

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 526**

51 Int. Cl.:
C12N 15/00 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)
C12N 5/02 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
C12N 15/87 (2006.01)
C12P 21/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04783263 .9**
96 Fecha de presentación: **03.09.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1660654**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.05.2006**

54 Título: **VECTOR DE EXPRESIÓN.**

30 Prioridad:
04.09.2003 US 500803 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.02.2012

73 Titular/es:
MEDAREX, INC.
707 STATE ROAD
PRINCETON, NJ 08540, US

72 Inventor/es:
BLACK, Amelia

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 374 526 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Vector de expresión

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a vectores para la alta expresión de uno o más genes de interés en células huéspedes tales como células de mamíferos y similares.

Antecedentes de la invención

10 La producción estable de un gen de interés (GDI) puede conseguirse transfectando células huéspedes con vectores que contienen el GDI conjuntamente unido con un gen marcador de selección y seleccionando para determinar células que contienen el GDI causando una tensión en la célula que solo puede disminuirse si la célula expresa cantidades suficientes del marcador de selección. Los vectores integran al azar ADN cromosómico en las células huéspedes y los transfectantes resultantes muestran un amplio grado de variación en el nivel de expresión del GDI. Sin embargo, debido al efecto posicional del sitio de integración, relativamente pocos clones de células transfectantes expresarán el GDI a los niveles más altos deseados. El nivel de expresión de los genes codificados por el vector está muy influenciado por el entorno cromosómico local en el sitio de integración de los genes (Barnet y col., 1995, Antibody Expression and Engineering, Wang and Imanaka (eds.), ACS Symposia Series, pág. 604).

15 El uso de un marcador de selección atenuado se ha correlacionado con un cambio hacia la obtención de transfectantes con mayores niveles de expresión del GDI unido, presumiblemente por sesgo de selección para posiciones de integración que poseen influencias positivas sobre la expresión del gen marcador de selección atenuado y el GDI conjuntamente unido (Reff y Pfarr, 1992, Gene Amplification in Mammalian Cells, R. E. Kellens (ed.), Marcel Dekker, Inc., pág.355). Los vectores de expresión descritos típicamente en la técnica anterior, contienen fuertes elementos reguladores para impulsar un alto nivel de expresión de proteína del GDI que está conjuntamente unido con un marcador de selección atenuado. Anteriormente se han utilizado estrategias para la reducción de marcadores de selección en vectores de expresión que incluyen mutaciones incapacitantes de proteínas de marcadores de selección (por ejemplo, documento US 6.316.253), inserciones intrónicas artificiales en el gen marcador de selección (por ejemplo, documento US 5. 733.779) y expresión reducida de marcadores de selección en construcciones de vectores policistrónicos (por ejemplo, documento US 4. 713.339 y Rees S al., 1996, Biotechniques 20:102). Aunque cada uno de estos sistemas para mejorar la expresión de los genes de interés puede tener problemas asociados con ellos, es deseable tener un sistema de expresión mejorado que permita un procedimiento más eficaz para generar y explorar células que sean grandes productoras del producto génico de interés. De esta manera, es deseable crear un vector de expresión y sistema de expresión en células huésped mejorados que puedan usarse para generar eficazmente altas cantidades de cualquier proteína recombinante mediante el aumento de la expresión estable de un gen de interés por una célula huésped.

20 La cita bibliográfica y/o mención de una referencia en esta sección y a lo largo de la memoria descriptiva se proporciona simplemente para aclarar la descripción de la presente invención y no es una admisión de que cualquier referencia de este tipo sea "técnica anterior" con respecto a la invención descrita en el presente documento.

Sumario de la invención

25 La presente invención proporciona vectores de expresión novedosos que son capaces de producir, en una célula huésped, particularmente en células de mamíferos, grandes cantidades de una o más proteínas deseadas.

30 En un aspecto, la presente invención se refiere a vectores de expresión. En una realización, el vector de expresión contiene un gen marcador de selección unido operativamente a un ácido nucleico regulador que comprende un promotor transcripcionalmente defectuoso y uno o más sitios de inserción para insertar un gen de interés unido conjuntamente que se une operativamente a secuencia reguladora.

35 En otra realización, el vector de expresión contiene un gen marcador de selección unido operativamente a un ácido nucleico regulador que comprende un promotor del gen de la beta globina que carece de una secuencia de caja CCAAT y uno o más genes de interés unidos operativamente a un ácido nucleico regulador. En algunas realizaciones, los vectores de expresión también poseen un gen marcador amplificable.

40 En otro aspecto, la invención se refiere a células huéspedes que se han transfectado con un vector de expresión de la presente invención. En una realización particular la célula huésped es una célula de mamífero, por ejemplo, una célula CHO.

45 En otro aspecto adicional, la presente invención se refiere a procedimientos para producir un polipéptido codificado por un gen de interés, que comprende cultivar una célula huésped, que contiene un vector de expresión de la presente invención, en condiciones adecuadas de tal manera que el gen de interés exprese el polipéptido. En realizaciones particulares, los procedimientos de la presente invención producen una cadena pesada de inmunoglobulina y una cadena ligera de inmunoglobulina, dando así como resultado un anticuerpo funcional.

Otras características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la descripción y ejemplos detallados más adelante que no deben interpretarse como limitantes.

Breve descripción de los dibujos

5 Las Figuras 1A-1B muestran la secuencia de un fragmento de ADN (SEC ID N°: 1) que contiene, de 5' a 3', un promotor principal de beta-globina murina, un gen de DHFR, una secuencia poli A del SV40, un segundo promotor principal de la beta globina murina y una parte de un gen de neo.

10 La Figura 2 muestra las secuencias del promotor principal de la beta globina murina pAGE2 (SEC ID N°: 2) y los promotores principales de la beta globina murina modificados pAGE8 y pAGE9 (SEC ID N°: 3 y 4). Las secuencias reguladoras transcripcionales CACCC, CCAAT y TATA están subrayadas. Los elementos de repetición directos están subrayados con líneas dobles.

La Figura 3 es un histograma en el que se compara el número de colonias obtenidas, transfectando células CHO con los vectores pAGE2 (barras de color blanco), pAGE8 (barras de color gris) o pAGE9 (barras de color negro), con sus niveles de expresión de proteína (en ng/ml).

La Figura 4 es un diagrama esquemático del vector pIE-Ugamma1.

15 La Figura 5 es un histograma en el que se compara el número de colonias obtenidas, transfectando células CHO con un vector pIE, que tiene la misma modificación que la del promotor de la beta la globina encontrado en pAGE9, con los niveles de expresión de anticuerpos (en ng/ml).

Descripción detallada de la invención

20 La presente invención proporciona vectores para altos niveles de expresión de un gen de interés (GDI). Los vectores de la presente invención están particularmente bien adaptados para la expresión de anticuerpos recombinantes (por ejemplo, cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos incluidas en el mismo vector de expresión) y que pueden usarse para obtener niveles de expresión de anticuerpos en el intervalo, por ejemplo, de 3-14 pg/cél/día. En los vectores de la presente invención, se consiguen altos niveles de expresión de proteínas mediante la unión conjunta del gen de interés (que codifica la proteína) con un gen marcador de selección que tiene un promotor transcripcionalmente defectuoso. En otra realización, el marcador de selección unido operativamente al promotor transcripcionalmente defectuoso se usa en combinación con otro marcador de selección que es amplificable para conseguir niveles de expresión, incluso más altos, del gen de interés. El alto nivel de expresión incluso estable de genes en células de mamíferos depende críticamente tanto del sitio de integración como del número de copias. La presión de selección impuesta por concentraciones convencionales del análogo de la neomicina G418, por ejemplo, es típicamente baja y produce clones celulares que tienen una amplia distribución de niveles expresión con escasísimos clones que tienen mayores niveles de expresión a los típicamente deseables para propósitos de producción de proteínas recombinantes. Los ácidos nucleicos y vectores de expresión descritos en el presente documento resuelven éste y otros problemas usando un marcador de selección unido operativamente a un promotor atenuado que está conjuntamente unido a un GDI. La expresión notablemente baja del gen marcador de selección permite una selección parcial hacia clones de alta expresión.

35

La presente invención proporciona nuevas construcciones de ácidos nucleicos (vectores de expresión) que son útiles para la expresión estable, a alto nivel, de un GDI heterólogo en una célula huésped, particularmente en células de mamíferos. En una realización, los vectores de expresión contienen (1) un gen marcador de selección unido operativamente a un ácido nucleico regulador que comprende un promotor atenuado y (2) un sitio de inserción para insertar uno o más genes de interés (GDI) conjuntamente unidos. La inserción de un GDI unido operativamente a una secuencia (o secuencias) de ácido nucleico reguladora apropiada en el sitio de inserción permite la expresión del GDI en altas cantidades en una célula huésped que se ha transfectado con el vector. En otra realización, los vectores de expresión contienen (1) un gen marcador de selección unido operativamente a un ácido nucleico regulador que comprende un promotor atenuado y (2) uno o más GDI unidos operativamente a un ácido nucleico regulador adecuado. Por tanto, en la realización de la presente invención el gen marcador de selección y el GDI están conjuntamente unidos en el vector. Los vectores de la presente invención contienen opcionalmente un segundo marcador de selección ("amplificable"), por ejemplo, dihidrofolato reductasa (DHFR), que facilita la selección de células huéspedes que expresan el GDI a altos niveles. Por tanto, una ventaja de los vectores de expresión de la presente invención es que permiten la expresión aumentada de un GDI y por lo tanto mayores niveles de producción del polipéptido de interés, en comparación con vectores que tienen el mismo promotor unido operativamente al gen marcador de selección, pero cuyo promotor no se ha atenuado.

50

Ácidos nucleicos

Como se usa en el presente documento, un "ácido nucleico" incluye ADN, ARN, ARNm, ADNc, ADN genómico y análogos de los mismos; de origen procarionta, eucariota y sintético. Una "secuencia codificante" o una secuencia que "codifica" un polipéptido seleccionado, es una molécula de ácido nucleico que se transcribe (en el caso de ADN) y se traduce (en el caso de ARNm) en un polipéptido *in vivo* cuando se coloca bajo el control de ácidos nucleicos reguladores apropiados (o "elementos de control"). Los límites de la secuencia codificante los determina un codón de

55

inicio en el extremo 5' (amino) y un codón de terminación de la traducción en el extremo 3' (carboxi). Una secuencia codificante puede incluir, pero sin limitación, secuencias ADNc de virus, de ARNm procariota o eucariota, de ADN genómico de ADN viral o procariota e incluso secuencias de ADN sintético. Una secuencia de terminación de la transcripción se localiza típicamente en el extremo 3' con respecto a la secuencia codificante. En la materia también se conocen técnicas para determinar la "identidad de secuencia" de ácidos nucleicos y aminoácidos. Típicamente, dichas técnicas incluyen determinar la secuencia de nucleótidos del ARNm para un gen y/o determinar la secuencia de aminoácidos codificada por el mismo y comparar estas secuencias con una segunda secuencia de nucleótidos o de aminoácidos. En general, "identidad" se refiere a una correspondencia exacta de nucleótido con nucleótido o de aminoácido con aminoácido de dos secuencias de polinucleótidos o de polipéptidos, respectivamente. Dos o más secuencias (de polinucleótidos o de aminoácidos) pueden compararse determinando su "porcentaje de identidad". El porcentaje de identidad de dos secuencias, ya sea de secuencias de ácidos nucleicos como de aminoácidos, es el número exacto de emparejamientos entre dos secuencias alineadas dividido entre la longitud de las secuencias más cortas y multiplicado por 100. El algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2: 482-489 (1931), proporciona un alineamiento aproximado para secuencias de ácidos nucleicos. Este algoritmo puede aplicarse a secuencias de aminoácidos usando la matriz de puntuación desarrollada por Dayhoff, *Atlas of Protein Sequences and Structure*, M. O. Dayhoff ed., 5 supl. 3: 353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C., USA, y normalizada por Gribskov, *Nucl. Acids Res.* 14(6): 6745-6763 (1986). El Genetics Computer Group (Madison, Wis.) proporciona una implementación ejemplar de este algoritmo para determinar el porcentaje de identidad de una secuencia en la aplicación de utilidad "BestFit". En el Manual del Programa del Paquete Informático de Análisis de Secuencias de Wisconsin, Versión 8 (1995) (disponible de Genetics Computer Group, Madison, Wis.) se describen los parámetros por defecto para este procedimiento. Un procedimiento preferido para el establecimiento del porcentaje de identidad en el contexto de la presente invención es usar el paquete informático MPSRCH de programas de propiedad registrada por la Universidad de Edimburgo, desarrollado por John f. Collins y Shane S. Sturrok, y distribuido por IntelliGenetis, Inc. (Mountain, View, Calif.). A partir de este conjunto de programas informáticos, el algoritmo Smith-Waterman puede emplearse donde se usan los parámetros por defecto para la tabla de resultados (por ejemplo, penalización por apertura de hueco de 12, penalización por extensión de hueco de uno, y un hueco de seis). A partir de los datos generados los valores de "emparejamiento" reflejan la "identidad de secuencia". Generalmente, en la técnica se conocen otros programas adecuados para calcular el porcentaje de identidad o similitud entre secuencias.

Se considera que dos fragmentos de ácidos nucleicos se "hibridan selectivamente" como se describe en el presente documento. El grado de identidad de secuencia entre dos moléculas de ácido nucleico influye en la eficacia y fuerza de sucesos de hibridación entre dichas moléculas. Una secuencia de ácido nucleico parcialmente idéntica inhibirá al menos parcialmente una secuencia completamente idéntica a partir de la hibridación con una molécula diana. La inhibición de hibridación de la secuencia completamente idéntica puede evaluarse usando ensayos de hibridación bien conocidos en la materia (por ejemplo, transferencia de Southern, transferencia de Northern, hibridación en solución o similares, véase Sambrook y col., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Nueva York; o Ausubel y col. (Eds.), *Current Protocols In Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York (1997)). Dichos ensayos pueden realizarse usando diversos grados de selectividad, por ejemplo, usando condiciones que varían desde una baja a una alta rigurosidad. Si se emplean condiciones de baja rigurosidad, la ausencia de unión no específica puede evaluarse usando una sonda secundaria que incluso carece de un grado parcial de identidad de secuencia (por ejemplo, una sonda que tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 30% con la molécula diana), de manera que, en ausencia de sucesos de unión no específicos, la sonda secundaria no se hibridará con la diana.

Cuando se utiliza un sistema de detección basado en hibridación, se selecciona una sonda de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia de ácido nucleico diana, y después por selección de condiciones apropiadas la sonda y la secuencia diana se "hibridan selectivamente", o se unen, entre sí, para formar una molécula híbrida. Una molécula de ácido nucleico que es capaz de hibridarse selectivamente con una secuencia diana en condiciones "moderadamente rigurosas" típicamente se hibrida en condiciones que permitan la detección de una secuencia de ácido nucleico diana de al menos aproximadamente 10-14 nucleótidos de longitud que tiene al menos aproximadamente una identidad de secuencia del 70% con la secuencia de la sonda de ácido nucleico seleccionada. Las condiciones de hibridación rigurosas típicamente permiten la detección de secuencias de ácido nucleico diana de al menos aproximadamente 10-14 nucleótidos de longitud que tienen una identidad de secuencia superior a aproximadamente 90-95% con la secuencia de la sonda de ácido nucleico seleccionada. Las condiciones de hibridación útiles para la hibridación de la sonda/diana en las que la sonda y la diana tienen un grado específico de identidad de secuencia, puede determinarse como se conoce en la materia (véase, por ejemplo, *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach*, editores B. D. Hames y S.J. Higgins, (1985) Oxford; Washington, D.C.; IRL Press).

Con respecto a las condiciones de rigurosidad para la hibridación, se conoce bien en la materia que pueden emplearse numerosas condiciones equivalentes para establecer una rigurosidad particular variando, por ejemplo, los siguientes factores: la longitud y la naturaleza de las secuencias de la sonda y de la diana, la composición de bases de las diversas secuencias, las concentraciones de sales y de otros componentes de la solución de hibridación, la presencia o ausencia de agentes de bloqueo en las soluciones de hibridación (por ejemplo, formamida, sulfato de dextrano y polietilenglicol), la temperatura de la reacción de hibridación y los parámetros de tiempo, así como

variando las condiciones de lavado. La selección de un conjunto particular de condiciones de hibridación se selecciona siguiendo procedimientos convencionales en la materia (véase, por ejemplo, Sambrook, y col., citado anteriormente o Ausubel y col., citado anteriormente).

- 5 Un primer polinucleótido “deriva de” un segundo nucleótido si tiene la misma, o sustancialmente la misma, secuencia de emparejamiento de bases que una región del segundo polinucleótido, si su ADNc se complementa con el mismo o si presenta identidad de secuencia como se ha descrito anteriormente. Un primer polipéptido “deriva de” un segundo polipéptido si (i) se codifica por un primer polinucleótido derivado de un segundo polinucleótido, o si (ii) presenta identidad de secuencia con los segundos polipéptidos como se ha descrito anteriormente.

Marcadores de selección

- 10 Se observa que, para diferenciar entre marcadores de selección usados para seleccionar células huéspedes que tienen integrado el GDI frente a marcadores de selección usados para amplificar copias del GDI, se usa la expresión “marcador amplificable” para describir lo último. En la materia se conocen bien marcadores de selección y amplificables y el experto profesional puede seleccionarlos para su uso en la invención para aislar transfectantes estables basándose en el sistema de expresión particular deseado.

- 15 Las concentraciones apropiadas de los agentes que causan estrés a la célula huésped, que metaboliza el marcador de selección, variarán basándose en la manera en que se usen. Un experto habitual en la materia puede determinar fácilmente los parámetros para dicho uso. En la materia también se conocen bien líneas de células deficientes de genes que codifican al marcador de selección.

- 20 Un “marcador de selección” codifica un polipéptido cuya expresión es necesaria para permitir que una célula, que se transfecta con un ácido nucleico o vector de la presente invención, sobreviva bajo un determinado estrés aplicado a la célula, por ejemplo un agente tóxico (por ejemplo G418). Los ejemplos de genes marcadores de selección que pueden usarse la presente invención incluyen, pero sin limitación, neomicina fosfotransferasa, glutamina sintetasa, dihidrofolato reductasa, cloramfenicol acetiltransferasa, higromicina B fosfotransferasa (véase Gritz y col., 1983, Gene 25: 179-188 y Palmer y col., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 1055-1059), xantina-guanina fosforibosiltransferasa (véase Mulligan y col., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2072-2076), histidinol deshidrogenasa, la subunidad β de la triptófano sintasa, blastidina S desaminasa, zeocina, asparagina sintasa, hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa, timidina quinasa (véase Littlefield y col., 1964, Science 145: 709-710), adenina fosforibosiltransferasa, P-glucoproteína, adenosina desaminasa (véase Kaufman y col., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 3136-3140), ornitina descarboxilasa y CAD (carbamoil-P- sintetasa, aspartato transcarbamilasa, dihidroorotasa). En las composiciones vectoriales y procedimientos descritos en el presente documento puede usarse cualquier marcador de selección que codifique un ácido nucleico adecuado. Típicamente, los genes marcadores de selección empleados en la presente invención pueden obtenerse a partir de fuentes fácilmente disponibles.

- 35 En una realización de la presente invención, el marcador de selección codifica un gen que otorga resistencia frente a antibióticos, por ejemplo, el gen de resistencia a neomicina (neo). El gen de resistencia a neomicina del transposón Tn5 codifica la neomicina fosfotransferasa II, que otorga resistencia frente a diversos antibióticos, incluyendo G418 y kanamicina. La cantidad óptima de sustrato (por ejemplo, G418) necesaria para la selección puede determinarse individualmente para cada línea celular de acuerdo con procedimientos conocidos. Véase Bryan L.E., 1984, Antimicrobial Drug Resistance, L.B. Bryan (ed.), Academic, NY, págs. 241-277.

- 40 En otra realización de la presente invención, en los vectores de la presente invención, para potenciar la expresión del GDI se emplea un “marcador amplificable”. Los ejemplos de marcadores amplificables incluyen dihidrofolato reductasa, P-glucoproteína, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa y CAD (carbamoil-P- sintetasa, aspartato transcarbamilasa, dihidroorotasa). En una realización de un vector de expresión de la presente invención, como un marcador de selección se usa neo y DHFR como el marcador amplificable para permitir la expresión aumentada del GDI. La DHFR es necesaria para la biosíntesis de purina y, en ausencia de purinas exógenas, se requiere DHFR para el crecimiento de las células. El metotrexato (MTX) es un fuerte inhibidor competitivo de la DHFR de manera que aumentando la concentración de MTX se seleccionan células que expresan niveles aumentados de DHFR. Los procedimientos de amplificación de DHFR convencionales permiten el aislamiento de células establemente amplificadas que contienen los genes de DHFR amplificados, así como el GDI, dentro de sus cromosomas. Para los usos de los genes de DHFR y MTX, como marcadores de selección y para la amplificación de genes, véase Maniatis y col., (1992) In: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor, NY.

Gen de interés

- 55 El GDI codifica una cadena pesada o una cadena ligera de un anticuerpo, que puede ser cualquier tipo de anticuerpo, por ejemplo, murino, quimérico, humanizado y humano, en el que las dos cadenas pueden proceder del mismo anticuerpo o de anticuerpos diferentes. Un GDI que codifica una cadena pesada o una cadena ligera puede codificar solamente un fragmento de la cadena pesada o de la cadena ligera, por ejemplo, la parte de unión al antígeno o la parte de unión a Fc o una combinación de ambas. Los expertos habituales en la materia apreciarán

que la expresión “parte de unión al antígeno” de un anticuerpo se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse a un antígeno. Se ha observado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede realizarse por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión incluidos dentro de la expresión “parte de unión al antígeno” de un anticuerpo incluyen, pero sin limitación, (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en dominios V_L , V_H , C_L y C_{H1} ; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en dominios V_H y C_m ; (iv) un fragmento fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward y col., 1989, Nature 341: 544-546), que consiste en un dominio V_H ; y (vi) una región determinante de la complementariedad (RDC) aislada. Adicionalmente, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H , se codifican por genes separados, estos pueden unirse, usando procedimientos recombinantes, mediante un engarce sintético que los permite constituirse como una sola cadena de proteína en la que las regiones V_L y V_H se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenaria (Fvmc); véase, por ejemplo, Bird y col., 1988, Science 242: 423-426; y Huston y col., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883). Dichos anticuerpos monocatenarios también pretenden incluirse dentro de la expresión “parte de unión al antígeno” de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia y los fragmentos se exploran para determinar la utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

Ácidos nucleicos reguladores

Un ácido nucleico regulador es cualquier secuencia que regule o influya en (i) la transcripción, (ii) traducción o (iii) modificaciones postraduccionales, durante la expresión de un gen unido operativamente al ácido nucleico regulador y que contiene uno o más “elementos de control” para la regulación de dicha actividad. Un ácido nucleico regulador y un gen unido operativamente no necesitan derivar del mismo organismo o del mismo tipo de célula. Preferentemente, el ácido nucleico regulador es de origen mamífero o viral.

La expresión “elemento de control” de un ácido nucleico regulador se conoce bien en la materia (véase, por ejemplo, Goeddel, Gene Expression Technology, Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA, 1990) e incluye, por ejemplo, promotores transcripcionales, elementos potenciadores de la transcripción, señales de terminación de la transcripción, secuencias de poliadenilación (localizadas en el extremo 3' con respecto al codón de terminación de la traducción), secuencias para optimizar el inicio de la traducción (localizadas en el extremo 5' con respecto a la secuencia codificante), secuencias de terminación de la traducción, secuencias que dirigen la modificación postraducional (por ejemplo, sitios de glucosilación), todos los cuales pueden usarse para regular la transcripción y/o traducción de un gen unido operativamente a una secuencia reguladora. Deberá apreciarse por los expertos en la materia que la selección de elementos de control de un ácido nucleico regulador dependerá de factores tales como la elección de la célula huésped a transformar, del nivel de expresión de la proteína deseada, etc.

Como se usa en el presente documento, “unido operativamente” se refiere a una disposición de elementos, por ejemplo, un ligamiento funcional entre un ácido nucleico regulador y un gen, en el que los componentes descritos de esta manera se configuran para realizar su función normal. Por tanto, un promotor determinado, unido operativamente a una secuencia codificante, es capaz de efectuar la expresión de la secuencia codificante cuando están presentes enzimas adecuadas. La secuencia promotora no necesita ser contigua a la secuencia codificante, siempre que opere para dirigir su expresión. Por tanto, entre la secuencia promotora y la secuencia codificante, por ejemplo, pueden estar presentes secuencias intermedio transcritas aunque no traducidas y la secuencia promotora puede aún considerarse unida operativamente a la secuencia codificante.

El término “promotor” incluye cualquier secuencia de ácido nucleico que es suficiente para dirigir la transcripción en una célula eucariota, incluyendo promotores inducibles, promotores represores y promotores constitutivos. Típicamente un promotor incluye elementos que son suficientes para hacer que la expresión del gen, dependiente del promotor, sea controlable de una manera específica del tipo de célula, específica de tejido o específica temporal o inducible por señales o agentes externos. Dichos elementos pueden localizarse en los extremos 5' ó 3' o en regiones de secuencia intrónicas de un gen particular. Habitualmente, la expresión del gen será constitutiva, aunque si se desea, en la presente invención, también pueden emplearse promotores regulables. Son ejemplos de promotores regulables adecuados las secuencias del represor de Tet, ecdisona y lac. El gen de expresión también puede controlarse por regulación de la transcripción usando calor, luz o metales, tales como mediante el uso de genes de metalotionina o genes de choque térmico. Los expertos habituales en la materia apreciarán que en un uso comercial de la presente invención, es deseable usar promotores no inducibles, no regulables, tales como, por ejemplo, el gen de la beta globina, CMV, ubitiquina y alfa SR.

Los promotores, para su uso en la presente invención, incluyen promotores virales, de mamíferos y de levaduras, por ejemplo, el promotor de la beta globina murina, el promotor de ubiquitina, el promotor del polioma, el promotor del CMV de mamíferos, la alcohol oxidasa de levaduras, el promotor de fosfoglicerocinasa, los promotores inducibles de lactosa, el promotor de galactosidasa, el promotor viral adeno-asociado, el promotor de poxvirus, los promotores retrovirales, el promotor del virus del sarcoma de Rous, los promotores de adenovirus, el promotor del SV40, el promotor de la hidroximetilglutaril coenzima A, el promotor de la timidina quinasa o los promotores del poxvirus H5R, el promotor tardío de adenovirus de tipo 2MPC, el promotor alfa-antitripsina, el promotor fox IX, el

promotor de inmunoglobulina, el promotor tensioactivo CFTR, el promotor de albúmina y promotor de transferrina. Un promotor seleccionado para su uso con ácidos nucleicos y vectores de expresión de la presente invención puede proporcionar (1) altos niveles de expresión, por ejemplo, dirigiendo la expresión del GDI, o (2) niveles disminuidos de expresión (después de atenuación por modificación), por ejemplo, dirigiendo la expresión del gen marcador de selección. Preferentemente, el promotor que dirige el GDI es un promotor fuerte, por ejemplo, promotores de ubiquitina, de CMV y de alfa SR, para aumentar la expresión y promover el corte y empalme correcto del producto de interés. En una realización, el gen marcador de selección está bajo el control del promotor del gen de la beta globina murina y el GDI está bajo el control del promotor de alfa SR (Takebe y col., 1988, *Molecular and Cellular Biology* 8: 466) o del promotor de la ubiquitina C humana (Nenoi y col., 1996, *Gene* 175: 179).

En la presente invención, se modifica un promotor usado para dirigir la expresión de un gen marcador de selección, de manera que uno o más elementos reguladores transcripcionales se alteran, es decir, la capacidad de uno o más elementos para dirigir la expresión de un gen unido operativamente se atenúa en comparación con un promotor que no está modificado. Un "elemento regulador transcripcional" es cualquier secuencia de ácido nucleico que codifique un sitio de unión a factores de transcripción o elemento potenciador dentro de un promotor implicado en la expresión de un gen marcador de selección unido operativamente, pero excluye el sitio de unión de la caja TATA o de ARN polimerasa II similar, es decir, en la presente invención, la secuencia de la caja TATA no se modifica. En la materia se conocen bien sitios de unión a factores de transcripción y elementos potenciadores dentro de promotores (véase, por ejemplo, Lemon & Tijan, 1999, *Genes Dev*, 14: 15; *Molecular Biology of the Cell*, 2002, 4th ed. B. Alberts y col. (eds), Garland Science). Un ácido nucleico regulador usado en la presente invención, que tiene su región promotora modificada, que da como resultado un promotor atenuado, se denomina en el presente documento "ácido nucleico regulador transcripcionalmente defectuoso". En la presente invención, el ácido nucleico regulador transcripcionalmente defectuoso consiste en la secuencia expuesta en la SEC ID N°: 4 (como se muestra en la Figura 2).

El promotor que dirige el gen marcador de selección se basa en el promotor principal de la beta globina murina bien caracterizado (Berg y col., 1983, *Mol. and Cell Biology* 3: 1246; Ward y col., 1990, *J Biological Chemistry* 265: 3030; Stuve y col., 1990, *Mol. and Cell Biology* 10:972; Patente de Estados Unidos N° 5.733.779; y Patente de Estados Unidos N° 6.042.835). Este promotor particular requiere un potenciador para ser activo en células no eritroides. En transfectantes de células de ovario de hámster chino (CHO), se observa que la fuerza del promotor de la beta globina murina depende de su proximidad a fuertes potenciadores sobre el mismo vector de ADN (Reff, M.E. y Pfarr, D.S. In: *Gene Amplification in Mammalian Cells* R.E. Kellems (ed.), Marcel Dekker, Inc. 355, 1992). Los elementos reguladores transcripcionales dentro del promotor de la beta globina murina, que son importantes para la activación del promotor, que incluyen, por ejemplo, los elementos de las cajas CACCC y CCAAT, se han identificado y caracterizado (Lemon y Tijan, 1999, *Genes Dev*. 14: 15; Mantovani, 1999, *Gene* 239: 15; *Molecular Biology of the Cell*, 2002, 4ª ed. B. Alberts y col. (eds), Garland Science). En otra realización particular, el vector de expresión se modifica genéticamente para codificar adicionalmente al marcador amplificable de dihidrofolato reductasa (dhfr) murino, que permite niveles de expresión del GDI más altos por amplificación de genes en transfectantes que responden al tratamiento con metotrexato (MTX).

El promotor atenuado usado en la presente invención es transcripcionalmente defectuoso modificando uno o dos sitios de unión a factores de transcripción (SUFC), de manera que un factor de transcripción se une débilmente, es decir, a un menor grado en comparación con un promotor de otra manera equivalente no modificado. Un promotor atenuado de acuerdo con la presente invención produce la expresión disminuida del gen marcador seleccionado unido operativamente a este.

Típicamente, los genes (por ejemplo, marcadores de selección y los GDI) se intercalan entre el promotor y un sitio de poliadenilación. La secuencia poli A usada puede ser del gen de interés (es decir, puede usarse la secuencia poli A nativa) o puede usarse una secuencia poli A heteróloga (es decir, de un gen diferente al GDI), por ejemplo, poliA de la hormona de crecimiento bovino (HCB) y poliA del SV40. Un ARNm se transcribe a partir de los promotores y se estabiliza por las señales de poliadenilación localizadas en el extremo 3' con respecto a las regiones codificantes. Las señales de poli A se conocen bien en la materia y pueden seleccionarse basándose en su idoneidad para usar con los vectores y las células huéspedes que se emplean en la presente invención. Los ejemplos de señales de poli A que pueden usarse incluyen poli A de la HCB, poli A del SV40, poli A de la beta actina humana, poli A de la beta globina de conejo, poliA de la cadena kappa de inmunoglobulina

Vectores de expresión

Los componentes de los sistemas de expresión de la presente invención, mencionados anteriormente, es decir, gen marcador de selección, GDI y secuencias reguladoras apropiadas, pueden incorporarse en varios vectores estructurales adecuados para facilitar la manipulación de los vectores de expresión y de las construcciones. Además, la incorporación de los componentes en un vector que contiene medios que permiten la replicación en un microorganismo facilita en gran medida la propagación y aislamiento de las construcciones (es decir, la creación de vectores lanzadera). Las expresiones "vector" y "vector de expresión" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a cualquier ácido nucleico, preferentemente ADN, que contiene (1) un gen marcador de selección unido operativamente a un ácido nucleico regulador que contiene el promotor atenuado y (2) un sitio de inserción para introducir un GDI unido operativamente a un ácido nucleico regulador. Por tanto, en una realización

particular de la presente invención, en la que el vector contiene un gen marcador de selección y un GDI, los dos genes se consideran conjuntamente unidos. Como se usa en el presente documento, la expresión “conjuntamente unidos”, y variaciones gramaticales de la misma, se refieren a dos ácidos nucleicos distintos, típicamente genes, que residen en el mismo vector en un tramo continuo de ADN (aunque puede haber ADN intermedio entre las dos secuencias de ADN unidas conjuntamente en el vector).

Los vectores usados en la presente invención incluyen cualquier construcción de ácido nucleico capaz de dirigir la expresión de un GDI y que puede transferir secuencias de genes a células diana y por lo tanto incluyen un promotor, que está unido operativamente al gen para el cual se desea la expresión. Además de los componentes del vector que pueden necesitarse para la expresión de un gen, los vectores también pueden incluir un origen de replicación bacteriano, un marcador de selección adicional o genes amplificables, una secuencia de señal que permita que el vector exista como ADN monocatenario (por ejemplo, origen de replicación de M13), un sitio de clonación múltiple, y un origen de replicación de mamífero (por ejemplo, un origen de replicación del SV40 o de adenovirus). Las estructuras de vectores se analizan con mayor detalle más adelante. Los vectores son capaces de transferir secuencias génicas a células diana (por ejemplo, vectores virales, vectores no virales, transportadores de partículas y liposomas). Los vectores pueden ser de cualquier tipo incluyendo de clonación, de expresión y de cualquier fuente incluyendo viral. En una realización, el vector es un vector expresión de mamífero.

Típicamente, un vector de expresión incluye uno o más elementos para medios de replicación, por ejemplo, origen de replicación, que pueden ser episómicos o cromosómicos. Preferentemente, la secuencia de replicación hace que el vector sea capaz de ambos medios, de tal manera que el vector es capaz de auto-replicación como una unidad extracromosómica y de integración en el cromosoma, bien debido a la presencia de una secuencia que puede translocarse, tal como una secuencia de inserción o trasposón, debido a homología sustancial con una secuencia presente en el cromosoma o debido a sucesos recombinacionales no homólogos. La secuencia de replicación o replicón será una reconocida por el huésped transformado y deriva de cualquier fuente conveniente, tal como de un plásmido, virus, célula huésped, por ejemplo, un segmento de replicación autónomo, en sí mismo, o junto con un centrómero o similar. La secuencia de replicación particular no es crítica para el objeto de la invención y pueden emplearse diversas secuencias. Puede emplearse, convenientemente, una secuencia de replicación de un virus.

Los vectores de expresión y procedimientos para su preparación se conocen bien en la materia (véase, por ejemplo, Maniatis y col., citado anteriormente) o pueden obtenerse a través de proveedores comerciales, por ejemplo, Invitrogen (Carlsbad, CA), Promega (Madison, WI), y Stratagene (La Jolla, CA) y modificarse si fuera necesario. Los ejemplos de vectores de expresión disponibles en el mercado incluyen pcDNA3 (Invitrogen) y pCMV-Script (Stratagene). Los componentes vectoriales, ácidos nucleicos reguladores, genes marcadores de selección, marcadores amplificables y GDI se encuentran típicamente disponibles a partir de una fuente comercial o pueden aislarse a partir de una fuente natural (por ejemplo, de tejidos de animales o de microorganismos) o prepararse usando un medio sintético, tales como PCR. La disposición de los componentes puede ser cualquier disposición prácticamente deseada por un experto habitual en la materia.

Los vectores usados en la presente invención pueden derivar de genomas virales que producen viriones o partículas similares a virus, que pueden o no replicarse independientemente como elementos extracromosómicos. Las partículas de viriones que contienen el ADN para el locus de alta expresión pueden introducirse en las células huéspedes por infección. El vector viral puede llegar a integrarse en el genoma celular. Son ejemplos de vectores virales para la transformación de células de mamíferos los vectores del SV40 y los vectores basados en papilomavirus, adenovirus, virus de Epstein-Barr, virus de vacunas y retrovirus, tales como virus del sarcoma de Rous o un virus de leucemia de ratón, tal como el virus de la leucemia murina de Moloney. Para las células de mamíferos, puede usarse la electroporación o introducción mediada por virus.

En la Figura 4 se describe un ejemplo de un vector de expresión usado en la presente invención. Éste puede usarse para expresar las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo. Una región variable de la cadena ligera (es decir, un primer gen de interés) puede insertarse en el sitio de restricción BglIII/BsiWI. Una región variable de la cadena pesada (es decir, un segundo gen de interés) puede insertarse en el sitio de restricción NheI/NotI. Un experto habitual en la materia podría modificar el vector de expresión representado en la Figura 4 para expresar otros genes de interés eliminando las regiones constantes kappa y gamma 1, que son secuencias útiles para generar cadenas de anticuerpos. Los ácidos nucleicos reguladores, por ejemplo, poli A de kappa, también pueden cambiarse para satisfacer las necesidades de los profesionales.

Células huéspedes y preparación

En la presente invención, como célula huésped, puede usarse cualquier tipo de célula capaz de la expresión de genes mediante un ácido nucleico o un vector de expresión. La expresión “células huéspedes” se refiere a células que se han transformado con un vector construido usando técnicas de ADN recombinante y codificando al menos un gen heterólogo, es decir, el gen marcador de selección unido operativamente a un promotor atenuado. En una realización, la célula huésped es sensible a antibióticos aminoglucósidos, tal como G418 y es capaz de hospedar genes de resistencia a kanamicina o neomicina para la expresión en el interior de, por ejemplo, células HeLa, células CV-1, células de CHO, células 3T3, células L o células TC7.

Los expertos en la materia pueden seleccionar una línea celular huésped particular que se ajuste mejor a la expresión del GDI y genes marcadores de selección mediante un vector de la presente invención. Las células que pueden emplearse en la presente invención incluyen células de mamíferos y de levaduras (por ejemplo, *Sacchromyces cerevisiae*), y líneas celulares y cultivos celulares derivados de estas. Las células de mamíferos, por ejemplo, células germinales o células somáticas, pueden derivar de mamíferos, tales como de ratones, ratas u otros roedores, o de primates, tales como seres humanos o monos. Se entenderá que, en la realización de las técnicas de la presente invención pueden emplearse cultivos celulares primarios o células inmortalizadas.

En realizaciones particulares, el tipo de célula es de origen mamífero o de levadura, incluyendo, aunque sin limitación, células de ovario de hámster chino (CHO) (por ejemplo, DG44 y DUXB11; Urlaub y col., Som. Cell Molec. Genet. 12: 555, 1986; Haynes y col., Nuc. Acid. Res. 11: 687-706, 1983; Lau y col., Mol. Cell. Biol. 4: 1469-1475, 1984; Methods in Enzymology, 1991, vol. 185, pags. 537-566. Academic Press, Inc., San Diego, CA), fibroblastos de hámster de chino (por ejemplo, R1610), carcinoma cervical humano (por ejemplo, HELA), línea renal de mono (por ejemplo, CV1 y COS), fibroblastos murinos (por ejemplo, BALBc/3T3), mieloma murino (P3x63-Ag3.653; NS0; SP2/O), línea renal de hámster (por ejemplo, HAK), células L murinas (por ejemplo, L-929), linfocitos humanos (por ejemplo, RAJI), riñón humano (por ejemplo, 293 y 293T), huésped de levadura (por ejemplo, como se describe en RE 35749; US 5.629.203; Gellissen y col., Antonie Van Leeuwenhoek 62: 79-93 (1992); Romanos y col., Yeast 8: 423-488 (1992); Goeddel, Methods in Enzymology 185 (1990); Guthrie y Fink, Methods in Enzymology 194 (1991). Las líneas celulares huéspedes se encuentran típicamente disponibles en el mercado (por ejemplo, de BD Biosciences, Lexington, KY; Promega, Madison, WI; Life Technologies, Gaithersburg, MD) o en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Manassas, VA).

Los ácidos nucleicos y vectores de expresión pueden introducirse o transformarse en una célula huésped apropiada por diversas técnicas bien conocidas en la materia (véase, por ejemplo, Ridgway, 1973, Vectors: Mammalian Expression Vectors, Capítulo 24.2, págs. 470-472, Rodríguez y Denhardt eds., Butterworths, Boston, MA; Graham y col., 1973, Virology 52: 456; Sambrook y col., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, Nueva York; Davis y col., 1986, Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier; y Chu y col., 1981, Gene 13: 197). Los términos "transformación" y "transfección" y sus variaciones gramaticales, se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a la captación de ADN extraño por una célula mediante cualquier medio posible. Una célula se ha "transformado" cuando un ácido nucleico exógeno se ha introducido dentro de la membrana celular. La captación de ácido nucleico da como resultado un transfectante estable, independientemente del medio mediante el cual se consiga la captación, que puede incluir la transfección (incluyendo electroporación), fusión de protoplastos, precipitación con fosfato de calcio, fusión celular con ADN envuelto, microinyección e infección con virus intactos. Incluso la expresión transitoria a niveles más altos de los normales es útil para realizar estudios funcionales o para la producción y recuperación de proteínas de interés. Las células transformadas se cultivan en condiciones apropiadas para la producción del GDI (es decir, anticuerpo de cadenas pesada y/o ligera) y se realizan ensayos para identificar el polipéptido de interés codificado. Las técnicas de ensayo ejemplares para identificar y cuantificar productos génicos incluyen ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) o análisis de separación de células activadas por fluorescencia (FACS), inmunohistoquímica y similares.

En la presente invención, se prefiere que se produzca la transformación permanente (es decir, estable) de un ácido nucleico o vector de la invención. Esto ocurre junto con la integración de ADN transformante en el genoma celular por recombinación. La transformación insercional, que da como resultado la alta expresión del locus que va a etiquetarse, normalmente tiene lugar por recombinación no homóloga de la construcción de ADN que contiene la etiqueta en una posición genómica al azar, aunque se entenderá que puede producirse la recombinación homóloga.

Las células transformadas obtenidas mediante el procedimiento de la presente invención pueden emplearse para la preparación de líneas celulares continuas en las que las células son esencialmente inmortales o para la preparación de líneas celulares establecidas que tienen el potencial de subcultivarse *in vitro*. Las líneas celulares continuas y las líneas celulares establecidas pueden obtenerse a partir de diversos organismos y órganos, tales como embriones de roedores; riñones de primates; tumores de roedores y de seres humanos; y fibroblastos, células epiteliales o linfoides. Si se desea, las células que presentan los niveles de expresión más altos pueden clonarse.

Las células usadas en la presente invención pueden cultivarse de acuerdo con técnicas de cultivo celular convencionales, por ejemplo, pueden fijarse a una superficie sólida o cultivarse en suspensión en medios nutritivos apropiados.

El término "recombinante", como se usa en el presente documento para describir una molécula de ácido nucleico, significa un polinucleótido de ADNc, genómico, semisintético o de origen sintético, que en virtud de su origen o manipulación (1) no está asociado con todo o una parte del polinucleótido al cual está asociado en la naturaleza y/o (2) está unido a un polinucleótido distinto al cual está unido en la naturaleza. El término "recombinante", como se usa en el presente documento para describir una proteína o polipéptido, significa un polipéptido producido por la expresión de un polinucleótido recombinante. El término "recombinante", como se usa en el presente documento en referencia a células, significa células que pueden ser o que se han usado como receptoras para vectores recombinantes u otro ADN transferente, e incluyen progenie de la célula original que se ha transfectado. Deberá entenderse que la progenie de una sola célula parental puede no ser completamente idéntica en cuanto a morfología o genómica o complementaria con el ADN total con respecto al parental original, debido a mutación accidental o

deliberada. La progenie de una célula parental, que es suficientemente similar a la del parental, se caracteriza por una propiedad relevante, de manera que la presencia de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido deseado también se considera progenie.

Ejemplos

5 *Ejemplo 1: Construcción de pAGE2 (plásmido para la expresión de AntiGen 2)*

Se construyó un vector pAGE2 a partir de una estructura del vector pcDNA3.1 (+) (Invitrogen nº V790-20) sustituyendo el promotor SV40 que dirige la expresión del marcador de selección de la neomicina fosfotransferasa (neo) con el promotor principal de la beta globina murina ((Berg y col., 1983, Molecular and Cellular Biology 3: 1246 y Ward y col., 1990, J. Biol. Chem. 265: 3030). Además, se insertó un casete de expresión que contenía un
10 marcador amplificable de la dihidrofolato reductasa (DHFR) murina (Nunberg y col., 1980, Cell 19: 355) aguas arriba del casete neo.

La región insertada en la estructura del vector para crear pAGE2 fue un ADN derivado de productos amplificados por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ensamblados que consistían en un promotor de la beta globina murina 5' → 3', una región que codifica la DHFR murina, una región de poliadenilación del SV40 (poliA) y un segundo
15 promotor de la beta globina murina. Los moldes para la amplificación por PCR de los promotores de la beta globina, de la región codificante de la DHFR y de la poli A del SV40 derivaron, respectivamente, de ADN genómico de Medarex Human Mouse® (véase la Fig. 2., Fishwild y col., 1996, Nature Biotechnology 14:845), de ADNc de la línea celular P3X63Ag8.653 (ATCC nº CRL-1580) y de ADN del vector de estructura vectorial. Como alternativa, esta región podría haberse generado mediante otras técnicas de biología molecular convencionales, incluyendo
20 ensamblaje de ADN sintético. La digestión de la estructura del vector se realizó en sitios exclusivos de enzimas de restricción Avr II y Bsa BI y la región de 69 pares de bases (pb) entre estos sitios se sustituyó por el inserto de ADN ensamblado. Adicionalmente, los nucleótidos en las posiciones -2 y -3, con respecto al codón de inicio ATG de la secuencia Kozak de neo, se modificaron de CG a TC. Un análisis de los ARNm de 699 vertebrados mostró que la secuencia TC es menos frecuente que la secuencia CG en las posiciones -2 y -3 (M. Kozak, 1987, Nuc. Acids Res.
25 15: 8125), pero estos dos motivos Kozak contienen pirimidinas en la posición -3 son iniciadores de traducción atenuados.

Por tanto, después de la inserción de los productos de la PCR ensamblados, el vector pAGE2 resultante contenía los siguientes elementos: un gen de resistencia de ampicilina, un promotor viral aguas arriba de un sitio de clonación múltiple seguido de una secuencia poli A (para permitir la inserción de un gen de interés a expresar), un ori f1, un
30 promotor principal de la beta globina murina unido operativamente al gen de la DHFR seguido de una secuencia de poli A del SV40 unida operativamente y un segundo promotor principal de la beta globina murina unido operativamente a un gen de neomicina seguido de una secuencia de poli A del SV40 unida operativamente. La secuencia explicada de la región insertada se muestra en las Figuras 1A-1B (SEC. ID Nº: 1).

Ejemplo 2: Construcción de pAGE8 y pAGE9 con fines comparativos

Para atenuar al promotor de la beta globina murina que dirige la expresión del gen marcador de selección neo, se eliminaron elementos reguladores transcripcionales dentro del promotor. El vector pAGE8 se construyó a partir del vector pAGE2 eliminando 199 pb del promotor de la beta globina entre los sitios de enzimas de restricción Rsa I y Ms1 I (véase la Fig. 2). El vector pAGE9 se construyó a partir de pAGE2 eliminando 129 pb inmediatamente aguas
40 abajo a partir del sitio de escisión de la enzima de restricción Rsa I en el promotor de la beta globina. En la Figura 2 se muestran las secuencias del promotor principal de la beta globina murina pAGE2 (SEC ID Nº: 2) y los promotores principales de la beta globina murina modificados pAGE8 y pAGE9 (SEC ID Nº: 3 y 4). El promotor de la beta globina del vector pAGE8 carece de los dos elementos CCAT y TATA, y el promotor de la beta globina del vector pAGE9 carece del elemento CCAAT pero conserva el elemento TATA.

Ejemplo 3: Subclonación de un gen de interés en los vectores de expresión pAGE2, pAGE8 y pAGE9

Se amplificó por PCR una secuencia de ADN que codifica un gen de interés (GDI), que codifica una proteína secretada de 165 aminoácidos, y se subclonó en pAGE2, pAGE8 y pAGE9 en los sitios Hind III y Xho I en cada sitio de clonación múltiple del vector. Las construcciones del GDI en pAGE2, pAGE8 y pAGE9 tenían secuencias idénticas excepto por las modificaciones realizadas en los promotores de la beta globina que dirigen la expresión de
45 neo.

50 *Ejemplo 4: Transfección de células huéspedes con construcciones de vectores de ensayo del GDI en pAGE2, pAGE8 y pAGE9*

Como células huéspedes para expresar el GDI a partir de las construcciones pAGE, se usó la línea celular DG44 de ovario de hámster chino CHO (Urlaub y col., Som. Cell Molec. Genet. 12: 555, 1986), que no tiene actividad DHFR. Las células DG44 de CHO se adaptaron al cultivo en suspensión en medio de cultivo (CHO SSFMI; Invitrogen nº 31033-020) complementado con HAT (hipoxantina 100 µM, timidina 16 µM; Invitrogen nº 11067-030).
55

Las construcciones pAGE2, pAGE8 y pAGE9 que contenían el GDI se linealizaron por digestión con la enzima de

restricción Bgl II. Los ADN se precipitaron con etanol y se resuspendieron en Tris 7.6 10 mM, EDTA 1 mM.

Las células CHO se prepararon por transfección lavando las células en una solución tamponada con sacarosa (SBS) y se resuspendieron a 1×10^7 células/ml de solución SBS. Las células (400 μ l) se mezclaron con los ADN de la construcción pAGE y se electroporaron (cuatro electroporaciones usando ADN 0,5 μ g y 3 electroporaciones usando ADN 2 μ g por electroporación para cada construcción) a 230 voltios, 400 microfaradai de capacitancia y 13 ohms de resistencia (manipulador electrocelular BTX de Molecular Delivery Systems n° 600; San Diego, CA). Las células se eliminaron de los tubos por electroporación, se añadieron 20 ml de medio de cultivo y se sembraron en placas en un disco de 96 pocillos usando 200 μ l de células por pocillo (aproximadamente 4×10^4 células/pocillo). Dos días después de la electroporación, se retiraron 140 μ l de medio de cada pocillo y se sustituyó por medio de selección 150 μ l [medio de cultivo con 400 μ g/ml de G418 (Invitrogen n° 10131-035)]. Cada tres a siete días, se sustituyeron 150 μ l de medio de selección por pocillo por medio de selección reciente. Durante 34 días, después de la electroporación, se realizó el recuento del número de pocillos por placa que poseían colonias de células viables

Como se observa en la Tabla I, las siete electroporaciones de la construcción del GDI en pAGE2 dieron como resultado 118 colonias viables y las electroporaciones de la construcción del GDI en pAGE8 y pAGE9 dieron como resultado, respectivamente, 0 y 1 colonia viable. Estos datos indican que pocas células sobreviven a la selección con G418 a partir de electroporaciones usando las construcciones pAGE8 y pAGE9 que contienen promotores modificados para atenuar la expresión del gen marcador de selección neo, en comparación con las electroporaciones realizadas usando la construcción pAGE2, que tiene un promotor no modificado que dirige la expresión de neo.

20

Tabla I

Vector	Placa n°	ADN (μ g)	n° colonias/placa	n° total de colonias por vector
pAGE2	1	0,5	1	118
	2	0,5	16	
	3	0,5	3	
	4	0,5	5	
	5	2	30	
	6	2	29	
	7	2	34	
pAGE8	8	0,5	0	0
	9	0,5	0	
	10	0,5	0	
	11	0,5	0	
	12	2	0	
	13	2	0	
	14	2	0,50	
pAGE9	15	0,5	0	1
	16	0,5	0	
	17	0,5	0	
	18	0,5	0	
	19	2	1	
	20	2	0	
	21	2	0	

Para obtener colonias viables a partir de electroporaciones del GDI en pAGE8 y pAGE9, se aumentó la concentración de ADN por electroporación (a las cantidades mostradas en la Tabla II siguiente) y se electroporaron células CHO, como se ha descrito anteriormente para el GDI. Las electroporaciones produjeron, respectivamente, 251, 38 y 287 colonias viables para las construcciones pAGE2, pAGE8 y pAGE9 (véase la Tabla II).

5

Tabla II

Vector	Placa nº	ADN (µg)	nº colonias/placa	nº total de colonias por vector
pAGE2	1	1	88	251
	2	1	48	
	3	1	37	
	4	2	42	
	5	2	22	
	6	2	14	
pAGE8	7	60	12	38
	8	60	11	
	9	80	7	
	10	80	0	
	11	80	8	
pAGE9	12	40	26	287
	13	40	34	
	14	40	51	
	15	60	22	
	16	60	21	
	17	60	26	
	18	80	32	
	19	80	46	
	20	80	29	

10

15

Quando en los pocillos las colonias viables tenían aproximadamente una confluencia del veinte al cuarenta por ciento, se midieron las concentraciones en los sobrenadantes del cultivo de la proteína codificada por el GDI mediante ELISA los días 22, 27, 32, 36, 41 y 47 después de la electroporación. La Figura 3 muestra un histograma que compara el número de colonias obtenidas para cada construcción con sus niveles de expresión de proteína. Las células electroporadas con pAGE8 produjeron solamente 38 colonias viables que tenían bajos niveles de expresión de proteína. Las células electroporadas con la construcción pAGE2 produjeron 245/251 (98%) colonias con niveles de expresión del GDI por debajo de 500 ng/ml y solamente 1/251 (0,3%) colonias con niveles de expresión del GDI por encima de 1000 ng/ml. Por otro lado, las células electroporadas con la construcción pAGE9 produjeron 254/287 (88%) colonias con niveles de expresión por debajo de 500 ng/ml y 10/287 (3%) colonias con niveles de expresión por encima de 1000 ng/ml. Por tanto, la construcción pAGE9, que contenía modificaciones en el promotor de la beta globina murina, que dirige la expresión del marcador de selección neo, consiguió el mayor porcentaje de colonias transfectantes que producían a los niveles más altos la expresión de la proteína del GDI.

Ejemplo 5: Construcción de pIE (plásmido para la expresión de inmunoglobulina)

20

Se construyó una segunda serie de vectores (denominada pIE) para la expresión de anticuerpos recombinantes utilizando el vector pAGE9, que contenía el promotor de la beta globina modificado, para aumentar el número de clones transfectantes que producen altos niveles de anticuerpo. Este vector consistía en la estructura del vector pAGE9 modificada para contener dos casetes de expresión distintos para las proteínas de la cadena ligera y pesada

del anticuerpo. En la Figura 4 se muestra un vector pIE representativo. Los expertos habituales en la materia apreciarán que el vector pIE puede modificarse para expresar cualquiera de los dos genes de interés, es decir, subunidades de un complejo de receptor u otra proteína.

5 El casete de expresión de cadena ligera se creó modificando el casete de expresión de la proteína del vector pAGE. La región poliA original en el casete de expresión de la proteína entre los sitios Bbs I y Xba I se sustituyó por una región poliA de kappa humana (Hieter y col., Cell 22: 197, 1980). El sitio de reconocimiento de Bgl II aguas arriba del promotor del casete de expresión de la proteína se destruyó por digestión del plásmido con Bgl II seguido por tratamiento con Klenow. Se amplificó una región constante de kappa humana por PCR a partir de un molde de región constante de kappa sintético utilizando cebadores que añadieron un sitio Xba I en el extremo 3' después del
10 codón de terminación traduccional y los sitios Avr II, Bgl II, Pme I, Hind III, y Kpn I en 5' y un sitio BsiW I que codifica los dos primeros codones de la región constante kappa. Este fragmento PCR que contenía la región constante kappa y los sitios de clonación de enzimas de restricción se digirieron con Avr II y Xba I y se subclonaron en los sitios Nhe I y Xba I en el sitio de clonación múltiple del casete de expresión de la proteína del vector pAGE. Para dirigir la expresión de la cadena ligera, un fuerte promotor, tal como el promotor de la ubitiquina C humana (U) (Neno y col., Gene 175: 79, 1996) o el promotor SR α con la unión de corte y empalme de la región (SR) tardía del SV40 (Takebe y col., Molecular and Cellular Biology 8: 466, 1988) se insertó entre los sitios Nru I y Bgl II. Para la expresión de las cadenas ligeras recombinantes, los ADNc de la región variable kappa del anticuerpo, incluyendo las secuencias de señal y las secuencias de Kozak óptimas, se subclonaron en marco con la región constante kappa en los sitios de reconocimiento de Bgl II y BsiW I.

20 Se creó un casete de expresión de cadena pesada en el sitio Pci I único aguas abajo del casete de expresión de neo. El molde de poliA de kappa humano se amplificó por PCR usando cebadores que añadieron los sitios Pci I, Not I, Xho I, sitios Nhe I y BamH I en el extremo 5' y un sitio Nco I en 3'. El producto de la PCR amplificado se digirió con las enzimas de restricción Pci I y Nco I y se clonó en el sitio Pci I del vector pAGE9. En los sitios Nhe I y BamH I del vector, se subclonó un ADNc de gamma1 humana, que contenía un sitio de reconocimiento Nhe I en 5' que codifica los dos primeros codones de la región constante gamma1 y un sitio BamH I en 3' a continuación del codón de terminación traduccional. En los sitios Pci I y Not I del vector, se clonó un promotor de ubiquitina C humana o SR α . Para la expresión de las cadenas pesadas recombinantes, se subclonaron los ADNc de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo, incluyendo las secuencias de señal y las secuencias de Kozak óptimas, típicamente en los sitios de reconocimiento Not I y Nhe I y en marco con la región constante gamma. Véase, por ejemplo, la
25 Figura 4.

Se construyó una serie de vectores pIE en la que los promotores en los casetes de la cadena ligera y pesada variaban (bien ubiquitina, de manera abreviada indicada con la letra U o bien SR α , de manera abreviada indicada con las letras SR) y la región constante de la cadena pesada gamma1 se sustituyó por una región constante gamma4 o por diversos alotipos gamma1, incluyendo z, f y fa (WHO, J. Immunogenetics 3: 357, 1976). Por tanto, la serie del vector pIE incluyó los siguientes vectores: pIE-U γ 1z, pIE-U γ 1f, pIE-U γ 1fa, pIE-U γ 4, pIESR γ 1z, pIE-SR γ 1f, pIE-SR γ 1fa y pIE-SR γ 4. La nomenclatura de los vectores representa la estructura del vector pIE, el promotor que dirige la expresión de la cadena pesada y ligera y el isotipo y alotipo de la región constante de la cadena pesada.
35

Ejemplo 6: Expresión de anticuerpos recombinantes por transfectantes de células CHO

40 Los ADNc de la región variable de la cadena pesada y ligera del anticuerpo, derivados de hibridomas que producían anticuerpos monoclonales completamente humanos, se subclonaron en los casetes de expresión de la cadena pesada y ligera de los vectores pIE, como se ha descrito anteriormente. Las construcciones de anticuerpo pIE se usaron para transfectar células huéspedes DG44 de CHO usando el protocolo descrito anteriormente para la construcción del GDI de ensayo en pAGE9. La transfección del GDI con las construcciones pIE dieron como resultado un porcentaje sustancial de las colonias productoras de anticuerpos altos niveles, que fue similar a los
45 resultados conseguidos usando el antígeno de ensayo pAGE9. La Figura 5 muestra un histograma que compara el número de colonias de 96 pocillos que expresan diversos niveles del anticuerpo monoclonal mAb1 representativo, medido por ELISA. En la etapa de 96 pocillos, 20/322 (6%) de las colonias produjeron anticuerpo por encima de 1000 ng/ml.

50 Se usaron seis construcciones de anticuerpo pIE para transfectar células CHO. Se exploraron menos de un centenar de colonias de 96 pocillos por construcción para la producción de niveles de IgG y para cada construcción, las colonias productoras de las mayores cantidades de anticuerpos se expandieron en matraces rotativos y se midió su productividad específica. Mediante análisis de transferencia de Western se determinó la cantidad de sitios de integración de la construcción. Aunque los clones transfectantes tuvieron pequeñas cantidades de sitios de integración, produjeron niveles de IgG de hasta 14 pg/célula/día. Por tanto, el alto nivel de expresión de anticuerpo
55 de cada uno de los seis transfectantes de las construcciones pIE no se asoció con un alto número de copias de la construcción integrada en muchos de sitios de inserción en los cromosomas huéspedes (Tabla III).

Tabla III

Anticuerpo humano	Vector	nº de colonias exploradas	Productividad (pg/cél/día)	nº de sitios de inserción
mAb 1	pIE-U γ 1fa	322	3	1
mAb 1	pIE-U γ 1fa	322	8	5
mAb 2	pIE-SR γ 1fa	952	6	2
mAb 3	pIE-SR γ 1f	61	8	2
mAb 4	pIE-SR γ 1z	643	14	1
mAb 5	pIE-U γ 1f	154	4	1
mAb 6	pIE-U γ 1f	373	8	ND

Ejemplo 7: Amplificación con tratamiento con metotrexato (MTX)

5 En los vectores pAGE y pIE descritos anteriormente, se modificaron, por ingeniería genética, casetes de expresión de DHFR y los vectores se usaron para transfectar células DG44 de CHO. Las células se cultivaron en Medio SSFMII para CHO (Invitrogen nº 31033-020) complementado con MTX, 5, 50 ó 500 nM para inducir la amplificación. Un transfectante particular de fabricación mAb4 tuvo un sitio de integración que contenía la construcción pIE y produjo 8 pg/cél/día antes de la amplificación en MTX 50 nM; después de la amplificación, la producción aumentó el triple junto con un aumento de siete veces en cuanto al número de copias de la construcción. En un transfectante particular de fabricación mAb1, que tuvo un sitio de integración y produjo 3 pg/cél/día de mAb, la amplificación secuencial en MTX, 5, 50 y 500 nM aumentó ocho veces el número de copias génicas y doce veces la productividad.

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un vector de expresión que comprende, (i) un gen marcador de selección unido operativamente a un ácido nucleico regulador que comprende un promotor del gen de la beta globina y (2) uno o más genes de interés unidos operativamente a un segundo ácido nucleico regulador, en el que el promotor de la beta globina comprende la secuencia expuesta en la SEC ID N°:4 (como se muestra en la Figura 2) y en el que uno o más genes de interés codifican una cadena pesada de inmunoglobulina y/o una cadena ligera de inmunoglobulina.
2. El vector de expresión de la reivindicación 1, en el que el gen marcador de selección es una neomicina fosfotransferasa.
- 10 3. El vector de expresión de la reivindicación 1, en el que el gen marcador de selección se selecciona de glutamina sintetasa, dihidrofolato reductasa, cloramfenicol acetiltransferasa, higromicina B fosfotransferasa, xantina-guanina fosforibosiltransferasa, histidinol deshidrogenasa, la subunidad β de la triptófano sintasa, blasticidina S desaminasa, zeocina, asparagina sintasa, hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa, timidina quinasa, adenina fosforibosiltransferasa, P-gluco proteína, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, CAD (carbamoil-P-sintetasa, aspartato transcarbamilasa, dihidroorotasa).
- 15 4. El vector de expresión de cualquier reivindicación anterior que adicionalmente comprende un segundo marcador de selección que facilita la selección de células huéspedes que expresan dicho uno o más genes de interés.
5. El vector de expresión de la reivindicación 4, en el que el segundo marcador de selección se selecciona de dihidrofolato reductasa, P-gluco proteína, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa o CAD (carbamoil-P-sintetasa, aspartato transcarbamilasa, dihidroorotasa).
- 20 6. El vector de expresión de cualquier reivindicación anterior, en el que el vector de expresión comprende dos genes de interés.
7. Una célula huésped transfectada con un vector de expresión de cualquier reivindicación anterior.
8. La célula huésped de la reivindicación 7, en la que el vector de expresión se integra establemente en un cromosoma de la célula huésped.
- 25 9. La célula huésped de la reivindicación 7 que es una célula de mamífero.
10. La célula huésped de la reivindicación 7 que es una célula de ovario de hámster chino.
11. Un procedimiento de cultivo de la célula de la reivindicación 7, en condiciones adecuadas de tal manera que se exprese el gen de interés.
- 30 12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que las condiciones adecuadas permiten al vector de expresión integrarse establemente en un cromosoma de la célula.
13. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que las condiciones adecuadas comprenden adicionalmente poner en contacto la célula con un compuesto que selecciona para la expresión del gen marcador de selección.
- 35 14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que el vector de expresión comprende adicionalmente un segundo gen marcador de selección y en el que las condiciones adecuadas comprenden adicionalmente poner en contacto la célula con un compuesto que selecciona para la expresión del segundo gen marcador.
15. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que se recupera la cadena pesada y/o ligera de inmunoglobulina.

Figura 1A (SEC ID N°: 1)

```

AvrII                promotor principal de beta globina murina
-----
1  CCTAGGAGTA GCTTTGCTTC TCAATTTCTT ATTTGCATAA TGAGAAAAAA AGGAAAATTA
-----
61  ATTTTAACAA CCAATTCAGT AGTTGATTGA GCAAATGCGT TGCCAAAAAG GATGCTTTAG
-----
121 AGACAGTGTT CTCTGCACAG ATAAGGACAA ACATTATTCA GAGGGAGTAC CCAGAGCTGA
-----
181 GACTCCTAAG CCAGTGAGTG GCACAGCATC CAGGGAGAAA TATGCTTGTC ATCACCGAAG
-----
241 CCTGATTCCG TAGAGCCACA CCTGCGTAAG GGCCAATCTG CTCACACAGG ATAGAGAGGG
-----
301 CAGGAGCCAG GGCAGAGCAT ATAAGGTGAG GTAGGATCAG TTGCTCCTAC ATTTGCTTCT
-----
                                DHR
-----
361 GACATAGTTG TGTGCGCGC TGTACAACAG CTCAGGGCTG CGATTTCCGG CCAAACCTGA
-----
421 CGGCAATCCT AGCGTGAAGG CTGGTAGGAT TTTATCCCCG CTGCCATCAT GGTTCGACCA
-----
481 TTGAACTGCA TCGTCGCCGT GTCCAAAAAT ATGGGGATTG GCAAGAACGG AGACCTACCC
-----
541 TGGCCTCCGC TCAGGAACGA GTTCAAGTAC TTCAAAGAA TGACCACAAC CTCTTCAGTG
-----
601 GAAGGTAAAC AGAATCTGGT GATTATGGGT AGGAAAACCT GGTCTCCAT TCCTGAGAAG
-----
661 AATCGACCTT TAAAGGACAG AATTAATATA GTTCTCAGTA GAGAACTCAA AGAACCACCA
-----
721 CGAGGAGCTC ATTTTCTTGC CAAAAGTTTG GATGATGCCT TAAGACTTAT TGAACAACCG
-----
781 GAATTGGCAA GTAAAGTAGA CATGGTTTGG ATAGTCGGAG GCAGTTCTGT TTACCAGGAA
-----
841 GCCATGAATC AACCAGGCCA CCTCAGACTC TTTGTGACAA GGATCATGCA GGAATTTGAA
-----
901 AGTGACACGT TTTTCCCAGA AATTGATTTG GGGAAATATA AACTTCTCCC AGAATACCCA
-----
961 GGCCTCCTCT CTGAGGTCCA GGAGGAAAAA GGATCAAGT ATAAGTTGA AGTCTACGAG
-----
1021 AAGAAAGACT AACAGGAAGA TGCTTTCAAG TTCTCTGCTC CCCTCCTAAA GCTATGCATT
-----
                                SV40 pA
-----
1081 TTTATAAGAC CATGGGACTT TTGCTGGCTT TAGAAAGGGC GAATTCAACT TGTTTATTGC
-----
1141 AGCTTATAAT GGTTACAAAT AAAGCAATAG CATCACAAAT TTCACAAATA AAGCATTTF
-----
1201 TTCACTGCAT TCTAGTTGTG GTTTGTCCAA ACTCATCAAT GTATCTTATC ATGTCAGAGT

```

Figura 1B (continuación de la SEC ID N°: 1)

promotor principal de beta globina murina

```
-----  
1261 AGCTTTGCTT CTCAATTTCT TATTTGCATA ATGAGAAAAA AAGGAAAAT AATTTAACA  
-----  
1321 ACCAATTCAG TAGTTGATTG AGCAAATGCG TTGCCAAAAA GGATGCTTTA GAGACAGTGT  
-----  
1381 TCTCTGCACA GATAAGGACA AACATTATTC AGAGGGAGTA CCCAGAGCTG AGACTCCTAA  
-----  
1441 GCCAGTGAGT GGCACAGCAT CCAGGGAGAA ATATGCTTGT CATCACCGAA GCCTGATTCC  
-----  
1501 GTAGAGCCAC ACCCTGGTAA GGGCCAATCT GCTCACACAG GATAGAGAGG GCAGGAGCCA  
-----  
1561 GGCAGAGCA TATAAGGTGA GGTAGGATCA GTTGCTCCTA CATTGCTTC TGACATAGTT  
-----  
1621          neo  
          -----  
GTGGATGGAT CGTTTTCCAT GATT...
```

Figura 2

secuencia del promotor principal de beta globina murina pAGE2 (SEC ID N°: 2)

```

1   AGCTTTGCTT CTCAATTTCT TATTTGCATA ATGAGAAAAA AAGGAAAATT AATTTTAACA ACCAATTCAG
71  TAGTTGATTG AGCAAATGCG TTGCCAAAAA GGATGCTTTA GAGACAGTGT TCTCTGCACA GATAAGGACA

           RsaI
           ~~~~~
141  AACATTATTC AGAGGGAGTA CCCAGAGCTG AGACTCCTAA GCCAGTGAGT GGCACAGCAT CCAGGGAGAA
211  ATATGCTTGT CATCACCGAA GCCTGATTCG GTAGAGCCAC ACCCTGGTAA GGGCCAATCT GCTCACACAG
281  GATAGAGAGG GCAGGAGCCA GGGCAGAGCA TATAAGGTGA GGTAGGATCA GTTGCTCCTA CATTGCTTC

           MslI
           ~~~~~
351  TGACATAGTT GTGGATGGAT CGTT
    
```

secuencia del promotor principal de beta globina murina pAGE8 (SEC ID N°: 3)

```

1   AGCTTTGCTT CTCAATTTCT TATTTGCATA ATGAGAAAAA AAGGAAAATT AATTTTAACA ACCAATTCAG
71  TAGTTGATTG AGCAAATGCG TTGCCAAAAA GGATGCTTTA GAGACAGTGT TCTCTGCACA GATAAGGACA

           Δ199
141  AACATTATTC AGAGGGAGT T TGTGGATGGA TCCTT
    
```

secuencia del promotor principal de beta globina murina pAGE9 (SEC ID N°: 4)

```

1   AGCTTTGCTT CTCAATTTCT TATTTGCATA ATGAGAAAAA AAGGAAAATT AATTTTAACA ACCAATTCAG
71  TAGTTGATTG AGCAAATGCG TTGCCAAAAA GGATGCTTTA GAGACAGTGT TCTCTGCACA GATAAGGACA

           Δ128
141  AACATTATTC AGAGGGAGT A GGGCAGGAGC CAGGGCAGAG CATATAAGGT GAGGTAGGAT CAGTTGCTCC

           MslI
           ~~~~~
211  TACATTTGCT TCTGACATAG TTGTGGATGG ATCGTT
    
```

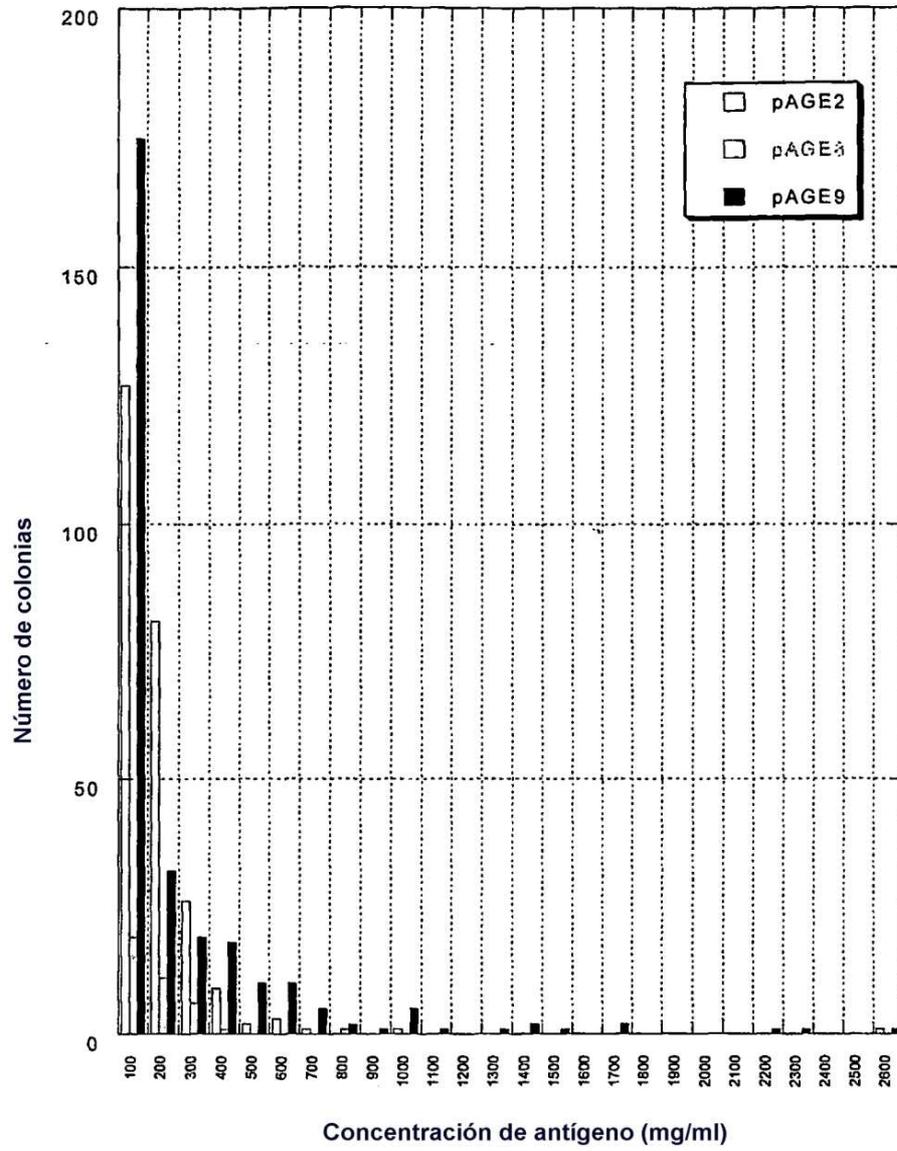
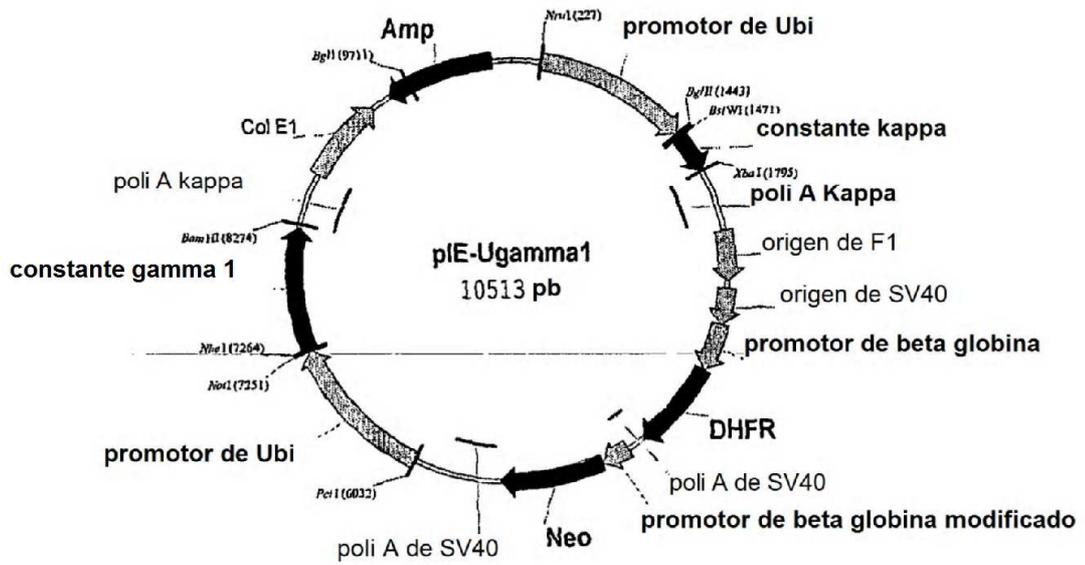


FIGURA 3

Figura 4



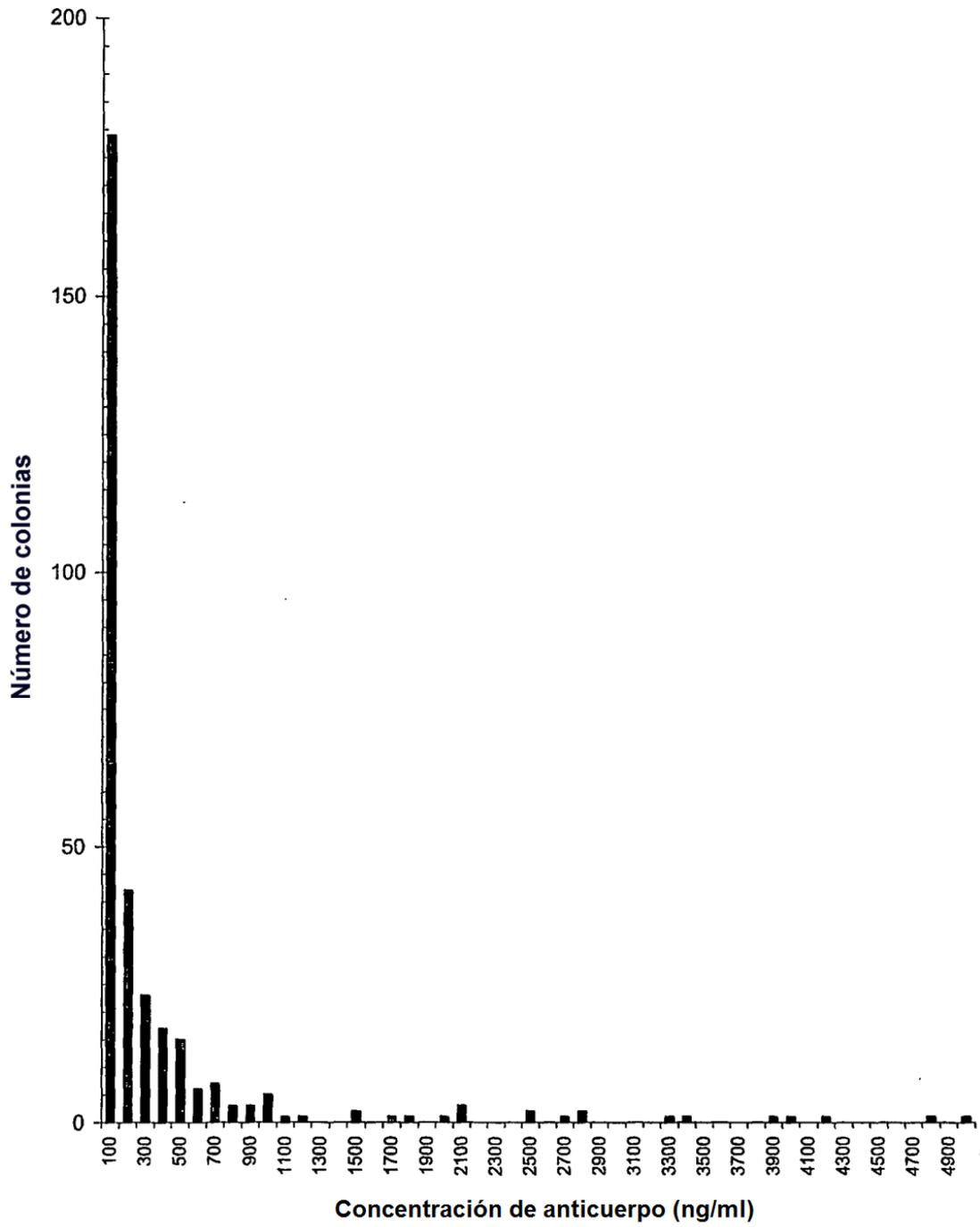


Figura 5