origen de replicación.
- 20 3. Una célula procariota hospedante recombinante según la reivindicación 1 o 2, caracterizada por que el origen de replicación condicional de dicha molécula de ADN circular procede de los plásmidos o bacteriófagos siguientes RK2, R6K, R1, pSC101, RtsI, F, RSF1010, P1, P4, lambda, Phi82 y Phi 80.
4. Una célula procariota hospedante recombinante según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por que dicho origen de replicación condicional de dicha molécula de ADN circular procede del plásmido bacteriano R6K.
- 25 5. Una célula procariota hospedante recombinante según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por que dicho origen de replicación condicional de dicha molécula de ADN circular está constituida en todo o en parte por el origen de replicación gamma del plásmido R6K.
6. Una célula procariota hospedante recombinante según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por que dicho origen de replicación condicional de dicha molécula de ADN circular está representada en todo o parte por la secuencia SEQ ID N°1.
- 30 7. Una célula procariota hospedante recombinante según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por que comprende un gen esencial que comprende una mutación ámbar.
8. Una célula procariota hospedante recombinante según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por que comprende un gen esencial que comprende un codón ámbar TAG.
- 35 9. Una célula procariota hospedante recombinante según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por que la mutación ámbar está localizada en un gen de la biosíntesis de una base nucleica, tal como las purinas.
10. Una célula procariota hospedante recombinante según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por que la mutación ámbar está localizada en un gen de la biosíntesis de un aminoácido tal como la arginina, o de la biosíntesis de la vitamina, de un gen que permite utilizar una fuente de carbono o de nitrógeno particular, o de un gen esencial.
- 40 11. Una célula procariota hospedante recombinante según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por que la célula se elige entre las cepas de E. coli.
12. Una célula procariota hospedante recombinante según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por que la célula procede de la cepa E. coli XAC 1.
- 45 13. Una célula procariota hospedante recombinante según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por que dicha proteína iniciadora de replicación está codificada por el gen pir o el gen pir que comprende al menos una mutación.

14. Una célula procariota hospedante recombinante según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por que dicha proteína iniciadora de replicación está codificada por el gen pir 116.
15. Una célula procariota hospedante recombinante según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por que el gen pir está mutado por la sustitución de una prolina por una leucina.
- 5 16. Una célula procariota hospedante recombinante según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por que dicha proteína iniciadora de replicación está codificada por el gen pir y la célula hospedante procariótica recombinante se designa XAC-1pir.
- 10 17. Una célula procariota hospedante recombinante según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por que dicha proteína iniciadora de replicación está codificada por el gen pir116 y la célula hospedante procariótica recombinante se designa XAC-1pir116.
18. Una célula procariota hospedante recombinante según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por que dicha proteína iniciadora de replicación está codificada por la secuencia SEQ ID NO : 2.
19. Una célula procariota hospedante recombinante según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por que dicha célula es deficiente en el gen endA.
- 15 20. Una célula procariota hospedante recombinante según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por que el gen endA se ha inactivado por mutación, delección total o parcial o por disrupción.
21. Una célula procariota hospedante recombinante que comprende un gen heterólogo pir o un gen pir, incorporado en el genoma de la célula, que comprende al menos una mutación y que codifica la proteína iniciadora de replicación pi. y deficiente en el gen endA.
- 20 22. Una célula procariota hospedante recombinante según la reivindicación 21 caracterizada por que la proteína de replicación pi está codificada por el gen pir116.
23. Una célula procariota hospedante recombinante según la reivindicación 21 o 22 caracterizada por que la proteína iniciadora de replicación está codificada por la secuencia SEQ ID NO : 2.
- 25 24. Una célula procariota hospedante recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23 caracterizada por que se elige entre las cepas de E. coli.
25. Una célula procariota hospedante recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 21 y 24 caracterizada por que la célula procede de la cepa E. coli XAC 1.
26. Una célula procariota hospedante recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 25, caracterizada por que el gen pir está mutado por la sustitución de una prolina por una leucina.
- 30 27. Una célula procariota hospedante recombinante según una de las reivindicaciones 21 a 26, caracterizada por que el gen endA se ha inactivado por mutación, delección total o parcial o por disrupción.



- CLAVE:
- SITIO DE UNIÓN PARA EL FACTOR IHF
 - SECUENCIAS CONSENSO DE Adh'A
 - ▲ CAJA DE AdhA N° 1
 - ITERÓN (SECUENCIA DE 22 pb)
 - PROTEÍNA π

FIG. 1

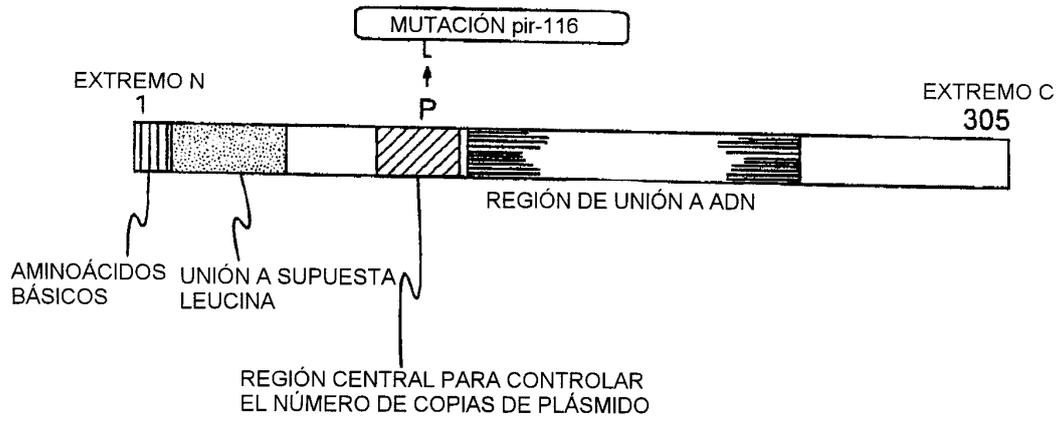


FIG. 2

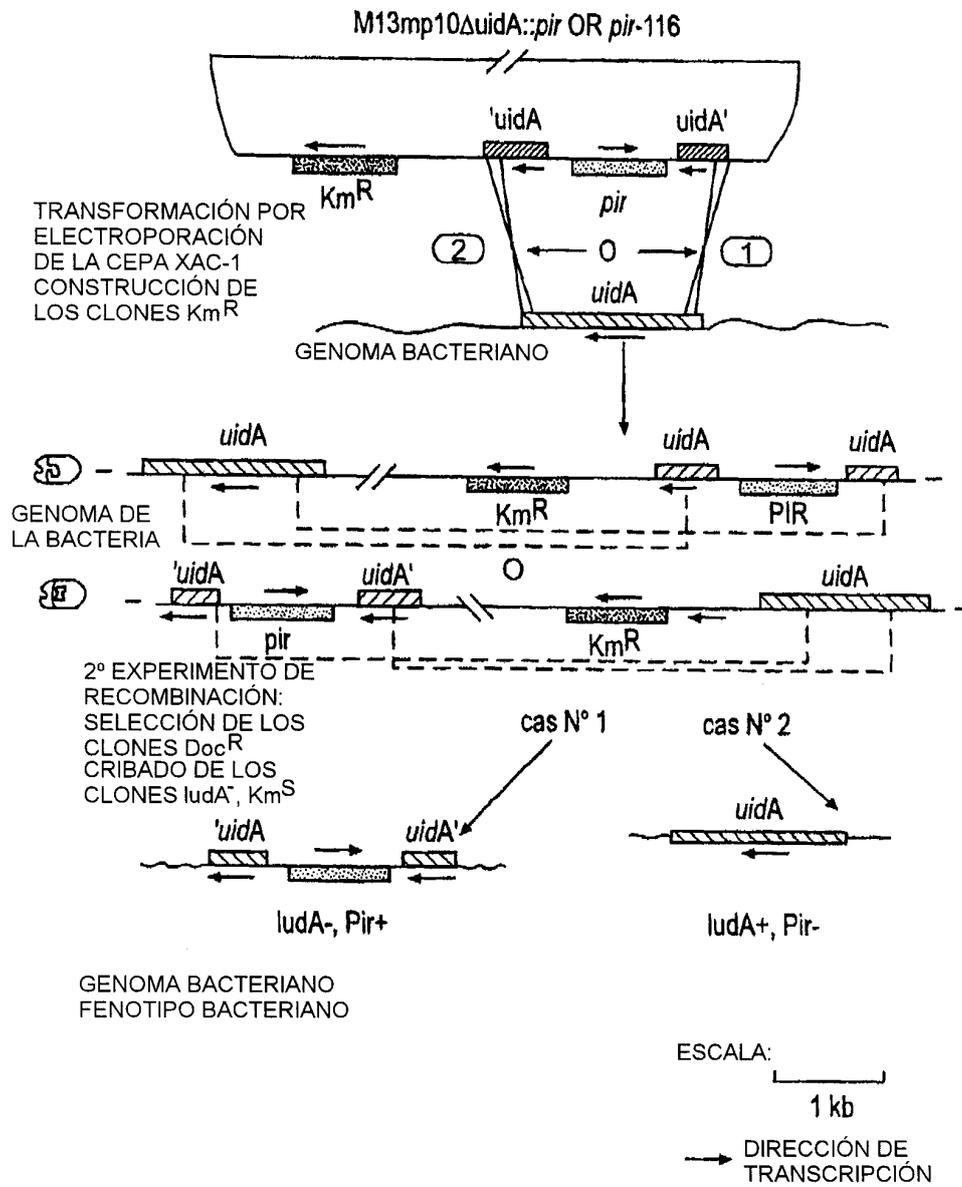


FIG. 3

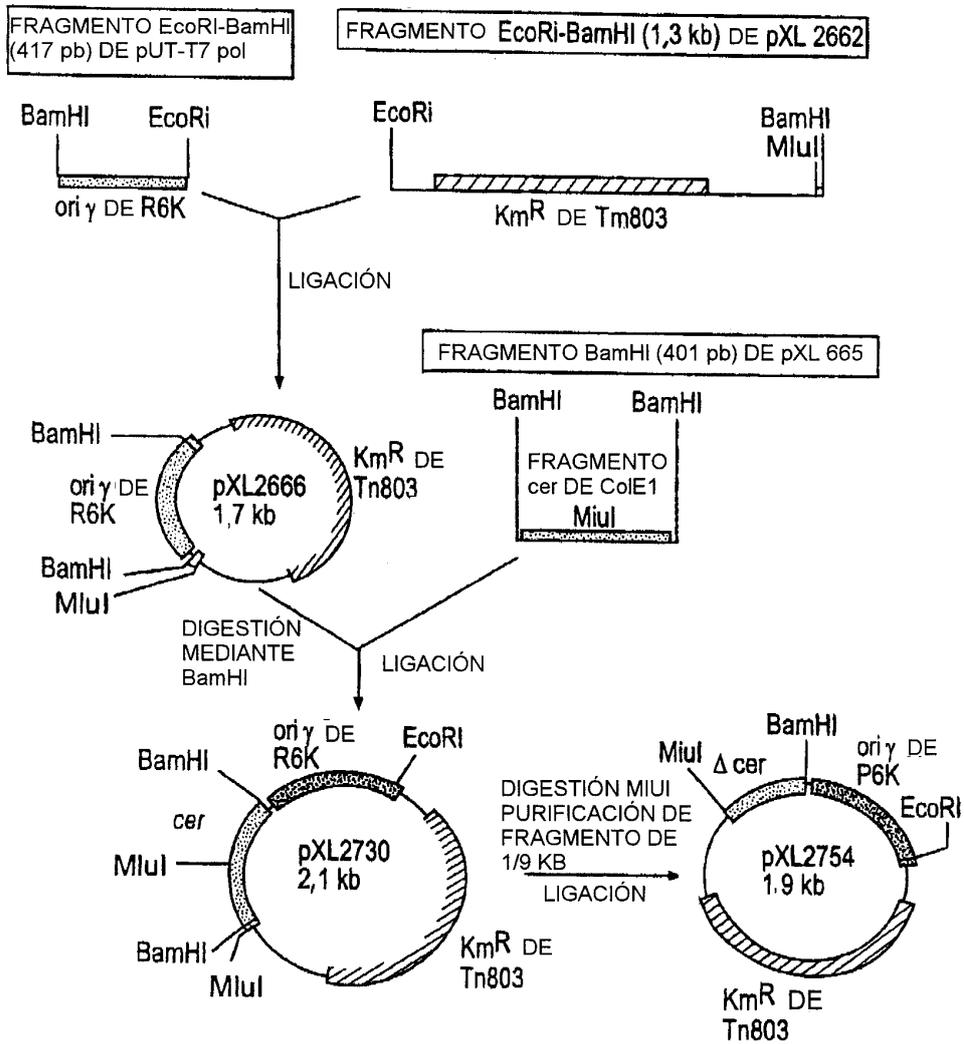


FIG. 4

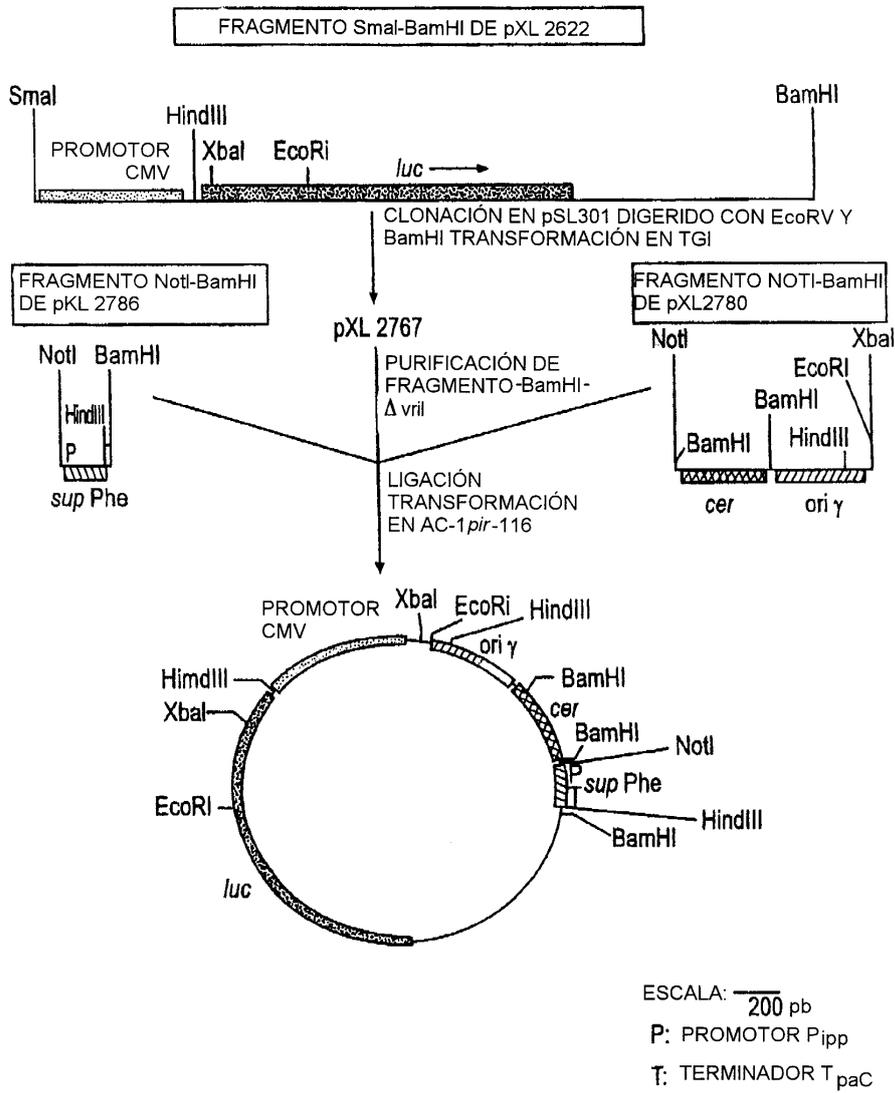


FIG. 5

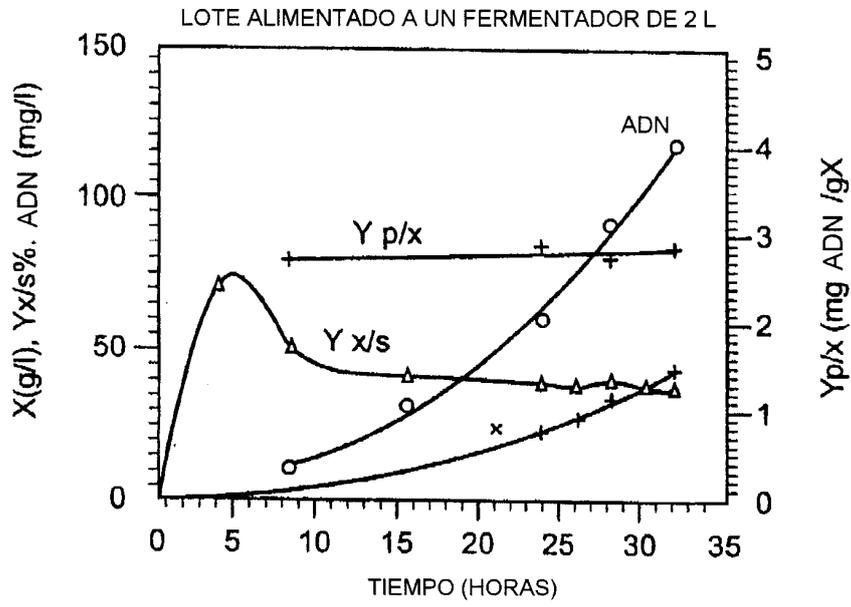


FIG. 6

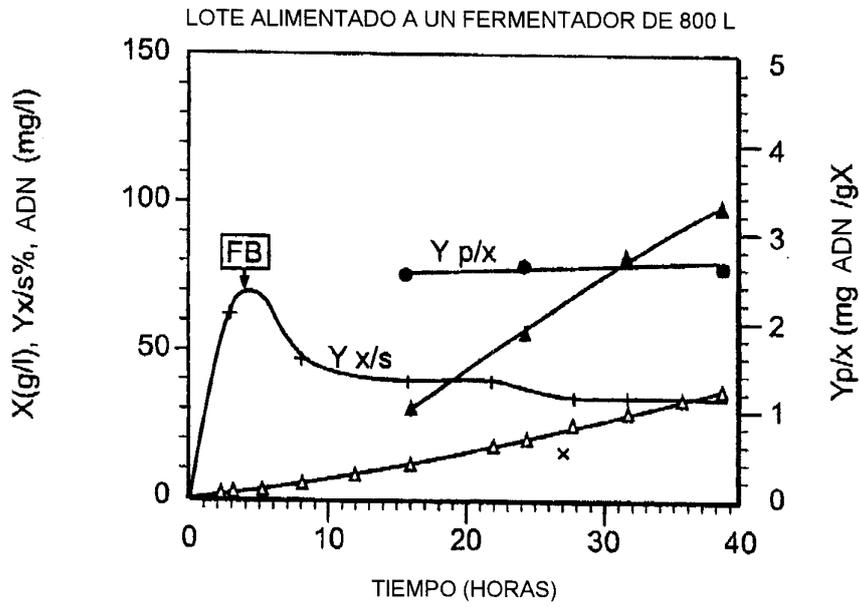


FIG. 7

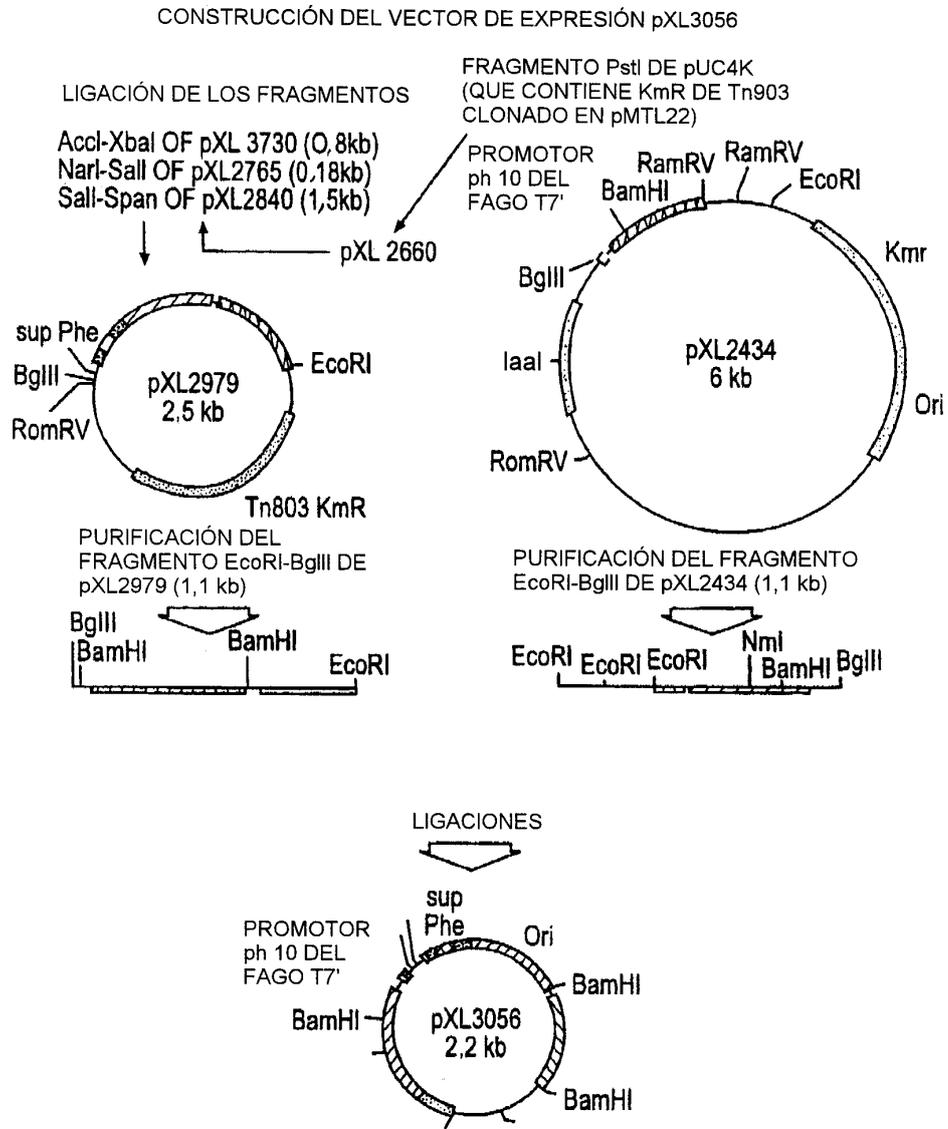


FIG. 8

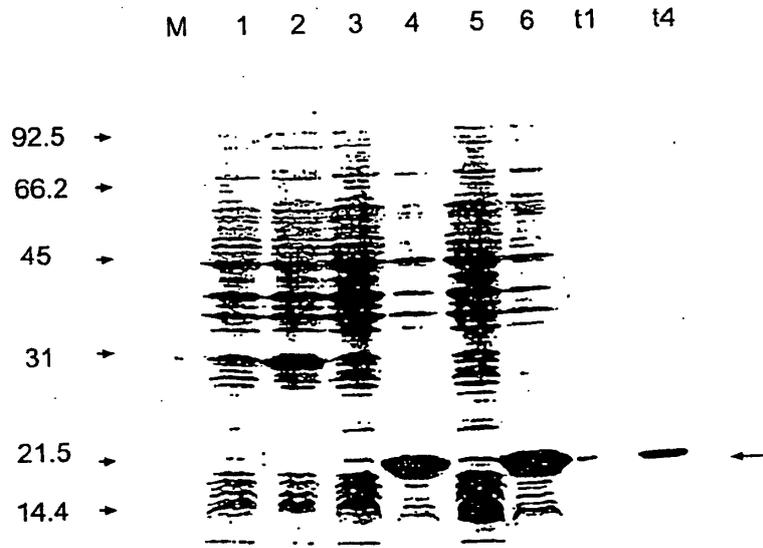


FIG. 9

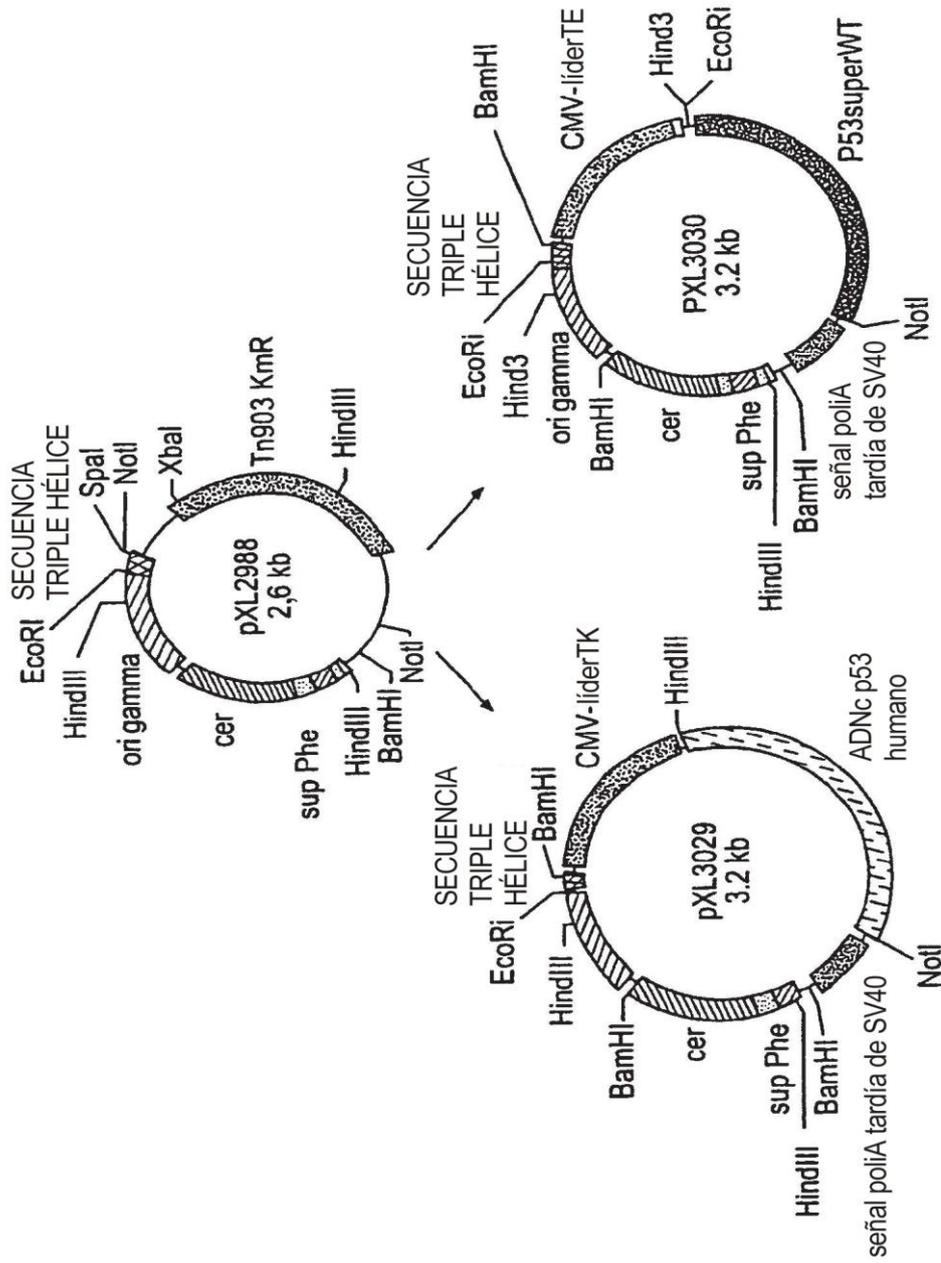


FIG. 10