

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 372 599**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 15/64 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03777599 .6**

96 Fecha de presentación: **14.10.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1549735**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.07.2005**

54 Título: **MOLÉCULA DE ADN CIRCULAR QUE TIENE UN ORIGEN DE REPLICACIÓN CONDICIONAL, PROCESOS PARA SU PREPARACIÓN Y SU USO EN TERAPIA GÉNICA.**

30 Prioridad:
11.10.2002 US 268948

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.01.2012

73 Titular/es:
**AVENTIS PHARMA S.A.
20, AVENUE RAYMOND ARON
92160 ANTONY, FR**

72 Inventor/es:
SOUBRIER, Fabienne

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 372 599 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

Molécula de ADN circular que tiene un origen de replicación condicional, procesos para su preparación y su uso en terapia génica

5 La presente invención se refiere a una nueva molécula de ADN con replicación condicional que puede usarse en terapia génica o para la producción de proteínas recombinantes. Las nuevas moléculas de ADN según la presente invención se designan pCOR™ de aquí en adelante en la presente memoria.

10 La terapia génica consiste en corregir una deficiencia o una anomalía introduciendo información genética en el órgano o célula afectada. Esta información puede introducirse tanto *in vitro* dentro de una célula extraída del órgano y reinyectándola en el cuerpo, o *in vivo*, directamente en el tejido diana. Como una molécula de alto peso molecular y con carga negativa, el ADN tiene dificultad para atravesar espontáneamente las membranas celulares fosfolípidicas. Varios vectores se usan así con el fin de permitir que tenga lugar la transferencia génica: vectores virales, por una parte, y vectores naturales o sintéticos químicos y/o bioquímicos, por otra parte.

15 Los vectores virales (retrovirus, adenovirus, virus adeno-asociados, etc.) son muy eficaces, en particular para atravesar las membranas, pero presentan un determinado número de riesgos tales como patogenicidad, recombinación, replicación e inmunogenicidad.

20 Los vectores químicos y/o bioquímicos permiten evitar estos riesgos (para revisiones, véase Behr, 1993, Cotten y Wagner 1993). Éstos son, por ejemplo cationes (fosfato de calcio, DEAE-dextrano, etc.) que actúan formando precipitados con ADN, que pueden ser "fagocitados" por las células. También pueden ser liposomas en los que el ADN se incorpora y que se fusionan con la membrana plasmática. Los vectores de transferencia génica sintéticos son generalmente lípidos o polímeros catiónicos que forman un complejo con el ADN y forman con él una partícula que presenta cargas superficiales positivas. Como ilustraciones de vectores de este tipo, puede mencionarse en particular dioctadecilamidoglicilispermina (DOGS, Transfectam™) o N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA, Lipofectin™).

25 Sin embargo, el uso de vectores químicos y/o bioquímicos o ADN desnudo implica la posibilidad de producir grandes cantidades de ADN con pureza farmacológica. La razón para esto es que en las técnicas de terapia génica, el producto medicinal consiste en el ADN en sí mismo y es esencial tener la capacidad de fabricar, en cantidades adecuadas, ADN que tengan las propiedades que son apropiadas para el uso terapéutico en el ser humano.

30 En el caso de vectorología no viral, los vectores usados son plásmidos de origen bacteriano. Los plásmidos usados generalmente en terapia génica portan (i) un origen de replicación, (ii) un gen marcador tal como un gen para resistencia a un antibiótico (kanamicina, ampicilina, etc.) y (iii) uno o más transgenes con secuencias necesarias para su expresión (amplificador(es), promotor(es), secuencias de poliadenilación, etc.). Sin embargo, la tecnología disponible actualmente no es completamente satisfactoria.

35 Por una parte, permanece el riesgo de diseminación en el cuerpo. Así, una bacteria que está presente en el cuerpo puede, a baja frecuencia, recibir este plásmido. Existe una mayor probabilidad de que esto tenga lugar si implica un tratamiento de terapia génica *in vivo* en el que el ADN puede diseminarse en el cuerpo del paciente y puede entrar en contacto con bacterias que infectan a este paciente o bacterias de la flora comensal. Si la bacteria que recibe el plásmido es una enterobacteria, tal como *E. coli*, este plásmido puede replicarse. Dicho evento da lugar a la diseminación del gen terapéutico. Desde el momento en el que los genes terapéuticos usados en los tratamientos de terapia génica pueden codificar, por ejemplo, una linfoquina, un factor de crecimiento, un anti-oncogén o una proteína cuya función es defectuosa en el huésped y que hace así posible corregir un defecto genético, la diseminación de algunos de estos genes podría tener efectos impredecibles y preocupantes (por ejemplo, si una bacteria patógena adquiere un gen de factor de crecimiento humano).

40 Por otra parte, los plásmidos usados generalmente en terapia génica no viral también poseen un marcador para resistencia a un antibiótico (ampicilina, kanamicina, etc.). La bacteria que adquiere dicho plásmido tiene así una ventaja selectiva innegable ya que cualquier terapia con antibiótico, usando un antibiótico de la misma familia de la que selecciona el gen de resistencia del plásmido, dará lugar a la selección del plásmido en cuestión. A este respecto, la ampicilina pertenece a las α -lactamas, que es la familia de antibióticos que se usa más frecuentemente en el mundo. El uso en bacterias de marcadores de selección que no son genes de resistencia a antibióticos sería así particularmente ventajoso. Esto evitaría la selección de bacterias que pueden haber recibido un plásmido que porta dicho marcador.

45 WO9710343 describe la cepa XAC-1 *pir116* (*ara*, Δ (*lac-proB*)_{x111}, *gyrA*, *argE*_{am}, *rpoB*, *thi*, *uidA*(Δ Mlul)::*pir116*/F'[*proB*⁺ *lacI*₃₇₃ *lacZ*_{u118am}]).

50 SOUBRIER ET AL (GENE THERAPY, vol. 6, 1999, 1482-1488) y CARRIÈRE ET AL (S.T.P. PHARMA SCIENCES, vol. 11, no. 1, 2001, 1-6), también describen ambos la cepa XAC *pir116*, así como un derivado *traD* de dicha cepa.

55 MIRON ALEXANDER ET AL (PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 91, no. 14, 1994, 6438-6442) describe la caracterización de varias mutaciones *pir*,

incluyendo *pir 42*, pero no describe ni sugiere hacer dobles mutantes y usarlos para incrementar el número de copias.

Es así particularmente importante esforzarse para limitar la diseminación de genes terapéuticos y genes de resistencia lo máximo posible.

5 La invención se refiere a la reivindicación 1.

10 Las moléculas de ADN tienen la ventaja de eliminar los riesgos asociados con la diseminación del plásmido, tales como (1) replicación y diseminación, que pueden dar lugar a la sobreexpresión incontrolada del gen terapéutico, (2) diseminación y expresión de genes de resistencia. La información genética contenida en las moléculas de ADN según la invención comprende efectivamente el o los genes terapéuticos y las señales para regular su expresión, un origen de replicación condicional funcional que limita en gran medida el espectro de célula huésped de este plásmido, un marcador de selección con un tamaño reducido que es preferiblemente diferente de un gen que confiere resistencia a un antibiótico y, cuando sea apropiado, un fragmento de ADN que permite la resolución de los multímeros de plásmido. La probabilidad de que estas moléculas (y así la información genética que contienen) sea transferida a un microorganismo, y mantenida de manera estable es muy limitada.

15 Por último, los vectores según la invención, también referidos como miniplásmidos debido a su estructura circular, su tamaño reducido y su forma superenrollada, tienen las ventajas adicionales siguientes: debido a su tamaño que es reducido en comparación con los plásmidos derivados de ColE1 usados convencionalmente, las moléculas de ADN según la invención tienen potencialmente mejor biodisponibilidad *in vivo*, y las moléculas de ADN o pCOR permanecen en una forma extracromosómica estable en las células huésped procariontas o eucariotas que no contienen la proteína iniciadora. En particular, tienen capacidades mejoradas de penetración y distribución en la célula. Así, se sabe que el coeficiente de difusión en los tejidos es inversamente proporcional al peso molecular (Jain, 1987). De manera similar, en la célula, las moléculas de alto peso molecular tienen una menor permeabilidad a través de la membrana plasmática. Además, con el fin de que el plásmido pase al interior del núcleo, que es esencial para su expresión, el alto peso molecular también es una desventaja, imponiendo los poros nucleares un límite de tamaño para la difusión en el interior del núcleo (Landford *et al.*, 1986). La reducción del tamaño de las partes no terapéuticas de la molécula de ADN (origen de replicación y gen de selección en particular) según la invención también hace posible disminuir el tamaño de las moléculas de ADN. La parte que permite la replicación y selección de este plásmido en la bacteria (1 kb) disminuye por un factor de 3, contando, por ejemplo, 3 kb para el origen de replicación y la parte del vector de marcador de resistencia. Esta disminución (i) en peso molecular y (ii) en carga negativa confiere una biodisponibilidad y difusión tisular, celular y nuclear mejoradas a las moléculas de la invención.

35 Más precisamente, la presente invención se refiere a una molécula de ADN circular, que es útil en terapia génica, comprendiendo esta molécula al menos una secuencia de ácido nucleico de interés, caracterizada porque la región que permite su replicación comprende un origen de replicación cuya funcionalidad en una célula huésped requiere la presencia de al menos una proteína específica que es extraña para dicha célula huésped.

Esta molécula de ADN puede estar en forma mono o bicatenaria y ventajosamente posee una forma superenrollada.

Para los propósitos de la presente invención, las células huésped usadas pueden tener varios orígenes. Pueden ser células eucariotas o procariontas. Según una realización preferida de la invención, son células procariontas.

40 La replicación de plásmidos bacterianos requiere convencionalmente la presencia de al menos una proteína, que está codificada por la célula huésped, del tipo de la ARN polimerasa, ARNasa, ADN polimerasa, etc.. Por las razones ya explicadas anteriormente, no es posible solucionar completamente, con este tipo de replicación, todos los posibles riesgos de diseminación en el organismo tratado. Ventajosamente, la funcionalidad del origen de replicación de la molécula de ADN según la invención requiere la presencia de una proteína específica que es extraña para la célula huésped. La significancia de esta característica es reducir el espectro de huésped del plásmido reivindicado a cepas específicas que expresan esta proteína iniciadora. La molécula de ADN desarrollada en el contexto de la presente invención posee así ventajosamente un denominado origen de replicación condicional.

45 El origen de replicación condicional usado según la presente invención puede originarse 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 es específica de ellos. Como ejemplo, pueden mencionarse los sistemas de replicación condicionales de los plásmidos y bacteriófagos siguientes:

plásmido o bacteriófago	proteína iniciadora específica
RK2 (Stalker <i>et al.</i> , 1981)	TrfA

plásmido o bacteriófago	proteína iniciadora específica
R1 (Ryder <i>et al.</i> , 1981)	RepA
pSC101 (Vocke y Bastia, 1983)	RepA
F (Murotsu <i>et al.</i> , 1981)	proteína E
Rts1 (Itoh <i>et al.</i> , 1982,1987)	RepA
RSF1010 (Miao <i>et al.</i> , 1995)	RepC
P1 (Abeles <i>et al.</i> , 1984)	RepA
P4 (Flensburg y Calendar, 1987)	proteína alfa
lambda (Moore <i>et al.</i> , 1981)	proteína O
phi 82 (Moore <i>et al.</i> , 1981)	proteína O de phi 82
phi 80	proteína O de phi 80

Según una realización preferida de la invención, el origen de replicación usado en las moléculas de ADN reivindicadas se obtiene de un plásmido natural de *E. coli* referido como R6K.

5 Las funciones de replicación de R6K se agrupan juntas en un fragmento de ADN de 5,5 kpb (Figura 1) que comprende 3 orígenes de replicación α , β , y γ (proporcionando γ y α 90 % de la replicación) y un operón que codifica la proteína iniciadora de la replicación Π y la proteína Bis. La cantidad mínima de información genética requerida para mantener este plásmido en su número característico de copias (15 copias por genoma) está contenida en dos elementos: los 400 pb de ori γ y el gen *pir*, cuyo producto es la proteína iniciadora Π .

10 Ori γ puede dividirse en dos partes funcionales: la parte núcleo y el elemento activador (Figura 1). La parte núcleo, que es esencial para la replicación, contiene los iterones (7 repeticiones directas de 22 pb) a los que se une la proteína Π representada en SEQ ID No. 1 y segmentos flanqueantes, que son dianas de las proteínas huésped (IHF, DnaA).

Según un modo preferido de la invención, el origen de replicación del vector reivindicado consiste en todo o parte de este origen de replicación γ del plásmido R6K y más preferiblemente, todo o parte de SEQ ID No. 1 o uno de sus derivados.

15 El origen de replicación descrito anteriormente, que tiene la ventaja de tener un tamaño muy limitado, es funcional solamente en presencia de una proteína iniciadora específica, la proteína Pi, producida por el gen *pir* (SEQ ID No. 2). Como esta proteína puede actuar en trans, es posible disociar físicamente el ori gamma del gen *pir*, que puede introducirse en el genoma de la célula que se elige como el huésped específico para estos plásmidos. Las mutaciones en Π pueden alterar sus funciones inhibidoras (Inuzuka y Wada, 1985) y dar lugar a un incremento en el número de copias de los derivados de R6K, hasta más de 10 veces el número inicial de copias. Estas sustituciones pueden estar en el dominio de 40 aminoácidos, que por lo tanto parecen ser responsables del control por Π del número de copias de plásmido (Figura 2), o en otras regiones de la proteína Π .

25 Según una realización ventajosa de la presente invención, la proteína Π , expresada en la célula huésped, resulta de la expresión del gen representado en SEQ ID No. 2 o uno de sus derivados como se ha definido anteriormente y más particularmente del gen *pir* 116 que comprende una mutación cuando se compara con el gen *pir*. Esta mutación corresponde a la sustitución de una prolina por una leucina en la posición 106 desde el codón de inicio. En este contexto, el número de copias de los derivados R6K es aproximadamente 250 copias por genoma.

30 Para los propósitos de la presente invención, el término derivado indica cualquier secuencia que se diferencia de la secuencia considerada, obtenida por una o más modificaciones de naturaleza genética y/o química, así como cualquier secuencia que hibrida con estas secuencias o fragmentos de éstas y cuyo producto posee la actividad indicada respecto a la proteína iniciadora de la replicación Π . El término modificación de naturaleza genética y/o química debe entenderse que se refiere a cualquier mutación, sustitución, delección, adición y/o modificación de uno o más residuos. El término derivado también comprende las secuencias homólogas con la secuencia considerada, obtenidas de otras fuentes celulares y en particular de células de origen humano, o de otros organismos, y que

poseen una actividad del mismo tipo. Dichas secuencias homólogas pueden obtenerse por experimentos de hibridación. Las hibridaciones pueden realizarse empezando con bibliotecas de ácido nucleico, usando la secuencia nativa o un fragmento de ésta como sonda, bajo condiciones convencionales de astringencia (Maniatis et al., cf. General techniques of molecular biology), o, preferiblemente, bajo condiciones de alta astringencia.

- 5 Además de un origen de replicación condicional como se ha definido anteriormente, las moléculas de ADN reivindicadas contienen una región que comprende uno (o más) gene(s) que hacen posible asegurar la selección de la molécula de ADN en el huésped elegido.

Éste puede ser un marcador convencional de tipo génico que confiere resistencia a un antibiótico, tal como kanamicina, ampicilina, cloramfenicol, estreptomycin, espectinomycin, lividomicina o semejantes.

- 10 Sin embargo, según una realización preferida de la invención, esta región es diferente de un gen que confiere resistencia a un antibiótico. Puede ser así un gen cuyo producto sea esencial para la viabilidad del huésped considerado, bajo condiciones de cultivo definidas. Puede ser, por ejemplo:

– un gen que codifica un ARNt supresor, de origen natural o sintético. Es, más preferiblemente, un ARNt de codón ámbar (TAG)

- 15 – un gen cuyo producto es necesario para el metabolismo de la célula, bajo determinadas condiciones de cultivo, concretamente un gen implicado en la biosíntesis de un metabolito (aminoácido, vitamina, etc.), o un gen de catabolismo que hace posible asimilar una sustancia presente en el medio de cultivo (fuente específica de nitrógeno o carbono), etc.

- 20 Según un modo preferido de la invención, esta región contiene un casete de expresión de un gen que codifica un ARNt supresor para codones específicos. Este último puede elegirse, en particular, de aquellos que codifican los aminoácidos fenilalanina, cisteína, prolina, alanina e histidina. Es, más particularmente, un ARNt supresor para codones ámbar (TAG).

- 25 En este caso particular, el sistema usado para seleccionar, en las células huésped, las moléculas de ADN que son la materia de la presente invención incluye dos elementos: 1) en la molécula de ADN, un gen que codifica un ARN de transferencia supresor para los codones ámbar (TAG) que constituye el marcador de selección, conocido como gen (*sup*) y 2) un huésped específico, uno de cuyos genes, que es esencial bajo determinadas condiciones de cultivo, contiene un codón ámbar TAG. Esta célula puede crecer, bajo las condiciones de cultivo para las que el producto del gen que contiene el codón TAG es esencial, sólo si el plásmido que permite la expresión de *sup* está presente en la célula. Las condiciones de cultivo constituyen así la presión para la selección de la molécula de ADN. Los genes *sup* usados pueden ser de origen natural (Glass et al., 1982) o pueden originarse a partir de una construcción sintética (Normanly et al., 1986, Kleina et al., 1990).

- 30 Dicho sistema ofrece una gran flexibilidad debido a, dependiendo del gen que contiene una mutación ámbar, que es posible determinar varios medios selectivos. En la bacteria *Lactococcus lactis* por ejemplo, el codón ámbar está localizado en un gen de la biosíntesis de la purina. Esto permite la selección del plásmido que porta el gen que codifica el ARNt supresor cuando las bacterias se multiplican en leche. Dicho marcador tiene la ventaja de ser muy pequeño y de no contener secuencias "extrañas", que se originan de fagos o transposones.

- 35 Según una realización particular de la invención, la molécula de ADN también comprende un fragmento de ADN, la diana para recombinasas específicas de sitio, que permite la resolución de multímeros de plásmido.

- 40 Así, dicho fragmento, introducido en una molécula de ADN que es circular y cuyo origen de replicación es, por ejemplo, ori gamma, permite la resolución de multímeros de dicho plásmido. Dichos multímeros se observan, en particular, cuando la molécula de ADN se prepara en una cepa que porta un alelo mutado de *pir*, tal como *pir116*, que hace posible incrementar el número de copias de los derivados R6K.

- 45 Esta recombinación puede conseguirse mediante varios sistemas que implican recombinación específica de sitio entre las secuencias. Más preferiblemente, la recombinación específica de sitio de la invención se obtiene mediante secuencias específicas de recombinación intramolecular que son capaces de recombinar entre sí en presencia de proteínas específicas, generalmente referidas como recombinasas. En este caso específico, están las recombinasas XerC y XerD. Por esta razón, las moléculas de ADN según la invención también comprenden generalmente una secuencia que permite esta recombinación específica de sitio. El sistema específico de recombinación presente en las construcciones genéticas según la invención (recombinasas y sitio específico de reconocimiento) pueden tener diferentes orígenes. En particular, las secuencias y las recombinasas específicas usadas pueden pertenecer a diferentes clases estructurales, y en particular a la familia resolvasa del transposón Tn3 o a la familia integrasa del bacteriófago lambda. Entre las recombinasas que pertenecen a la familia del transposón Tn3, puede mencionarse la resolvasa del transposón Tn3 o de los transposones Tn21 y Tn522 (Stark et al., 1992); la invertasa Gin del bacteriófago mu o alternativamente resolvasas plamídicas, tales como la del fragmento *par* de RP4 (Abert et al., Mol. Microbiol. 12 (1994) 131). Entre las recombinasas que pertenecen a la familia integrasa del bacteriófago λ, puede mencionarse en particular la integrasa de los fagos lambda (Landy et al., Science 197 (1977) 1147), P22 y Φ80 (Leong et al., J. Biol. Chem. 260 (1985) 4468), HP1 de *Haemophilus influenzae* (Hauser et al., J. Biol. Chem. 267

(1992) 6859), la integrasa Cre del fago P1, la integrasa del plásmido pSAM2 (EP 350 341) o alternativamente la recombinasa FLP del plásmido 2 μ y las recombinasas XerC y XerD de *E. coli*.

Preferiblemente, las moléculas de ADN que forman la materia de la presente invención, contienen el fragmento *cer* del plásmido de *E. coli* natural ColE1. El fragmento *cer* usado es un fragmento de 382 pb *Hpa*II de ColE1 que se ha mostrado que realiza, en *cis*, la resolución de multímeros de plásmido (Summers *et al.*, 1984; Leung *et al.*, 1985). También es posible usar un fragmento *Hpa*II-*Taq*I de tamaño similar (280 pb) o un fragmento más pequeño (aproximadamente 220 pb), contenido en el fragmento *Hpa*II, fragmentos que poseen las mismas propiedades (Summers y Sherratt, 1988). Esta resolución tiene lugar mediante recombinación intramolecular específica, que implica cuatro proteínas codificadas por el genoma de *E. coli*: ArgR, PepA, XerC y XerD (Stirling *et al.*, 1988, 1989; Colloms *et al.*, 1990, Blakely *et al.*, 1993). Se encontró que la inserción del fragmento *cer* del plásmido de *E. coli* natural ColE1 permite obtener una alta resolución de multímeros de plásmido, lo que resulta de esta manera en una alta proporción de monómeros de una manera reproducible. Esto resulta particularmente inesperado porque se ha mostrado que la inserción del sitio *cer* en un minicírculo que contiene el origen de replicación de ColE1 de pBluescript SK+ no resultó en una resolución de multímero eficaz (Kreiss *et al.*, Appl.Microbiol.Biotechnol, 49:560-567 (1998)), y así la resolución eficaz en *cis* de plásmidos es impredecible y parece depender de la conformación del plásmido. En el caso del plásmido pCOR, se logra una resolución eficaz en *cis* cuando *cer* está presente en pCOR, lo que resulta de esta manera en una alta cantidad de monómeros inesperada de pCOR de una manera reproducible.

A este respecto, es particularmente ventajoso usar todo o parte del fragmento *cer* de ColE1 o uno de sus derivados como se ha definido anteriormente.

Según una variante de implementación, las moléculas de ADN de la invención también pueden comprender una secuencia capaz de interactuar específicamente con un ligando. Preferiblemente, ésta es una secuencia capaz de formar, por hibridación, una triple hélice con un oligonucleótido específico. Esta secuencia hace así posible purificar las moléculas de la invención por hibridación selectiva con un oligonucleótido complementario inmovilizado en un soporte (véase la solicitud WO 96/18744 y WO 02/07727). La secuencia puede estar presente de forma natural en el origen de replicación del plásmido como se describe en la publicación de solicitud US 2003/186268 del Solicitante, o estar presente de forma natural en el transgén como se describe en WO 02/07727, y alternativamente puede estar situada en cualquier sitio de la molécula de ADN de la invención, siempre que no afecte la funcionalidad del gen de interés y del origen de replicación. La formación de una triple hélice por hibridación ocurre así entre el oligonucleótido y la secuencia complementaria específica presente en el ADN. En este sentido, para obtener los mejores rendimientos y la mejor selectividad, en el método de la invención se utilizan un oligonucleótido y una secuencia específica que son totalmente complementarios. Estos pueden ser, en particular, una oligonucleótido poli(CTT) y una secuencia específica poli(GAA). Por ejemplo, los oligonucleótidos que contienen restos repetidos tales como CTT son capaces de formar una triple hélice con una secuencia específica que contenga unidades complementarias (GAA). La secuencia en cuestión puede, en particular, ser una región que contenga 7, 14 o 17 unidades GAA, y en los oligonucleótidos un número correspondiente de repeticiones CTT. En este caso, el oligonucleótido se une en una orientación antiparalela a la cadena de polipurina. Estas triples hélices son estables sólo en presencia de Mg²⁺ (Vasquez *et al.*, Biochemistry, 34: 7243-7251 (1995); Beal y Dervan, Science, 251: 1360-1363 (1991)).

Como se ha indicado anteriormente, la secuencia específica puede ser una secuencia presente de forma natural en pCOR, o puede ser una secuencia sintética introducida artificialmente en este último. Es especialmente ventajoso utilizar un oligonucleótido capaz de formar una triple hélice con una secuencia que está presente de forma natural en pCOR, por ejemplo, en el origen de replicación de un plásmido o en un gen marcador. La síntesis de oligonucleótidos capaces de formar triples hélices con estas regiones naturales de homopurina-homopirimidina es particularmente ventajosa, ya que puede aplicarse a plásmidos pCOR no modificados. Las secuencias diana particularmente preferidas que pueden formar estructuras tríplex con oligonucleótidos particulares se han identificado en los orígenes de replicación en ColE1 y en pCOR. Los plásmidos derivados de ColE1 contienen una secuencia de homopurina de 12-mer (5'-AGAAAAAAGGA-3') (SEQ ID NO: 33) mapeada en posición 5' respecto al transcrito de ARN-II implicado en la replicación del plásmido (Lacatena *et al.*, Nature, 294:623 (1981)). Esta secuencia forma una estructura tríplex estable con el oligonucleótido complementario de 12-mer 5'-TCTTTTTTTCCT-3' (SEQ ID NO: 34). La parte central de pCOR contiene una cadena de homopurina de 14 bases no repetidas (5'-AAGAAAAAAGAA-3') (SEQ ID NO: 35) localizada en el segmento rico en A+T del origen de replicación y de pCOR (Levchenko *et al.*, Nucleic Acids Res., 24, 1936(1996)). Esta secuencia forma una estructura tríplex estable con el oligonucleótido complementario de 14-mer 5'-TTCTTTTTTTTCTT-3' (SEQ ID NO: 36). Los oligonucleótidos correspondientes 5'-TCTTTTTTTCCT-3' (SEQ ID NO: 37) y 5'-TTCTTTTTTTTCTT-3' (SEQ ID NO: 38) localizan de manera eficaz y específica sus secuencias complementarias respectivas localizadas en el origen de replicación de ColE1 ori o pCOR (oriy). También, la utilización de un oligonucleótido capaz de formar una triple hélice con una secuencia presente en un origen de replicación o en un gen marcador es especialmente ventajosa, ya que hace posible, con el mismo oligonucleótido, la purificación de cualquier ADN que contiene dicho origen de replicación o dicho gen marcador. Por lo tanto, no es necesario modificar el plásmido o el ADN bicatenario hebra con el fin de incorporar en éste una secuencia artificial específica.

Aunque se prefieren secuencias totalmente complementarias, se entiende, sin embargo, que pueden tolerarse algunos emparejamientos erróneos entre la secuencia del oligonucleótido y la secuencia presente en el ADN, siempre que no den lugar a una gran pérdida de afinidad. Puede mencionarse la secuencia 5'-AAAAAAGGGAATAAGGG-3' (SEQ ID NO: 39) presente en el gen de β -lactamasa de *E. coli*. En este caso, la timina que interrumpe la secuencia de polipurina puede reconocerse mediante una guanina de la tercera hebra, formando así un triplete G*TA que es estable cuando está flanqueado por dos tripletes T*AT (Kießling et al., *Biochemistry*, 31:2829-2834 (1992)).

Según una realización particular, los oligonucleótidos usados pueden comprender la secuencia (CCT)_n, la secuencia (CT)_n o la secuencia (CTT)_n, en las que n es un número entero entre 1 y 15 inclusive. Es especialmente ventajoso usar secuencias del tipo (CT)_n o (CTT)_n. Los oligonucleótidos también pueden combinar unidades (CCT), (CT) o (CTT).

Los oligonucleótidos usados pueden ser naturales (compuestos por bases naturales sin modificar) o pueden estar modificados químicamente. En particular, el oligonucleótido puede tener ventajosamente determinadas modificaciones químicas que permiten incrementar su resistencia a o su protección frente a nucleasas o su afinidad por la secuencia específica.

Como una molécula de ADN representativa de la presente invención, el plásmido pXL2774 y sus derivados pueden reivindicarse más particularmente. Para los propósitos de la invención, el término derivado se entiende que se refiere a cualquier construcción derivada de pXL2774 y que contiene uno o más genes de interés distintos del gen de la luciferasa. También pueden mencionarse los plásmidos pXL3029, pXL3030, y el plásmido pXL3179 o NV1FGF que contienen un casete de expresión de un gen terapéutico. En una realización lo más preferida, la invención se refiere a un pCOR que comprende el gen FGFa o FGF-1 como se describe en la patente US 4.686.113 del Solicitante, que se designa pXL 3179 o NV1FGF.

La presente invención también se refiere al desarrollo de un proceso para la construcción de células huésped específicas, que son particularmente eficaces para la producción de estas moléculas de ADN terapéuticas.

Otra materia de la presente invención se refiere a un proceso para la producción de una molécula de ADN circular, caracterizado porque se cultiva una célula huésped que contiene al menos una molécula de ADN como se ha definido anteriormente y una proteína, que puede o no expresarse *in situ*, que condiciona la funcionalidad del origen de replicación de dicha molécula de ADN, que es específica y que es extraña para dicha célula huésped, bajo condiciones que permiten la selección de las células huésped transformadas con dichas moléculas de ADN.

Más preferiblemente, la proteína que condiciona la funcionalidad del origen de replicación de la molécula de ADN se expresa *in situ* a partir de un gen correspondiente. El gen que codifica la proteína iniciadora de la replicación puede estar portado por un replicón subsidiario, que es compatible con los derivados del origen de replicación condicional usado o que puede introducirse en el genoma de la célula huésped por recombinación, mediante un transposón, un bacteriófago o cualquier otro vector. En el caso particular en el que el gen que expresa la proteína se pone en un replicón subsidiario, el último también contiene una región promotora para la transcripción funcional en la célula, así como una región que está localizada en el extremo 3' y que especifica una señal de terminación de la transcripción. Respecto a la región promotora, ésta puede ser una región promotora que es responsable de forma natural de expresar el gen considerado cuando el último es capaz de funcionar en la célula. También puede ser el caso de regiones de origen diferente (responsables de la expresión de otras proteínas) o incluso de origen sintético. En particular, puede ser el caso de secuencias promotoras para genes procariotas o de bacteriófago. Por ejemplo, puede ser el caso de secuencias promotoras obtenidas del genoma celular.

Como genes que codifican la proteína iniciadora de la replicación, pueden usarse genes de tipo salvaje o de alelos mutados que hacen posible obtener un número incrementado de copias de los plásmidos (o derivados) específicos para la proteína iniciadora que condiciona la funcionalidad del origen de replicación usado en la molécula de ADN.

Dichos mutantes se han descrito en particular para los plásmidos R6K (Inuzuka y Wada, 1985; Greener *et al.*, (1990), Rts1 (Terawaki y 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).

En el caso particular en el que la molécula de ADN usada posea un origen de replicación derivado del plásmido R6K, la proteína iniciadora es un derivado de la proteína Π de este mismo plásmido. Es particularmente ventajoso expresar una forma mutada de esta proteína que sea capaz de incrementar el número de copias inicial de manera apreciable. Para hacer esto, el gen incorporado en la célula huésped está representado preferiblemente por todo o parte de la secuencia representada en SEQ ID No. 2 o uno de sus derivados y más preferiblemente por el gen *pir116*. La mutación asociada corresponde a la sustitución de una prolina por una leucina. Según una realización particular de la invención, este gen *pir116* se incorpora directamente en el genoma de la célula huésped.

Ventajosamente, uno de los genes de la célula huésped específica, que es esencial bajo las condiciones de cultivo elegidas, contiene un codón específico que es reconocible por el ARNt supresor seleccionado en la molécula de ADN. Según un modo preferido de la invención, éste es un codón ámbar TAG. En este caso particular, la célula

puede crecer, bajo las condiciones de cultivo para las que el producto del gen que contiene el codón TAG es esencial, sólo si el plásmido que permite la expresión de *sup* está presente en la célula huésped. Las condiciones de cultivo constituyen así la presión para la selección de la molécula de ADN.

Preferiblemente, el gen que contiene el codón ámbar es un gen implicado en la biosíntesis de un aminoácido, arginina. Este gen, *argE*, codifica una N-acetilornitinasasa (Meinzel *et al.*, 1992) y en este caso contiene un codón TAG correspondiente a una mutación puntual Gln-53 (CAG)-> TAG; la presión de la selección del plásmido que porta el gen *sup* se proporciona por el cultivo en medio mínimo M9 (Maniatis *et al.*, 1989). Sin embargo, éste también podría ser, por ejemplo, un gen para la biosíntesis de una vitamina o una base de ácido nucleico, o alternativamente un gen que permite usar una fuente específica de nitrógeno o carbono o cualquier otro gen cuya funcionalidad es esencial para la viabilidad celular bajo las condiciones de cultivo elegidas.

La célula huésped se elige preferiblemente de cepas de *E. coli* y está representada más preferiblemente por la cepa de *E. coli* XAC-1.

Según una realización específica de la invención, la célula huésped usada en el proceso reivindicado es una célula de la cepa de *E. coli* XAC-1, que contiene el gen *pir116* en su genoma y transformada por el plásmido pXL2774 o uno de sus derivados.

Según una variante ventajosa de la invención, la célula huésped usada en el proceso reivindicado es una célula procarionta en la que el gen *endA1* o un gen homólogo está inactivado. El gen *endA* codifica la endonucleasa I de *E. coli*. Esta enzima periplásmica tiene una actividad no específica de escindir ADN bicatenario (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 en varias cepas de *Escherichia coli* (tipo salvaje o *endA*) mostró que la degradación de ADN plasmídico incubado en extractos de estas cepas bacterianas se produjo en las cepas *endA+* pero no en los mutantes *endA*. (Wendt S. (1994) BioTechniques 17: 270-272). La calidad del ADN plasmídico aislado de las cepas *endA+* o de los mutantes *endA* la estudió la empresa Promega usando 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 como sigue: 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 se ve afectada así por cualquier contaminación con esta endonucleasa (degradación relativamente a largo plazo del ADN).

La delección o mutación del gen *endA* puede considerarse sin dificultad debido a que los mutantes que no tienen más esta actividad endonucleasa se comportan en conjunto como bacterias de tipo salvaje (Dürwald, H. y H. Hoffmann-Berling (1968) J. Mol. Biol. 34: 331-346).

El gen *endA1* puede inactivarse por mutación, delección total o parcial, disrupción, etc. La inactivación del gen *endA* de la cepa de *E. coli* elegida para producir los plásmidos pCOR puede conseguirse más particularmente transfiriendo, mediante el bacteriófago P1, la delección $\Delta_{endA}::Tc^R$ 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 Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. Gene 158:9-14) o intercambiando el alelo de tipo salvaje presente en el genoma de la bacteria de interés por un alelo mutado o deleccionado de *endA*, por recombinación homóloga. El uso de este tipo de cepa en el contexto de la presente invención hace posible mejorar ventajosamente la calidad del ADN producido.

La invención también se refiere a cualquier célula recombinante que contiene una molécula de ADN como se ha definido anteriormente. Ésta puede ser una célula de varios orígenes, de tipo eucariota, procarionta, etc.

Según otra realización de la invención, la célula huésped *E. coli* XAC-1 usada en el proceso reivindicado se designa TEX1, y comprende un gen *traD*, o un gen homólogo de éste, inactivado para impedir la transferencia F'. El *traD* está en el extremo 5' de uno del operón *tra* y codifica una proteína de membrana de 81,7 kDa que está implicada directamente en la transferencia de ADN y en el metabolismo del ADN (Frost *et al.*, Microbiology Reviews, 1994, 58: 162-210). Los mutantes *traD* no transfieren ADN (Panicker *et al.*, J. Bacteriol., 1985, 162:584-590). El gen episomal *traD* puede inactivarse por mutación, delección total o parcial, o disrupción usando métodos muy conocidos para los expertos en la técnica (Véase el Ejemplo 9). Un método para inactivar este gen se describe en el Ejemplo 1, y la cepa resultante *E. coli* XAC-1 *pir116 endA traD* así obtenida se designa TEX1 (Soubrier *et al.*, Gene Therapy, 1999, 6: 1482-1488).

Según una realización de la invención, la célula huésped usada en el proceso reivindicado es una célula de la cepa de *E. coli* XAC-1, que contiene la mutación *pir116* combinada con la mutación *pir42*. Las mutaciones *pir116* y *pir42* afectan a diferentes dominios de la proteína pi. La mutación *pir116* afecta la región de control del número de copias, mientras que la mutación *pir42* afecta el resto de cremallera de leucina potencial, como se muestra en la Figura 11. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos del gen *pir* que contiene las mutaciones *pir116* y *pir42* se muestran en la Figura 12 y SEQ ID NOs: 21 y 22, respectivamente. La mutación *pir42* comprende una transición C a T en la posición 124 del codón iniciador de metionina, y resulta así en la sustitución de la prolina en la posición 42 por una

leucina. La mutación *pir42* la describió Miron et al. (Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. 91 (14): p. 6438-42; EMBO J, 1992. 11 (3): p. 1205-16), y se indicó que incrementaba el número de copias de un plásmido "ori gamma R6K-Km^R - *pir42*" 2,5 veces comparado con el mismo plásmido que alberga el gen *pir* de tipo salvaje. Sin embargo, la mutación *pir42* no se usó ni se describió nunca en combinación con la mutación *pir116* y aunque otras mutaciones que resultan en alto número de copias tales como *cop21* en el gen *pir* combinadas con *pir116* no presentan un incremento en el número de copias del plásmido, la combinación de las mutaciones *pir116* y *pir42* en una cepa de *E. coli* XAC-1 *endA*⁻ *traD*⁻ mostró sorprendentemente un incremento significativo del número de copias del plásmido. Los solicitantes han mostrado así resultados inesperados de esta combinación en términos de número de copias de los plásmidos producidos en cepas huésped de *E. coli* que comprenden el gen mutado *pir116* y *pir42* comparado con cepas que albergan *pir116* solo, o en una célula huésped que comprende la mutación *pir116* combinada con otra mutación del gen *pir*, tal como la mutación *cop21* (Inuzuka et al., FEBS Lett, 1988. 228 (1): p. 7-11). Por ejemplo, *E. coli* TEX1*pir42* (=XAC-1 *endA*⁻ *traD*⁻ *pir116* *pir42*) presentó un incremento de 2,5 veces en el número de plásmidos, comparado con una cepa *pir116*, o cepas que comprenden mutaciones combinadas *pir116* y *cop21* (Véase el Ejemplo 11). En otras realizaciones, el gen *pir* comprende al menos una mutación, que, por ejemplo, puede ocurrir en la región de control del número de copias, en el resto semejante a cremallera de leucina, en la región de unión a ADN, o en una o más de estas regiones o en otra región de la proteína pi codificada por el gen *pir*.

La célula huésped procariota según la presente invención también comprende una o más mutaciones en el mismo dominio o en uno diferente de la proteína pi, codificada por la copia del gen *pir*, tal como el dominio de unión a ADN, y/o la región de control del número de copias y/o el resto de cremallera de leucina. La célula huésped procariota recombinante puede comprender el gen heterólogo *pir* en un plásmido o en el genoma de la célula huésped.

Dichas mutaciones pueden cribarse usando el método de cribado basado en fluorescencia según un aspecto de la presente invención como se describe más adelante. Como se muestra en el Ejemplo 13, las células huésped que comprenden al menos una mutación en el gen *pir*, la mutación *pir116* y una mutación en el dominio de unión a ADN se cribaron usando el método de cribado basado en fluorescencia según la presente invención. Las células huésped que comprenden las mutaciones presentes en el dominio de unión a ADN además de *pir116*, es decir, como por ejemplo en la construcción 100B, en la que la tirosina (K) en la posición 292 se sustituye por una metionina (M), en la construcción 114C, en la que un ácido glutámico (E) en la posición 130 se sustituye por una valina (V), o en la construcción 201C, en la que un ácido aspártico (D) en la posición 117 se sustituye por una glicina (G) (Fig. 26) se ensayan para su capacidad de producir un número alto de copias de plásmido usando el método de cribado basado en fluorescencia.

Según otra realización de la presente invención, la célula huésped usada en el proceso reivindicado es una célula huésped procariota en la que el gen *recA* o un gen homólogo se ha inactivado. Preferiblemente, la célula huésped según la presente invención es la cepa de *E. coli* XAC-1 que comprende las mutaciones *pir116*, *pir42*, *endA*⁻, *traD*⁻, *recA*⁻. Dicha cepa se designa TEX2*pir42*. *recA* puede inactivarse por métodos muy conocidos para los expertos en la técnica. *recA* codifica una proteína de recombinación principal y las mutaciones en este gen reducen la frecuencia de alteración mediada por recombinación en los plásmidos y la recombinación intramolecular que podría dar lugar a la multimerización de los plásmidos. Como se describe en el Ejemplo 12, puede obtenerse por PCR un gen *recA* delecionado que contiene 3 codones de parada de la traducción (uno en cada marco) en su extremo 5'. El gen inactivado resultante se introdujo por reemplazo génico en el genoma de TEX1 (Ejemplo 12.1).

Estas células se obtienen por cualquier técnica conocida por los expertos en la técnica que permita la introducción de dicho plásmido en una célula dada. Dicha técnica puede ser, en particular, transformación, electroporación, conjugación, fusión de protoplastos o cualquier otra técnica conocida por los expertos en la técnica.

La cepa XAC-1*pir116* se depositó bajo los términos del Tratado de Budapest con la Collection Nationale De Cultures de Micro-organismes (CNCM), Instituto Pasteur, 28, calle Dr. Roux, 75724 París Cedex 15, Francia, el 10 de octubre, 2003 con el no. de registro I-3108.

La cepa TEX2*pir42* se depositó bajo los términos del Tratado de Budapest con la Collection Nationale De Cultures de Micro-organismes (CNCM), Instituto Pasteur, 28, calle Dr. Roux, 75724 París Cedex 15, Francia, el 10 de octubre, 2003 con el no. de registro I-3109.

Las moléculas de ADN según la invención pueden usarse en cualquier aplicación de vacunación o de terapia génica y celular para transferir un gen a una célula, tejido u organismo dado, o para la producción de proteínas recombinantes *in vitro*.

En particular, pueden usarse para la administración directa *in vivo* o para la modificación de células *in vitro* o *ex vivo*, para el propósito de implantarlas en un paciente.

A este respecto, otra materia de la presente invención se refiere a cualquier composición farmacéutica que comprende al menos una molécula de ADN como se ha definido anteriormente. Esta molécula puede estar o no asociada en ella con un vector de transfección químico y/o bioquímico. Esto puede implicar en particular cationes (fosfato de calcio, DEAE-dextrano, etc.) o liposomas. Los vectores sintéticos asociados pueden ser polímeros

catiónicos o lípidos. Los ejemplos de dichos vectores que pueden mencionarse son DOGS (Transfectam[™]) o DOTMA (lipofectin[™]).

5 Las composiciones farmacéuticas según la invención pueden formularse para el propósito de administraciones tópica, oral, parenteral, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraocular, o transdérmica. El plásmido reivindicado se usa preferiblemente en una forma inyectable o en aplicación. Puede mezclarse con cualquier vehículo que sea farmacéuticamente aceptable para una formulación inyectable, en particular para una inyección directa en el sitio que se va a tratar. Esto puede implicar, en particular, disoluciones isotónicas estériles o composiciones secas, en particular composiciones liofilizadas, que, por adición, dependiendo del caso, de agua esterilizada o de disolución salina fisiológica, permiten preparar disoluciones inyectables. Esto puede implicar en particular tampones Tris o PBS diluidos en glucosa o en cloruro de sodio. Una inyección directa en la región afectada del paciente es ventajosa ya que permite que el efecto terapéutico se concentre a nivel de los tejidos afectados. Las dosis usadas pueden adaptarse como una función de varios parámetros, y en particular como una función del gen, del vector, del modo de administración usado, de la patología considerada o de la duración deseada del tratamiento.

15 Las moléculas de ADN de la invención pueden contener uno o más genes de interés, es decir uno o más ácidos nucleicos (ADN, ADN_g, ADN_c, etc., sintéticos o semisintéticos) cuya transcripción y, posiblemente, cuya traducción en la célula diana genere productos con interés terapéutico, vacunal, agronómico o veterinario.

20 Entre los genes de interés terapéutico que pueden mencionarse más particularmente están los genes que codifican enzimas, derivados sanguíneos, hormonas y linfoquinas: interleuquinas, interferones, TNF, etc. (FR 92/03120), factores de crecimiento, neurotransmisores o sus precursores o enzimas sintéticas y factores tróficos (BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, NT3, NT5, VEGF-B, VEGF-C etc.; apolipoproteínas: ApoA1, ApoAIV, ApoE, etc. (FR 93/05125), distrofina o una minidistrofina (FR 91/11947), 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 alternativamente todo o parte de una inmunoglobulina natural o artificial (Fab, ScFv, etc.), un ligando ARN (WO 91/19813), etc. El gen terapéutico también puede ser una secuencia o gen antisentido, cuya expresión en la célula diana hace posible el control de la expresión de genes o la transcripción de ARNm celulares. Dichas secuencias pueden transcribirse, por ejemplo en la célula diana, en ARN que son complementarios a ARN celulares y bloquear así su traducción en proteína, según la técnica descrita en la patente EP 140,308. Un inserto de interés que puede portar pCOR de la invención es un ARNi, que es capaz de interferir con la traducción de un gen diana (Wilson et al., Curr Opin Mol Ther. 2003 Ago;5(4):389-96) y regular de esta manera la expresión de dicho gen.

30 El gen de interés también puede ser un gen de vacunación, es decir un gen que codifica un péptido antigénico, capaz de generar una respuesta inmune en un ser humano o en animales, para el propósito de producir vacunas. Estos péptidos antigénicos pueden ser en particular péptidos antigénicos específicos del virus de Epstein-Barr, virus VIH, virus de la hepatitis B (EP 185,573), o virus de pseudorabia o alternativamente péptidos antigénicos específicos de tumores (EP 259,212).

40 Generalmente, en las moléculas de ADN de la invención, el gen de interés terapéutico, vacunal, agronómico o veterinario también contiene una región promotora para la transcripción funcional en el organismo o célula diana, así como una región localizada en el extremo 3' que especifica una señal de terminación de la transcripción y un sitio de poliadenilación. Respecto a la región promotora, puede ser una región promotora que es responsable de forma natural de la expresión del gen considerado cuando esta región es capaz de funcionar en la célula u organismo considerado. Las regiones promotoras también pueden ser regiones de origen diferente (responsables de la expresión de otras proteínas) o incluso de origen sintético. En particular, pueden ser secuencias promotoras de genes eucarióticos o virales. Por ejemplo, pueden ser secuencias promotoras obtenidas del genoma de la célula diana. Entre los promotores eucariotas que pueden usarse están cualesquiera promotores o secuencia derivada que estimula o suprime la transcripción de un gen de una manera específica o no específica, inducible o no inducible, fuerte o débil. Los promotores eucariotas pueden ser en particular promotores ubicuos (promotores de los genes de HPRT, PGK, α -actina, tubulina, etc.), promotores de filamento intermedios (promotores de los genes de GFAP, desmina, vimentina, neurofilamentos, queratina, etc.), promotores de genes terapéuticos (por ejemplo los promotores de los genes de MDR, CFTR, factor VIII, ApoA1, etc.) promotores específicos de tejido (promotores de los genes de piruvato quinasa, villina, proteína de unión de ácidos grasos intestinal, α -actina de músculo liso, etc.) o alternativamente promotores que responden a un estímulo (receptor de la hormona esteroide, receptor del ácido retinoico, etc.). De manera similar, pueden ser secuencias promotoras obtenidas del genoma de un virus, tal como, por ejemplo, los promotores de los genes de adenovirus E1A y MLP, el promotor temprano de CMV o alternativamente el promotor LTR de RSV, etc. Además, estas regiones promotoras pueden modificarse por adición de secuencias activadoras o reguladoras o secuencias que permiten la expresión específica de tejido o la expresión que es predominantemente específica de tejido.

60 Además, el gen de interés también puede contener una secuencia señal que dirija el producto sintetizado a las rutas de secreción de la célula diana. Esta secuencia señal puede ser la secuencia señal natural del producto sintetizado, pero también puede ser cualquier otra secuencia señal funcional o una secuencia señal artificial. La secuencia señal

preferida usada según la presente invención es el péptido señal de secreción del interferón humano como describen Taniguchi et al. (Gene, 1980,233 (4763):541-5)

5 Dependiendo del gen de interés, las moléculas de ADN de la invención pueden usarse para el tratamiento o prevención de varias patologías, incluyendo enfermedades genéticas (distrofia, fibrosis quística, etc.), enfermedades neurodegenerativas (enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, ALS, etc.), cánceres, patologías asociadas con trastornos de la coagulación o con dislipoproteinemias, patologías asociadas con infecciones virales (hepatitis, SIDA, etc.), o en los campos agronómico y veterinario, etc.

10 Según una realización preferida, las moléculas de ADN de la presente invención se usan para tratar patologías de isquemia de miembros crítica tales como por ejemplo enfermedad arterial periférica oclusiva y claudicación intermitente.

15 Además, la presente invención también se refiere al uso de moléculas de ADN con replicación condicional para la producción de proteínas recombinantes. Pueden usarse bacterias para producir proteínas de diferentes orígenes, eucariotas o procariotas. Entre las bacterias, *E. coli* constituye el organismo de elección para expresar genes heterólogos teniendo en cuenta su facilidad de manipulación, el gran número de sistemas de expresión disponibles y las grandes cantidades de proteínas que pueden obtenerse. Se entiende que el sistema de la invención puede usarse en otros organismos, determinándose el tropismo por la naturaleza del origen de replicación, como se ha indicado anteriormente. Para este uso, la secuencia de ácido nucleico de interés comprende una región codificadora bajo el control de señales de expresión que son apropiadas para el huésped elegido, en particular un huésped procarionota. Éstas pueden ser, por ejemplo, promotores Plac, Ptrp, PT7, Ptrc, P_{tac}, PL, P_{BAD} o PR, la secuencia Shine-Dalgarno, etc. (este conjunto constituye el casete de expresión). La secuencia de ácido nucleico de interés puede ser cualquier secuencia que codifica una proteína que es valiosa en los campos de farmacia, agro-alimentos, química o agroquímica. Éste puede ser un gen estructural, una secuencia de ADN complementaria, una secuencia sintética o semisintética, etc.

25 El casete de expresión puede introducirse en el vector de replicación condicional que es la materia de la invención, constituyendo así un vector de replicación condicional que permite la expresión de proteínas de interés en *E. coli*. Este vector tiene varias ventajas: no se usa antibiótico para seleccionarlo en la bacteria (coste reducido, no hay necesidad de un estudio respecto a la presencia de antibiótico o de productos derivados potencialmente tóxicos en el producto terminado), virtualmente no hay probabilidad de diseminación del plásmido en la naturaleza (origen de replicación condicional), posible fermentación en un medio completamente definido. Los ejemplos dados muestran las propiedades ventajosas de estos vectores condicionales para la producción de proteínas recombinantes.

30 Como se ha descrito anteriormente, la molécula de ADN según la presente invención comprende un origen de replicación ORly derivado de R6K en el que el gen *pir* se elimina y se introduce en el genoma de una célula huésped específica que se usa para la producción de las moléculas de ADN a gran escala. Existe siempre una necesidad de producir cantidades crecientes de plásmido para ensayos clínicos y/o para uso en terapia génica basada en ADN. La células huésped productoras se han sometido a ingeniería para portar el gen *pir* que contiene al menos una mutación, tal como la mutación *pir116* y/o *pir42*. El uso de dicha cepa huésped mutada resulta en un incremento del número de copias de los plásmidos y eleva así significativamente el rendimiento de la producción. También, la conformación de los plásmidos así producidos es muy satisfactoria.

40 Según un aspecto particular, se proporciona un nuevo método basado en fluorescencia para el cribado de mutantes con alto número de copias. Este método de cribado basado en fluorescencia es muy superior al método clásico de cribado basado en el nivel de resistencia a antibióticos en bacterias, que puede no usarse cuando el número de copias basal del plásmido es ya muy alto tal como el obtenido usando el mutante *pir116*, por ejemplo, aproximadamente 400 copias de plásmido por célula. El método de cribado basado en fluorescencia según la presente invención usa preferiblemente el gen *cobA* como gen informador de fluorescencia roja del número alto de copias. El gen *cobA* que es un gen de *Pseudomonas denitrificans* (Crouzet et al., J. Bacteriol. 1999, 172: 5968-79) codifica uro III metiltransferasa, una enzima de la ruta de la vitamina B12, que añade dos grupos metilo a la molécula de urógeno III. Wildt et al. (Nature Biotechnology, vol. 17, 1999, pp1175) ha descrito el uso de *cobA* como un gen informador transcripcional fluorescente para células de *E. coli*, levadura y mamífero. Por ejemplo, dicho gen informador fluorescente se usó para la selección de cepas de *E. coli* que contienen plásmidos recombinantes que acumulan compuestos porfirinoides fluorescentes debido a la sobreexpresión del gen *cobA* que codifica la uroIII metiltransferasa. Cuando se iluminan con luz UV, las células emiten fluorescencia con un color rojo brillante (Biotechniques, 1995, vol 19, no. 7, p. 760).

55 El Solicitante ha encontrado sorprendentemente una correlación cercana entre el número de copias del plásmido que porta el gen *cobA* y el nivel de fluorescencia de rosa a rojo. El método de cribado basado en fluorescencia de mutantes con alto número de copias según la presente invención es así útil para cribar varios mutantes que pueden evaluarse en el genoma de la célula huésped productora, tal como *E.coli*, o mutantes de cualesquiera genes tal como en el gen *pir*, que se insertan en el genoma de la célula huésped productora o son portados en un plásmido.

Además de la correlación con el número de copias de los plásmidos, el método de cribado basado en fluorescencia de la presente invención se realiza fácilmente y rápidamente ya que sólo requiere plaquear y cultivar las células

huésped transformadas toda la noche y exponerlas a luces UV, para revelar la intensidad de la fluorescencia producida, deduciendo de esta manera directamente el número de copias de plásmidos en la célula huésped.

Así, la presente invención proporciona un método para detectar una mutación que resulta en alto número de copias de plásmido que comprende:

- 5 (a) introducir al menos una mutación en una secuencia diana;
- (b) transformar la secuencia diana mutada en una célula huésped que comprende un plásmido, en el que el plásmido comprende una secuencia de nucleótidos que codifica uroIII metiltransferasa y el número de copias del plásmido se ve afectado por la secuencia diana;
- 10 (c) crecer la célula huésped bajo condiciones en las que se expresa la secuencia de nucleótidos para producir un cultivo de células huésped;
- (d) exponer el cultivo de células huésped a luz UV; y
- (e) detectar la fluorescencia producida por el cultivo de células huésped.

Según la presente invención, el método comprende además comparar la fluorescencia detectada en (e) con la fluorescencia producida por un cultivo de células huésped que comprende una secuencia diana no mutada.

- 15 Preferiblemente, el gen de la uroIII metiltransferasa está codificado por el gen *cobA* de *Pseudomonas denitrificans*.

La mutación puede estar presente en un plásmido que comprende un gen *pir* heterólogo que comprende al menos una mutación. El plásmido puede comprender al menos una mutación en las otras regiones de *pir* tales como en la región de control del número de copias y/o en el dominio de unión a ADN, y/o en el resto de cremallera de leucina y/o en otra región del gen *pir*. También, el plásmido puede comprender al menos una mutación en la región de control del número de copias y el resto semejante a una cremallera de leucina del gen *pir* heterólogo. El plásmido puede comprender además una mutación en la región de unión a ADN del gen *pir*. Además, el plásmido puede comprender una o más mutaciones en la misma o una región diferente del gen *pir* que codifica la región de control del número de copias y/o en el dominio de unión a ADN, y/o en el resto semejante a una cremallera de leucina u otra región de la proteína Π .

- 25 Dentro de la limitación, la célula huésped recombinante procarionta según la presente invención comprende la mutación *pir116* y una segunda mutación en la región de unión a ADN tal como *pir292*, *pir130*, o *pir117* (Fig. 26).

Dicha cepa huésped mutada productora puede producirse ventajosamente usando una herramienta de plásmido universal tal como el minicírculo. La tecnología de minicírculo se describe entre otras en las patentes US 6.143,530 y 6,492,164 del Solicitante o en la solicitud PCT WO 96/26270.

- 30 Los minicírculos son moléculas de ADN recombinantes que no contienen ningún origen de replicación y así representan un vector suicida excelente para el reemplazo de genes del genoma de cualquier microorganismo. En particular, el gen o genes de interés están flanqueados por las dos secuencias que permiten la recombinación específica de sitio, situadas en la orientación directa en el minicírculo. La posición en la orientación directa indica que las dos secuencias siguen la misma polaridad 5'-3' en el minicírculo de ADN recombinante. Las construcciones genéticas de minicírculo son generalmente moléculas de ADN bicatenario circular que carecen de origen de replicación pero también pueden estar en forma lineal y contener el gen o genes de interés flanqueados por las dos secuencias que permiten la recombinación específica de sitio, situadas en la orientación directa. Según esta realización particular de la invención, el minicírculo puede usarse para transformar cualquier microorganismo competente para el propósito del reemplazo génico en el genoma de éste (Figura 31).

- 40 El minicírculo para el reemplazo génico se genera a partir de un plásmido parental que comprende al menos:

- a) un origen de replicación y un gen marcador de selección,
- b) dos secuencias que permiten la recombinación específica de sitio, situadas en la orientación directa, y,
- c) situados entre dichas secuencias b), uno o más genes de interés.

- 45 El sistema de recombinación específico presente en las construcciones genéticas puede tener diferentes orígenes. En particular, las secuencias y las recombinasas específicas usadas pueden pertenecer a diferentes clases estructurales, y en particular a la familia integrasa del bacteriófago λ o a la familia resolvasa del transposón Tn3. Entre las recombinasas que pertenecen a la familia integrasa del bacteriófago λ , pueden mencionarse, en particular, la integrasa de los fagos lambda (Landy et al., Science 197: 1147, 1977), P22 y Φ 80 (Leong et al., J. Biol. Chem. 260: 4468, 1985), HP1 de *Haemophilus influenza* (Hauser et al., J. Biol. Chem. 267 6859, 1992), la integrasa Cre del fago P1, la integrasa del plásmido pSAM2 (EP 350,341) o alternativamente la recombinasa FLP del plásmido 2 μ . Los minicírculos se preparan así por recombinación mediante un sistema específico de sitio de la familia integrasa del

bacteriófago λ , las moléculas de ADN según la invención comprenden generalmente, además, una secuencia que resulta de la recombinación entre dos secuencias de unión *att* del bacteriófago o plásmido correspondiente.

Entre las recombinasas que pertenecen a la familia del transposón Tn3, pueden mencionarse, en particular, la resolvasa del transposón Tn3 o de los transposones Tn21 y Tn522 (Stark et al., Trends Genet, 8, 432-439, 1992); la invertasa Gin del bacteriófago μ o alternativamente resolvases de plásmidos, tales como la del fragmento *par* de RP4 (Albert et al., Mol. Microbiol. 12:131, 1994). Cuando los minicírculos se preparan por recombinación mediante un sistema específico de sitio de la familia del transposón Tn3, comprenden, generalmente, además del gen de interés que se pretende insertar en el genoma de un microorganismo, una secuencia que resulta de la recombinación entre dos secuencias de reconocimiento de la resolvasa del transposón en cuestión. Las secuencias que permiten la recombinación específica de sitio también pueden derivar de la región *loxP* del fago P1, que está compuesta esencialmente de dos secuencias repetidas capaces de recombinar específicamente una con otra en presencia de una proteína, designada Cre (Sternberg et al., J. Mol. Biol. 150: 467, 1971). El plásmido usado para producir el minicírculo comprende así (a) un origen de replicación bacteriano y un gen marcador de selección; (b) las secuencias repetidas del bacteriófago P1 (región *loxP*); y (c), situados entre dichas secuencias (b), uno o más genes de interés que se desean insertar en el genoma de un microorganismo.

Los minicírculos pueden comprender secuencias que permitan la recombinación específica de sitio derivadas de un bacteriófago, tal como secuencias de unión (secuencias *attP* y *attB*) de un bacteriófago o secuencias derivadas de dichas secuencias de unión. Estas secuencias son capaces de recombinar específicamente una con otra en presencia de una recombinasa referida como una integrasa sin o con escisionasa. El término "secuencias derivadas de dichas secuencias de unión" incluye las secuencias obtenidas por modificación o modificaciones de las secuencias de unión de los bacteriófagos que retienen la capacidad de recombinar específicamente en presencia de la recombinasa apropiada. Así, dichas secuencias pueden ser fragmentos reducidos de estas secuencias o, alternativamente fragmentos extendidos por adición de otras secuencias (sitios de restricción, y semejantes). También pueden ser variantes obtenidas por mutación o mutaciones, en particular por mutación o mutaciones puntuales. Los términos secuencias *attP* y *attB* de un bacteriófago o de un plásmido indican, según la invención, las secuencias del sistema de recombinación específicas para dicho bacteriófago o plásmido, es decir la secuencia *attP* presente en dicho fago o plásmido y la secuencia *attB* cromosómica correspondiente. Las secuencias de unión son muy conocidas en la técnica e incluyen entre otras las secuencias de unión de los fagos λ , P22, Φ 80, P1, y HP1 de *Haemophilus influenzae* o, alternativamente del plásmido pSAM2 o del plásmido 2 μ .

Los minicírculos se producen fácilmente a partir del plásmido parental descrito anteriormente. El método para la producción del minicírculo consiste en poner en contacto el cultivo de células que están transformadas con el plásmido parental con la integrasa con o sin la escisionasa, de manera que se induce la recombinación específica de sitio. El cultivo y la integrasa con o sin la escisionasa se ponen en contacto por transfección o infección con un plásmido o un fago que contiene el gen de dicha integrasa y cuando es aplicable el gen de la escisionasa. Alternativamente, por ejemplo, se induce la expresión de genes que codifican dicha integrasa y cuando es aplicable la escisionasa, presente en la célula huésped. Como se menciona más adelante, estos genes pueden estar presentes en la célula huésped en forma integrada en el genoma, en un plásmido replicativo o, alternativamente, en el plásmido de la invención, en la parte no terapéutica.

Para permitir la producción de los minicírculos según la invención por recombinación específica de sitio *in vivo*, la integrasa con/sin la escisionasa usada se introducen en, o se inducen en, células o el medio de cultivo en un momento particular. Para este propósito, pueden usarse diferentes métodos. Según un primer método, se usa una célula huésped que contiene, por ejemplo, el gen de recombinasa, es decir el gen de integrasa con o sin el gen de escisionasa, en una forma que permite su expresión regulada. El gen de la integrasa con o sin el gen de la escisionasa puede, por ejemplo, introducirse bajo el control de un promotor, o de un sistema de promotores inducibles o, alternativamente, en un sistema sensible a la temperatura.

En particular, el gen de la integrasa puede estar presente en un fago sensible a la temperatura, latente durante la fase de crecimiento e inducido a una temperatura adecuada (por ejemplo, fago lisogénico λ Xis' c/857).

Alternativamente, el gen puede estar bajo el control de un promotor regulado, por ejemplo, el promotor *placUV5*, la célula huésped se designa *E.coli* G6191.

Preferiblemente, la integrasa con o sin el gen de la escisionasa puede estar bajo el control de un promotor regulado, por ejemplo el promotor *P_{BAD}* del operón *araBAD* (arabinosa), que está regulado por arabinosa (Guzman et al., J. Bacteriol, 1995, 4121-4130; US5,028,530). Particularmente, el uso del promotor *P_{BAD}* permite una expresión suficiente de escisionasa e integrasa en presencia de arabinosa, como agente inductor, y así más de 90% de recombinación de los plásmidos que están presentes en alto número de copias en las bacterias, mientras en ausencia de arabinosa, el promotor está fuertemente inhibido. El casete para la expresión de la integrasa con/sin escisionasa puede realizarse por un plásmido, un fago, o incluso por el plásmido de la invención en la región no terapéutica. Puede estar integrado en el genoma de la célula huésped o mantenido en forma replicativa. Dichas células huésped son en particular *E.coli* G6264 y *E.coli* G6289. Según otro método, el casete de expresión del gen o genes se realiza por un plásmido o un fago usado para transfectar o infectar el cultivo celular después de la fase de crecimiento. En este caso, no es necesario para el gen estar en una forma que permita su expresión regulada. En

particular, puede usarse cualquier promotor constitutivo. El ADN también puede ponerse en contacto con la integrasa y cuando es aplicable la escisionasa *in vitro*, en una preparación de plásmido, por incubación directa con la proteína.

5 El minicírculo así producido comprende así un casete de expresión que contiene uno o más genes de interés que se van a insertar en el microorganismo diana, carece de un origen de replicación y comprende una secuencia attR que resulta de recombinación específica de sitio entre una secuencia attB y una attP, o una secuencia attL que resulta de recombinación específica de sitio entre una secuencia attB y una attP. El minicírculo puede usarse así como un vector suicida universal para el reemplazo génico en cualquier microorganismo. En efecto, el minicírculo que porta un gen para reemplazo flanqueado por secuencias homólogas y un gen de resistencia a antibiótico se integrará fácilmente en un sitio diana del genoma de cualquier microorganismo por recombinación homóloga como se representa en la Figura 31. Un segundo evento de escisión que puede desencadenarse por una segunda presión de selección puede seleccionar eficazmente sólo los microorganismos que portan el nuevo gen insertado en su genoma.

15 La presente invención también se refiere así a un método de ingeniería genética de un microorganismo. Este nuevo método puede usarse para modificar por ingeniería cualquier microorganismo independientemente de su origen. En efecto, el minicírculo no contiene ningún origen de replicación y puede usarse así universalmente para reemplazo génico en cualquier tipo de microorganismo. Este método representa una alternativa ventajosa al uso del bacteriófago M13 para reemplazo génico por doble recombinación homóloga en un microorganismo.

20 Según una realización particular de la presente invención, el minicírculo comprende un primer marcador seleccionable tal como un gen de resistencia a antibiótico, que permite seleccionar el primer evento de recombinación. El segundo marcador seleccionable preferido es el gen III o el gen deleciónado funcional III'. El gen III o su variante funcional es capaz de conferir sensibilidad a desoxicolato como se describe en Boeckle et al. (Mol. Gen. Genet., 186, 185-92, 1982) y permite así contraseleccionar el segundo evento de recombinación (Fig. 31). El método consiste así en introducir el minicírculo en el microorganismo por cualquier método de transformación muy conocido en la técnica, y preferiblemente por electroporación, seleccionar el evento de integración del minicírculo en un cultivo suplementado con un antibiótico o bajo otra presión de selección y seleccionar un segundo evento de escisión tratando con desoxicolato u otra presión de selección apropiada.

La presente invención se describirá más completamente con la ayuda de los ejemplos siguientes, que deben considerarse como ilustraciones no limitantes.

30 Descripción breve de los dibujos:

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

Figura 2: Organización de los dominios funcionales de la proteína Π del plásmido R6k.

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

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

35 Figura 5: Construcción de pXL2774.

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

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

Figura 8: Construcción de pXL3056.

40 Figura 9: Visualización de la proteína aFGF producida por *E. coli* XAC-1*pir116* (pXL3056+PT7po123) después de la inducción. Los extractos celulares totales desnaturalizados se depositan en un gel de SDS-poliacrilamida 12,5%. M: marcador de masa molecular (Biorad, Intervalo bajo). Cada banda se identifica con una flecha y una figura que indica su masa en kDaltons. 1: XAC-1*pir116* (pXL3056+pUC4K) no inducido; 2: XAC-1*pir116* (pXL3056+pUC4K) inducido a 42°C; 3: XAC-1*pir116* (pXL3056+PT7po123) clon 1, no inducido; 4: XAC-1*pir116* (pXL3056+PT7po123) clon 1, inducido a 42°C; 5: XAC-1*pir116* (pXL3056+PT7po123) clon 2, no inducido; 6: XAC-1*pir116* (pXL3056+PT7po123) clon 2, inducido a 42°C; t1: 1 μ g de aFGF purificado; t4: 4 μ g de aFGF purificado.

Figura 10: Representaciones esquemáticas para los vectores pXL3029, pXL3030, y pXL3179 o NV1FGF.

Figura 11: Representación esquemática de los dominios funcionales de las proteínas iniciadoras π de R6K.

Figura 12: Secuencias de nucleótido y aminoácidos del gen *pir* que comprende las mutaciones *pir116* y *pir42*.

Figura 13: Construcción del vector suicida *pir116pir42* para recombinación homóloga.

- Figura 14: Representación esquemática de los productos de PCR obtenidos cuando se amplifica la región *uidA::pir116 +/- pir42*.
- Figura 15: Electroforesis en gel de agarosa que muestra la topología del plásmido pCOR pXL3179 producido en TEX1 o *TEX1pir42*.
- 5 Figura 16: Representación esquemática del plásmido suicida pXL3749 que porta el gen *pir-116cop21*.
- Figura 17: Electroforesis en gel de agarosa que muestra el número de copias del plásmido de pXL2979 cuando se produce en la célula huésped *E. coli* TEX1*cop21* (líneas 1-4), en la célula huésped *E. coli* XAC1*pir* (líneas 5-8), en *E. coli* TEX1 (líneas 9-12).
- Figura 18: Representación de la estrategia de clonación para la construcción del vector suicida *recA*.
- 10 Figura 19: Representación esquemática de los productos de PCR obtenidos cuando se amplifican regiones de la cepa de *E. coli* TEX2.
- Figura 20: Electroforesis en gel de agarosa que muestra la topología de pCOR pXL3179 producido en *E. coli* TEX2*pir42* (línea B), en *E. coli* TEX1*pir42* (línea C), en *E. coli* TEX1 (línea D).
- Figura 21: Análisis del plásmido pXL3179 producido por fermentación en *E. coli* TEX2*pir42*.
- 15 Figura 22: Ensayo basado en fluorescencia que muestra que la fluorescencia incrementa con el número de copias del plásmido.
- Figura 23: Diagrama de los plásmidos cribados en el ensayo basado en fluorescencia.
- Figura 24: Diagrama del plásmido pXL3830.
- Figura 25: Placa de agar que demuestra el cribado basado en fluorescencia para mutantes con alto número de copias generados por mutagénesis aleatoria.
- 20 Figura 26: Evaluación de los mutantes con alto número de copias identificados por el método de cribado basado en fluorescencia.
- Figura 27: Diagrama de la estrategia para evaluar los mutantes *pir116* insertados en el genoma bacteriano.
- Figura 28: Evaluación del número de copias de pXL3179 en diferentes cepas mutantes *pir116** de *E. coli*.
- 25 Figura 29: Construcción de un plásmido usado para generar vectores de minicírculo para recombinación homóloga en *E. coli*.
- Figura 30: Construcción de un vector de minicírculo usado para generar las cepas mutantes *pir116** de *E. coli*.
- Figura 31: Diagrama de reemplazo génico por recombinación homóloga usando un vector de minicírculo.
- Figura 32: Demostración de clones dobles recombinantes crecidos en medio que contiene desoxicolato de sodio.
- 30 Figuras 33A y B: Los resultados de PCR control en dobles recombinantes.

I - MATERIALES Y MÉTODOS

A) Materiales

1) Medios de cultivo

- 35 Se usaron medios completos LB, 2XTY y SOC y medio mínimo M9 (Maniatis *et al.*, 1989). Los medios de agar se obtuvieron por adición de 15 g de agar Difco. Además, si es necesario, estos medios se suplementaron con antibióticos (ampicilina o kanamicina) a concentraciones respectivas de 100 mg/l y 50 mg/l. Los sustratos cromogénicos X-Gal y X-Gluc se usaron a una concentración de 40 mg/l.

2) Cepas de *E. coli*, plásmidos y bacteriófagos

Las cepas de *E. coli*, plásmidos y bacteriófagos usados se definen respectivamente en los ejemplos siguientes.

40 B) Métodos

1) Manipulación del ADN

El aislamiento del ADN bacteriano (plásmido y genómico) y ADN de fago (forma replicativa de M13), digestión con endonucleasas de restricción, ligación de los fragmentos de ADN, electroforesis en gel de agarosa (en tampón TBE)

y otras técnicas estándar se realizaron según las recomendaciones del fabricante, para el uso de enzimas, o según los procedimientos descritos en "Molecular Cloning: a Laboratory Manual" (Maniatis et al., 1989).

Los marcadores de tamaño de ADN usados durante la electroforesis son los siguientes: escalera de 1 kb (BRL) para los fragmentos lineales y el marcador de ADN superenrollado (Stratagene) para los plásmidos no digeridos.

- 5 La secuenciación se realizó según la técnica de Sanger (Sanger *et al.*, 1977) adaptada al método automático usando didesoxinucleótidos fluorescentes y ADN polimerasa Taq (PRISM Ready Reaction DyeDideoxy Terminator Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems).

10 Los oligodesoxinucleótidos usados (designados por "seq+no.", véase más adelante) se sintetizaron en el "Sintetizador de ADN/ARN 394 de Applied Biosystems" por el método de la fosforamidita, usando grupos protectores α -cianoetilo (Sinha *et al.*, 1984). Después de la síntesis, los grupos protectores se eliminaron por tratamiento con amoníaco. Dos precipitaciones con butanol permiten purificar y concentrar el oligonucleótido (Sawadogo *et al.*, 1991).

Secuencias de los oligonucleótidos usados para la amplificación por PCR:

SEQ ID No. 3 5'-GACCAGTATTATTATCTTAATGAG-3'

- 15 SEQ ID No. 4 5'-GTATTTAATGAAACCGTACCTCCC-3'

SEQ ID No. 5 5'-CTCTTTTAATTGTCGATAAGCAAG-3'

SEQ ID No. 6 5'-GCGACGTCACCGAGGCTGTAGCCG-3'

20 Las reacciones de PCR (Saiki *et al.*, 1985) se realizaron bajo las condiciones siguientes, en un volumen total de 100 μ l. La mezcla de reacción comprende 150 ng de ADN genómico de la cepa que se va a estudiar, 1 μ g de cada uno de los dos cebadores oligonucleotídicos (24-mer), 10 μ l de tampón 10XPCR, cuya composición es la siguiente "500 mM KCl, 0,1 % gelatina, 20 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl pH 7,5", y 2,5 unidades de ADN polimerasa Taq (Amplitaq Perkin-Elmer). Las condiciones de PCR, en el equipo Ciclador Térmico de ADN Cetus Perkin-Elmer son las siguientes: 2 min a 91°C, 30 ciclos sucesivos de desnaturalización (1 min a 91°C), hibridación (2 min a 42°C) y elongación (3 min a 72°C), y finalmente 5 min a 72°C. Los productos así obtenidos, que se digieren o no con una enzima de restricción, se analizan por electroforesis en gel de agarosa.

30 Los análisis de las diferentes especies de plásmidos por ADN topoisomerasas se realizaron según el procedimiento siguiente: las enzimas, purificadas en el laboratorio, se incuban durante 1 hora a 37°C. Las mezclas de reacción (volumen total: 40 μ l) tienen la composición siguiente: 150 ng de plásmido, 300 ng de ADN topoisomerasa I ó 150 ng de ADN girasa de *E. coli*, ó 160 ng de ADN topoisomerasa IV de *S. aureus* y 20 μ l de tampón específico para cada enzima. La composición de estos tampones se indica a continuación:

para ADN topoisomerasa I:

50 mM Tris-HCl pH 7,7, 40 mM KCl, 1 mM DTT, 100 μ g/ml BSA, 3 mM MgCl₂, 1 mM EDTA;

para ADN topoisomerasa IV:

- 35 60 mM Tris-HCl pH 7,7, 6 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 100 μ g/ml BSA, 1,5 mM ATP, 350 mM glutamato de potasio;

para ADN girasa:

50 mM Tris-HCl pH 7,7, 5 mM MgCl₂, 1,5 mM ATP, 5 mM DTT, 100 μ g/ml BSA, 20 mM KCl.

2) Transformación de *E. coli*

40 Ésta se realizó rutinariamente según el método TSB (Transformation and Storage Buffer) descrito por Chung y Miller (1988). Para cada cepa tal como TG1 (Gibson *et al.*, 1984), la eficacia de la transformación obtenida es aproximadamente 10^5 - 10^6 transformantes por μ g de pUC4K (Vieira y Messing; 1982). Cuando era necesaria una mayor eficacia de transformación, las bacterias se transformaron por electroporación según el procedimiento recomendado por el fabricante del electroporador (Biorad). Este método hace posible conseguir eficacias de 10^8 a 10^{10} transformantes por μ g de pUC4K.

3) Transfección celular mediada por un lipofectante catiónico

45 Las células usadas son fibroblastos de ratón NIH 3T3 sembrados el día antes en placas de 24 pocillos, a una densidad de 50.000 células por pocillo. El medio de cultivo usado es medio DMEM, que contiene 4,5 g/l de glucosa y suplementado con 10 % suero fetal de ternera y 1 % de disoluciones de 200 mM glutamina y antibióticos (5.10³ μ /ml estreptomycin, 5.10⁵ μ /ml penicilina) (Gibco). El ADN plasmídico (1 μ g en 25 μ l de 9 % NaCl) se mezcla, en una

base volumen-volumen, con una suspensión de lipofectante. Se ensayan cuatro proporciones "cargas de lipofectante/cargas de ADN": 0, 3, 6 y 9. Estas proporciones se calculan considerando que 1 µg de ADN plasmídico contiene 3,1 nmoles de cargas negativas y que el lipofectante contiene 3 cargas positivas por molécula. Después de un tiempo de contacto de 10 minutos para permitir la formación del complejo ADN/lípido, se introducen 50 µl de mezcla ADN-lipofectante en las células en medio de cultivo sin suero (500 µl). Las células se prelavaron dos veces con este mismo medio. Se evita así la inhibición de la transfección por el suero. Después de la incubación (2 horas a 37°C en el incubador de CO₂), se añade 10 % de suero fetal de ternera al medio. Las células se vuelven a incubar durante 24 horas.

4) Medida de la actividad luciferasa de células eucariotas

Esto se realiza 24 horas después de la transfección. La luciferasa cataliza la oxidación de la luciferina en presencia de ATP, Mg²⁺ y O₂, con la producción concomitante de un fotón. La cantidad total de luz emitida, medida con un luminómetro, es proporcional a la actividad luciferasa en la muestra. Los reactivos usados los suministra Promega (sistema de ensayo luciferasa) y se usan según el procedimiento recomendado. Después de la lisis de las células, la fracción insoluble de cada extracto se elimina por centrifugación. El ensayo se realiza en 5 µl de sobrenadante, que puede diluirse o no en el tampón de lisis celular.

5) Medida de la concentración de proteínas en los extractos celulares

Esto se realiza según el método BCA (Pierce) usando ácido bicinonínico (Wiechelman *et al.*, 1988). El intervalo estándar de BSA se prepara en el tampón de lisis (véase III-B-4). Las muestras que se van a ensayar y aquellas del intervalo se pretratan, en una base volumen-volumen, con 0,1 M yodoacetamida/tampón 0,1 M Tris, pH 8,2, durante 1 hora a 37°C. Este tratamiento hace posible evitar la interferencia, durante el ensayo, del agente reductor (DTT) presente en el tampón de lisis. El resultado del ensayo se lee a 562 nm.

EJEMPLO 1: Construcción de las cepas huésped XAC-1 pir y pir116 por recombinación homóloga

La cepa usada fue la cepa de *E. coli* XAC-1 (Normanly *et al.*, 1980). El gen *argE* de esta cepa incluye ventajosamente una mutación de 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 la biosíntesis de la arginina, N-acetilornitinas. XAC-1 no puede, por lo tanto, sintetizar arginina y, consecuentemente, crecer en medio mínimo. Esta auxotrofia se eliminará si la cepa alberga un plásmido que permita la expresión de un ARNt supresor. Será así posible, cultivando en medio mínimo, seleccionar las bacterias que portan dicho plásmido. Con el fin de permitir la replicación en éstas de plásmidos derivados de R6K, fue necesario introducir, por recombinación homóloga, el gen *pir* en el genoma de XAC-1. El gen *pir* (tipo salvaje o mutado) se introduce en el locus *uidA* por intercambio entre el gen de tipo salvaje *uidA* y una copia interrumpida por el gen *pir* (o *pir116*). El gen *uidA* codifica β-glucuronidasa, la enzima para la hidrólisis de β-glucurónidos. Este gen puede inactivarse sin problema ya que no es esencial para el crecimiento en medios sintéticos estándar, en los que no se usan β-glucurónidos. Además, la actividad β-glucuronidasa puede monitorizarse mediante un sustrato cromogénico, X-Gluc, cuya hidrólisis libera un pigmento azul.

1) Construcción de un vector suicida que porta el casete "*Km^R-uidA::pir* (o *pir116*)

Usamos una estrategia que implica un único huésped bacteriano y que minimiza las modificaciones en el genoma de la cepa de interés. El fago M13mp10 (Messing y Vieira; 1982) se usó como un vector suicida (Blum *et al.*, 1989). Una mutación ámbar en el gen II, que es esencial para la replicación, reduce el espectro de huésped de esta M13 respecto a las cepas, tal como TG1 (*supE*), que producen un ARNt supresor de ámbar; por lo tanto, no será capaz de replicarse en las cepas de *E. coli sup+*, tal como XAC-1.

Los casetes de 3,8 kb *Bam*HI, que contienen el gen de resistencia a kanamicina de Tn5 y *_uidA::pir* o *pir116*, se purificaron respectivamente de M13wm34 y 33 (Metcalf *et al.*, 1994). Se clonaron en M13mp10 linealizado con *Bam*HI. Los clones recombinantes se seleccionaron plaqueando en medio agar LB suplementado con kanamicina, después de electroporar las mezclas de ligación en TG1. La conformidad de los clones obtenidos se mostró por análisis del perfil de restricción y por secuenciación de la región correspondiente a la mutación *pir116*.

2) Introducción de los genes *pir* o *pir116* en el genoma de *E. coli* XAC-1 por recombinación homóloga

La estrategia adoptada y los diferentes eventos implicados se presentan en la Figura 3.

a) Primer evento de recombinación

La cepa XAC-1 se transformó por electroporación con 10, 100 ó 2.000 ng de cada RF (*mp10-_uidA::pir* o *pir116*). Un tercio de cada mezcla de expresión se plaqueó en placas LB que contienen kanamicina y se incubaron toda la noche a 37°C. Los fagos *mp10-_uidA::pir* o *pir116* no pueden replicarse en la cepa XAC-1 (*sup+*). Por lo tanto, el marcador de resistencia a kanamicina ("*Km^R*") sólo puede mantenerse por integración en el genoma de la bacteria mediante recombinación homóloga con la copia de tipo salvaje del gen *uidA*. Los resultados de las electroporaciones de XAC-1 se presentan en la Tabla 1. La eficacia de la transformación obtenida fue 4.10⁹ transformantes por µg de pUC4K.

TABLA 1

CONSTRUCCIÓN	Número de colonias obtenido con las cantidades de ADN transformadas		
	10 ng	100 ng	2.000 ng
M13mp10- <i>_uidA::pir</i>	1	41	146
M13mp10- <i>_uidA::pir116</i>	0	16	124

Bajo las condiciones de ensayo, el número de integrantes incrementó de una manera no lineal con la cantidad de ADN. Dada la eficacia de la transformación y el tamaño de los RF (11,7 kpb), fue posible tener una idea aproximada del nivel de recombinación. Considerando el punto a 100 ng, se obtuvo una frecuencia de recombinación de aproximadamente 10^{-6} .

b) Segundo evento de recombinación

El segundo evento de recombinación se seleccionará por la resistencia de las cepas a desoxicolato ("Doc^{Rm}").

Para hacer esto, cinco integrantes de cada construcción se cultivaron en medio 2XTY suplementado con 0,2 % desoxicolato de sodio. Aparecieron dos poblaciones distintas. Determinados clones proporcionaron una turbidez bastante visible después de aproximadamente 8 horas a 37°C (dos clones para la construcción *pir* y tres para la construcción *pir116*). Los demás clones proporcionaron un cultivo denso sólo después de una noche a 37°C. Todos fueron virtualmente sensibles a la kanamicina ("Km^S"), como se esperaba. Para cada uno de los electroporantes estudiado, se sembraron 50 Km^S descendientes en medio LB suplementado con X-Gluc. Después de 48 horas a 37°C, los clones UidA⁺ eran azul claro mientras que aquellos que habían sufrido un reemplazo de alelo (caso No. 1, Figura 3) permanecieron blancos en este medio (UidA⁻). La Tabla 2 resume el análisis fenotípico de los dobles recombinantes obtenidos. De 18 a 30 % de los dobles recombinantes sufrieron un reemplazo de alelo.

TABLA 2

Cepa	Número de Km ^S entre los Doc ^R	Porcentaje de UidA ⁻ entre los Km ^S
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>pir116-1</i>	50/50	32
XAC <i>pir116-4</i>	35/50	30

3) Comprobación de la naturaleza de carácter *Pir*⁺ de las cepas obtenidas por recombinación

Para asegurar el carácter *Pir*⁺ de las cepas obtenidas por doble recombinación, transformamos tres clones de cada construcción con pBW30 (Metcalf *et al.*, 1994). El hecho de que los transformantes se obtuvieron para todas las cepas ensayadas hace posible mostrar la funcionalidad de los genes *pir* y *pir116*, que se integraron en el genoma de XAC-1. Bajo las mismas condiciones, no se obtuvo ningún transformante con la cepa parental XAC-1. Continuamos estudiando dos clones XAC-1*pir* (B y C) y dos clones XAC-1*pir116* (E y D).

4) Comprobación, por amplificación por PCR, de las cepas obtenidas por recombinación

Para confirmar el reemplazo de alelo, comprobamos las regiones genómicas en los dos lados del locus *uidA* por amplificación por PCR. Cada par de oligonucleótidos consistió en un oligonucleótido correspondiente a una región interna de *pir* y un segundo oligonucleótido correspondiente a una región, cercana a *uidA* cromosómico, pero no en el fragmento que sirvió para la recombinación. La secuencia del último oligonucleótido se determinó mediante la secuencia ECOUIDAA de Genbank (número de registro: M14641). Así, fuimos capaces de verificar la localización exacta del gen *pir* en el genoma bacteriano. La naturaleza de los fragmentos amplificados, cuyo tamaño está de acuerdo con el que se podría esperar, se confirmó por digestión con *Mlu*I.

EJEMPLO 2: Construcción de vectores plasmídicos derivados de R6K que portan el marcador de selección *sup* Phe

Se construyeron vectores que contenían ori y de R6K y el gen de resistencia a kanamicina (pXL2666). La observación de multímeros de pXL2666 en la cepa BW19610 (*pir116*) 5 (Metcalf *et al.*, 1993) nos impulsó a estudiar el efecto del fragmento *cer* de ColE1 en este fenómeno. Introducimos el casete de expresión del ARNt supresor de fenilalanina (*sup* Phe) en el vector ori y $-Km^R$ -*cer* (pXL2730). Este vector, pXL2760, sirve como base para la construcción de vectores que pueden usarse en terapia génica.

1) Construcción y análisis de vectores que contienen ori y de R6K y el gen de resistencia a kanamicina

a) Construcciones

En el primer plásmido construido, pXL2666, el gen de resistencia a la kanamicina originado de pUC4K (Vieira y Messing; 1982) y el origen de replicación, contenido en un fragmento de 417 pb *EcoRI-BamHI*, se originaron del vector suicida pUT-T7pol (Herrero *et al.*, 1990) (Figura 4). La transferencia de pXL2666 en las cepas BW19094 y 19610 (Metcalf *et al.*, 1994) hizo posible mostrar que la cantidad de plásmido se incrementa de hecho en una cepa *pir116*, cuando se compara con el mismo plásmido en una cepa *pir*. Sin embargo, el análisis electroforético de los plásmidos no digeridos mostró que este incremento era paralelo con la aparición de unas pocas formas multiméricas. Este fenómeno está asociado muy probablemente con la recombinación intermolecular entre las múltiples copias del plásmido. Así, construimos pXL2730 clonando el fragmento *cer* del plásmido natural de *E. coli*, ColE1, que había mostrado que permitía, en *cis*, la resolución de los dímeros de plásmido (Summers y Sherrat, 1984), en pXL2666. El fragmento usado corresponde a un fragmento de 382 pb *HpaI* de ColE1 (Leung *et al.*, 1985). Contiene un sitio de recombinación intermolecular específico; con el fin de funcionar, implica sólo proteínas del huésped incluyendo las recombinasas XerC y XerD y los factores auxiliares ArgR y PepA (Stirling *et al.*, 1988, 1989; Colloms *et al.*, 1990). Para asegurar que los efectos observados son de hecho debidos al fragmento *cer*, también construimos el plásmido control pXL2754, en el que el fragmento *cer* tiene una delección de 165 pb. Se mostró que esta delección suprimía la acción de *cer* en la resolución de los multímeros (Leung *et al.*, 1985). Las diferentes etapas de clonación que dan lugar a la construcción de estos plásmidos se presentan en la Figura 4.

b) Análisis cuantitativo y cualitativo de las especies de plásmido

(i) análisis por electroforesis en gel de agarosa

Los análisis electroforéticos de los diferentes plásmidos construidos permitió la demostración de varias especies de plásmido, que son variables según las cepas usadas. El tamaño de los plásmidos no digeridos se evaluó respecto a un marcador de ADN superenrollado. En la cepa *pir* (BW19094), los plásmidos pXL2666, 2754 y 2730 estaban casi completamente en forma monomérica. Las bandas por encima de cada banda principal corresponde a varios topoisómeros ligeramente menos superenrollados, como se confirma por el perfil observado después de la acción de la ADN girasa en pXL2730.

En el caso de la cepa *pir116* (BW19610), los perfiles fueron diferentes: con los plásmidos pXL2666 y 2754 se observaron diferentes especies que variaban de monómero a multímeros (2, 3 ó 4 unidades), siendo la forma principal el dímero. Después de la digestión con *EcoRI*, sólo se encontró el ADN plasmídico lineal; estas especies de plásmido corresponden bien a multímeros de plásmido o a varios topoisómeros. Sin embargo, como el tamaño de las formas determinado según el marcador de ADN superenrollado fue un producto completo del del plásmido monomérico, es muy probable que sean multímeros. Lo más probable es que la formación de multímeros sea atribuible a la mutación *pir116*, aunque las dos cepas BW19094 y BW19610 no son estrictamente isogénicas (BW19610 es *recA*). El perfil obtenido con pXL2730 fue diferente: aunque las formas multiméricas todavía eran visibles, la forma principal es la forma monomérica. El fragmento *cer* puede facilitar así la resolución de los multímeros de plásmido que construimos, independientemente de *recA*, en BW19610.

(ii) análisis después de tratamiento con ADN topoisomerasas

Para refutar la teoría de que las formas observadas en las cepas que portan el alelo *pir116* son topoisómeros específicos, cada preparación de plásmido se sometió a la acción de ADN topoisomerasas. Las actividades de las distintas enzimas bajo las condiciones experimentales fueron las siguientes: relajar el ADN por la ADN topoisomerasa I de *E. coli*, superenrollamiento negativo del ADN relajado por la ADN girasa de *E. coli*, y desenredo de los ADN entrelazados y relajación de ADN superenrollado por la ADN topoisomerasa IV de *S. aureus*. La acción de la ADN topoisomerasa IV hace posible mostrar que las formas de plásmido de alto peso molecular no resultan del desenredo de varias moléculas de plásmido; en este caso, se habrían convertido en las especies monoméricas. La funcionalidad de la enzima fue, por supuesto, comprobada en una preparación de ADN de quinetoplasto, compuesto por moléculas de ADN entrelazado (no mostrado). La actividad de relajación también fue visible porque las especies que se obtienen migran menos que en los controles no tratados. La acción de la ADN girasa hace posible convertir los topoisómeros ligeramente relajados en las especies más superenrolladas extraídas de la bacteria (monómero o dímero principalmente). Además, hizo posible verificar que los ADN preparados estaban principalmente en la forma superenrollada. Las muestras así tratadas permitieron confirmar los resultados anteriores respecto a las especies principales para cada construcción. La ADN topoisomerasa I relajó de hecho el ADN, pero sólo parcialmente. Esto podría deberse al hecho de que los plásmidos estudiados contienen sólo unas pocas regiones monocatenarias, a las que se une preferiblemente esta enzima (Roca, 1995).

2) Introducción del marcador de selección *sup Phe* en pXL2730

Usamos el casete de expresión del gen del ARNt supresor sintético (Phe) (Kleina *et al.*, 1990). Éste introdujo una fenilalanina en la cadena polipeptídica en crecimiento en respuesta a un codón TAG. Además, permitió la producción en XAC-1 de una proteína ArgE que fue lo suficientemente activa como para permitir un buen crecimiento en medio deficiente en arginina. *sup Phe* se expresó constitutivamente en el plásmido pCT-2-F (Normanly *et al.*, 1986) a partir de un promotor sintético derivado de la secuencia promotora, *P_{lpp}*, del gen *lpp* de *E. coli*. Después del extremo 3' de este gen, se paró la transcripción por el terminador sintético, *T_{trc}*, del operón de *E. coli rrnC* (Normanly *et al.*, 1986). Las diferentes etapas de clonación se indican en la Figura 5.

Las diferentes subclonaciones se realizaron en XAC-1. La funcionalidad del casete de expresión del ARNt supresor se comprobó así mediante la actividad α -galactosidasa de esta cepa, que sólo existe si hay supresión del codón ámbar del gen *lacZ_{u118am}*. La etapa final consiste en la introducción del casete de expresión de *sup Phe* en pXL2730. Los resultados obtenidos con el fragmento *cer (B-1-b)* nos impulsaron a seleccionar este plásmido en lugar de pXL2666. Retuvimos el gen de resistencia a kanamicina para facilitar la clonación posterior, en particular con el fin de tener disponible un cribado adicional durante la clonación final (pérdida de Km^R).

EJEMPLO 3: Validación del vector plasmídico para aplicaciones en terapia génica por transfección de fibroblastos de ratón

1) Construcción del vector informador pXL2774

Para ensayar la validez para terapia génica del sistema para producir ADN plasmídico, introducimos un gen informador, que puede usarse en células eucariotas, en pXL2760. Usamos el gen *luc*, que codifica la luciferasa de *Photinus pyralis*, ya que el ensayo de la medida de bioluminiscencia es muy sensible y es lineal en un intervalo amplio, y el ruido de fondo debido a la actividad endógena de las células eucariotas es muy bajo. El gen *luc* estaba controlado por secuencias promotoras-amplificadoras de un gen temprano del citomegalovirus humano (promotor CMV), que permitió un alto nivel de expresión. Había una región no traducida en el extremo 3' de *luc*, que se origina del virus SV40, que contenía la señal de poliadenilación (poli(A)+). Después de una clonación intermedia, que permitió incrementar el número de sitios de restricción disponibles, el casete de "CMV promotor-luc-poli(A)+" se introdujo en el vector mínimo ori y - *cer-sup Phe* (pXL2760) en lugar del marcador Km^R . El plásmido resultante se ha denominado pXL2774. La Figura 6 muestra las diferentes etapas de clonación. Las mezclas de ligación se transformaron en *XAC-1pir116* por electroporación. La incubación que permite que las bacterias expresen los marcadores de selección se realizó en medio rico (medio SOC); fue así necesario lavar las células dos veces con medio M9 antes de plaquearlas. Esto hizo posible eliminar el medio residual, que habría resultado en ruido de fondo del cultivo en medio mínimo.

El medio elegido para plaquear las células electroporadas fue el medio mínimo M9, que hace posible seleccionar las bacterias que expresan un ARNt supresor y así la presencia de nuestros plásmidos. La adición de X-Gal hizo posible, mediante la coloración azul, visualizar la expresión del ARNt supresor. Las placas se analizaron después de aproximadamente 20 horas a 37°C. La ausencia de colonias en el control sin ADN nos asegura que la selección fue correcta, incluso con siembras densas. Todos los clones examinados por restricción (8) portan un plásmido, correspondiente al perfil esperado. El plásmido así construido, pXL2774, se preparó a partir de un clon cultivado en un litro de medio líquido M9 (aproximadamente 18 horas a 37°C), por una técnica que implica, entre otras, una etapa de intercambio iónico (kit Promega, MegaPreps). La cantidad de ADN recogida fue 2 mg.

2) Análisis del vector informador pXL2774 transfectado en células de mamífero.

La capacidad de pXL2774 para transfectar células eucariotas y para permitir la expresión de luciferasa se evaluó por transfección en fibroblastos de ratón NIH 3T3. El vector elegido como referencia fue el plásmido pXL2622 (éste es el plásmido pGL2 de Promega cuyo promotor SV40 ha sido reemplazado por el promotor CMV), que porta el mismo casete de expresión de luciferasa que pXL2774, pero en un replicón diferente. Éste es un derivado de 6,2 kb ColEI que porta el gen de resistencia a ampicilina. Este plásmido sirvió como control. Las actividades luciferasa (expresadas como RLU, o unidades relativas de luminiscencia) se indican en la Tabla 3.

Los mejores resultados se obtuvieron con una proporción "cargas de lipofectante/cargas de ADN" de 6; bajo estas condiciones, pXL2622 y 2774 parecían ser equivalentes.

TABLA 3

	pXL2622			pXL2774		
Proporciones de carga	RLU/pg de proteínas y por pocillo	Media	Coefficiente de variación (%)	RLU/ μ g de proteínas y por pocillo	Media	Coefficiente de variación (%)

ES 2 372 599 T3

	pXL2622			pXL2774		
Proporciones de carga	RLU/pg de proteínas y por pocillo	Media	Coefficiente de variación (%)	RLU/ μ g de proteínas y por pocillo	Media	Coefficiente de variación (%)
	0,0	no detectable		0,0	no detectable	
0	0,0			0,0		
	0,0			0,0		
	$9,9 \cdot 10^6$			$3,3 \cdot 10^6$		
3	$6,2 \cdot 10^6$	$7,6 \cdot 10^6$	22	$2,9 \cdot 10^6$	$2,9 \cdot 10^6$	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
	$1,9 \cdot 10^7$			$1,1 \cdot 10^7$		
	$9,5 \cdot 10^6$			$1,110^7$		
9	$7,5 \cdot 10^6$	$1,0 \cdot 10^7$	26	$8,3 \cdot 10^6$	$6,4 \cdot 10^6$	13
	$1,4 \cdot 10^7$			$8,5 \cdot 10^6$		

EJEMPLO 4: Verificación de la naturaleza del vector suicida en *E. coli* de los plásmidos pCOR

La naturaleza no replicativa de los plásmidos de tipo pCOR derivados de R6K se verificó por un experimento de electroporación en JM109 *E. coli* (Yanisch-Perron et al., 1985) de los plásmidos pUC4K (ori ColEI-KmR, (Vieira y Messing, 1982)) y pXL2730 (ori gamma de R6K-KmR, véase el Ejemplo 2). El electroporador usado fue Biorad Gene Pulser y las células electrocompetentes JM109 se prepararon según el procedimiento del fabricante (manual de instrucciones de electroporación bacteriana y controlador de pulso. número de catálogo 165-2098).

Las células electrotransformadas se plaquearon en medio LB suplementado con kanamicina (50 mg/l) y se incubaron toda la noche a 37°C. Los resultados obtenidos se presentan más adelante.

Resultados

Plásmido	Cantidad transformada (ng)	Número de transformantes	Eficacia (número de transformantes/ng de plásmido)
pUC4K	0,01	>>2.000	>2.105
pXL2730	5	0	0

Estos resultados muestran que había un mínimo de 5 logs de diferencia entre la eficacia de transformación de un derivado ColEI (pUC4K) y la de un derivado R6K (pXL2730) en una cepa que no expresa el gen *pir*. En una cepa *pir+* tal como XAC-1pir116, la eficacia de electrotransformación de los plásmidos derivados de R6K alcanza o supera convencionalmente los 108 transformantes/ μ g de plásmido.

EJEMPLO 5: Producción de ADN plasmídico por cultivo de alta densidad de la cepa de *E. coli* XAC-1pir116 (pXL2774): proceso de fermentación

5.1. Cepas:

Producción en XAC-1pir116 *E. coli* (Ejemplo 1) de un plásmido mínimo, pXL2774; este plásmido comprende los elementos siguientes: ori R6K-cer-tRNA^{supPhe} y un casete de expresión del gen informador luc bajo el control del promotor CMV (Ejemplo 3). Se desarrolló un proceso de alta productividad para la producción de plásmidos de este tipo.

5 5.2. Medios y condiciones de cultivo:

a) Medio de crecimiento:

Composición del medio definido usado para los cultivos del 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

10 Composición del medio complejo usado para los cultivos de alimentación discontinua (g/l): KH₂PO₄ 8, K₂HPO₄ 6,3, Na₂HPO₄ 1,7, (NH₄)₂ SO₄ 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 medio de alimentación discontinua idéntica al medio complejo, pero el extracto de levadura se reemplaza por 2,5 g/l of NH₄Cl.

b) Condiciones del cultivo con alimentación discontinua:

15 Los estudios en fermentadores de 2 litros (Setric Francia) que contienen 1 l de medio se realizaron con el fin de definir las condiciones óptimas para el crecimiento y producción de ADN plasmídico. El fermentador se inoculó con 80 ml de un cultivo de inóculo que había llegado al comienzo de la fase estacionaria de crecimiento.

20 Durante la fermentación, el pH se controló y se ajustó automáticamente entre 6,9 y 7,0 con 10% (p/v) de amoniaco acuoso; la temperatura se mantuvo a 37°C; la aireación se ajustó a 75 l/h ((1.1 vvm) a una presión de 0,2 bares y el oxígeno disuelto se ajustó a (40% de saturación de aire por retroacción en la velocidad de agitación y, si es necesario, por enriquecimiento con oxígeno puro.

Todos los parámetros (pH, temperatura, agitación, DO, O₂ y CO₂ en los gases efluentes) se recogieron y calcularon en línea mediante una interfaz HP3852 conectada a un Hewlett-Packard 9000.

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

30 Para adaptar las condiciones del cultivo a fermentadores de 800 litros, se realizaron secuencias de producción compuestas por dos cultivos de inóculo sucesivos, en escala de laboratorio: el inóculo I en un matraz cónico agitado y el inóculo II en un fermentador de 2 litros (cultivo discontinuo), seguido de cultivo de producción con alimentación discontinua, en un fermentador de 7 litros.

5.3. Resultados

35 Se estudiaron diferentes condiciones de cultivo en medio complejo, en medio definido y a varias velocidades de crecimiento. En todos los casos, después de un cultivo discontinuo inicial de la cepa bacteriana y consumo de la fuente de carbono, el medio de suministro se añadió al fermentador mediante una bomba peristáltica acoplada a un perfil de adición pre-programado. Este perfil se dedujo de experimentos previos en los que la velocidad de suministro se había controlado bien por el nivel de oxígeno disuelto o por una velocidad de crecimiento constante.

40 Además, con el fin de extrapolar sin dificultad la condición 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 ajustó a 2,5-3 mM/min. Para esto, la velocidad de crecimiento del microorganismo se redujo, si es necesario, variando la velocidad de suministro de la carga complementaria.

Como se ve en la Tabla 4, se obtuvieron muy buenos resultados tanto en medio complejo como en medio definido, ambos en escala de laboratorio y en escala de un fermentador de 800 litros; además, las cinéticas de crecimiento y producción de ADN plasmídico son completamente comparables (véanse las Figuras 6 y 7).

Tabla 4:

	Medio complejo		Medio definido
	fermentador de 2 ó 7 l	fermentador de 800 l	fermentador de 2 l
Duración de la fermentación (horas)	40	39	48

	Medio complejo		Medio definido
	fermentador de 2 ó 7 l	fermentador de 800 l	fermentador de 2 l
µh-l	0,130	0,132	0,124
DO (600 nm)	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)			

A partir de los resultados globales surge que:

- el cambio de escala del fermentador de 2 litros a 800 litros puede realizarse sin ningún problema,
 - el oxígeno consumido está fuertemente correlacionado con la biomasa producida (1,08 g O₂/g de biomasa producida),
- 5
- el plásmido fue estable durante al menos 50 generaciones sin presión de selección,
 - puede obtenerse una gran biomasa, mayor de 40 g de células secas/litro, en medio complejo,
 - la producción de ADN plasmídico alcanza 100 mg de ADN superenrollado/l de medio,
- 10
- hubo una muy buena correlación entre la producción de ADN y la biomasa: la producción puede estimarse en (1 mg de ADN plasmídico/unidad DO, o alternativamente (2,7 mg de ADN plasmídico/g de biomasa, independientemente de la duración de la fermentación,
 - el uso de un medio definido también hace posible alcanzar una gran biomasa (30 g de células secas/l) y una alta producción de ADN plasmídico (100 mg/l), sin ninguna pérdida de productividad.

EJEMPLO 6: Transferencia de pXL2774 en células animales, in vitro e in vivo

6.1. Transferencia *in vitro* de pXL2774 en células animales

- 15
- La capacidad del plásmido mínimo pXL2774 para transfectar varias líneas celulares se ensayó in vitro, en células de origen humano y origen murino. El plásmido pXL2784 se usó como control. Contiene el mismo casete de expresión eucariota (promotor CMV-luciferasa-poliA) que pXL2774, pero éste es un derivado de 6,4 kb de ColEI que comprende el gen que confiere resistencia a kanamicina en *E. coli*.

Las células ensayadas son las siguientes:

Células	Tipo	ref. Atcc/ref. bibliográfica
3LL	Carcinoma pulmonar de ratón	
NIH 3T3	Fibroblastos embrionarios de ratón	CCL92
293	Células renales embrionarias humanas transformadas con adenovirus de tipo 5	CRL1573
HeLa	Carcinoma humano del cuello del útero	CCL2
Caco-2	Adenocarcinoma de colon humano	HTB37
H460	Carcinoma de pulmón humano con células no pequeñas	HTB177

Células	Tipo	ref. Atcc/ref. bibliográfica
ECV 304	Células endoteliales del cordón umbilical humano	Takahashi et al., 1990

Las condiciones de la transfección fueron las siguientes:

D-1: Inoculación de las células a una densidad de 100.000 células por 2 cm² pocillo (placa de 24 pocillos) en medio DMEM (Medio de Eagle modificado por Dulbecco) suplementado con 10% suero fetal de ternera (FCS).

- 5 D-3: Transfección de las células, con 10 µl de una disolución de transfección que contiene: 0,5 µg de ADN, 150 mM NaCl, 5% glucosa y 3 nmoles de RPR120 535 lipofectante por µg de ADN, en 250 µl de medio de cultivo, que se suplementó o no con 10% FCS. Después de incubar 2 horas, el medio se reemplazó por 500 µl de medio DMEM suplementado con 10% FCS.

D-4: Renovación del medio de cultivo

- 10 D-5: Lavado de las células con PBS, seguido de lisis con 100 µl de tampón de lisis Promega (Tampón de Lisis Celular Promega E153 A). El ensayo de la actividad luciferasa se realizó en un luminómetro Lumat LB 9501 (Berthold) en 10 µl de lisado, con una duración de la integración de 10 segundos. El reactante usado fue el de Promega (Sustrato del Ensayo de Luciferasa Promega). Los resultados, recopilados en las tablas siguientes 5-8, se expresan en RLU (Unidades Relativas de Luz) para 10 µl de lisado (media de la medida en 4 pocillos). También se proporcionan los coeficientes de variación (CV).

- 15 Los resultados de las transfecciones en ausencia de suero se presentan más adelante.

	TIPOS DE CÉLULAS			
	NIH 3T3	3LL	293	
pXL2774	37 763 380	559270	1 884 200	RLU
	16	25	73	CV
pXL2784		113 764	1 723 546	RLU
		24	101	CV

TIPOS DE CÉLULAS

	HeLa	CaCo2	H460	ECV304
pXL2774	11000000	1 108 422	1459 501	36450
	15	14	5	23
pXL2784	557930	93610	7 563	168795
	87	40	11	40

Los resultados de las transfecciones en presencia de suero (10%) se presentan más adelante:

TIPOS DE CÉLULAS

	NIH 3T3	3LL	293
pXL2774	50612590	566377	992500

	NIH 3T3	3LL	293
	12	18	59
pXL2784	12 693 780	436 704	2 300 000
	38	12	47

TIPOS DE CÉLULAS

	HeLa	H460	ECV304
pXL2774	9490000	857385	18 021
	25	16	30
pXL2784	1 508 480	433 023	32 074
	23	27	47

Estos resultados revelan la capacidad de pXL2774 para transfectar eficazmente, *in vitro*, varios tipos de células de origen murino y humano. La expresión del gen informador *luc* hizo posible mostrar que su eficacia de transfección es al menos tan buena como la de un plásmido "estándar", derivado de ColE1, que porta el mismo casete de expresión de luciferasa.

5

6.2. Transferencia *in vivo*, en animales (ratones), de pXL2774

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

ADN plasmídico desnudo disuelto en "5% glucosa, 150 mM NaCl" se inyectó en el músculo tibial craneal de ratones OF1. Los músculos se recogieron 7 días después de la inyección, se picaron, se homogenizaron en 750 µl de tampón de lisis (Tampón de Lisis Celular Promega E153A) y se centrifugaron a 20.000 × g durante 10 minutos.

10

El ensayo de la actividad luciferasa se realizó en 10 µl de sobrenadante después de la adición de 50 µl de reactivo (Sustrato del Ensayo Luciferasa Promega). La lectura se realizó en un luminómetro Lumat LB9501 (Berthold) con una duración de integración de 10 segundos.

Los resultados se presentan en la tabla siguiente.

Plásmido	pXL2784	pXL2774	pXL2784	pXL2774
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)				
Media	80.922	471 733	35329	30569
Desviación estándar	104573	402602	37041	35774

15 Estos resultados muestran que un plásmido con replicación condicional tal como pXL2774 fue de hecho capaz de transfectar células de músculo de ratón *in vivo* y de hacer esto con una eficacia comparable, o incluso superior, que la de un plásmido "estándar" derivado de ColE1, que porta el mismo casete de expresión del gen luciferasa.

b) Modelo 2: Modelo de tumor 3T3 HER2

El modelo es como sigue:

- Ratones hembras adultas de tipo Swiss/desnudo
- Tumores experimentales inducidos después de inyectar células 107 3T3 HER2 subcutáneamente en el costado.
- La mezcla de transfección se inyectó 7 días después de la inyección de las células.

5 - Disoluciones inyectadas: El ADN se disolvió primero en el tampón. Después de la adición de todos los productos, la mezcla contenía, además de ADN, NaCl (150mM) y 5% D-glucosa en agua ó 5 mM de tampón HEPES.

10 - Dos días después de la inyección, el tejido tumoral se recogió, se pesó y se picó y se homogenizó en 750 μ l de tampón de lisis (Tampón de Lisis Celular Promega E153 A). Después de centrifugar (20.000 \times g durante 10 minutos), se recogieron 10 μ l de sobrenadante y se evaluó la actividad luciferasa. Esta actividad se determinó midiendo la emisión total de luz obtenida después de mezclar con 50 μ l de reactivo (Sustrato del Ensayo de Luciferasa Promega) en un luminómetro Lumat LB 9501 (Berthold) con una duración de integración de 10 segundos.

15 La actividad resultante se expresó en RLU (Unidades Relativas de Luz) estimadas en todo el sobrenadante de lisis tumoral.

Resultados

Tampón	Plásmido			RLU/resultados del tumor		+/n
H2O o HEPES	referencia	μ g/tumor	[ADN] final en disol. iny.	media	desviación estándar	
HEPES	pXL2784	10	0,5 μ g/ μ l	744 150	682434	6/6
	pXL2774	10	0,5 μ g/ μ l	1016380	1 322 500	5/6
H2O	pXL2784	24	0,6 μ g/ μ l	2 906 073	1 745 857	8/8
	pXL2774	16,8	0,4 μ g/ μ l	4292043	4 995 187	6/6
H2O	pXL2784	7,5	0,3 μ g/ μ l	702554	552207	6/7
	pXL2774	5	0,2 μ g/ μ l	3 413 430	4000875	6/6

Estos resultados muestran que un plásmido con replicación condicional tal como pXL2774 fue de hecho capaz de transfectar células tumorales de ratón *in vivo* y de hacer esto con una eficacia al menos comparable con la de un plásmido "estándar" derivado de ColE1, que porta el mismo casete de expresión del gen luciferasa.

20 Estos diferentes experimentos demuestran que los plásmidos con replicación condicional, y más particularmente pXL2774, tenían de hecho características de transfección en células animales que son esenciales para uso en terapia génica. Más precisamente, se mostraron los siguientes:

1) la capacidad de pXL2774 para transfectar eficazmente, *in vitro*, varios tipos de células de origen humano o murino;

25 2) la capacidad de pXL2774 para transfectar, *in vivo*, músculo de ratón;

3) la capacidad de pXL2774 para transfectar, *in vivo*, células tumorales implantadas en ratones.

Los experimentos de electrotransformación, fermentación y transfección hicieron así posible validar los plásmidos con replicación condicional como vectores que pueden usarse en terapia génica mostrando:

30 i) que no se replicaban de manera detectable en una cepa de E. coli que no expresa el gen *pir* (origen de replicación condicional)

ii) que podían producirse en una escala compatible con la producción industrial, en un medio definido que no contiene antibióticos;

iii) que estos plásmidos podían transfectar, *in vitro* y especialmente *in vivo*, células de mamífero.

EJEMPLO 7: Producción in vitro de proteínas recombinantes

7.1. Construcción del vector de expresión

Para mostrar la viabilidad de dicha estrategia, construimos un vector de expresión según los criterios descritos anteriormente (Ejemplos 2 y 3). Este vector, pXL3056, contiene:

5 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 bacterias (*sup*)

10 2) el casete de expresión, basado en el sistema descrito por Studier (Studier et al., 1990), que comprende el promotor del gen 10 del bacteriófago T7, el operador *lacO*, el gen que codifica aFGF 154 (factor de crecimiento de fibroblastos ácido, forma que contiene 154 aminoácidos) (Jaye et al., 1986), y el terminador TF del bacteriófago T7. Este casete de expresión es idéntico al presente en el plásmido pXL2434, que se describe en la solicitud WO 96/08572.

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

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

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

20 7.2. Producción de la cepa de expresión

25 El plásmido pXL3056 se introdujo por transformación en la cepa XAC-1*pir116*. La cepa resultante se transformó con el plásmido PT7pol23 (Mertens et al., 1995), a 30°C. Con el fin de expresar el gen de interés bajo el control del promotor T7, la bacteria debe contener en su genoma, en un plásmido, o un bacteriófago, un casete que permita la expresión de la ARN polimerasa del bacteriófago T7. En el ejemplo descrito, usamos el plásmido pT7pol23, que es compatible con los derivados de R6K tales como pXL3056, y que permite la expresión inducible por la temperatura de la ARN polimerasa del bacteriófago T7. Sin embargo, también se puede considerar lisogenizar la cepa XAC-1*pir116* con *lambda* DE3 (Studier et al., 1990) para conservar sólo un plásmido y para inducir la producción de ARN polimerasa de T7 por IPTG en lugar de por la temperatura.

7.3. Expresión de aFGF

30 La cepa XAC-1*pir116* (pXL3056+PT7po123) se cultivó a 30°C en medio mínimo M9 suplementado con 0,2% de casaminoácidos (DIFCO) y kanamicina (25 µg/ml), hasta una densidad óptica a 600 nm de 0,6-1,0. La mitad del cultivo se puso a 42°C (inducción de la ARN polimerasa T7), mientras que la otra mitad permaneció a 30°C (control negativo). El mismo experimento se realizó con la cepa XAC-1*pir116* (pXL3056+pUC4K) que constituye un control para la expresión de aFGF en ausencia de ARN polimerasa de T7.

35 Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 9. Muestran que la producción de aFGF era comparable o superior a la observada con BL21 (DE3)(pXL2434) (WO 96/08572), que muestran claramente el potencial de los plásmidos de replicación condicional para la expresión de proteínas recombinantes in vitro, especialmente en E. coli.

EJEMPLO 8: Construcción de un vector pCOR que expresa una proteína p53 de tipo salvaje o híbrida o la proteína humana FGF1

40 Este ejemplo describe la construcción de vectores de replicación condicional según la invención que contienen un ácido nucleico que codifica una proteína p53. Estos vectores pueden usarse para restaurar una actividad de tipo p53 en células deficientes (mutadas, delecionadas) tales como, en particular, células tumorales.

El casete de expresión eucariota contiene los elementos siguientes:

45 1) el promotor de CMV "inmediato temprano" (posiciones -522 a +72) seguido de una secuencia líder del gen de la timidina quinasa del virus del herpes simple tipo I (posición -60 a +1 del gen, con referencia a la secuencia en el artículo por McKnight, S.†L. (1980) Nucleic Acids Res. 8:5949-5964);

2a) un ácido nucleico que codifica la proteína p53 de tipo salvaje o una variante de p53, como se describe en la solicitud PCT/FR 96/01111 (V325K variante = V325 con una secuencia Kozak con ATG);

50 2b) un ácido nucleico que codifica FGFa o FGF-1 humano como se describe en Jaye M. (Sciences 1986; 233(4763):451, patente US No: 4.686.113, y Patente Europea No: 259 475;

2c) un ácido nucleico que codifica un gen de fusión entre la señal de secreción del interferón de fibroblastos humanos (Taniguchi et al.) y la forma truncada natural de FGF-1 humano desde el aminoácido 21 al 154 como describen Jaye et al., y US 5.849.538.

3) la secuencia de poliadenilación poliA de SV40.

- 5 Estos elementos se pusieron en la forma de un fragmento *Ascl-XbaI* en el vector pCOR pXL2988 entre los sitios *BssHII* y *SpeI*. pXL2988 es idéntico a pXL2979 (Ejemplo 7.1.) aparte de la presencia de un elemento adicional, una secuencia capaz de formar una triple hélice de ADN compuesta por 17 copias del trinucleótido GAA, situado al lado del origen de replicación gamma.

Los plásmidos resultantes se denominaron pXL3029, pXL3030, pXL3179 o NV1FGF (Figura 10).

- 10 La funcionalidad de estas construcciones se verificó *in vitro* en células p53-SAOS2 en cultivo midiendo la actividad de activador transcripcional de p53 o p53superWT, o midiendo la secreción de FGF1 por ejemplo por experimentos ELISA que es muy conocido en la técnica.

EJEMPLO 9: Construcción de TEX 1 (XAC1 *pir116*, *endA*⁻, *traD*⁻)

- 15 *E. coli* XAC-1*pir116* contiene un episoma F', una molécula de ADN circular de aproximadamente 100kb, que porta *proB*⁺ *lacI*₃₇₃*lacZ*_{u118m}. Muchas cepas macho de *E. coli* de laboratorio, portan una mutación *traD36* en su episoma, pero no se ha descrito ninguna mutación que afecte la capacidad de transferencia de F' descrita para XAC-1. El gen *traD* está en el extremo 5' de uno de los operones *tra* (transferencia) y codifica una proteína de membrana que está implicada directamente en la transferencia de ADN y en el metabolismo del ADN (Frost et al., BBRC, 1994, 58:162-210). Un fragmento central de 2kb de *traD*, que comprende 92% del gen, se reemplazó por el elemento omega de 2kb (número de registro Genbank M60473) de pHP45Q (Prentki y Krisch, 1984, Gene, 29:303-313) por recombinação homóloga en XAC-1*pir116 endA*⁻. El elemento omega contiene el gen de resistencia a antibiótico *aadA* flanqueado por repeticiones invertidas cortas. El gen *aadA* codifica la aminoglicósido-3 adeniltransferasa y confiere resistencia a estreptomina y espectinomicina ("Sp^R"). El fragmento omega se usó porque termina prematuramente la síntesis de ARN y proteínas lo que da lugar a la inactivación de todo el operón *traD*. Esta nueva cepa pCOR XAC-1*pir116 endA*⁻ *traD*⁻:SpR se designó TEX1. La transferencia de cualquier plásmido residente, bien pCOR o pUC, fue indetectable cuando el donante fue TEX1.
- 20
- 25

- La nueva cepa huésped de pCOR TEX1 se evaluó en experimentos de fermentación. Se usó medios complejos que contienen extracto de levadura para fermentación con alimentación discontinua con XAC-1*pir116*. La estabilidad de pCOR (más de 50 generaciones) hace posible usar un medio no selectivo. Bajo estas condiciones, XAC-1*pir116* produjo más de 40 g/l peso seco de células y se obtuvieron 100 mg/l de pCOR pXL2774 a partir de fermentadores de 2 litros. El número de copias de pCOR se estimó en 400-500 copias por células y la velocidad de síntesis del ADN plasmídico fue constante a lo largo de la fermentación. Estos resultados se extrapolaron a un fermentador de 800 litros adecuado para la fabricación. La fermentación también se realizó en ausencia de extracto de levadura o cualquier material crudo de origen animal. Se obtuvieron resultados similares (30g/l peso seco de células y 100 mg/l de ADN plasmídico) usando un medio definido en cultivos de 2 litros sin pérdida de productividad.
- 30
- 35

EJEMPLO 10: Construcción de cepas huésped XAC-1*pir116pir42* por recombinação homóloga

1) Construcción de un vector suicida que porta el casete "*KmR-uidA:pir116;pir42*"

- El casete *Km*^R-*uidA::pir116* de M13wm33 como se describe en el Ejemplo 1 (Metcalf W. et al. Gene, 1994, 138(1-2): p. 1-7), se modificó por mutagénesis dirigida a sitio usando PCR (kit de mutagénesis dirigida a sitio QuickChange, Stratagene, La Jolla, CA) para introducir la mutación *pir42* en el gen *pir116*. Las diferentes etapas de clonación/mutagénesis se describen en la Figura 13
- 40

Los oligonucleótidos usados para mutagénesis contenían la mutación *pir42* junto con una mutación silenciosa que creó un sitio *ClaI* para indicar fácilmente el procesamiento de *pir42* por análisis de restricción cuando se necesitó.

Los oligonucleótidos con sentido y antisentido usados son los siguientes:

- 45 Oligonucleótido con sentido número 11076 (SEQ ID NO: 7)

5'-G TAT ATG GCG CTT GCT CTC ATC GAT AGC AAA GAA CC-3'
pir42 ClaI

Oligonucleótido antisentido número 11077 (SEQ ID NO: 8)

5'-GG TTC TTT GCT ATC GAT GAG AGC AAG CGC CAT ATA C-3'

*Cla*I *pir42*

La técnica usada para reemplazar *pir116* por *pir116pir42* en el genoma del huésped TEX1 de *E. coli* pCOR se basó en el de Blum et al. (J.Bacteriol. 1989, 171, p 538-46). El bacteriófago recombinante pXL3723 mostrado en la Figura 13 es un vector suicida en todas las cepas de *E. coli* no supresoras, porque tiene una mutación sin sentido en el gen II que codifica la nickasa M13 que evita la replicación del genoma viral.

Se realizó una doble recombinación como se ha descrito para la construcción de XAC-1*pir116* (Ejemplo 1, punto 2). Los clones que habían sufrido eventos de doble recombinación homóloga se cribaron por PCR para ensayar la presencia de la mutación *pir42* en el genoma de TEX1. El ADN genómico aislado de los candidatos de doble recombinación se usó como molde para PCR. En segundo lugar, la secuenciación se hizo en cada único fragmento amplificado, todos los cuales tuvieron el tamaño esperado. Los fragmentos de PCR se muestran en la Figura 14.

Los cebadores de PCR fueron los siguientes:

Cebador 11088 (SEQ ID N°: 9) :5'-GAGATCGCTGATGGTATCGG-3'

Cebador 11089 (SEQ ID N°: 10): 5'-TCTACACCACGCCGAACACC-3'

Este análisis mostró que uno de los seis dobles recombinantes ensayados había sufrido el intercambio de alelos. Esta nueva cepa, denominada TEX1*pir42*, se evaluó más para su capacidad de replicar plásmidos pCOR comparado con la cepa parental TEX1.

2) Evaluación de TEX1*pir42*

Los plásmidos pCOR se transformaron en paralelo en TEX1 y TEX1*pir42* y se crecieron toda la noche en 2 ml de medio selectivo M9. Después, el ADN plasmídico se extrajo con el kit Wizard SV plus minipreps (Promega) para evaluar el número relativo de copias del plásmido y la topología de los plásmidos pCOR en ambas cepas.

Se obtuvo de manera reproducible un incremento de 2 veces en el número de copias en TEX1*pir42* transformadas con el plásmido pCOR pXL3516 (2,56 kb). Para caracterizar más TEX1*pir42*, el número de copias y la topología de los plásmidos pCOR tal como pXL3179 y pXL2774 se evaluaron por análisis de electroforesis en gel de agarosa después de una purificación a pequeña escala del ADN plasmídico (4 a 6 clones/cepa). El número de copias se evaluó en plásmidos linealizados con la enzima de restricción *Eco*RI. Se realizó un ensayo de topología en plásmidos no digeridos, en ausencia de bromuro de etidio. El gel de agarosa resultante se muestra en la Figura 15, y muestra claramente un mayor número de copias cuando el plásmido pXL3179 se produjo en TEX1*pir42*, que cuando se produjo en la cepa TEX1. La Figura 15 también muestra la topología del plásmido pXL3179, y muestra un incremento en el número de copias de plásmidos, que estaban esencialmente en la forma de monómeros, con pocos plásmidos en la forma de multímeros. Los resultados obtenidos con estos plásmidos pCOR también se resumen en la Tabla 5. El número de copias relativo se calculó en comparación con el mismo plásmido en TEX1. Se observó un incremento del número de copias de plásmidos de 2-3 veces con los plásmidos pXL3179 y 2774 producidos en TEX1*pir42*.

TABLA 5: Replicación y número de copias de los plásmidos pCOR producidos en TEX1*pir-42*

PLÁSMIDOS	TAMAÑO (kb)	NÚMERO DE COPIAS RELATIVO*
pXL3179	2,4	x3
pXL2774	4,5	x2

* el número de copias se comparó con el mismo plásmido en TEX1.

EJEMPLO 11: Experimentos comparativos: construcción de TEX1*cop21* (XAC-1*endA-traD-pir116cop21*)

1) Construcción de TEX1*cop21*

La cepa TEX1*cop21* se construyó de manera similar a la descrita en el Ejemplo 10 para TEX1*pir42*. Los oligonucleótidos siguientes usados para introducir *cop21* en el gen *pir116* por mutagénesis dirigida fueron los siguientes:

Oligonucleótidos con sentido: 11153 (SEQ ID NO: 11)

5'-CG CAA TTG TTA ACG TCC AGC TTA CGC TTA AGT AGC C-3'

cop21

Oligonucleótido antisentido: 11154 (SEQ ID NO: 12)

5'-G GCT ACT TAA GCG TAA GCT GGA CGT TAA CAA TTG CG-3'

5 La mutación *cop21* se introdujo como un codón serina TCC en lugar del codón serina TCA para eliminar un sitio de restricción *HindIII* cercano a la mutación.

El molde usado para la mutagénesis dirigida fue pXL3395 (véase la Figura 13). El plásmido resultante denominado pXL3432 se usó para construir el vector suicida M13 de una manera similar a la mostrada para *pir42* en la Figura 13. El vector suicida pXL3749 se muestra en la Figura 16.

10 Los clones de *E. coli* obtenidos después de recombinación homóloga con pXL3749 se cribaron por PCR y restricción posterior con *HindIII* y secuenciación para monitorizar las mutaciones *cop21* y *pir116*. Un clon de los seis dobles recombinantes ensayados había sufrido el reemplazo génico. La cepa resultante se denominó TEX1*cop21*.

2) Evaluación de TEX1*cop21*

15 TEX1*cop21* se transformó con varios plásmidos pCOR, incluyendo pXL2979, un vector de 2,5 kb Km^R pCOR (Véase el Ejemplo 7.1), y se ensayó para número de copias incrementado por electroforesis en gel. Dicho experimento con pXL2979 se muestra en la Figura 17. El ADN plasmídico de cuatro clones independientes para cada cepa preparado con el kit Promega miniprep se lializó con *EcoRI*, se sometió a electroforesis en gel de agarosa y se tiñó con bromuro de etidio. Cada muestra representó una cantidad similar de bacterias, como se mide por densidad óptica a 600 nm. La electroforesis en gel de agarosa obtenida para el plásmido pCOR pXL2979 producido en *E. coli* 20 TEX1*cop21*, XAC1*pir*, y TEX1 se muestra en la Figura 17. Muestra claramente que no hubo un incremento en el número de copias de los plásmidos cuando los plásmidos se producen en la cepa TEX1*cop21*, comparado con TEX1.

EJEMPLO 12: Construcción de TEX2*pir42* (XAC-1*pir116pir42 recA*)

En primer lugar, se construyó un derivado *recA* de TEX1. La mutación *pir42* se introdujo en la cepa resultante denominada TEX2 para generar TEX2*pir42*.

25 1) Construcción de *E. coli* TEX2, un derivado *recA* de TEX1

Un gen *recA* delecionado que contiene 3 codones de parada de la traducción (uno en cada marco) en su extremo 5' se obtuvo por PCR. Este gen *recA* delecionado se introdujo por reemplazo génico (Blum et al., J. Bacteriol., 1989, 171, p. 538-46) en el genoma de TEX1. La construcción del vector suicida para recombinación homóloga se muestra en la Figura 18.

30 Los cebadores de PCR usados para la amplificación de los fragmentos *recA* se muestran en la Tabla 6 siguiente:

TABLA 6

cebadores	secuencias de ADN
seq 10930 SEQ ID NO: 13	5'CCCTCTAGATCGATAGCCATTTTTACTCCTG 3'
seq 10931 SEQ ID NO: 14	5'CGGGATCCTGATTATGCCGTGTCTATTAG 3'
seq 10932 SEQ ID NO: 15	5' CCCAAGCTTCTTCGTTAGTTTCTGCTACGCCTTCGC 3'
seq 10933 SEQ ID NO: 16	5'GGTCTAGAACGTGAAAGTGGTGAAGAACAAAATCG 3'

Los sitios de restricción añadidos a la secuencia *recA* están subrayados.

35 Para mantener el fenotipo RecA⁺ necesario para que ocurra la recombinación homóloga, se proporcionó la función *recA* para *E. coli* TEX1 con un plásmido que contiene un gen *recA* heterólogo que puede complementar los mutantes *E. coli recA*, tal como por ejemplo el gen *recA* de la bacteria *Agrobacterium radiobacter*, y un gen de resistencia a antibiótico, tal como el gen de resistencia a ampicilina. Después del reemplazo génico, el plásmido se eliminó de la cepa recombinante por dilución del cultivo en medio no selectivo (LB). La ausencia del plásmido se cribó para la pérdida de resistencia a antibiótico.

La cepa resultante se denominó TEX2. El reemplazo génico se monitorizó por PCR en la Figura 19. Los cebadores de PCR se describen en la Tabla 7 siguiente.

TABLA 7

	Cebadores 11355-11354	Cebadores 11355-11354
recA de tipo salvaje	1117 pb	1089 pb
recA deleciónado	404 pb	376 pb

5 El primer cebador se basó en la secuencia del gen *recA*. El segundo se basó en una secuencia cercana a pero fuera de la región de homología presente en el vector suicida pXL3457 (inmediatamente 5' ó 3' de *recA*) para asegurar que la amplificación sólo pueda ocurrir en un fragmento genómico. La secuencia de ambos oligonucleótidos se eligió según la secuencia de *E. coli*, que comprende el locus *recA* (Genbank ECAE000354).

Los fragmentos de PCR obtenidos de una cepa con *recA* deleciónado fueron más cortos comparados con los obtenidos con una cepa de tipo salvaje, como se presenta en la Tabla 8 siguiente.

10 TABLA 8: Cebadores de PCR para la amplificación de *recA*

cebadores	secuencia 5'->3'
seq 11352 - SEQ ID NO: 17	GCGACCCCTGTGTATCAAAC
seq 11353 - SEQ ID NO: 18	GGTATTACCCGGCATGACAG
seq 11355 - SEQ ID NO: 19	GTGGTGGAATGGCGATAGG
seq 11354 - SEQ ID NO: 20	GCGATTTTGTCTTCACCAC

El perfil de PCR obtenido fue como se esperaba y demostró la presencia de un gen *recA* truncado en el genoma de TEX2. Se comprobó el fenotipo *recA* (sensibilidad a la luz UV), así como las características fenotípicas de TEX2. Las características fenotípicas de TEX2 fueron las mismas que las de la cepa TEX1, es decir, ara⁻, Rif^R, Nal^R, Sp^R, UidA⁻, Arg⁻, Km^S Amp^S), como se esperaba.

15 B) Construcción de *E. coli* TEX2*pir42*

Una cepa *TEX2pir42* se construyó por doble recombinación homóloga, según la estrategia descrita en el Ejemplo 10, con la excepción de que la recombinación en TEX2 se realizó en presencia de un plásmido que porta un gen *recA* heterólogo capaz de complementar los mutantes *E. coli recA*, con el fin de mantener un fenotipo *recA*+ requerido para la recombinación homóloga.

20 El reemplazo génico se monitorizó por análisis de restricción del producto de PCR digerido con *ClaI* (véase la Figura 14). El reemplazo génico había ocurrido en dos de los cuatro clones dobles recombinantes estudiados.

C) Evaluación de *E. coli* TEX2*pir42*

1) Evaluación de la producción de plásmidos a escala de laboratorio:

25 *TEX2pir42* se transformó con el plásmido pCOR pXL3179 (2,4 kb). La producción de pXL3179 en *TEX2pir42* se estudió intensivamente a escala de laboratorio, en términos de reproducibilidad de la mejora del número de copias de plásmidos, condiciones de cultivo, así como estabilidad (número de generaciones). Todos los estudios mostraron consistentemente un incremento de 2 a 5 veces en el número de copias de plásmidos comparado con la producción de pXL3179 en TEX1 bajo las mismas condiciones. El número de copias de plásmidos se evaluó más para la producción de pXL3179 en *TEX2pir42*, y *TEX1pir42* y TEX1 como experimentos comparativos. En este experimento, los plásmidos se extrajeron a partir de una biomasa bacteriana idéntica, tomando como base la DO a 600 nm, y se analizaron por electroforesis en gel de agarosa. El gel se tiñó con bromuro de etidio después de la electroforesis. La electroforesis en gel de agarosa, que se muestra en la Figura 20, muestra claramente que los plásmidos se producen en *TEX2pir42* a un número de copias alto, y ventajosamente muestra que los multímeros de plásmido se reducen cuando se producen en *TEX2pir42* en lugar de en *TEX1pir42*.

35 2) Evaluación en fermentadores:

Estos resultados se confirmaron a una mayor escala en fermentadores de 7 litros, como se describe más adelante.

a) Composición de los medios de fermentación

La composición del medio usado para los cultivos de inóculo fue: Na₂HPO₄ 6 g/l, KH₂PO₄ 3 g/l, NaCl 0,5 g/l, NH₄Cl 1 g/l, NH₄H₂PO₄ 3 g/l, glucosa 5 g/l, MgSO₄·7H₂O 0,24 g/l, CaCl₂·2H₂O 0,015 g/l, tiamina HCl 0,010 g/l.

- 5 La composición del medio usado para el cultivo con alimentación discontinua fue la siguiente: KH₂PO₄ 8 g/l, K₂HPO₄ 6,3 g/l, Na₂HPO₄ 1,7 g/l, NH₄Cl 2,5 g/l, glucosa 10 g/l, MgSO₄·7H₂O 2,6g/l, tiamina 0,011g/l, Biospumex36 antiespumante 0,1ml/l, mezcla de sales (véase la tabla 9) 2,5 ml/l.

TABLA 9 : Composición de la mezcla de sales

	Disolución de Mezcla de Sales (g/100ml)	Concentración final en el medio de alimentación discontinua
FeSO ₄ , 7H ₂ O	1,6	40
CaCl ₂ , 2H ₂ O	1,6	40
MnSO ₄ , H ₂ O	0,4	10
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0,16	4
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	0,08	2
MoO ₄ Na ₂ , 2H ₂ O	0.072	1,8
CuCl ₂ , 2H ₂ O	0,04	1
H ₃ BO ₃	0,02	0,5
AlCl ₃ , 6H ₂ O	0,04	1

La composición del medio de suministro fue la siguiente: 50% glucosa, 0,7%, magnesio 0,02% tiamina-HCl, 1% Biospumex36 antiespumante.

10 b) Parámetros de la fermentación

Un fermentador de 7 litros que contiene 3 litros del medio de alimentación discontinua se inoculó con 1,2% del cultivo de inóculo. El inóculo se preparó como sigue: 250ml del medio de inóculo en un matraz de 2 litros se inoculó con 0,25ml de una suspensión celular congelada de la cepa de *E. coli* TEX2pir42 (pXL3179).

- 15 Los matraces se incubaron durante 24 horas a 37°C a 220 rpm. Después de 24 horas, se midieron diferentes parámetros: glucosa residual: 0g/l, DO_{600nm} fue 2,7 y pH 6,24. Durante la fermentación, el pH se controló y se ajustó automáticamente entre 6,9 y 7 con NH₃. La temperatura se mantuvo a 37°C y el oxígeno disuelto se ajustó a una pO₂ de 45% por retroacción en la velocidad de agitación.

- 20 Después de un cultivo discontinuo inicial de la cepa bacteriana durante aproximadamente 17 horas y el consumo de la fuente de carbono (glucosa) se añadió el medio de suministro. La glucosa y los ácidos, tales como lactato y acetato, se mantuvieron a una concentración cercana a 0.

c) Resultados

Los resultados finales se presentan en la Tabla 10, comparado con la producción en un fermentador de 100 litros con *E. coli* TEX1 (pXL3179) en condiciones optimizadas.

- 25 Como para XAC-1pir116, no hubo diferencia entre los fermentadores de 7 litros y de 800 litros en términos de número de copias de plásmidos de pXL3179 producidos en TEX1.

Los plásmidos pXL3179 producidos en un fermentador de 7 litros usando *E. coli* TEX2pir42 se compararon con la producción de pXL3179 en un fermentador de 100 litros con *E. coli* TEX1, en condiciones optimizadas. Se demostró que como para XAC-1pir116 (Véase el Ejemplo 5.3), hay una velocidad estable de producción de plásmido en un fermentador de 7 litros, 100 litros ó 800 litros en TEX1.

Tabla 10: Características de la fermentación de las cepas TEX1 y *TEX2pir42* que contienen pXL3179.

	Referencia	Duración de la fermentación (h)	DO final (600nm)	Peso Seco de Células	Concentración de ADN (mg/l)	Número de copias estimado (copia/bacteria)
TEX1 (pXL3179)	OpGen 090	43,00	104	33,1	96	616-627
TEX2 <i>pir42</i> (pXL3179)	Op132 8S5	48,47	72	27,1_	205	1896-1904

Hubo 3 veces más copias del plásmido pXL3179 por bacteria en *TEX2pir42* comparado con TEX1.

Los plásmidos correspondientes a los diferentes puntos de tiempo de la fermentación se extrajeron a partir de una biomasa bacteriana idéntica, tomando como base la DO a 600 nm, y se analizaron por electroforesis en gel de agarosa. La Figura 21 muestra claramente un incremento en el número de copias de plásmidos con la duración de la fermentación. También, la Figura 21 muestra la topología del plásmido pXL3179 producido en Op1328S5 *TEX2pir42*, que fue casi exclusivamente en una forma monomérica.

En conclusión, la cepa huésped de *E. coli TEX2pir42* según la presente invención proporcionó una mejora en el número de copias de plásmidos inesperadamente alto de plásmidos pCOR, tal como pXL3179, de 2 a 5 veces en *TEX2pir42* comparado con TEX1, a escala de laboratorio y en fermentadores. Además, mientras el número de copias de plásmidos se mejoró mucho, los plásmidos así producidos presentaron una topología monomérica, no sólo a escala de laboratorio sino también a mayor escala (fermentador de 7 litros) compatible con la producción industrial.

EJEMPLO 13: Nuevos Mutantes Con Alto Número de Copias de *pir116* Identificados por un Nuevo Método de Cribado Basado en Fluorescencia

Para incrementar el número de copias de plásmidos pCOR en células huésped bacterianas, hemos mutagenizado el gen *pir116*, que codifica una versión mutada con alto número de copias del gen *pir*. Hasta la fecha, todas las mutaciones que incrementan el número de copias de plásmidos derivados de R6K, tal como realizaciones de pCOR, se han encontrado en el gen *pir*.

Después de mutagénesis aleatoria por PCR, se introdujeron genes mutados *pir116* en un vector pCOR que contiene el gen informador *cobA*, que se describe más adelante. Después de cribado basado en fluorescencia, se evaluaron el número de copias y topología del plásmido mutante seleccionado. Obtuvimos tres mutantes diferentes del gen *pir116* que incrementan el número de copias de plásmidos. Estas nuevas mutaciones no se han descrito previamente.

Un método clásico de cribado para mutantes con alto número de copias se basa en resistencia a antibióticos. En este método, el nivel de resistencia de una bacteria huésped a un antibiótico es función del número de copias de un gen de resistencia a antibiótico localizado en un plásmido en el interior de la célula. Al incrementarse el número de copias de del plásmido y, por lo tanto, el gen de resistencia a antibiótico, el nivel de resistencia a antibióticos también se incrementa. Este método, sin embargo, no fue aplicable para los plásmidos derivados de R6K en células huésped que contienen la mutación *pir116* debido a un número de copias del plásmido demasiado alto en la línea base (aproximadamente 400 copias/célula) en estas células. Consecuentemente, se desarrolló un nuevo método de cribado basado en fluorescencia para identificar mutaciones que resultan en alto número de copias del gen *pir116*.

Para este nuevo método, el gen *cobA* se introdujo en un vector pCOR para proporcionar un medio sencillo para monitorizar la mejora en el número de copias de plásmidos. El gen *cobA* se obtuvo de *Pseudomonas denitrificans* (Crouzet et al., J. Bacteriol, 172:5968-79 (1990)). Codifica uroIII metiltransferasa, una enzima de la ruta de la vitamina B12 que añade dos grupos metilo a la molécula de urógeno III. Cuando se sobreexpresa en *E. coli*, *cobA* da lugar a la acumulación de productos rojos que son fluorescentes en luz UV cercana. Cuando se exponen a UV, las colonias bacterianas que sobreexpresan este gen aparecen rosa a rojo. Ensayamos este gen para determinar si podría servir como gen informador para el número de copias de plásmidos en el sistema pCOR.

Para evaluar la relación entre el número de copias de plásmidos y el nivel de fluorescencia de las bacterias transformadas expuestas a luz UV, se construyó un plásmido control (pXL3767) que comprende *cobA* delecionado de su propio promotor (Fig. 22). Este plásmido se transformó en tres cepas huésped diferentes (*XAC1pir*, *XAC1pir116* y *TEX1pir42*). Estas cepas se seleccionaron tomando como base experimentos previos que muestran que el número de copias medio de un plásmido pCOR en *XAC1pir* es 1, es aproximadamente cinco a diez veces mayor en TEX1, y 15 a 30 veces mayor en *TEX1pir42*.

Las colonias recombinantes se sembraron en medio mínimo M9 y se expusieron a luz UV en un transiluminador como se muestra en la Figura 22. Observamos que la intensidad de la fluorescencia de las colonias se

correlacionaba positivamente con el número de copias de plásmidos, presentando XAC1*pir116* más fluorescencia que XAC*pir*, y TEX1*pir42* presentando más fluorescencia que XAC1*pir116*.

5 Los resultados mostrados en la Fig. 22 demuestran que este método de ensayo basado en fluorescencia discrimina fácilmente entre los números de copias de plásmidos ensayados, especialmente entre el número de copias de plásmidos encontrado en las cepas TEX1 y TEX1*pir42*. Esto es, la intensidad de fluorescencia roja observada en este ensayo se incrementa con el número de copias de plásmidos pCOR-*cobA*.

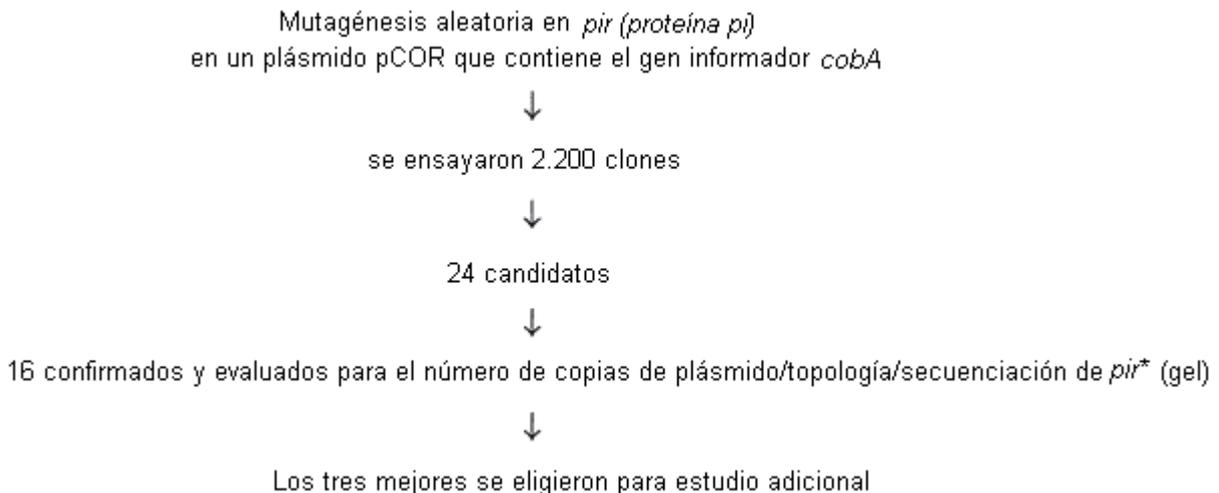
10 Habiendo demostrado una correlación positiva entre fluorescencia y número de copias de *cobA*, construimos un plásmido en el que introducimos genes *pir116* mutagenizados para cribado. Cuatro plásmidos con diferentes combinaciones de módulos constitutivos, como se muestra en la Fig. 23, se construyeron y se ensayaron. Uno de estos plásmidos demostró un nivel significativamente diferente de fluorescencia cuando se transformó en las cepas isogénicas *pir116* y *pir116pir42*. Este plásmido, pXL3830, se muestra en la parte pertinente en la Fig. 24.

15 Se usaron plásmidos control durante los experimentos de cribado y evaluación. En primer lugar, se usó un plásmido control de nivel basal, pXL3830, que contiene *pir116* "tipo salvaje" para ajustar un nivel de fluorescencia basal. En segundo lugar, pXL3795, que contiene la doble mutación *pir116-pir42* que incrementa el número de copias del plásmido por 4 a 6 comparado con pXL3830, se usó como control positivo.

20 Se realizó mutagénesis aleatoria en el gen *pir116* usando el kit de mutagénesis aleatoria Diversify PCR (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA, EEUU). Se usó la condición 1, que introdujo una media de 2 mutaciones por 1.000 pares de bases. Un experimento preliminar realizado usando la "condición 1" ha mostrado por secuenciación de 12 mutantes que la proporción de mutación era realmente aproximadamente 2 mutaciones en el gen *pir116*. El gen *pir116* se amplificó como un fragmento *EcoRI-SstI* con los oligonucleótidos C8832 (5'-CTTAACGGCTGACATGGGAATTC-3') (SEQ ID NO: 23) y C8833 (5'-CGATGGGCGAGCTCCACCG-3') (SEQ ID NO: 24). Después de digestión con *EcoRI* y *SstI*, el fragmento mutagenizado que contiene *pir116* se clonó en pXL3830 en lugar del gen *pir116* "tipo salvaje".

25 Los plásmidos que portaban *pir116* mutagenizado ("*pir116**") se transformaron en la cepa de *E. coli* XAC-1, la parental del huésped pCOR XAC1*pir116*. Los transformantes se cribaron para fluorescencia incrementada bajo luz UV y se compararon con los controles XAC1(pXL3830) y XAC1(pXL3795). Una placa en duplicado no se expuso a UV para minimizar las mutaciones secundarias. Una placa de cribado representativa bajo luz UV se muestra en la Fig. 25.

El diagrama de flujo siguiente resume los resultados del experimento de cribado.



30 La evaluación de los tres mutantes seleccionados se resume en la Fig. 26. Cada mutante mostró un incremento en el número de copias comparado con el plásmido *pir116*. En el caso de los mutantes 114C y 100B, el plásmido estaba esencialmente en forma monomérica. Esto podría ser una ventaja comparado con un plásmido *pir116pir42*, que tiene un número de copias incrementado y un alto contenido en multímeros, como el mutante 201C.

35 El gen *pir116** de cada mutante se secuenció. Cada clon contiene una única mutación no isocodificante en *pir116* ORF. Las tres mutaciones afectan el extremo C de la proteína pi, que está implicada en la unión a ADN. Ninguna de estas mutaciones se ha descrito anteriormente.

Una vez detectadas por cribado en un sistema de plásmidos, estas mutaciones se evaluaron en un sistema de producción, es decir, en el que el gen *pir116** se introduce en el genoma de una cepa huésped de *E. coli* pCOR. La estrategia para esta evaluación se resume en la Fig. 27.

5 Para esta evaluación, el plásmido pXL3179 se transformó en cada una de las tres cepas de *E. coli* que alberga las mutaciones identificadas en la Fig. 26, y se evaluó para el número de copias y topología del plásmido. Los resultados de estos experimentos se presentan en la Fig. 28. Se observó que el número de copias de plásmidos se incremento significativamente respecto a XAC1*pir116* sólo para el mutante 201C.

EJEMPLO 14: Minicírculo con el gen III de M13 como una herramienta para la integración por recombinación homóloga en *E. coli*

10 1. Vectores suicida

El reemplazo génico por doble recombinación homóloga en *E. coli* requiere el uso de un vector suicida. Estos vectores se construyen y producen en un huésped capaz de replicarlos y se usan posteriormente para recombinación en el cromosoma de un huésped incapaz de replicarlos.

15 El bacteriófago M13 es una herramienta genética muy útil que puede usarse en mutantes *rep* (Metcalf, W., W. Jiang, et al., Gene 138:1-7 (1994)) o en cepas de *E. coli* no supresoras cuando se usan M13 mp8 a 11 (Blum, P. et al., J Bacteriol., 171:538-46 (1989)). Frecuentemente, se encuentran determinadas limitaciones en términos de construcción, tamaño del inserto e inestabilidad. Los plásmidos que portan el origen de replicación de ADN gamma de R6K son vectores suicida muy conocidos (Miller, V. y J. Mekalanos, J Bacteriol., 170:2575-83 (1988)), pero no son útiles para modificar cepas de *E. coli* que expresan la proteína pi, que permite que dichos plásmidos se repliquen.

20 Se construyó por ingeniería un vector suicida universal con un nuevo marcador contraseleccionable y se usó para construir cepas de *E. coli* en las que se insertan mutantes del gen *pir116* (*pir116**) en un genoma bacteriano por recombinación homóloga. La estrategia presentada aquí se demuestra para el mutante 114C, pero también se ha usado para producir cepas que albergan otros mutantes *pir116**.

25 2. Marcador contraseleccionable

Pueden usarse diferentes marcadores para seleccionar bacterias que han sufrido un segundo evento de recombinación. Este evento da lugar a la pérdida de este marcador y en algunos casos al reemplazo génico después de la recombinación entre el cromosoma y un vector suicida. Por ejemplo, el gen *SacB* de *Bacillus* es letal cuando las bacterias que expresan el gen se plaquean en un medio que contiene sacarosa (Ried, J. L. y A. Collmer, Gene 57:239-46 (1987)). Como otro ejemplo, el gen de resistencia a tetraciclina confiere sensibilidad al ácido fusárico (Bochner, B. R., et al., J Bacteriol. 143(2):926-3 (1980)). La infección con el bacteriófago M13 confiere la sensibilidad al detergente desoxicolato (Blum, P., et al., J Bacteriol. 171:538-46 (1989)).

35 Debido a la ausencia de eficacia en algunas cepas de *E. coli*, se desarrolló un método de selección positiva para dobles recombinantes. El gen III del bacteriófago M13 se evaluó como un marcador contraseleccionable. Este gen codifica un componente menor del virión responsable de la infectividad de las partículas. Cuando se sobreexpresa a partir del plásmido multicopia pBR322, el gen III confiere sensibilidad a desoxicolato a las células debido a la inserción de la proteína del gen III en la membrana de las bacterias (Boeke, J. D. et al., Mol Gen Genet 186:185-92 (1982)). No existe ninguna publicación que indique si este gen podría usarse como un marcador contraseleccionable eficaz cuando está presente en una única copia en el genoma de *E. coli*. Por lo tanto, ensayamos esta hipótesis con un vector minicírculo suicida.

40 3. Amplificación por PCR de la versión delecionada del gen III de M13

Para reducir el tamaño del vector minicírculo que se va a construir, se eligió una versión delecionada del gen III (gen III') que todavía era capaz de conferir sensibilidad a desoxicolato (Boeke, J. D., P. Model, et al., Mol Gen Genet 186:185-92 (1982)). Se amplificó por PCR junto con su propio promotor de M13mp18 (Yanisch-Perron, C., J. Vieira, et al., Gene 33:103-19 (1985)) como un fragmento *Bgl*III- *Xho*I (véase la Figura 29).

Los oligonucleótidos fueron los siguientes:

C19519 : 5'-GGCAGATCTTAAACCGATACAATTAAGG-3' (SEQ ID NO: 25)

*Bgl*III

C19520: 5'- CCGCTCGAGTTACGATTGGCCTTGATATTCACAAAC-3 (SEQ ID NO: 26)

XhoI

El fragmento amplificado se clonó por clonación T-A en pGEMT-easy (Promega Corporation, Madison, WI, EEUU) para generar pXL4230 (Fig. 29). Se encontró que la secuencia de nucleótidos del inserto se correspondía con la descrita en GenBank no. de registro VB0018. pXL4230 confiere sensibilidad a desoxicolato cuando se transforma en la cepa de *E. coli* DH10B (Invitrogen), lo que indica que funciona como se esperaba.

4. Vector suicida basado en minicírculo

Como no contiene ningún origen de replicación, un plásmido minicírculo puede usarse como un vector suicida universal. Para este propósito, debe añadirse un marcador seleccionable tal como el gen de resistencia a kanamicina para seleccionar un primer evento de recombinación homóloga. Para contraseleccionar bacterias que no han sufrido un segundo evento de recombinación, el gen III' se añadió al vector minicírculo. La construcción del plásmido usada para producir el minicírculo para recombinación se muestra en Fig. 29.

El minicírculo se genera a partir de un plásmido, tal como pXL4235, después de inducir la integrasa del bacteriófago lambda, que recombina entre *attP* y *attB* en el plásmido (Darquet, A. M et al., Gene Ther 4(12):1341-9 (1997)). Esta recombinasa se expresa bajo el control de P_{BAD} de una manera dependiente de arabinosa en la cepa de *E. coli* G6264, que se describe en la solicitud U.S. no. 09/981,803. El minicírculo resultante contiene *attL*, una secuencia formadora de TH (triple-hélice) para la purificación, el marcador seleccionable gen de resistencia a kanamicina *Tn903*, el gen III' marcador contraseleccionable y el fragmento de interés para recombinación homóloga, clonado en el sitio de multiclonación de pXL4235 (Fig. 29).

Como ejemplo, las construcciones usadas para generar las cepas de *E. coli* que expresan una mutación que resulta en alto número de copias de *pir116* se describen en la Fig. 30. Estas cepas pueden usarse para producir plásmidos pCOR (Soubrier, F. et al., Gene Ther 6:1482-1488 (1999)). Como no hay homología entre *pir* y el genoma bacteriano, las secuencias de *pir116** se insertaron en el gen cromosómico de *E. coli uidA*, que codifica β-D-glucuronidasa. Este gen proporciona suficiente similitud de secuencia con el genoma de *E. coli* para que se produzca recombinación homóloga.

El protocolo para la purificación del minicírculo y recombinación ocurrió como sigue. El plásmido pal4256 (Fig. 30) se transformó en la cepa de *E. coli* G6264 para generar G6656. Cincuenta ml de medio LB suplementado con ampicilina (100 mg/l) se inocularon con 0,5 ml de un cultivo de toda la noche de G6656 y se incubó a 37°C, con agitación a 200 rpm hasta que se alcanzó una densidad óptica a 600 nm de 0,7. La producción del minicírculo se indujo por la adición de 250µl de una disolución estéril de 10% arabinosa al medio. Después de 30 minutos a 37°C, 200 rpm, el ADN plasmídico total se extrajo usando el sistema de Purificación de ADN Wizard Plus Midipreps (Promega Corporation, Madison WI, EEUU).

Seis µg de la preparación de ADN plasmídico se cargaron en un gel preparativo de agarosa al 0,8%. Se usó una escalera de ADN superenrollado (Promega Corporation, Madison WI, EEUU) como un estándar de peso molecular. Después de electroforesis toda la noche a 50V, la construcción de minicírculo superenrollado (5,1 kb) se extrajo y se purificó del gel usando un kit de purificación de gel SV (Promega Corporation, Madison WI, EEUU).

5. Doble recombinación homóloga con el minicírculo 4256 (*uidA::pir116** vector minicírculo suicida)

Las etapas de recombinación para construir las cepas y los fenotipos correspondientes se describen en la Fig. 31.

Para el primer evento de recombinación (integración), se electroporaron 0,2, 1 y 5 µl de minicírculo 4256 purificado en la cepa de *E. coli* XAC1 (Normanly, J et al., Proc Natl Acad Sci USA 83:6548-52 (1986)), que es la cepa parental para huéspedes pCOR. Las colonias resistentes a kanamicina se obtuvieron en Agar LB suplementado con kanamicina (50 mg/l) después de una incubación toda la noche a 37°C.

Para evaluar el número de colonias que potencialmente contienen pXL4256 contaminante no recombinado, 50 colonias Km^R se sembraron en paralelo en Agar LB suplementado con kanamicina o ampicilina. Sólo 4 colonias de 50 fueron resistentes a kanamicina y ampicilina y se mostró por análisis de restricción de plásmido que contenían pXL4256 no recombinado. Esto indicó que 46 colonias de 50 obtenidas por electroporación eran realmente integrantes del minicírculo 4256.

Para el segundo evento de recombinación (escisión), todos los 46 integrantes Km^R se aislaron en placas de Agar LB recién preparadas que contienen 1,5 % desoxicolato de sodio ("Doc"; Sigma) y se incubaron a 37°C toda la noche. Sólo unas pocas colonias resistentes a desoxicolato (Doc^R) (1 a 15) se obtuvieron para cada integrante, como se muestra en la Fig. 32. Este resultado fue consistente con la selección de un evento relativamente raro, tal como el segundo evento de recombinación. 100 colonias Doc^R obtenidas de 15 integrantes se parchearon en paralelo en

Agar LB con 1,5% Doc y Agar LB más kanamicina para cribar dobles recombinantes Doc^R y Km^S. 86 % de las colonias cribadas fueron Km^S, lo que indica que habían perdido el vector suicida.

5 Para cribar para reemplazo de alelos, el locus cromosómico *uidA* se amplificó por PCR. Si ha ocurrido el reemplazo de alelos, el tamaño esperado del fragmento de PCR es 1,3 kb. El tamaño del fragmento correspondiente al locus *uidA* de tipo salvaje, esto es, sin una mutación *pir116** integrada, es 0,85 kb. Los resultados presentados en la Fig. 33-panel A indican que el reemplazo de alelos ha ocurrido en 30% de los dobles recombinantes. Esto se confirmó por análisis fenotípico porque estos clones también son *UidA*- (beta glucuronidasa -) y proporcionaron colonias blancas en agar LB suplementado con Xgluc.

10 La integridad del genoma bacteriano en la región cercana al sitio de recombinación homóloga se comprobó por PCR en dos recombinantes independientes. El primer cebador (seq6113 o seq6115) se basó en la secuencia del gen *pir* y el segundo (seq6112 o seq6116) tenía una secuencia basada en una secuencia cercana a, pero fuera de, la región de homología (inmediatamente 5' ó 3' de *uidA*). Se usó ADN XAC1 como un control negativo, mientras XAC1*pir116* o TEX1 (Soubrier, F. et al., Gene Ther 6:1482-1488 (1999)) se usaron como controles positivos.

Los oligonucleótidos usados como cebadores de PCR fueron los siguientes:

Seq11088 :	5'-GAGATCGCTGATGGTATCGG-3' (SEQ ID NO: 27)
Seq11089:	5'-TCTACACCACGCCGAACACC-3' (SEQ ID NO: 28)
Seq6112:	5'-GACCAGTATTATTATCTTAATGAG-3' (SEQ ID NO: 29)
Seq6113:	5'-GTATTTAATGAAACCGTACCTCCC-3'(SEQ ID NO: 30)
Seq6115:	5'-CTCTTTTAATTGTCGATAAGCAAG-3' (SEQ ID NO: 31)
Seq6116:	5'-GCGACGTCACCGAGGCTGTAGCCG-3' (SEQ ID NO: 32)

15 El tamaño esperado para el producto de PCR es 0,83 kb usando los cebadores seq6112 y seq6113, y 0,88 kb cuando se usan los cebadores seq6114 y seq6115. Los resultados se presentan en la Figura 33-panel B. Los dos dobles recombinantes obtenidos con el vector suicida minicirculo mostraron el perfil de PCR esperado. Esto demuestra que la doble recombinación homóloga puede conseguirse fácilmente en *E. coli* usando los plásmidos minicirculo como vector suicida y el gen *gene III'* de M13 como un marcador contraseleccionable. Esta técnica de reemplazo génico puede realizarse directamente universalmente en cualquier contexto genético de microorganismos.

20

BIBLIOGRAFÍA

- Alting-Mees, M.A., J.A. Sorge, y J.M. Short. 1992. *Methods Enzymol.* 216:483-495
- 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.
- 5 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.
- 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.
- 10 Filutowicz, M., S. Dellis, I. Levchenko, M. Urh, F. Wu, y D. York. 1994. *Prog. in Nucleic Acid Res. y Mol. Biol.* 48:239-273.
- Gibson, T.J. 1984. Tesis Doctoral. Universidad de Cambridge.
- Greener, A., M. Filutowicz, M. McEachern, y D. Helsinki. 1.990. *Mol. Gen. Genet.* 224:24-32.
- Herrero, M., V. de Lorenzo, y K.N. Timmis. 1.990. *J. Bacteriol.* 172:6557-6567.
- 15 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
- Kleina, L.G., J.M. Masson, J. Normanly, J. Abelson, y J.H. Miller. 1.990. *J. Mol. Biol.* 213:705-717.
- Kowalczykowski, S.C., y A.K. Eggleston. 1994. *Annu. Rev. Biochem.* 63:9991-10043.
- 20 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.
- Mertens, N., E. Remant y W. Fiers. (1995) *Bio/Technology* 13:175-179
- Messing, J., y J. Vieira. 1982. *Gene* 19: 269-276.
- 25 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.
- 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. 1.990. *J. Mol. Biol.* 213:719-726.
- Roca, J. 1995. *TIBS* 20:156-160.
- 30 Saiki, R.K., S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich, y N. Arnheim. 1985. *Science* 230:1350-1354.
- 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.
- 35 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.

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.

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

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.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110 > CENTELION

Soubrier, Fabienne

5 <120> Molécula de ADN Circular con Origen de Replicación Condicional, Método para Prepararla y uso de Ésta en Terapia Génica

<130> 8888.0132-01

10 <150> US 10/268,948

<151> 2002-10-11

<160> 39

15 <170> Versión PatentIn 3.1

<210> 1

<211> 389

<212> ADN

20 <213> Escherichia coli

<400> 1

tg tcagccgt taagtgtcc tgtgtcactg aaaattgctt tgagaggctc taagggcttc	60
tc agtgcggt acatccctgg ctgtgtgtcc acaaccgtta aaccttaaaa gctttaaaag	120
cc ttatatat tctttttttt cttataaaac ttaaaccctt agaggctatt taagttgctg	180
at ttatatta attttattgt tcaaacatga gagcttagta cgtgaaacat gagagcttag	240
ta cgtagtagcc atgagagctt agtacgtag ccatgagggt ttagttcggt aaacatgaga	300
gc tttagtacg ttaaacatga gagcttagta cgtgaaacat gagagcttag tacgtactat	360
ca acagggtg aactgctgat cttcagatc	389

<210> 2

25 <211> 960

<212> ADN

<213> Escherichia coli

<400> 2

tata cagaat gatgaggttt ttttatgaga ctcaagggtca tgatggacgt gaacaaaaaa	60
--	-----------

30

ES 2 372 599 T3

acgaaaattc gccaccgaaa cgagctaaat cacaccctgg ctcaacttcc tttgcccgca 120
 aagcgagtga tgtatatggc gcttgctccc attgatagca aagaacctct tgaacgaggg 180
 cgagttttca aaattagggc tgaagacctt gcagcgctcg ccaaaatcac cccatcgctt 240
 gcttatcgac aattaaaaga ggggtggtaaa ttacttgggt ccagcaaaat ttcgctaaga 300
 ggggatgata tcattgcttt agctaaagag cttaacctgc cttttactgc taaaaactcc 360
 cctgaagagt tagatcttaa cattattgag tggatagctt attcaaatga tgaaggatac 420
 ttgtctttaa aattcaccag aaccatagaa ccatatatct ctagccttat tgggaaaaaa 480
 aataaattca caacgcaatt gttaacggca agcttacgct taagtagcca gtattcatct 540
 tctctttatc aacttatcag gaagcattac tctaatttta agaagaaaaa ttattttatt 600
 atttccgttg atgagttaa ggaagagtta acagcttata cttttgataa agatggaaat 660
 attgagtaca aataccctga ctttcttatt tttaaaagg atgtgttaa taaagccatt 720
 gctgaaatta aaaagaaaac agaaatatcg tttgttggct tcaactgttca tgaaaaagaa 780
 ggaagaaaaa ttagtaagct gaagttcgaa tttgtcgttg atgaagatga attttctggc 840
 gataaagatg atgaagcttt ttttatgaat ttatctgaag ctgatgcagc ttttctcaag 900
 gtatttaatg aaaccgtacc tccccaaaaa gctaaggggt gatatatggc taaaatttac 960

<210> 3

<211> 24

<212> ADN

5 <213> Escherichia coli

<400> 3

gaccagtatt attatcttaa tgag 24

<210> 4

10 <211> 24

<212> ADN

<213> Escherichia coli

<400> 4

15 gtatttaatg aaaccgtacc tccc 24

<210> 5

<211> 24

<212> ADN

20 <213> Escherichia coli

<400> 5

ctcttttaat tgtcgataag caag 24

ES 2 372 599 T3

<210> 6
<211> 24
<212> ADN
<213> Escherichia coli
5
<400> 6
gcgacgtcac cgaggctgta gccg 24

<210> 7
10 <211> 36
<212> ADN
<213> Escherichia coli

<400> 7
15 gtatatggcg cttgctctca tcgatagcaa agaacc 36

<210> 8
<211> 36
<212> ADN
20 <213> Escherichia coli

<400> 8
ggttctttgc tatcgatgag agcaagcgcc atatac 36

25 <210> 9
<211> 20
<212> ADN
<213> Escherichia coli

30 <400> 9
gagatcgctg atggtatcgg 20

<210> 10
<211> 20
35 <212> ADN
<213> Escherichia coli

ES 2 372 599 T3

<400> 10

tctacaccac gccgaacacc 20

<210> 11

5 <211> 36

<212> ADN

<213> Escherichia coli

<400> 11

10 cgcaattggt aacgtccagc ttacgcttaa gtagcc 36

<210> 12

<211> 36

<212> ADN

15 <213> Escherichia coli

<400> 12

ggctacttaa gcgtaagctg gacgtaaca attgcg 36

20 <210> 13

<211> 31

<212> ADN

<213> Escherichia coli

25 <400> 13

ccctctagat cgatagccat tttactctct g 31

<210> 14

<211> 29

30 <212> ADN

<213> Escherichia coli

<400> 14

cgggatcctg attatgccgt gtctattag 29

35

<210> 15

<211> 36

ES 2 372 599 T3

<212> ADN

<213> Escherichia coli

<400> 15

5 cccaagcttc ttcgtagtt tctgctacgc cttcgc 36

<210> 16

<211> 35

<212> ADN

10 <213> Escherichia coli

<400> 16

ggtctagaac gtgaaagtgg tgaagaacaa aatcg 35

15 <210> 17

<211 > 20

<212> ADN

<213> Escherichia coli

20 <400> 17

gcgacccttg tgtatcaaac 20

<210> 18

<211 > 20

25 <212> ADN

<213> Escherichia coli

<400> 18

ggtattacc ggcatgacag 20

30

<210> 19

<211 > 20

<212> ADN

<213> Escherichia coli

35

<400> 19

gtggtgaaa tggcgatagg 20

ES 2 372 599 T3

<210> 20

<211 > 20

<212> ADN

5 <213> Escherichia coli

<400> 20

gcgatttgt tctcaccac 20

10 <210> 21

<211> 918

<212> ADN

<213> Escherichia coli

<400> 21

atgagactca aggtcatgat ggacgtgaac aaaaaaacga aaattcgcca ccgaaacgag	60
ctaaatcaca ccctggctca acttcctttg cccgcaaagc gagtgatgta tatggcgctt	120
gctctcatcg atagcaaaga acctcttgaa cgagggcgag ttttcaaat tagggctgaa	180
gaccttgca gctcgcaca aatcaccca tcgcttgctt atcgacaatt aaaagaggg	240
ggtaaattac ttggtgccag caaaatttcg ctaagagggg atgatatcat tgcttagct	300
aaagagctta acctgctctt tactgctaaa aactcccctg aagagttaga tcttaacatt	360
attgagtgga tagcttattc aatgatgaa ggatacttgt ctttaaaatt caccagaacc	420
atagaacat atatctctag cttattggg aaaaaaata aattcacaac gcaattgtta	480
acggcaagct tacgcttaag tagccagtat tcattcttctc tttatcaact ttcaggaag	540
cattactcta atttaagaa gaaaaattat tttattattt ccggtgatga gttaaaggaa	600
gagttaatag cttatacttt tgataaagat ggaatattg agtacaata ccctgacttt	660
cctattttta aaagggatgt gttaataaaa gccattgctg aaattaataa gaaaacagaa	720
atatcgtttg ttggcttcac tgttcatgaa aaagaaggaa gaaaaattag taagctgaag	780
ttcgaatttg tcggtgatga agatgaattt tctggcgata aagatgatga agctttttt	840
atgaatttat ctgaagctga tgcagctttt ctcaaggat ttgatgaaac cgtacctccc	900
aaaaagcta aggggtga	918

15

<210> 22

<211> 305

<212> PRT

<213> Escherichia coli

20

<400> 22

ES 2 372 599 T3

Met Arg Leu Lys Val Met Met Asp Val Asn Lys Lys Thr Lys Ile Arg
 1 5 10 15
 His Arg Asn Glu Leu Asn His Thr Leu Ala Gln Leu Pro Leu Pro Ala
 20 25 30
 Lys Arg Val Met Tyr Met Ala Leu Ala Leu Ile Asp Ser Lys Glu Pro
 35 40 45
 Leu Glu Arg Gly Arg Val Phe Lys Ile Arg Ala Glu Asp Leu Ala Ala
 50 55 60
 Leu Ala Lys Ile Thr Pro Ser Leu Ala Tyr Arg Gln Leu Lys Glu Gly
 65 70 75 80
 Gly Lys Leu Leu Gly Ala Ser Lys Ile Ser Leu Arg Gly Asp Asp Ile
 85 90 95
 Ile Ala Leu Ala Lys Glu Leu Asn Leu Leu Phe Thr Ala Lys Asn Ser
 100 105 110
 Pro Glu Glu Leu Asp Leu Asn Ile Ile Glu Trp Ile Ala Tyr Ser Asn
 115 120 125
 Asp Glu Gly Tyr Leu Ser Leu Lys Phe Thr Arg Thr Ile Glu Pro Tyr
 130 135 140
 Ile Ser Ser Leu Ile Gly Lys Lys Asn Lys Phe Thr Thr Gln Leu Leu
 145 150 155 160
 Thr Ala Ser Leu Arg Leu Ser Ser Gln Tyr Ser Ser Ser Leu Tyr Gln
 165 170 175
 Leu Ile Arg Lys His Tyr Ser Asn Phe Lys Lys Lys Asn Tyr Phe Ile
 180 185 190
 Ile Ser Val Asp Glu Leu Lys Glu Glu Leu Ile Ala Tyr Thr Phe Asp
 195 200 205
 Lys Asp Gly Asn Ile Glu Tyr Lys Tyr Pro Asp Phe Pro Ile Phe Lys
 210 215 220
 Arg Asp Val Leu Asn Lys Ala Ile Ala Glu Ile Lys Lys Lys Thr Glu
 225 230 235 240
 Ile Ser Phe Val Gly Phe Thr Val His Glu Lys Glu Gly Arg Lys Ile
 245 250 255
 Ser Lys Leu Lys Phe Glu Phe Val Val Asp Glu Asp Glu Phe Ser Gly
 260 265 270
 Asp Lys Asp Asp Glu Ala Phe Phe Met Asn Leu Ser Glu Ala Asp Ala
 275 280 285
 Ala Phe Leu Lys Val Phe Asp Glu Thr Val Pro Pro Lys Lys Ala Lys
 290 295 300
 Gly
 305

ES 2 372 599 T3

<210> 23
<211> 23
<212> ADN
<213> Escherichia coli
5
<400> 23
cttaacggct gacatgggaa ttc 23

<210> 24
10 <211> 19
<212> ADN
<213> Escherichia coli

<400> 24
15 cgatgggcga gctccaccg 19

<210> 25
<211> 29
<212> ADN
20 <213> Bacteriófago M13mp18

<400> 25
ggcagatctt aaaccgatac aattaaagg 29

<210> 26
25 <211> 36
<212> ADN
<213> Bacteriófago M13mp18

<400> 26
30 ccgctcgagt tacgattggc ctgatattc acaaac 36

<210> 27
<211> 20
35 <212> ADN
<213> Escherichia coli

ES 2 372 599 T3

<400> 27
gagatcgctg atggtatcgg 20

<210> 28
5 <211 > 20
<212> ADN
<213> Escherichia coli

<400> 28
10 tctacaccac gccgaacacc 20

<210> 29
<211> 24
<212> ADN
15 <213> Escherichia coli

<400> 29
gaccagtatt attatcttaa tgag 24

20 <210> 30
<211> 24
<212> ADN
<213> Escherichia coli

25 <400> 30
gtatttaatg aaaccgtacc tccc 24

<210> 31
<211> 24
30 <212> ADN
<213> Escherichia coli

<400> 31
ctctttaat tgtcgataag caag 24
35

<210> 32
<211> 24

ES 2 372 599 T3

<212> ADN

<213> Escherichia coli

<400> 32

5 gcgacgtcac cgaggctgta gccg 24

<210> 33

<211> 12

<212> ADN

10 <213> Escherichia coli

<400> 33

agaaaaaaag ga 12

15 <210> 34

<211> 12

<212> ADN

<213> Escherichia coli

20 <400> 34

tcttttttc ct 12

<210> 35

<211> 14

25 <212> ADN

<213> Escherichia coli

<400> 35

aagaaaaaaa agaa 14

30

<210> 36

<211> 14

<212> ADN

<213> Escherichia coli

35

<400> 36

ttctttttt tctt 14

ES 2 372 599 T3

<210> 37

<211> 12

<212> ADN

5 <213> Escherichia coli

<400> 37

tcttttttc ct 12

10 <210> 38

<211> 14

<212> ADN

<213> Escherichia coli

15 <400> 38

ttctttttt tctt 14

<210> 39

<211> 17

20 <212> ADN

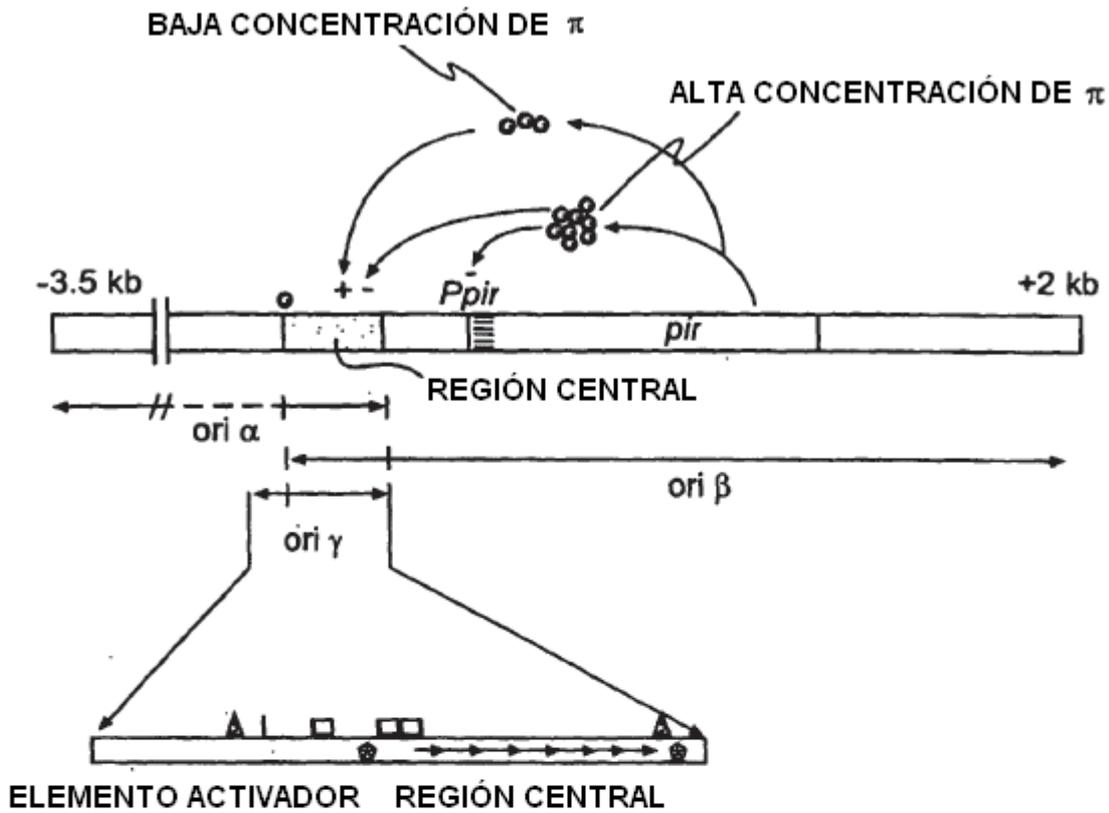
<213> Escherichia coli

<400> 39

aaaaaagga ataaggg 17

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una célula huésped recombinante procariota que comprende un gen pir heterólogo que codifica una proteína pi y una molécula de ADN extracromosómica que comprende un gen terapéutico heterólogo y un origen de replicación condicional cuya funcionalidad en la célula huésped recombinante procariota requiere la proteína pi, en el que el gen pir heterólogo comprende al menos una mutación además de la mutación pir116, seleccionándose dicha mutación adicional del grupo que consiste en que el residuo 130 de la proteína pi sea una valina, el residuo 292 de la proteína pi sea una metionina o el residuo 117 de la proteína pi sea una glicina.
2. La célula huésped recombinante procariota de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el gen pir heterólogo está en un plásmido.
- 10 3. La célula huésped recombinante procariota de la reivindicación 1, en la que el gen pir heterólogo está en el genoma de la célula huésped.
4. La célula huésped recombinante procariota de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el origen de replicación condicional es de un plásmido bacteriano o un bacteriófago.
- 15 5. La célula huésped recombinante procariota de la reivindicación 4, en la que el origen de replicación condicional es de R2K, R6K, RI, pSC101, RtsI, F, RSF1010, P1, P4, lambda, Phi82 o Phi80.
6. La célula huésped recombinante procariota de la reivindicación 5, en la que el origen de replicación condicional es del plásmido bacteriano R6K.
7. La célula huésped recombinante procariota de la reivindicación 6, en la que el origen de replicación comprende la SEQ ID NO: 1.
- 20 8. La célula huésped recombinante procariota de cualquiera de las reivindicaciones 4-7, en la que el plásmido comprende además un gen de selección que no confiere resistencia a un antibiótico.
9. La célula huésped recombinante procariota de la reivindicación 8, en la que el gen de selección codifica un ARN de transferencia supresor para codones específicos.
- 25 10. La célula huésped recombinante procariota de la reivindicación 8, en la que el gen de selección es un ARN de transferencia supresor de ámbar y la célula huésped comprende además un gen que comprende una mutación ámbar.
11. La célula huésped recombinante procariota de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha célula huésped es deficiente para el gen endA.
- 30 12. La célula huésped recombinante procariota de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha célula huésped es deficiente para el gen traD.
13. La célula huésped recombinante procariota de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha célula huésped comprende además un gen recA mutado.
- 35 14. Un método para producir un plásmido que comprende un gen terapéutico heterólogo y un origen de replicación condicional cuya funcionalidad en una célula huésped procariota requiere una proteína iniciadora de la replicación extraña para la célula huésped, que comprende: a) cultivar la célula huésped recombinante procariota de cualquiera de las reivindicaciones anteriores bajo condiciones en las que se produce el plásmido; y b) aislar el plásmido.



CLAVE:

- SITIO DE UNIÓN PARA EL FACTOR IHF
- SECUENCIAS CONSENSO DnaA
- ▲ CAJA NO. 1 DnaA
- ITERÓN (SECUENCIA DE 22 PB)
- PROTEÍNA π

FIG. 1

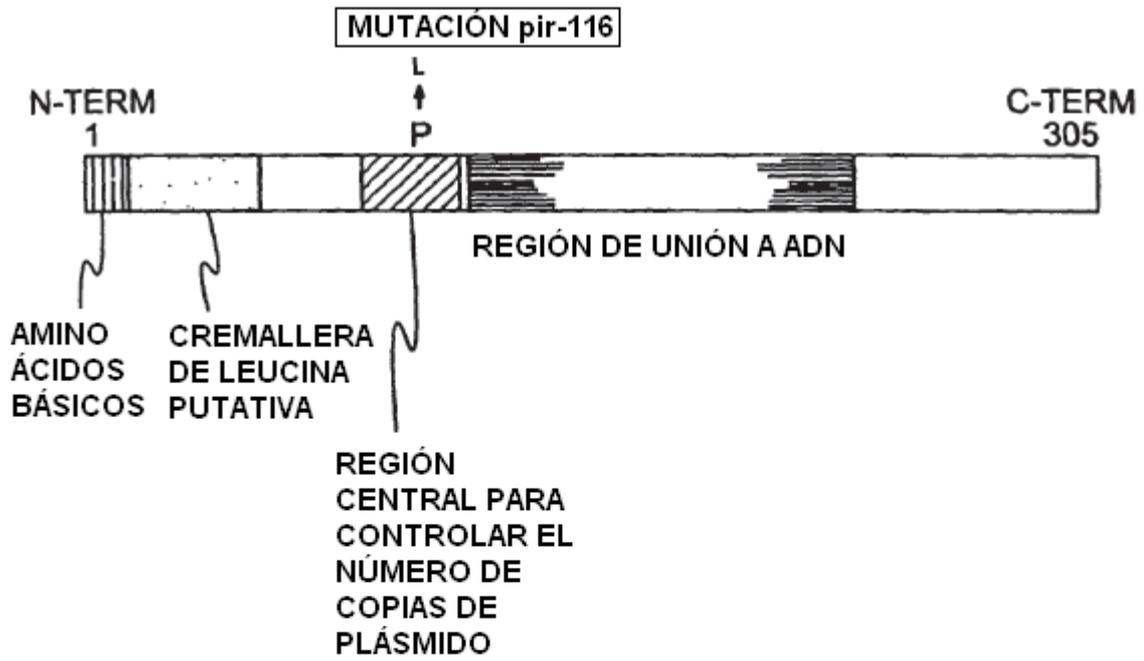


FIG. 2

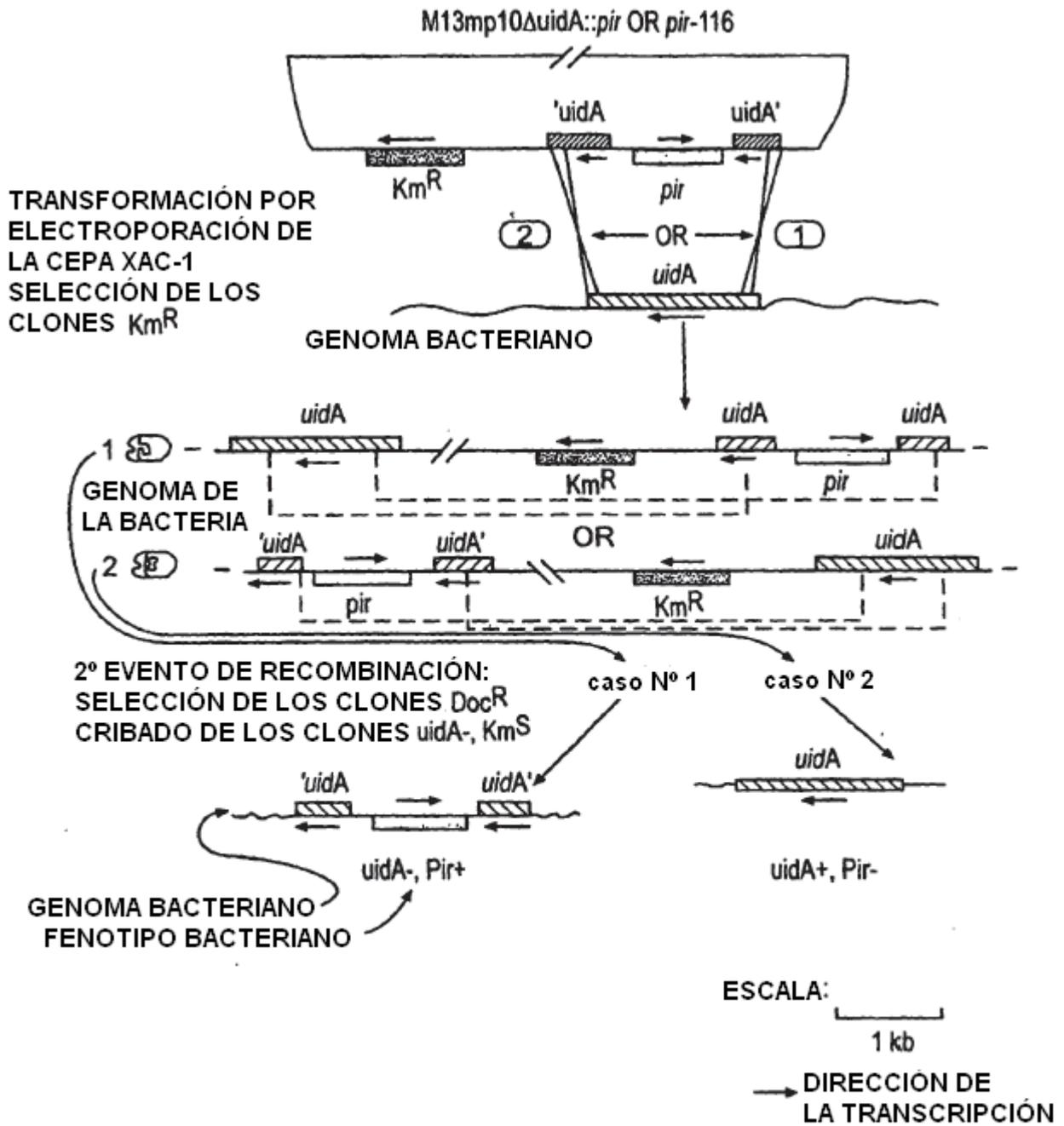


FIG. 3

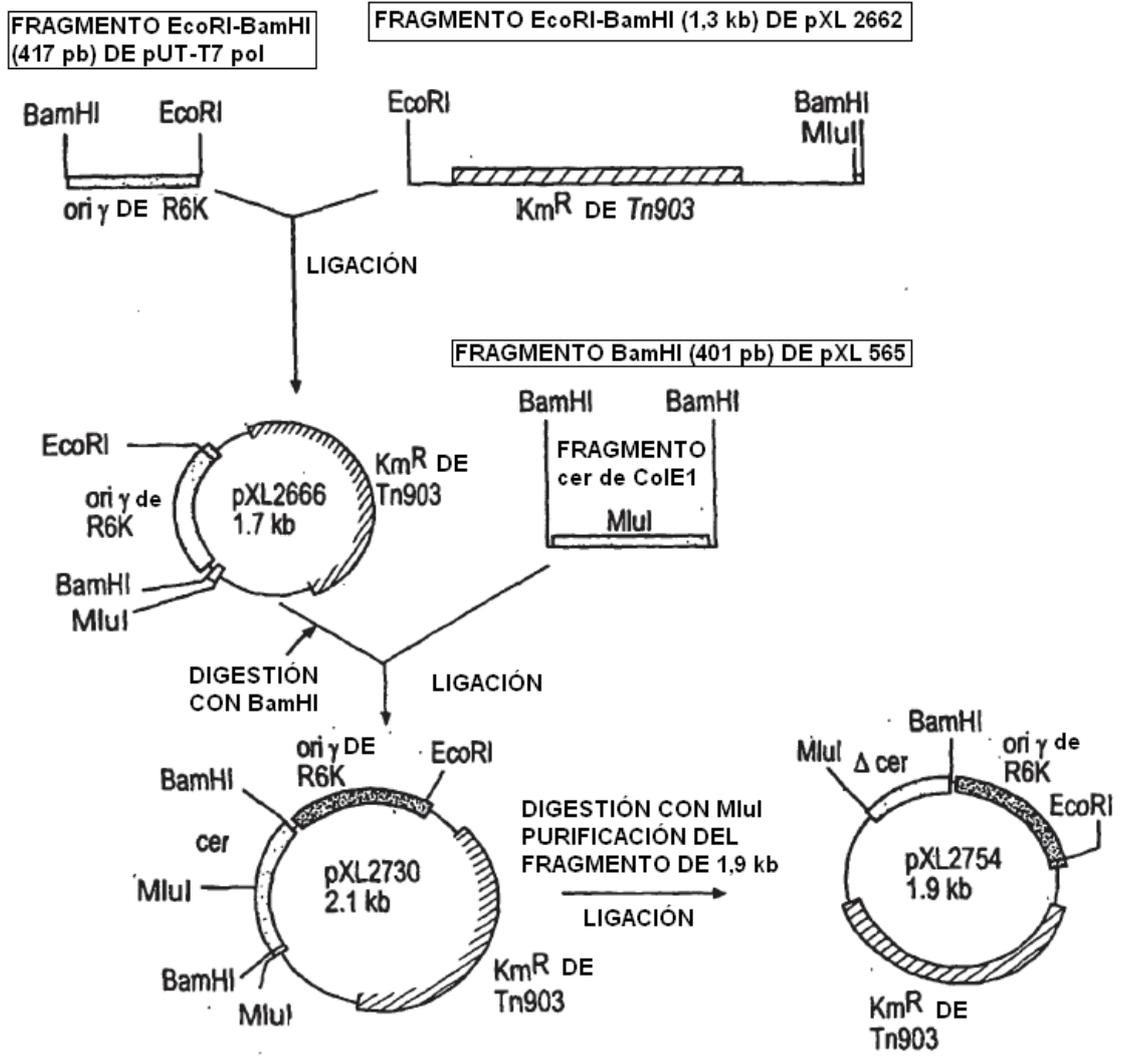


FIG. 4

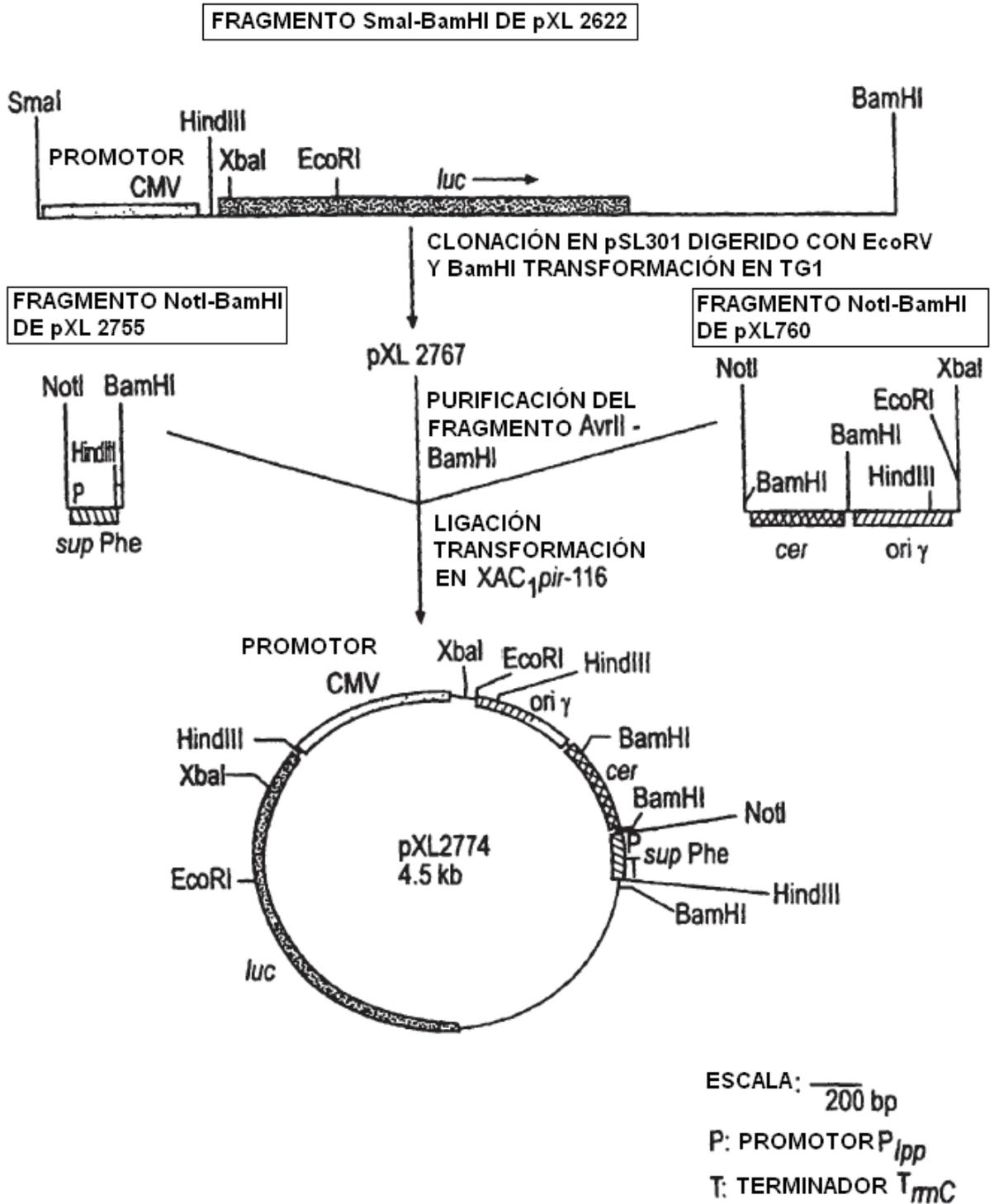


FIG. 5

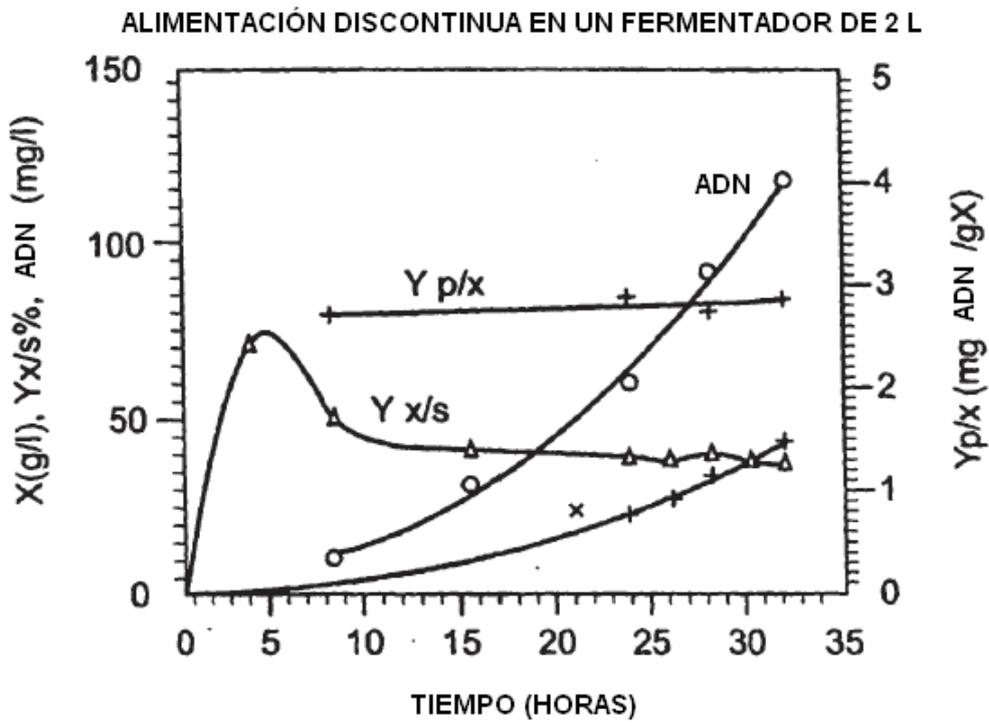


FIG. 6

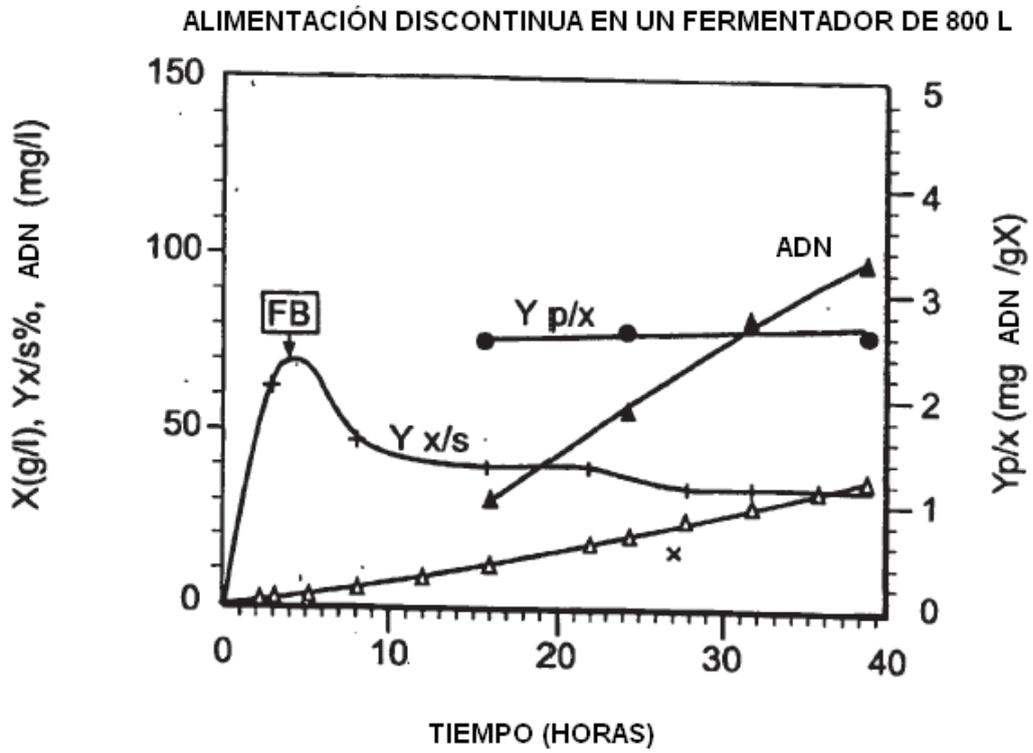


FIG. 7

CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR DE EXPRESIÓN pXL3056

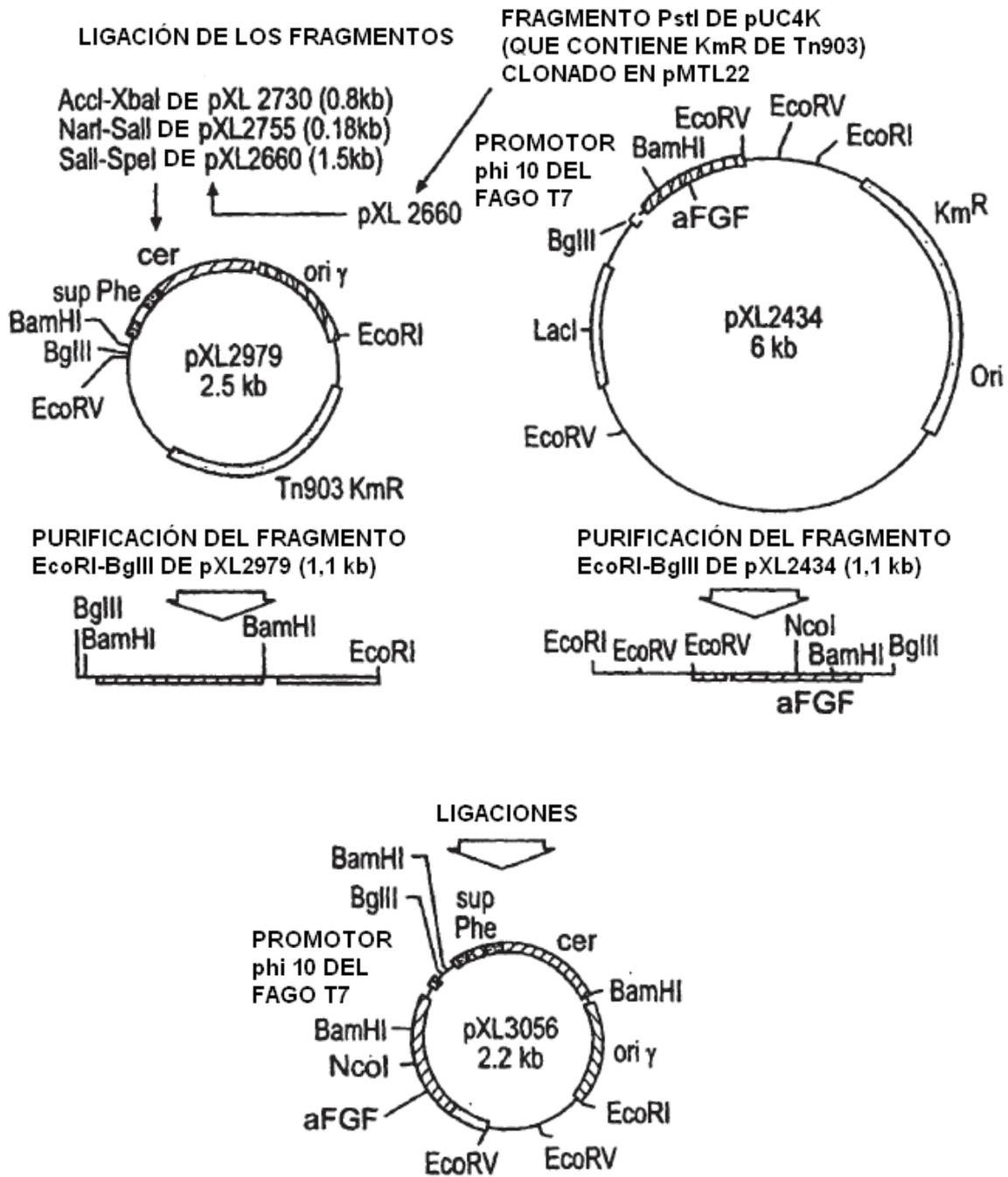


FIG. 8

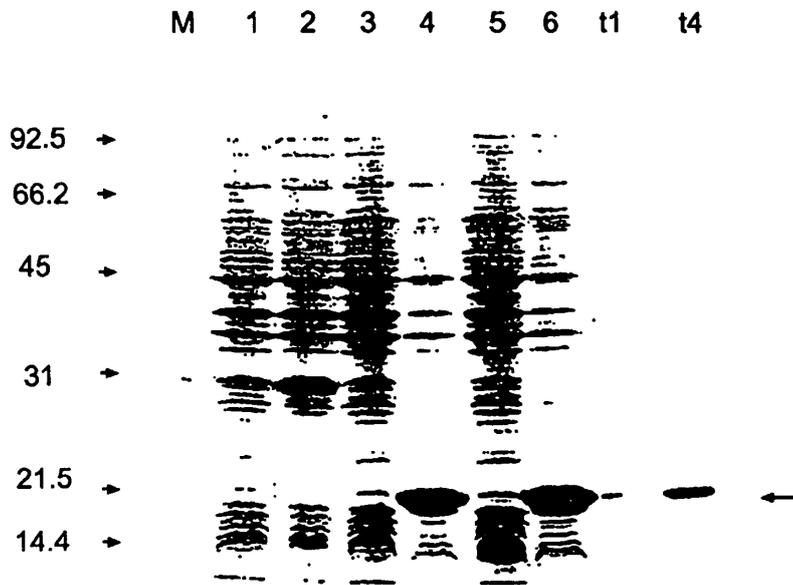


FIG. 9

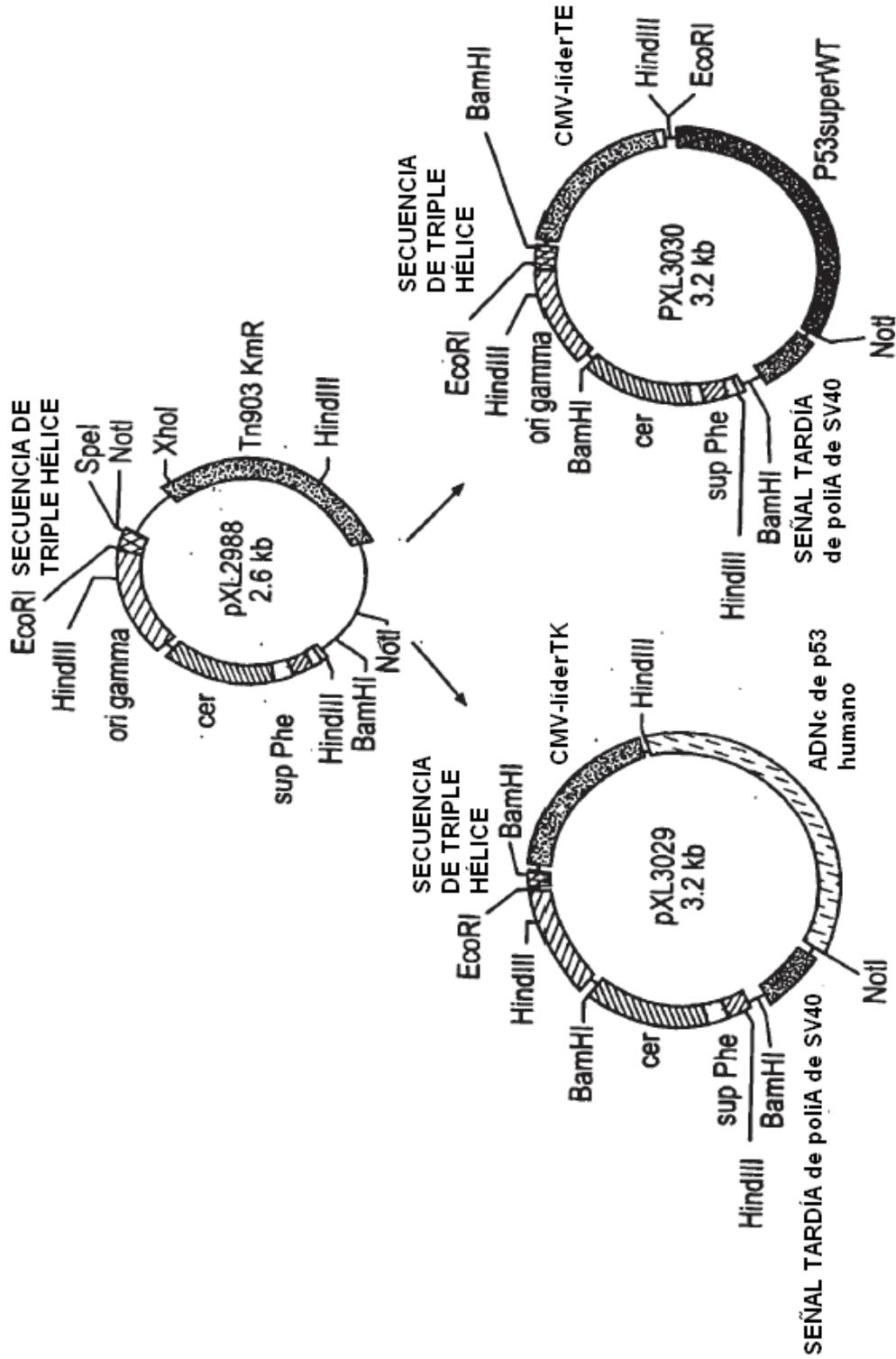


FIG. 10

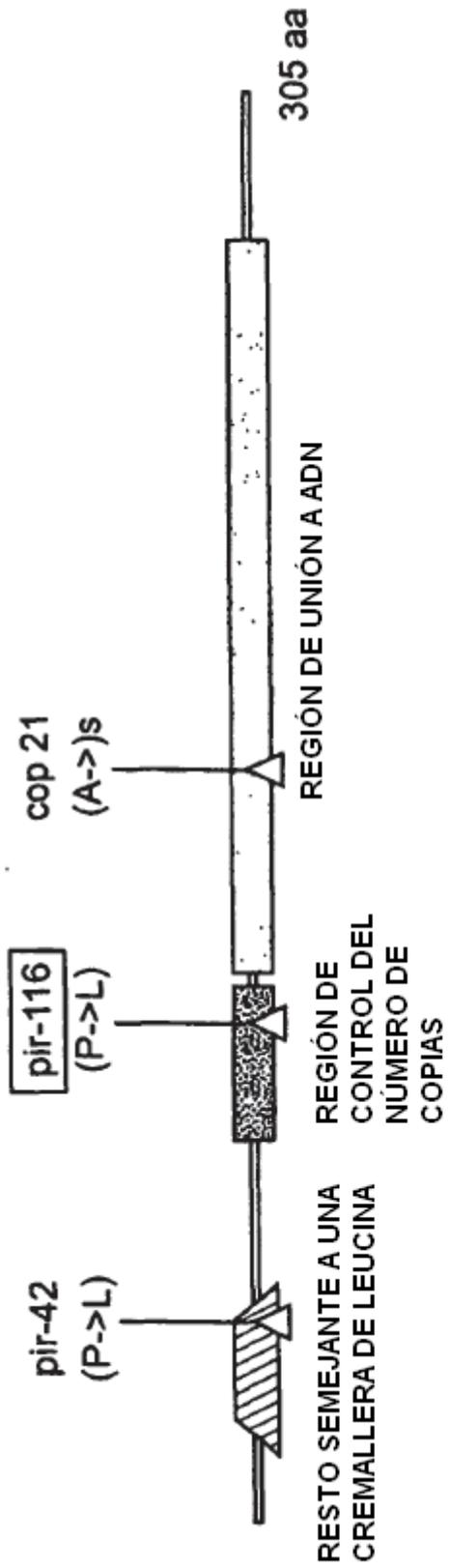


FIG. 11

(SEQ ID NO: 21)

Met Arg Leu Lys Val Met Met Asp Val Asn Lys Lys Thr Lys Ile Arg His Arg
 1 ATG AGA CTC AAG GTC ATG ATG GAC GTG AAC AAA AAA ACG AAA ATT CGC CAC CGA

5 Asn Glu Leu Asn His Thr Leu Ala Gln Leu Pro Leu Pro Ala Lys Arg Val Met
 55 AAC GAG CTA AAT CAC ACC CTG GCT CAA CTT OCT TTG CCC GCA AAG CGA GTG ATG

Tyr Met Ala Leu Ala [Leu] Ile Asp Ser Lys Glu Pro Leu Glu Arg Gly Arg Val
 10 109 TAT ATG GGC CTT CGT [CTC] ATC GAT AGC AAA GAA CCT CTT GAA CGA GGG CGA GTT

Phe Lys Ile Arg Ala Glu Asp Leu Ala Ala Leu Ala Lys Ile Thr Pro Ser Leu
 163 TTC AAA ATT ACG GCT GAA GAC CTT GCA GCG CTC GCC AAA ATC ACC CCA TCG CTT

15 Ala Tyr Arg Gln Leu Lys Glu Gly Gly Lys Leu Leu Gly Ala Ser Lys Ile Ser
 217 GCT TAT CGA CAA TTA AAA GAG GGT GGT AAA TTA CTT GGT GGC AGC AAA ATT TCG

Leu Arg Gly Asp Asp Ile Ile Ala Leu Ala Lys Glu Leu Asn Leu [Leu] Phe Thr
 271 CTA AGA GGG GAT GAT ATC ATT GCT TTA GCT AAA GAG CTT AAC CTG [CTC] TTT ACT

20 Ala Lys Asn Ser Pro Glu Glu Leu Asp Leu Asn Ile Ile Glu Trp Ile Ala Tyr
 325 GCT AAA AAC TCC CCT GAA GAG TTA GAT CTT AAC ATT ATT GAG TGG ATA GCT TAT

25 Ser Asn Asp Glu Gly Tyr Leu Ser Leu Lys Phe Thr Arg Thr Ile Glu Pro Tyr
 379 TCA AAT GAT GAA GGA TAC TTG TCT TTA AAA TTC ACC AGA ACC ATA GAA CCA TAT

Ile Ser Ser Leu Ile Gly Lys Lys Asn Lys Phe Thr Thr Gln Leu Leu Thr Ala
 30 433 ATC TCT AGC CTT ATT GGG AAA AAA AAT AAA TTC ACA ACG CAA TTG TTA ACG GCA

Ser Leu Arg Leu Ser Ser Gln Tyr Ser Ser Ser Leu Tyr Gln Leu Ile Arg Lys
 487 AGC TTA CGC TTA AGT AGC CAG TAT TCA TCT TCT CTT TAT CAA CTT ATC AGG AAG

35 His Tyr Ser Asn Phe Lys Lys Lys Asn Tyr Phe Ile Ile Ser Val Asp Glu Leu
 541 CAT TAC TCT AAT TTT AAG AAG AAA AAT TAT TTT ATT ATT TCC GTT GAT GAG TTA

FIG. 12.1

Lys Glu Glu Leu Ile Als Yyr Thr Phe Asp Lys Asp Gly Asn Ile Glu Tyr Lys
 595 AAG GAA GAG TTA ATA GCT TAT ACT TTT GAT AAA GAT GGA AAT ATT GAG TAC AAA
 5 Tyr Pro Asp Phe Pro Ile Phe Lys Arg Asp Val Leu Asn Lys Ala Ile Ala Glu
 649 TAC OCT GAC TTT OCT ATT TTT AAA AGG GAT GTG TTA AAT AAA GCC ATT GCT GAA
 Ile Lys Lys Lys Thr Glu Ile Ser Phe Val Gly Phe Thr Val His Glu Lys Glu
 703 ATT AAA AAG AAA ACA GAA ATA TCG TTT GTT GGC TTC ACT GTT CAT GAA AAA GAA
 10
 Gly Arg Lys Ile Ser Lys Leu Lys Phe Glu Phe Val Val Asp Glu Asp Glu Phe
 15 757 GGA AGA AAA ATT AGT AAG CTG AAG TTC GAA TTT GTC GTT GAT GAA GAT GAA TTT
 Ser Gly Asp Lys Asp Asp Glu Ala Phe Phe Met Asn Leu Ser Glu Ala Asp Ala
 811 TCT GGC GAT AAA GAT GAT GAA GCT TTT TTT ATG AAT TTA TCT GAA GCT GAT GCA
 20 Ala Phe Leu Lys Val Phe Asp Glu Thr Val Pro Pro Lys Lys Ala Lys Gly ***
 865 GCT TTT CTC AAG GTA TTT GAT GAA ACC GTA OCT CCC AAA AAA GCT AAG GGG TGA

FIG. 12.2

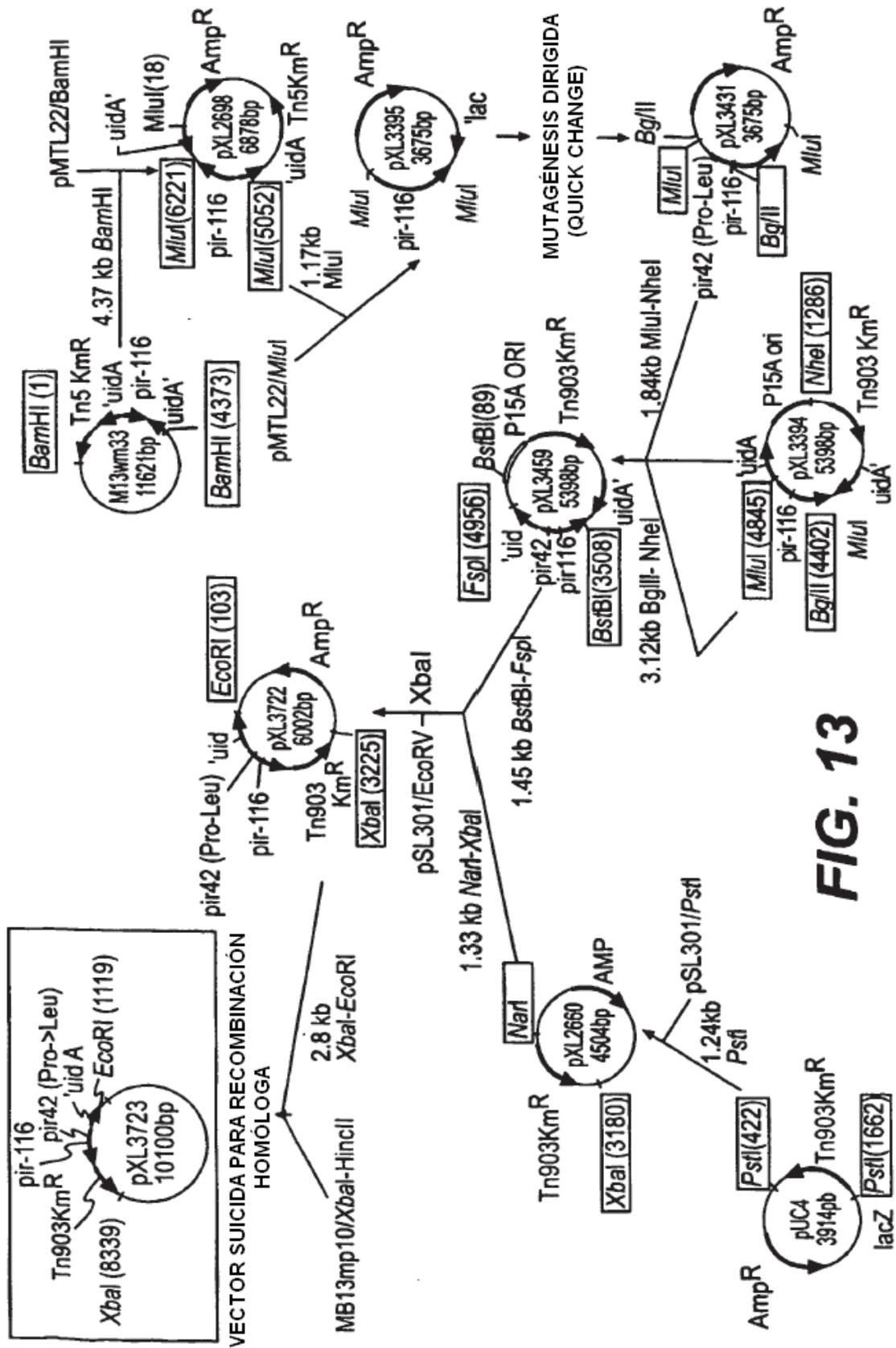


FIG. 13

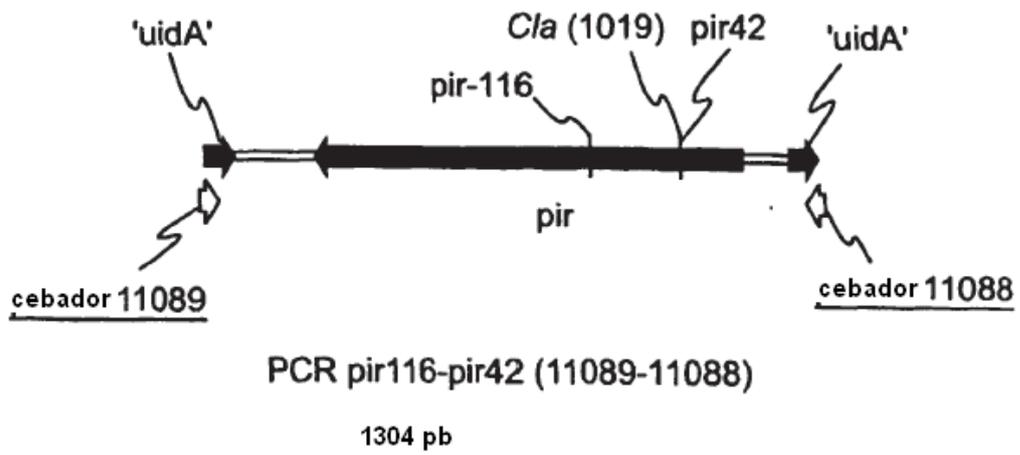
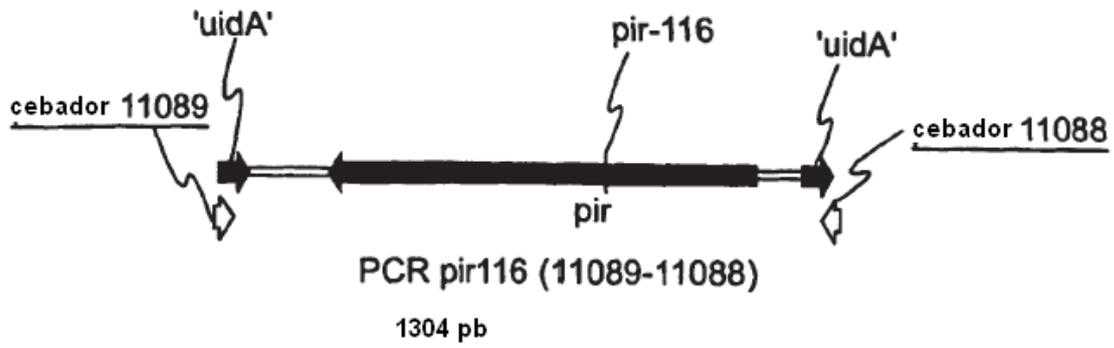


FIG. 14

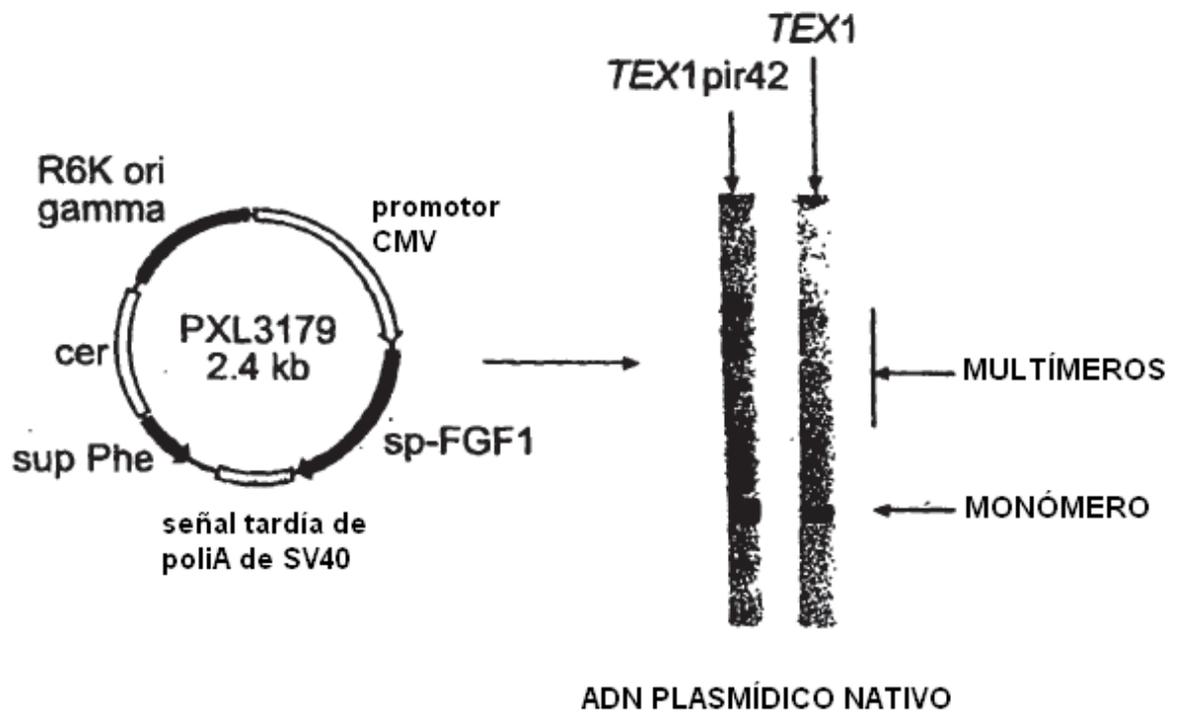


FIG. 15

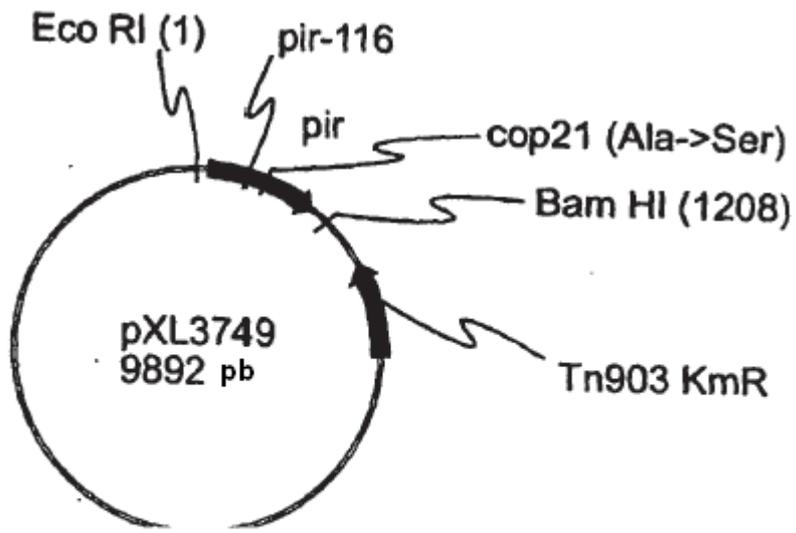
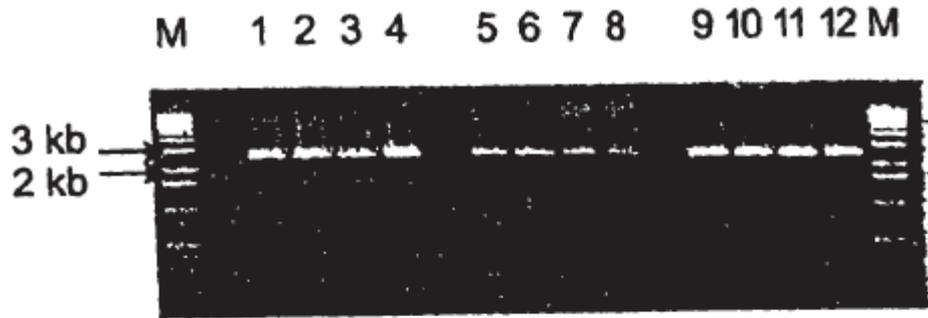


FIG. 16



M: 1 kb ESCALERA (LIFE BIOTECHNOLOGIES)
1->4: *TEX1cop21* (pXL2979)
5->8: *XAC1pir* (pXL2979)
9->12: *TEX1* (pXL2979)

FIG. 17

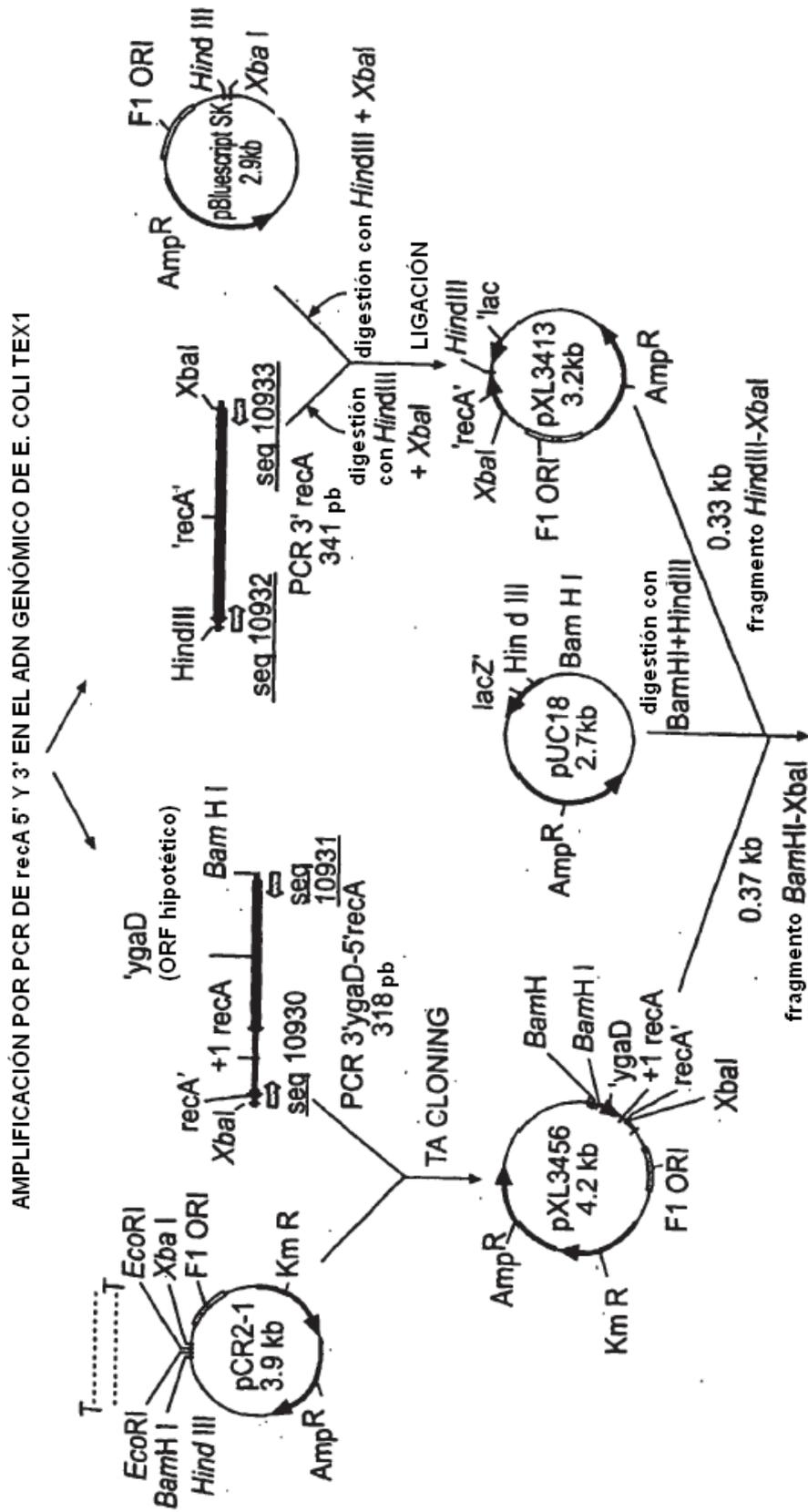
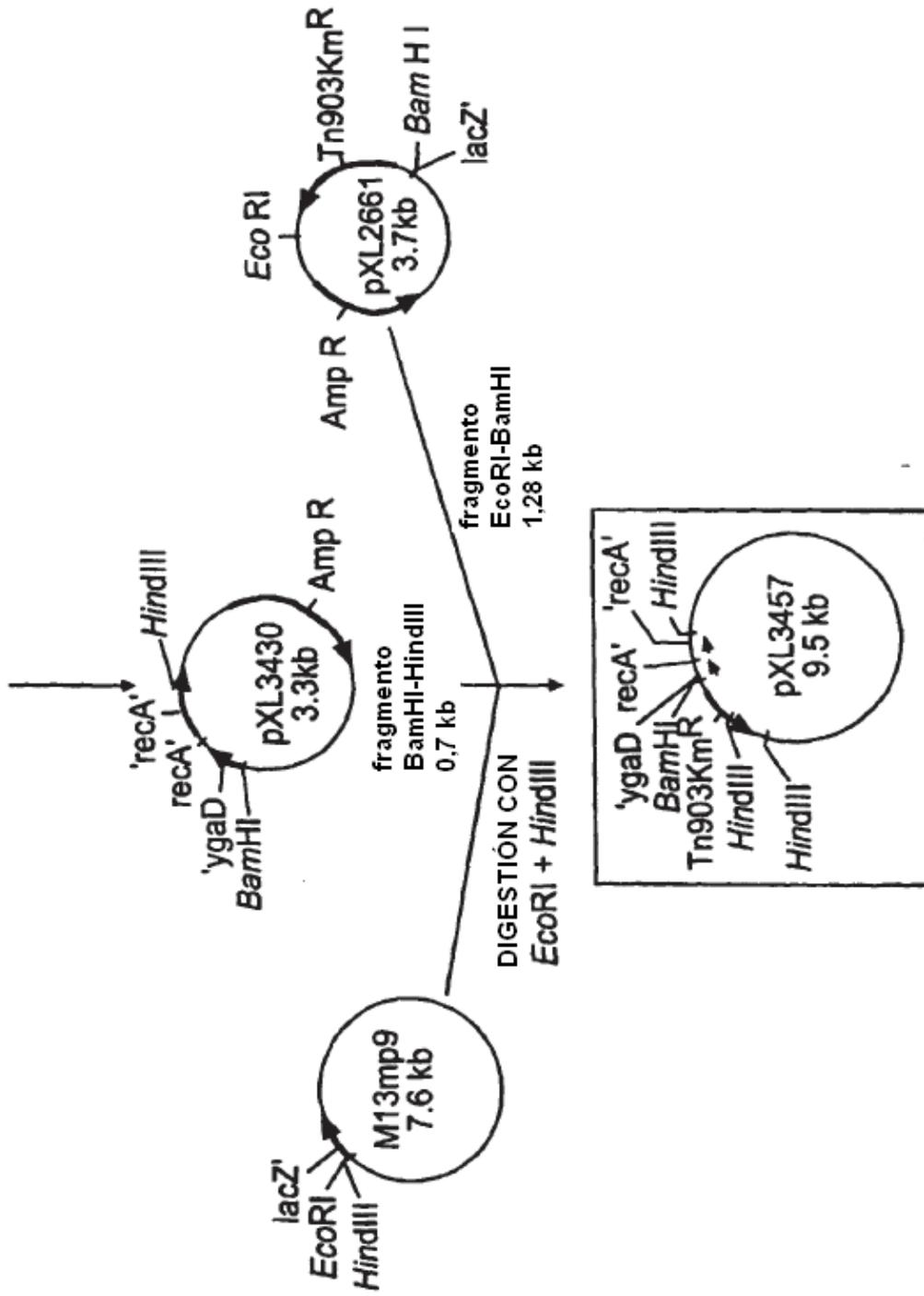


FIG. 18.1



VECTOR SUICIDA PARA RECOMBINACIÓN

FIG. 18.2

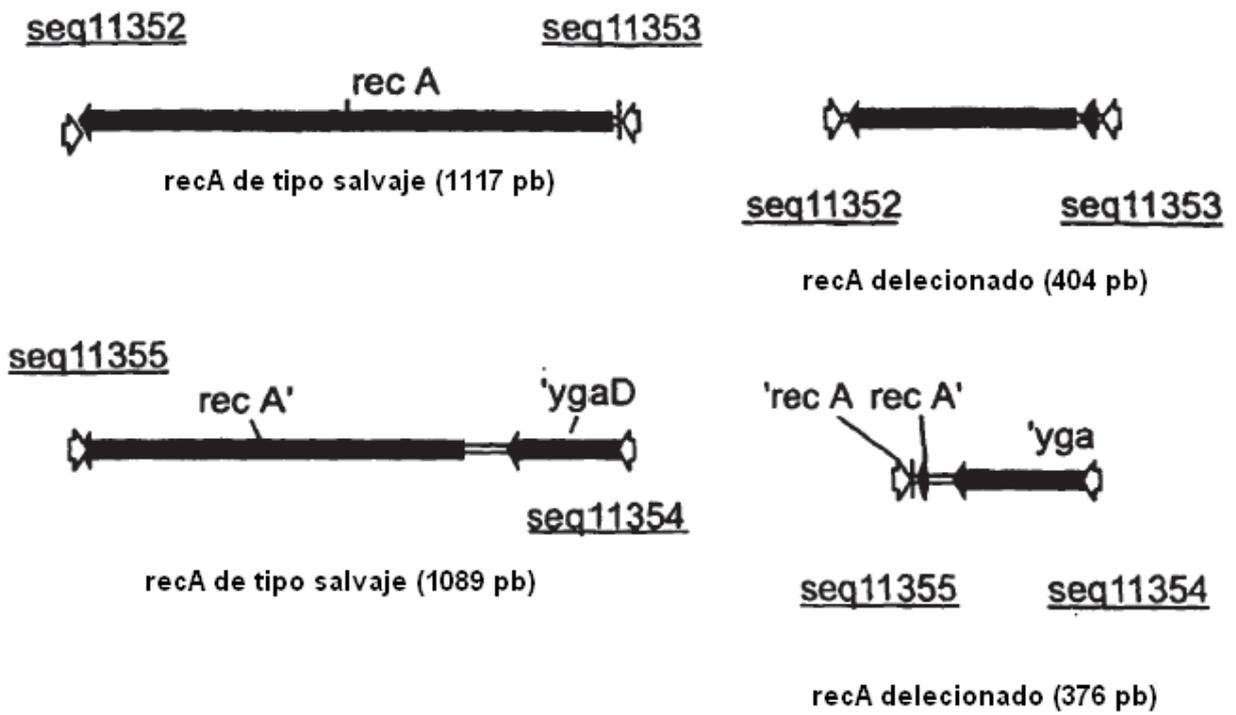
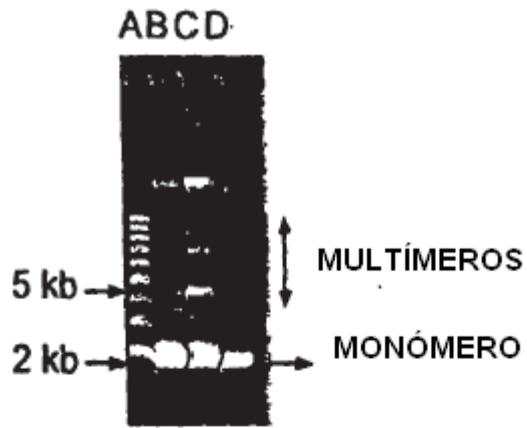


FIG. 19



- A: ESCALERA DE ADN SUPERENROLLADO (PROMEGA)
- B: pXL3179 EN TEX2 *pir42*
- C: pXL3179 EN TEX1 *pir42*
- D: pXL3179 EN TEX1

FIG. 20

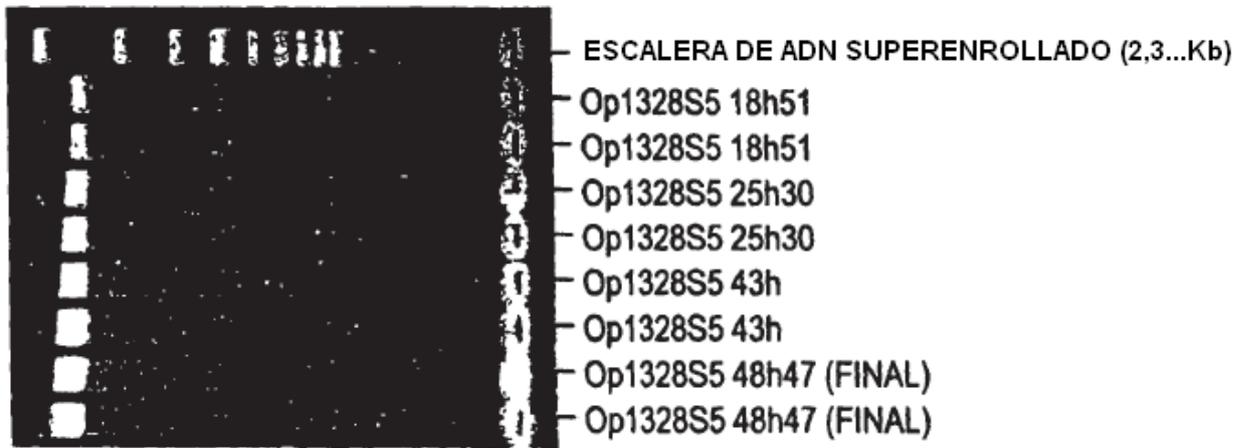


FIG. 21

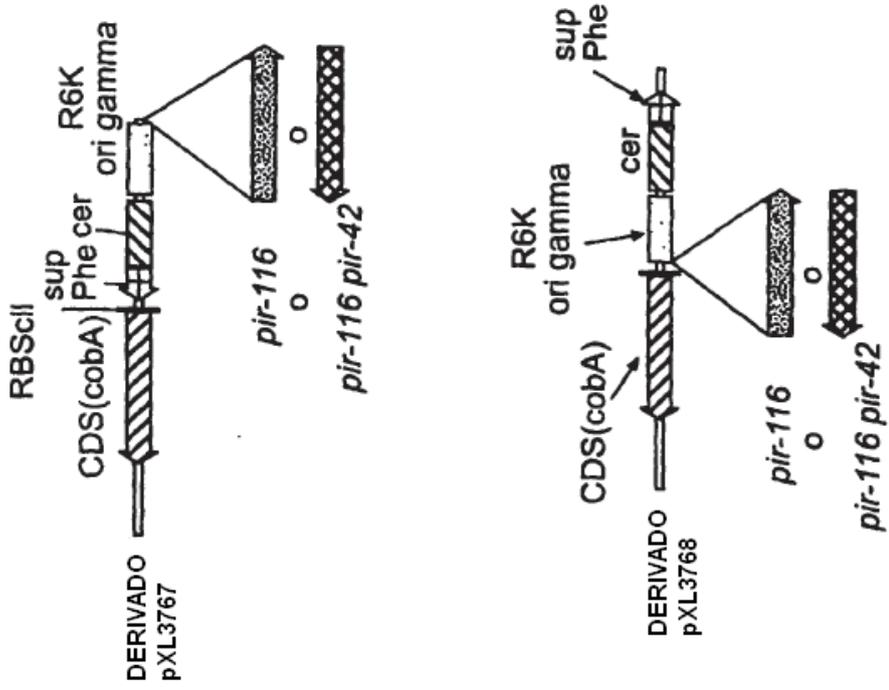


FIG. 23

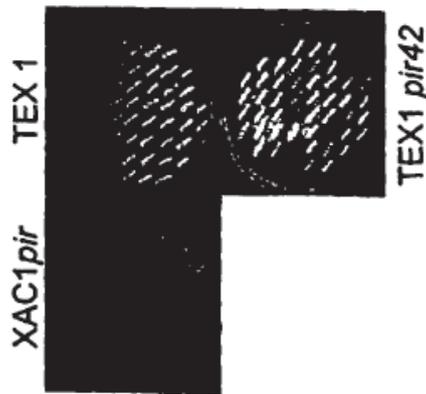
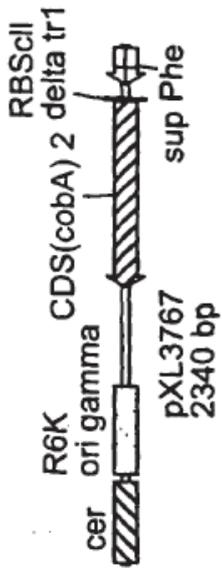


FIG. 22

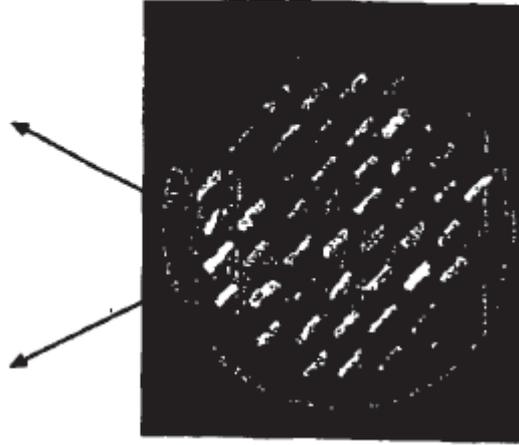
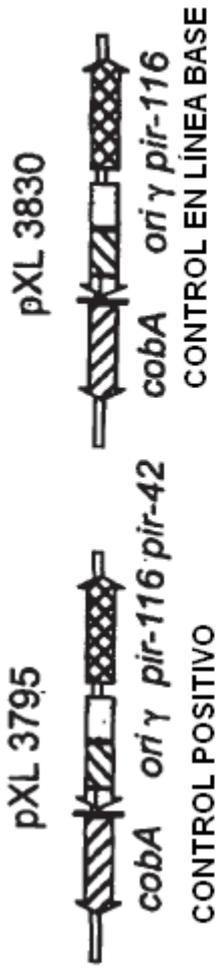


FIG. 25

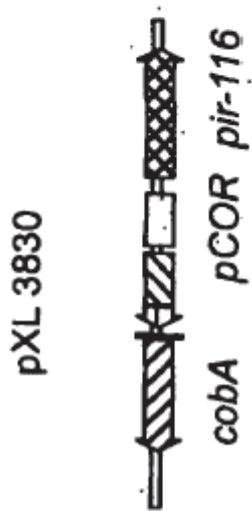


FIG. 24

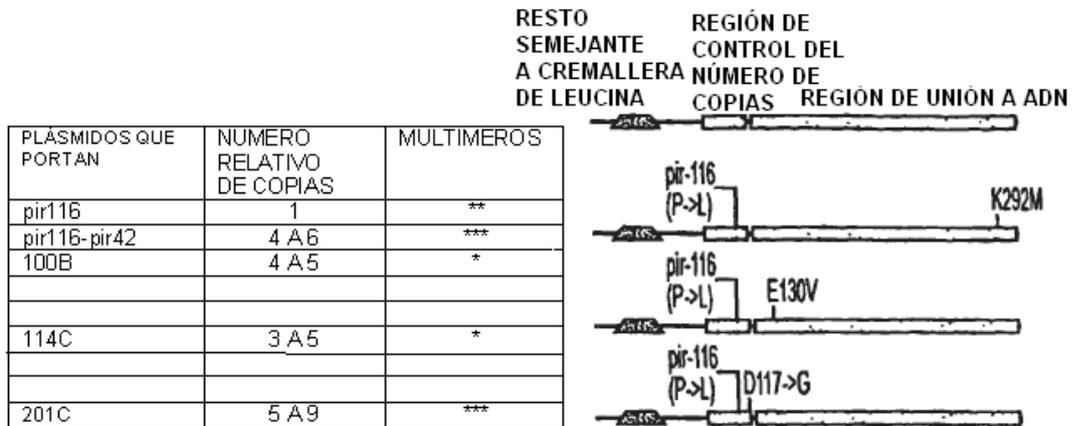


FIG. 26

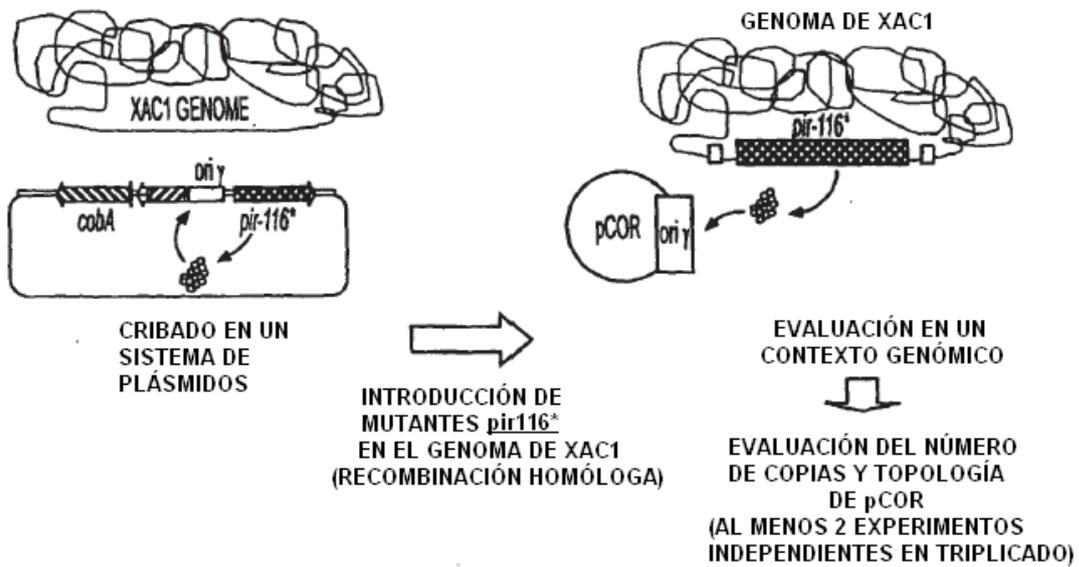


FIG. 27

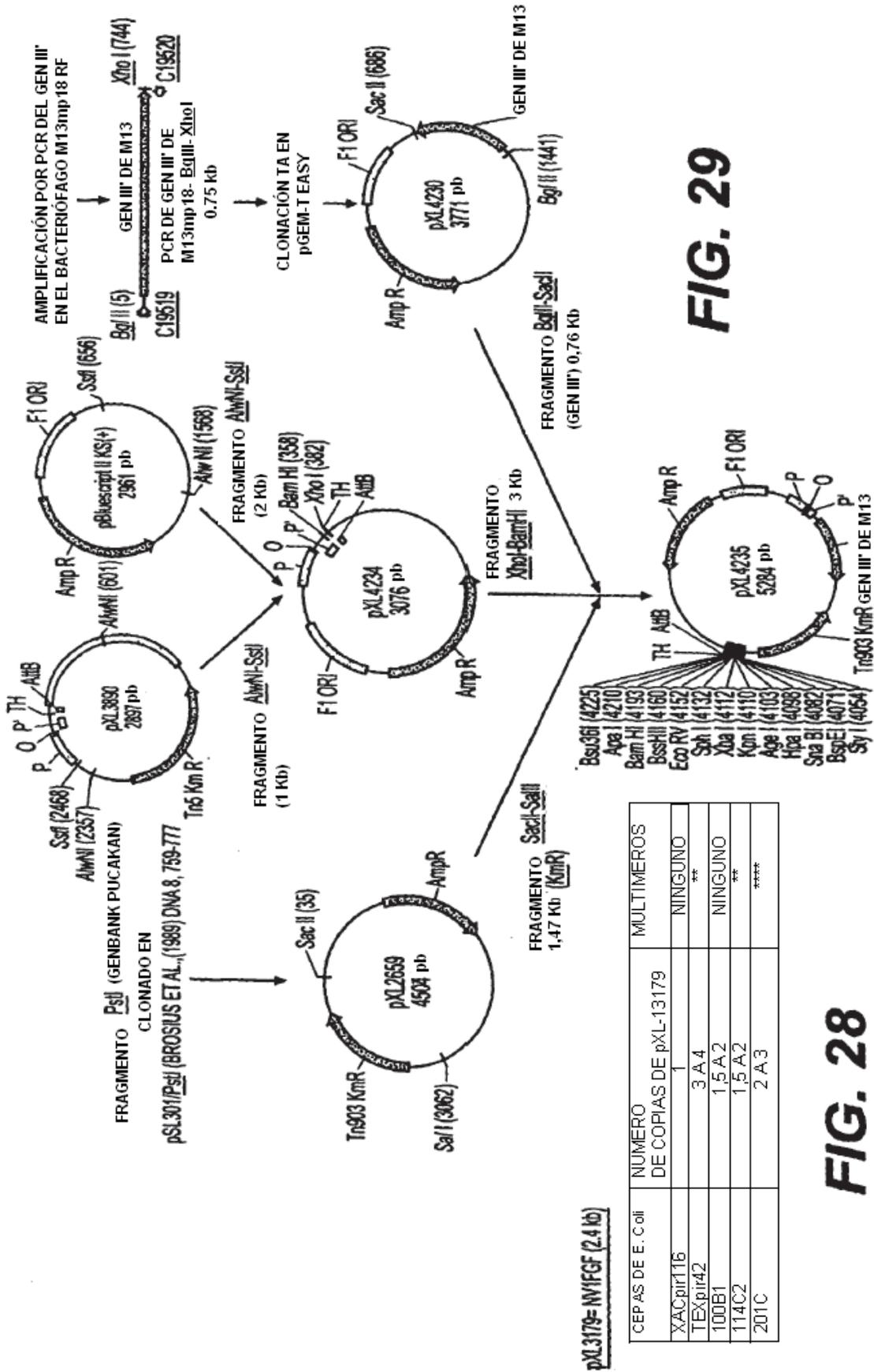


FIG. 29

FIG. 28

CASETE *uidA::pir116** COMO UN FRAGMENTO *AgeI-XbaI*
(UNA VERSIÓN MUTANTE DEL CASETE DESCRITO EN
SOUBRIER, F. ET AL. (1999). GENE THER 6: 1482-1488)

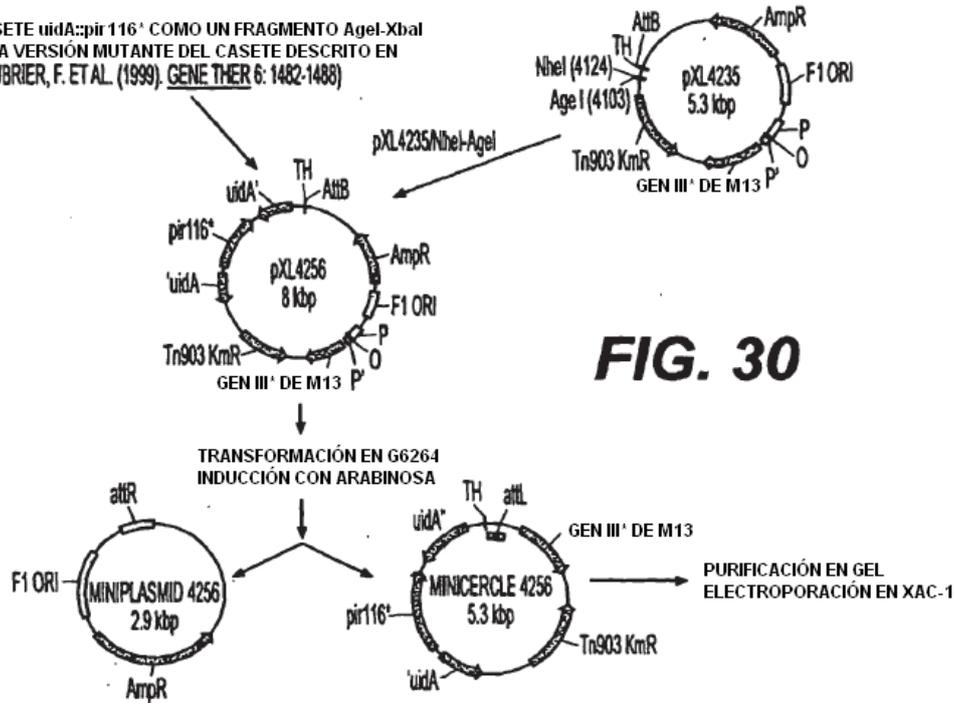
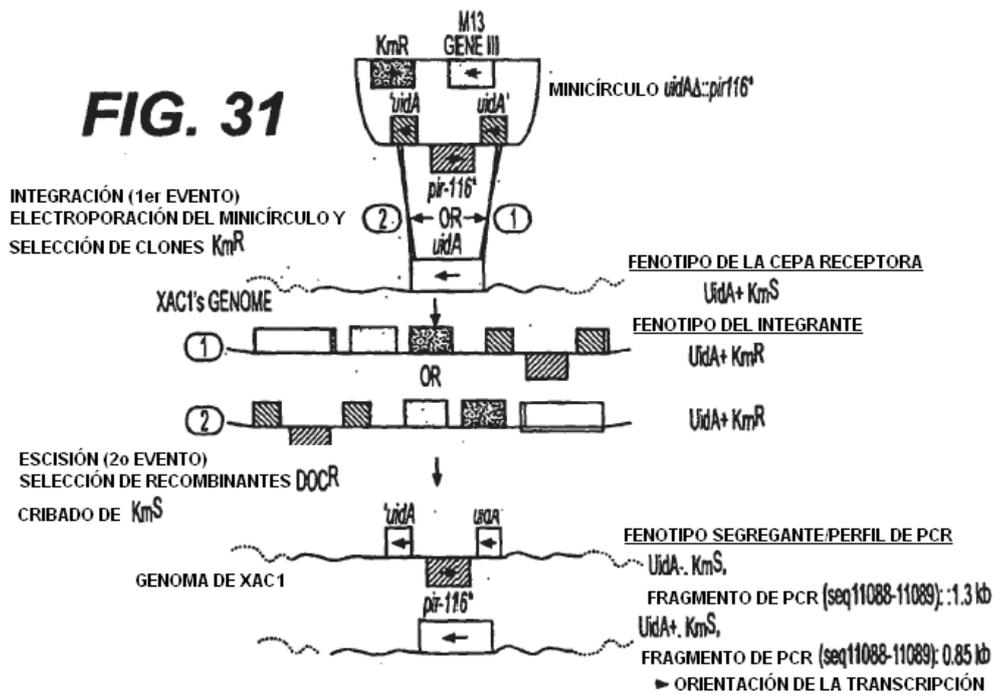


FIG. 31



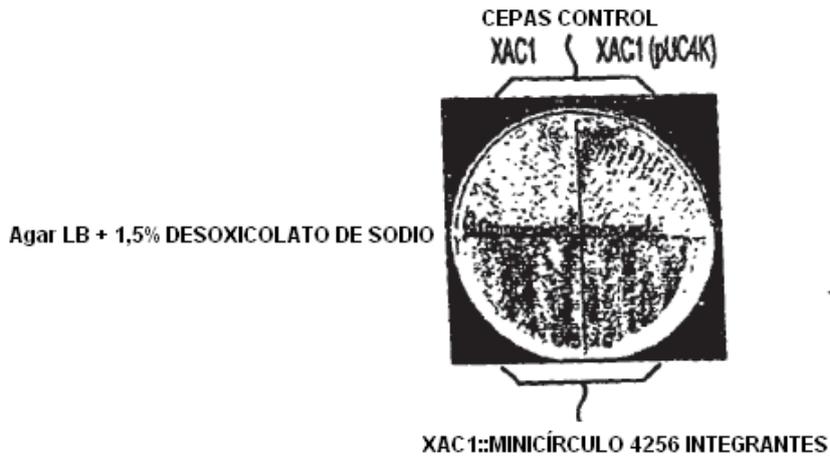


FIG. 32

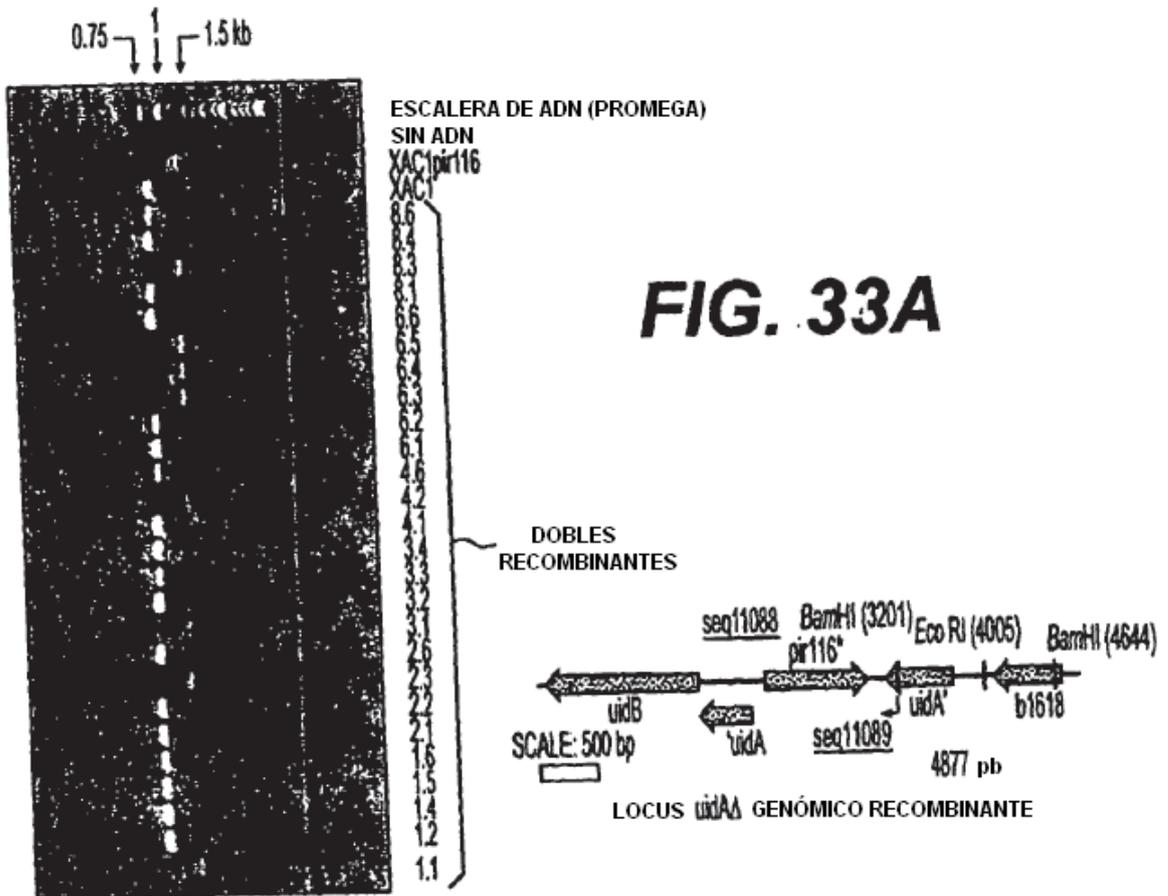


FIG. 33A

PCR WITH OLIGOS seq11088 AND seq11089

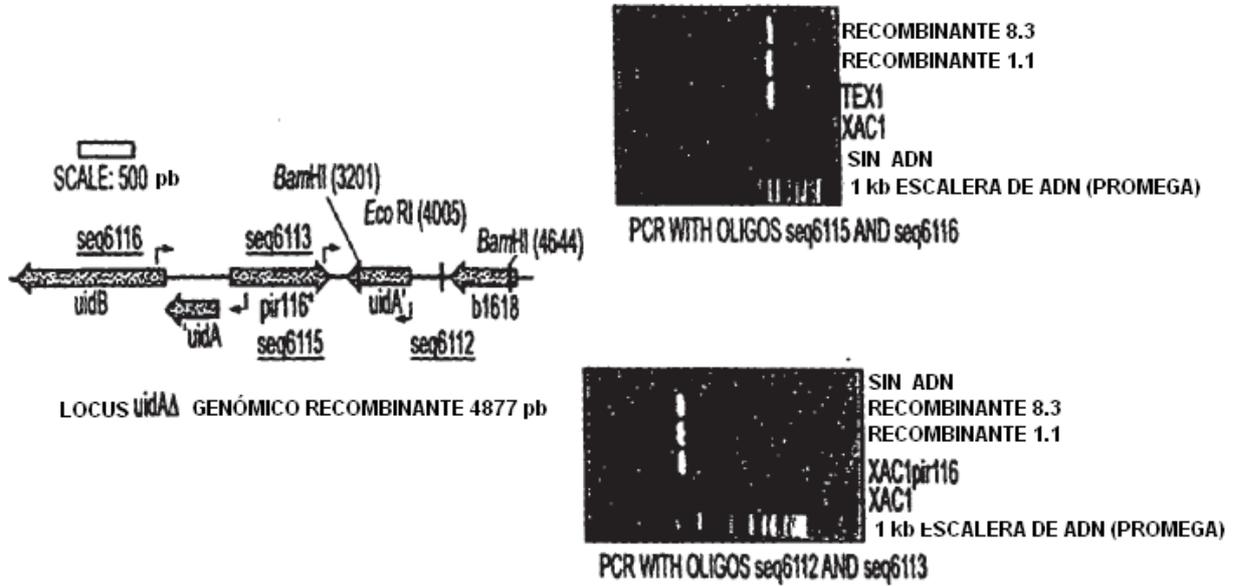


FIG. 33B