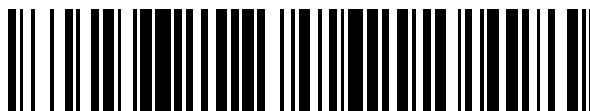


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 266**

51 Int. Cl.:
C12N 15/85 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **99934910 .3**
96 Fecha de presentación: **21.07.1999**
97 Número de publicación de la solicitud: **1098986**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.05.2001**

54 Título: **UN POLINUCLEÓTIDO QUE COMPRENDE UN ELEMENTO DE APERTURA DE CROMATINA UBICUO (UCOE).**

30 Prioridad:
21.07.1998 GB 9815879
09.11.1998 US 107688 P
23.03.1999 GB 9906712
01.04.1999 US 127410 P
23.04.1999 GB 9909494
12.05.1999 US 134016 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.02.2012

73 Titular/es:
MILLIPORE CORPORATION
290 CONCORD ROAD
BILLERICA MASSACHUSETTS 01821, US

72 Inventor/es:
ANTONIOU, Michael y
CROMBIE, Robert

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

ES 2 375 266 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

Un polinucleótido que comprende un elemento de apertura de cromatina ubicuo (UCOE)

La presente invención se refiere a un polinucleótido que comprende un elemento de apertura de cromatina ubicuo (UCOE) que no se deriva de una LCR. La presente invención también se refiere a un vector que comprende la secuencia del polinucleótido, a una célula hospedante que comprende el vector, y al uso del polinucleótido en terapia.

El modelo actual de la estructura de la cromatina en eucariotas superiores postula que los genes se organizan en "dominios" (Dillon y Grosveld, 1994). Los dominios de cromatina pueden consistir en grupos de genes que se expresan de una manera estrictamente específica de tejido, tales como la familia de la β -globina humana (Grosveld *et al.*, 1993), genes que se expresan de forma ubicua, tales como el locus de TBP/C5 humano (Trachtulec, Z. *et al.*, 1997), o una mezcla de genes específicos de tejido y expresados de forma ubicua, tales como el locus γ/δ TCR/*dad-1* murino (Hong *et al.*, 1997; Ortiz *et al.*, 1997) y el locus de la α -globina humana (Vyas *et al.*, 1992). Genes con dos especificidades de tejido diferentes también pueden estar muy relacionados, por ejemplo, los genes de la hormona del crecimiento y de somatomotropina coriónica (Jones *et al.*, 1995). Se contempla que los dominios de cromatina existen en un estado transcripcionalmente silencioso, cerrado y "condensado" o en una configuración transcripcionalmente competente, abierta y "descondensada". El establecimiento de una estructura de cromatina abierta caracterizada por una sensibilidad a la ADNasa I, una hipometilación del ADN y una hiperacetilación de las histonas, se considera un prerrequisito para el comienzo de la expresión génica.

El descubrimiento de elementos de regulación transcripcional específicos de tejido, conocidos como regiones de control de locus (LCR), ha proporcionado una nueva percepción de los mecanismos mediante los cuales se establece el dominio de cromatina abierta y transcripcionalmente competente y su mantenimiento en ciertos casos. Las LCR se definen por su capacidad para conferir a un gen unido en *cis* la expresión de dicho gen restringida a un tipo de célula hospedante, independiente del sitio de integración y dependiente del número de copias (Grosveld *et al.*, 1987; Lang *et al.*, 1988; Greaves *et al.*, 1989; Díaz *et al.*, 1994; Carson y Wiles, 1993; Bonifer *et al.*, 1990; Montoliu *et al.*, 1996; Raguz *et al.*, 1998; documento EP-A-0 332 667), en especial como transgenes de una sola copia (Ellis *et al.*, 1996; Raguz *et al.*, 1998). Las LCR son capaces de impedir la dispersión de la heterocromatina y evitar la variegación por efecto de posición (Festenstein *et al.*, 1996; Milot *et al.*, 1996). Este patrón de expresión conferido por las LCR sugiere que estos elementos poseen una poderosa capacidad de remodelación de la cromatina, y también son capaces de establecer y mantener un dominio de cromatina abierta y transcripcionalmente competente. Además, se ha descubierto que las LCR poseen una capacidad de activación transcripcional inherente que les permite conferir una expresión génica específica de tejido independiente de su promotor cognado (Blom van Assendelft *et al.*, 1989; Collis *et al.*, 1990; Antoniou y Grosveld, 1990; Greaves *et al.*, 1989).

Todas las LCR están asociadas con dominios génicos con un marcado componente específico de tejido o restringido a tejidos, y están asociadas con una serie de sitios hipersensibles a la ADNasa I que pueden localizarse 5' (Grosveld *et al.*, 1987; Carson y Wiles, 1993; Bonifer *et al.*, 1994; Jones *et al.*, 1995; Montoliu *et al.*, 1996) o 3' (Greaves *et al.*, 1989) de los genes que regulan. Además, en fechas recientes se ha descubierto que existen elementos LCR entre genes muy cercanos en el espacio (Hong *et al.*, 1997; Ortiz *et al.*, 1997). También se ha indicado que un elemento de tipo LCR tiene una localización intrónica dentro de un gen (Aronow *et al.*, 1995). En los pocos casos que se han investigado, estos elementos se corresponden con grandes agrupaciones de sitios de unión a factores de transcripción específicos de tejido y ubicuos (Talbot *et al.*, 1990; Philipsen *et al.*, 1990; Pruzina *et al.*, 1991; Lake *et al.*, 1990; Jarman *et al.*, 1991; Aronow *et al.*, 1995).

El descubrimiento de las LCR sugiere que los elementos reguladores que controlan la expresión de genes específicos de tejido desde un dominio de cromatina concreto están organizados de una manera jerárquica. Las LCR parecen actuar como un interruptor maestro, en donde su activación da como resultado el establecimiento de una estructura de cromatina abierta que debe preceder a cualquier expresión génica. Entonces puede lograrse la transcripción al nivel fisiológicamente requerido a través de una interacción de cromatina directa entre la LCR y el promotor local y los elementos potenciadores de un gen individual a través de la formación de bucles del ADN interviniente (Hanscombe *et al.*, 1991; Wijgerde *et al.*, 1995; Dillon *et al.*, 1997).

Tal como se indicó anteriormente, una característica fundamental de una LCR es su especificidad de tejido. La especificidad de tejido de una LCR ha sido investigada por Ortiz *et al.* (1997); se deletionó una serie de sitios hipersensibles a la ADNasa I de la LCR del receptor-alfa de células T (TCR α) y se identificó un elemento derivado de LCR que abre la cromatina en una serie de tejidos. Talbot *et al.* (1994, NAR, **22**, 756-766) describen un elemento similar a LCR que se considera que permite la expresión de un gen relacionado en una serie de tejidos. Sin embargo, no se obtuvo la expresión reproducible del gen relacionado. Se indica que los niveles de expresión tienen una desviación estándar de entre 74% del valor medio sobre una base por copia del gen, en la que el gen se expresa cuando el número de copias del transgén es de 3 o más. Cuando el número de copias es 1 ó 2, los niveles de expresión génica son 10 veces menores y tienen una desviación estándar del 49% del valor medio sobre una base por copia del gen en la que el gen se expresa. El elemento descrito por Talbot *et al.* no produce una expresión reproducible del gen relacionado. Esto y la alta variabilidad del sistema limita claramente el uso de este sistema.

- La corrección a largo plazo de trastornos genéticamente heredados mediante la terapia génica requiere una expresión mantenida y sostenida de la unidad de transcripción a unos niveles lo suficientemente elevados como para que tenga valor terapéutico. Esto puede lograrse con dos estrategias. En primer lugar, las unidades de transcripción pueden integrarse de modo estable en el genoma de la célula hospedante utilizando, por ejemplo, vectores retrovéricos (Miller, 1992; Miller *et al.*, 1993) o víricos adenoasociados (AAV) (Muzyczka, 1992; Kotin, 1994; Flotte y Carter, 1995). Como alternativa, los genes terapéuticos pueden incorporarse dentro de vectores episómicos autorreplicadores que comprenden orígenes de la replicación víricos, tales como los del EBV (Yates *et al.*, 1985), del papovirus BK humano (De Benedetti y Rhoads, 1991; Cooper y Miron, 1993), y del BPV-1 (Piiirsoo *et al.*, 1996).
- Por desgracia, el nivel de expresión que se observa normalmente en genes que están integrados en el genoma es demasiado bajo o tiene una duración demasiado corta como para tener un valor terapéutico en la mayoría de los casos. Esto es debido a lo que se conoce en general como "efectos de posición". La transcripción del gen introducido depende del sitio de su integración, en el que cae bajo la influencia de elementos competidores activadores (promotores/potenciadores) o, con más frecuencia, represores (silenciamiento de la cromatina). Los efectos de posición siguen imponiendo restricciones importantes a la eficacia terapéutica de los vectores con una base vírica integradores con un origen retrovérico y vírico adenoasociado (AAV). Los elementos reguladores transcripcionales víricos son muy susceptibles al silenciamiento por los elementos de cromatina cercanos a los sitios de integración. La inclusión de elementos promotores y potenciadores clásicos procedentes de genes altamente expresados como parte de las construcciones víricas no ha resuelto este importante problema (Dai *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1993).
- La inclusión de una LCR totalmente funcional como parte de la unidad de transcripción supera esta deficiencia puesto que este elemento puede utilizarse para conducir un nivel de expresión predecible, fisiológico y sostenido del gen deseado en un tipo celular específico (véase, Yeoman y Mellor, 1992; Brines y Klaus, 1993; Needham *et al.*, 1992 y 1993; Tewari *et al.*, 1998; Zhumabekov *et al.*, 1995). Este grado de predecibilidad de la expresión es vital para una estrategia de terapia génica segura y con éxito.
- El uso de vectores episómicos replicadores (REV) ofrece una alternativa atractiva a los vectores víricos integradores para producir una expresión génica a largo plazo. En primer lugar, los REV no plantean las mismas limitaciones de tamaño a la unidad de transcripción terapéutica que los vectores víricos, siendo posibles unos insertos de más de 300 kb (Sun *et al.*, 1994). En segundo lugar, por ser episómicos, los REV no padecen los peligros potenciales asociados con la mutagénesis de las inserciones, que es un problema inherente a los vectores víricos integradores. Por último, los REV se introducen en las células diana utilizando sistemas de transporte no víricos que pueden producirse de modo más barato a escala que los vectores víricos.
- Se ha demostrado que los plásmidos transfectados de modo transitorio no replicadores (Reeves *et al.*, 1985; Archer *et al.*, 1992) y los REV (Reeves *et al.*, 1985; Smith *et al.*, 1993) ensamblan nucleosomas. El ensamblaje en los REV es más organizado y se parece a la cromatina nativa, mientras que los nucleosomas en los plásmidos transitorios están menos ordenados y pueden permitir cierto acceso de los factores de transcripción a las secuencias diana aunque la expresión génica puede verse inhibida (Archer *et al.*, 1992). En fechas recientes se ha demostrado que las LCR son capaces de conferir una expresión génica a largo plazo y específica de tejido desde dentro de REV (solucitud de patente internacional WO 98/07876).
- La generación de líneas celulares de mamífero cultivadas que producen niveles altos de un producto de proteína terapéutica es una importante industria en desarrollo. Los efectos de posición de la cromatina hacen que este proceso sea difícil, consume mucho tiempo y sea caro. La estrategia que se utiliza de modo más habitual para la producción de dichas "factorías celulares" de mamífero se basa en la amplificación génica inducida por una combinación de genes de resistencia a fármacos (por ejemplo, DHFR, glutamina sintetasa (Kaufman, 1990)) y altas concentraciones de fármacos tóxicos que se tienen que mantener todo el tiempo. El uso de vectores que poseen LCR procedentes de dominios génicos altamente expresados simplifica en gran medida la generación de estas líneas celulares (Needham *et al.*, 1992; Needham *et al.*, 1995).
- Las LCR también se describen en el contexto de la expresión de transgenes en Talbot D., *et al.* (The 5' flanking region of the rat LAP (C/EBP β) gene can direct high-level, position-independent, copy number-dependent expression in multiple tissues in transgenic mice, *Nucleic Acids Research* (1994), 22(5), 756-766).
- Un problema con el uso de LCR es que son específicas de tejido, y su expresión reproducible sólo se obtiene en el tipo celular específico. Por consiguiente, no puede obtenerse una expresión reproducible en un tipo de tejido o en una serie de tipos de tejidos en los que no haya una LCR. Por consiguiente, es necesario un UCOE, que no se derive de una LCR.
- Tal como se indicó anteriormente, Ortiz *et al.* (1997), describen un elemento derivado de LCR, que abre la cromatina en una serie de tejidos. Existe una serie de problemas con el elemento derivado de LCR de Ortiz *et al.* (1997). En particular, el elemento debe construirse con cuidado utilizando técnicas de ADN recombinante para que contenga las regiones necesarias de la LCR y también para que el elemento no produzca niveles de expresión reproducibles de un gen relacionado en células de tipos diferentes, en especial cuando el elemento tenga una sola copia del transgén o un número bajo (menor que 3).

La solicitud de patente europea EP 0 848 061 se dirige al control de la expresión transgénica, y describe un sistema conceptual en el que la expresión de un gen produce un factor regulador de la transcripción que actúa sobre un promotor que dirige otro gen de interés concreto.

5 En Song W. y Lahiri D.K. (Molecular cloning of the gene encoding the Rhesus monkey beta-amyloid precursor protein: structural characterization and a comparative study with other species, *Gene* (1998), 217, 151-164) se describen islas de CpG. En Tazi J. y Bird A., se analizan las islas de CpG no metiladas que incluyen promotores y regiones transcritas 5' de genes como un modelo para la estructura de la cromatina activa (Alternative Chromatin Structure at CpG Islands, *Cell* (1990), 60, 909-920).

10 En Ohbayashi T. *et al.*, se analiza la estructura del promotor del gen de proteína de unión a TATA de ratón y humana, y se indica que los genes de expresión ubicua a menudo carecen de una caja TATA pero tienen cajas GC dentro de los promotores, y en algunos casos se sabe estas cajas GC desempeñan un papel en la activación transcripcional, y que los promotores sin TATA con frecuencia dirigen la transcripción desde múltiples sitios (Promoter Structure of the Mouse TATA-Binding Protein (TBP) Gene, *Biochemical and Biophysical Research Communications* (1996), 225, 275-280). Los autores han descubierto que los promotores de TBP de vertebrados están incluidos en la clase de promotores que contienen cajas CG, que no contienen TATA, y que son ubicuamente activos, y concluyen que su descubrimiento será importante para la comprensión de la forma en que las células somáticas regulan la expresión génica de TBP y, por tanto, mantienen la homeostasis.

15 En Bird A.P., se analizan las islas de CpG asociadas con genes de vertebrados, considerando las propiedades de islas de CpG no metiladas agrupadas y su relación con los genes (CpG-rich islands and the function of DNA methylation, *Nature* (1986), 321, 209-213).

20 En Gardiner-Garden M. y Frommer M., se seleccionaron secuencias de genes de vertebrados para determinar la presencia de islas de CpG, y fueron analizadas en términos de la longitud, la composición de nucleótidos, la frecuencia de dinucleótidos CpG, y la localización con relación a la unidad de transcripción del gen asociado (CpG Islands in Vertebrate Genomes, *J. Mol. Biol.* (1987), 196, 261-282). Se descubrió que las islas de CpG están asociadas con genes constitutivos y genes específicos de tejido. En Gardiner-Garden y Frommer se analizan las posibles funciones de las islas de CpG en la regulación transcripcional y postranscripcional de la expresión génica, y estas funciones fueron relacionadas por los autores con teorías sobre el mantenimiento de las islas de CpG como "zonas exentas de metilación" en el ADN de la línea germinal.

25 En Qvist H. *et al.*, se analiza la actividad promotora del gen DPPIV porcino basándose en ensayos de transfección transitoria (The TATA-Less, CG-Rich Porcine Dipeptidylpeptidase IV (DPPIV) Promoter Shows Bidirectional Activity, *Biol. Chem.* (1998), 379, 75-81). En una línea similar, Bohm S.K. *et al.*, analizan la actividad promotora de DPPIV humana basándose en ensayos de transfección transitoria en una orientación sentido (Human dipeptidyl peptidase IV gene promoter: tissue-specific regulation from a TATA-less CG-rich sequence characteristic of a housekeeping gene promoter, *Biochem. J.* (1995), 311, 835-843).

30 Se han descrito elementos que comprenden promotores bidireccionales e islas de CpG exentas de metilación; sin embargo, no se describe ni indicado que los elementos abran la cromatina ni que mantengan a la cromatina en un estado abierto y faciliten la expresión reproducible de un gen unido operablemente en células de al menos dos tipos diferentes de tejidos.

35 El locus Surf1 humano abarca aproximadamente 60 kb y se localiza sobre el cromosoma 9q34.2. El locus comprende promotores bidireccionales entre los genes SURF5 y SURF3, y entre los genes SURF1 y SURF2 (Huxley *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 605-614, 1990; Duhig *et al.*, *Genomics*, **52**, 72-78, 1998; Williams *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 4558-4569, 1986). No existen indicaciones de que estas regiones abran la cromatina ni que mantengan a la cromatina en un estado abierto y faciliten la expresión reproducible de un gen unido operablemente en células de al menos dos tipos diferentes de tejidos.

40 También se describe un promotor bidireccional en Brayton *et al.* (*J. Biol. Chem.*, **269**, 5313-5321, 1994) entre los genes GPAT y AIRC aviares. De nuevo, no existen indicaciones de que estas regiones abran la cromatina ni que mantengan a la cromatina en un estado abierto y faciliten la expresión reproducible de un gen unido operablemente en células de al menos dos tipos diferentes de tejidos.

45 Se describe un promotor bidireccional en Ryan *et al.* (*Gene*, **196**, 9-17, 1997) entre los genes de chaperonina 60 y chaperonina 10 mitocondriales. De nuevo, no existen indicaciones de que las regiones abran la cromatina ni que mantengan a la cromatina en un estado abierto y faciliten la expresión reproducible de un gen unido operablemente en células de al menos dos tipos diferentes de tejidos.

50 También se describe un promotor bidireccional asociado con el gen HTF9 murino. De nuevo, no existen indicaciones de que las regiones abran la cromatina ni que mantengan a la cromatina en un estado abierto y faciliten la expresión reproducible de un gen unido operablemente en células de al menos dos tipos diferentes de tejidos.

55 En Palmiter *et al.* (*PNAS USA*, **95**, 8428-8430, 1998) y la solicitud de patente internacional WO 94/13273 se describe

un elemento asociado con los genes de metalotioneína. El elemento comprende sitios hipersensibles a la ADNasa I que no están asociados con promotores. Además, no existen pruebas que demuestren que el elemento no abre la cromatina ni que la mantenga en un estado abierto y facilite la expresión reproducible de un gen unido operablemente en células de al menos dos tipos diferentes de tejidos.

5 El uso de plásmidos tranfectados de forma transitoria y no replicadores para lograr la expresión génica en las células tranfectantes es muy conocido. También se sabe que se logra sólo una expresión a corto plazo (en general menos de 72 horas) utilizando plásmidos tranfectados de forma transitoria y no replicadores. La expresión a corto plazo se considera que es debida en general a la degradación del plásmido o a la pérdida del plásmido desde la célula. En vista de este inconveniente, el uso de dichos plásmidos es limitado.

10 Se describe un polinucleótido que comprende un UCOE que abre la cromatina o que mantiene a la cromatina en un estado abierto y facilita la expresión reproducible de un gen unido operablemente en células de al menos dos tipos diferentes de tejidos, en el que el polinucleótido no se deriva de una región de control de locus.

15 Una "región de control de locus" (LCR) se define como un elemento genético que se obtiene a partir de un locus específico de tejido de una célula hospedante eucariota y que, cuando se une a un gen de interés y se integra en un cromosoma de una célula hospedante, confiere una expresión dependiente del número de copias, independiente del sitio de integración y específica de tejido al gen de interés. Un polinucleótido derivado de una LCR puede ser cualquier parte o partes de una LCR. Preferiblemente, un polinucleótido derivado de una LCR es cualquier parte de una LCR que actúe para abrir la cromatina. Una LCR está asociada con uno o más sitios hipersensibles (HS) a la ADNasa I que no están asociados con un promotor, y se prefiere que el UCOE no comprenda sitios HS que no estén asociados con un promotor. Los sitios HS son muy conocidos por los expertos en la técnica, y pueden ser identificados basándose en técnicas convencionales, que se describen en la presente.

20 La expresión "facilita la expresión reproducible" se refiere a la capacidad del UCOE para facilitar la activación de la transcripción reproducible del gen unido operablemente. Se cree que el proceso implica la capacidad del UCOE para hacer que la región de la cromatina que incluye el gen (o al menos los sitios de unión a factores de transcripción) sea accesible a los factores de transcripción. Una expresión reproducible significa preferiblemente que el polinucleótido, cuando está unido operablemente a un gen expresable, produce sustancialmente el mismo nivel de expresión del gen unido operablemente, independientemente de su entorno de cromatina y preferiblemente también independientemente del tipo de tejido celular. Preferiblemente, "sustancialmente el mismo nivel de expresión" significa un nivel de expresión que tiene una desviación estándar del valor medio menor que 48%, preferiblemente menor que 40%, y lo más preferiblemente menor que 25% sobre una base por copia del gen. Como alternativa, "sustancialmente el mismo nivel de expresión" significa preferiblemente que el nivel de expresión varía en menos de 10 veces, más preferiblemente en menos de 5 veces, y lo más preferiblemente en menos de 3 veces sobre una base por copia del gen. El nivel de expresión es preferiblemente el nivel de expresión medido en un animal transgénico no humano. Se prefiere en especial que el UCOE facilite una expresión reproducible de un gen unido operablemente cuando esté presente como una sola copia o un número de copias bajo (menor que 3).

35 Tal como se emplea en la presente, "unido" se refiere a un enlace *cis*, en el que el gen y el UCOE están presentes en una relación *cis* sobre la misma molécula de ácido nucleico. La expresión "unido operablemente" se refiere a un enlace *cis* en el que el gen se somete a la expresión facilitada por el UCOE.

40 La cromatina abierta o la cromatina en un estado abierto se refiere a la cromatina en un estado descondensado, y también se denomina eucromatina. La cromatina condensada también se denomina heterocromatina. Tal como se indicó anteriormente, la cromatina en un estado cerrado (condensado) es transcripcionalmente silenciosa. La cromatina en un estado abierto (descondensado) es transcripcionalmente competente. El establecimiento de una estructura de cromatina abierta se caracteriza por una sensibilidad a la ADNasa I, una hipometilación del ADN y una hiperacetilación de las histonas. Los métodos convencionales para identificar a la cromatina abierta son muy conocidos por los expertos en la técnica y se describen en Wu, 1989, Meth. Enzymol., **170**, 269-289; Crane-Robinson *et al.*, 1997, Methods, **12**, 48-56; Rein *et al.*, 1998, N.A.R., **26**, 2255-2264.

45 La expresión "células de dos o más tipos de tejidos" se refiere a células de al menos dos, preferiblemente al menos 4 y más preferiblemente todos los siguientes tipos de tejidos diferentes: tejido de corazón, riñón, pulmón, hígado, intestino, músculo esquelético, gónadas, bazo, cerebro y timo. Preferiblemente, el polinucleótido facilita la expresión reproducible de una manera no específica de tejido, es decir, sin especificidad de tejido. También se prefiere que el polinucleótido de la presente invención facilite una expresión reproducible en al menos 50% y más preferiblemente en todos los tipos de tejidos en los que se produce la expresión génica activa.

50 Preferiblemente, el polinucleótido de la presente invención facilita una expresión reproducible de un gen unido operablemente a un nivel fisiológico. Un nivel fisiológico significa un nivel de expresión génica en el que la expresión en una célula, una población de células o un paciente muestra un efecto fisiológico. Preferiblemente, el nivel fisiológico es un nivel fisiológico óptimo que depende del resultado deseado. Preferiblemente, el nivel fisiológico es equivalente al nivel de expresión de un gen endógeno equivalente.

El UCOE descrito en la presente puede ser cualquier elemento que abra la cromatina o que mantenga a la cromatina

- en un estado abierto y facilite la expresión reproducible de un gen unido operablemente en células de al menos dos tipos diferentes de tejidos, con la condición de que no se derive de una LCR. En una realización preferida, el UCOE comprende una isla de CpG exenta de metilación extendida. Las islas de CpG tienen un contenido medio en GC de aproximadamente 60%, comparado con la media del 40% en el grueso del ADN. Los expertos en la técnica pueden identificar con facilidad las islas de CpG utilizando técnicas convencionales, tales como la utilización de enzimas de restricción específicas para secuencias de C y G. Estas técnicas se describen en Larsen *et al.*, 1992, y Kolsto *et al.*, 1986. Una isla de CpG exenta de metilación extendida es una isla de CpG exenta de metilación que se extiende a través de una región que incluye más de un sitio de inicio transcripcional y/o se extiende en más de 300 pb y preferiblemente en más de 500 pb.
- 5
- 10 Preferiblemente, el UCOE se deriva de una secuencia que, en su posición endógena natural, está asociada (más preferiblemente, está localizada adyacente) a un gen expresado de modo ubicuo. También se prefiere que el UCOE comprenda al menos un sitio de unión a factores de transcripción. Los sitios de unión a factores de transcripción incluyen secuencias de promotores y secuencias de potenciadores. Preferiblemente, el UCOE comprende
- 15 promotores duales o bidireccionales que se transcriben de modo divergente. Los promotores duales se definen en la presente como dos o más promotores que son independientes entre sí de modo que uno de los promotores puede ser activado o desactivado sin afectar al otro promotor o promotores. Un promotor bidireccional se define en la presente como una región que puede actuar como promotor en ambas direcciones pero que no puede activarse o desactivarse sólo en una dirección. Preferiblemente, el UCOE comprende promotores duales. Preferiblemente, el UCOE comprende promotores duales o bidireccionales que se transcriben de modo divergente (es decir, pueden
- 20 conducir a una transcripción en direcciones opuestas) y que, en sus posiciones endógenas naturales, están asociados con genes expresados de manera ubicua. Preferiblemente, el UCOE comprende promotores duales que se transcriben de modo divergente. El UCOE puede comprender un promotor heterólogo, es decir, un promotor que en la naturaleza no está asociado con las otras secuencias del UCOE. Por ejemplo, es posible utilizar el promotor de CMV con el UCOE asociado con los promotores de hnRNP A2 y HP1H- γ , que se analiza más a fondo a
- 25 continuación. También se proporciona en la presente un UCOE que comprende uno o más promotores heterólogos. El promotor o promotores heterólogos pueden reemplazar a uno o más de los promotores endógenos del UCOE, o pueden utilizarse además de dicho uno o más promotores endógenos del UCOE. El promotor heterólogo puede ser cualquier promotor, incluyendo promotores específicos de tejido, tales como promotores específicos de tumores y promotores ubicuos. Preferiblemente, el promotor heterólogo es un promotor sustancialmente ubicuo, y lo más preferiblemente es el promotor del CMV.
- 30
- Preferiblemente, el UCOE no es el fragmento *EcoRI* de 3725 pb que comprende el promotor bidireccional del fragmento pequeño *HpaII* (HTF) de la isla HTF9 según se describe en Lavia *et al.*, EMBO J., **6**, 2773-2779 (1987).
- Preferiblemente, el UCOE no es el elemento MES-1 de 149 pb localizado dentro de fragmento genómico *BamHI* de 800 pb localizado entre los genes SURF1 y SURF2 murinos del locus Surfeit (Williams *et al.*, Mol. Cell. Biol., **13**, 4784-4792, 1993). Preferiblemente, el UCOE no es el promotor bidireccional localizado entre los genes SURF5 y SURF3 del locus Surfeit (Williams *et al.*, Mol. Cell. Biol., **13**, 4784-4792, 1993). También se prefiere que el UCOE no se derive del locus del gen Surfeit humano que abarca 60 kb y está localizado sobre el cromosoma 9q34.2, según se define en Duhig *et al.*, Genomics, **52**, 72-78 (1998), o el correspondiente locus murino (Huxley *et al.*, Mol. Cell. Biol., **10**, 605-614 (1990).
- 35
- 40 Preferiblemente, el UCOE no es la región del promotor bidireccional localizado entre los genes GPAT y AIRC aviares contenidos en el fragmento *SmaI* de 1350 pb depositado en la base de datos GenBank (nº de registro L12533) (Gavalas *et al.*, Mol. Cell. Biol., **13**, 4784-4792, 1993) o el correspondiente equivalente humano (Brayton *et al.*, J. Biol. Chem., **269**, 5313-5321, 1994).
- Preferiblemente, el UCOE no es el fragmento de ADN genómico de 13894 pb (nº de registro de GenBank U68562) que comprende los genes de chaperonina 60 y chaperonina 10 mitocondriales de rata. También se prefiere que el UCOE no sea el fragmento de 581 pb que contiene el promotor bidireccional localizado en la región intergénica entre los genes de chaperonina 60 y chaperonina 10 mitocondriales de rata (Ryan *et al.*, Gene, **196**, 9-17, 1997).
- 45
- Preferiblemente, el UCOE es un fragmento de ADN de 44 kb que abarca el gen de la proteína de unión a TATA (TBP) humano y 12 kb de cada una de las secuencias flanqueantes 5' y 3', o su homólogo o fragmento funcional.
- 50
- Preferiblemente, el UCOE es un fragmento de ADN de 60 kb que abarca el gen hnRNP A2 humano con 30 kb de la secuencia flanqueante 5' y 20 kb de la secuencia flanqueante 3', o su homólogo o fragmento funcional. En otra realización preferida, el UCOE comprende la secuencia de la figura 21 entre los nucleótidos 1 a 6264, o su homólogo o fragmento funcional. Esta secuencia incluye el promotor de hnRNP A2 (nucleótidos 5636 a 6264) y 5,5 kb de la secuencia flanqueante 5' que comprende el promotor de HP1H- γ .
- 55
- Preferiblemente, el UCOE es un fragmento de ADN de 25 kb que abarca el gen TBP humano con 1 kb de la secuencia flanqueante 5' y 5 kb de la secuencia flanqueante 3', o su homólogo o fragmento funcional.
- Preferiblemente, el UCOE es un fragmento de ADN de 16 kb que abarca el gen hnRNP A2 humano con 5 kb de la secuencia flanqueante 5' y 1,5 kb de la secuencia flanqueante 3', o su homólogo o fragmento funcional.

Preferiblemente, el UCOE comprende la secuencia de la figura 21 entre los nucleótidos 1 y 5636 (los 5,5 kb de la secuencia flanqueante 5' del promotor de hnRNP A2) y el promotor de CMV, o su homólogo o fragmento funcional.

Preferiblemente, el UCOE comprende la secuencia de la figura 21 entre los nucleótidos 4102 y 8286, o su homólogo o fragmento funcional. Esta secuencia incluye ambos promotores de hnRNP A2 y HP1H- γ .

5 Preferiblemente, el UCOE comprende la secuencia de la figura 21 entre los nucleótidos 1 y 7627, o su homólogo o fragmento funcional. Esta secuencia incluye ambos promotores de hnRNP A2 y HP1H- γ , y el exón 1 del gen hnRNP A2.

10 Preferiblemente, el UCOE comprende la secuencia de la figura 21 entre los nucleótidos 1 y 9127, o su homólogo o fragmento funcional. Esta secuencia incluye ambos promotores de hnRNP A2 y HP1H- γ , y la secuencia flanqueante 3' del promotor de hnRNP A2 hasta el exón 2, pero sin incluirlo, del gen hnRNP A2.

También se prefiere que el UCOE tenga la secuencia de nucleótidos de la figura 20 o de la figura 21, o su fragmento u homólogo funcional.

15 La expresión "homólogos o fragmentos funcionales", tal como se emplea en la presente, significa homólogos o fragmentos que abren la cromatina o que mantienen a la cromatina en un estado abierto y facilitan la expresión reproducible de un gen unido operablemente. Preferiblemente, los homólogos son homólogos de especie que se corresponden con los UCOE identificados, o son homólogos asociados con otros genes expresados de modo ubicuo. Pueden realizarse comparaciones de secuencias entre los UCOE para identificar los motivos de secuencias conservadas que permite la identificación o la síntesis de otros UCOE. Los expertos en la técnica conocen los paquetes informáticos adecuados para realizar dichas comparaciones de secuencias. Un paquete informático
20 preferido para realizar comparaciones de secuencias es PCGENE (Intelligenetics, Inc., EEUU). Pueden identificarse con facilidad fragmentos funcionales generando metódicamente fragmentos de UCOE conocidos y ensayando su función. La identificación de los motivos de secuencias conservados también ayudará a la identificación de fragmentos funcionales, puesto que es probable que los fragmentos que comprenden motivos de secuencias conservados sean funcionales. Los homólogos funcionales también incluyen UCOE modificados, en los que los
25 elementos del UCOE han sido reemplazados por elementos similares, tales como el reemplazo de uno o más promotores de un UCOE por promotores heterólogos diferentes. Tal como se indicó anteriormente, el promotor heterólogo puede ser cualquier promotor que incluya promotores específicos de tejido, tales como promotores específicos de tumores y promotores ubicuos. Preferiblemente, el promotor heterólogo es un promotor fuerte y/o sustancialmente ubicuo, y lo más preferiblemente es el promotor de CMV.

30 Además, se proporciona un método para identificar un UCOE que facilita la expresión reproducible de un gen unido operablemente en células de al menos dos tipos diferentes de tejidos, que comprende:

1. ensayar un UCOE candidato mediante la transfección de células de al menos dos tipos diferentes de tejidos con un vector que contiene el UCOE candidato unido operablemente a un gen marcador; y

35 2. determinar si se obtiene la expresión reproducible del gen marcador en las células de dos o más tipos diferentes de tejidos.

Preferiblemente, el método para identificar un UCOE comprende la etapa adicional de seleccionar UCOE candidatos que estén asociados con uno o más de un gen expresado de forma ubicua, un promotor dual o bidireccional, y una isla de CpG exenta de metilación extendida.

40 Preferiblemente, la expresión reproducible del gen marcador se determina en células que contienen una única copia del UCOE unido al gen marcador.

También se describe en la presente un método, en el que se ensaya el UCOE candidato generando un animal transgénico no humano que contiene células que comprenden un vector que contiene el UCOE candidato unido operablemente a un gen marcador, y determinando si se obtiene la expresión reproducible del gen marcador en las células de dos o más tipos diferentes de tejidos. Preferiblemente, el animal transgénico no humano es un animal
45 transgénico no humano de la generación F1 o mayor. Preferiblemente, el animal transgénico no humano es un roedor, más preferiblemente un ratón.

En la presente se proporciona un UCOE que puede derivarse de una secuencia de un ácido nucleico asociada o adyacente a un gen expresado de modo ubicuo. Preferiblemente, la secuencia del ácido nucleico comprende una isla de CpG exenta de metilación extendida. También se prefiere que la secuencia del ácido nucleico comprenda al
50 menos un sitio de unión a factores de transcripción. Preferiblemente, la secuencia del ácido nucleico comprende promotores duales o bidireccionales que se transcriben de modo divergente. Preferiblemente, la secuencia del ácido nucleico comprende promotores duales que se transcriben de modo divergente. Preferiblemente, la secuencia del ácido nucleico comprende promotores duales o bidireccionales que se transcriben de modo divergente, y que están asociados con genes de expresión ubicua. Preferiblemente, la secuencia del ácido nucleico comprende promotores
55 duales que se transcriben de modo divergente, y que están asociados con genes de expresión ubicua.

También se proporciona el uso del polinucleótido según se describe en la presente, o su fragmento, en un ensayo para identificar otros UCOE. Preferiblemente, se emplea un fragmento del polinucleótido que incluya un motivo de secuencia conservada o estructural. Los métodos para realizar dicho ensayo son muy conocidos por los expertos en la técnica.

5 También se proporciona un vector que comprende el polinucleótido según se describe en la presente. El vector comprende preferiblemente un gen expresable unido operablemente al polinucleótido. El gen expresable comprende los elementos necesarios que permiten la expresión génica, tales como promotores, potenciadores, secuencias aceptoras del corte y empalme, secuencias de sitios internos de entrada a ribosomas (IRES) y sitios de fin de la transcripción adecuados. Los elementos adecuados para permitir la expresión génica son muy conocidos por los expertos en la técnica. Los elementos adecuados para permitir la expresión génica pueden ser los elementos endógenos naturales asociados con el gen, o pueden ser elementos heterólogos utilizados para obtener un nivel o una distribución tisular diferentes de la expresión génica, comparado con el gen endógeno. Preferiblemente, el vector comprende un promotor asociado operablemente con el gen expresable y el polinucleótido. El promotor puede ser un promotor endógeno natural del gen expresable o puede ser un promotor heterólogo. El promotor heterólogo puede ser cualquier promotor que incluya promotores específicos de tejido, tales como promotores específicos de tumores y promotores ubicuos.

Preferiblemente, el promotor heterólogo es un promotor fuerte y/o sustancialmente ubicuo, y lo más preferiblemente es el promotor de CMV.

20 El vector puede ser cualquier vector capaz de transferir ADN a una célula. Preferiblemente, el vector es un vector integrador o un vector episómico.

Los vectores integradores preferidos incluyen vectores retrovéricos recombinantes. Un vector retrovérico recombinante incluirá ADN de al menos una porción de un genoma retrovérico, pudiendo dicha porción infectar a las células diana. El término "infección" se utiliza para indicar el proceso mediante el cual un virus transfiere material genético a su célula hospedante o diana. Preferiblemente, el retrovirus que se utilice en la construcción de un vector también se hace que sea defectuoso en la replicación para eliminar el efecto de la replicación vírica de las células diana. En estos casos, el genoma vírico defectuoso en la replicación puede ser encapsulado por un virus auxiliar según las técnicas convencionales. En general, puede emplearse cualquier retrovirus que cumpla los anteriores criterios de infectividad y capacidad de transferencia de genes funcionales.

30 Los vectores retrovéricos adecuados incluyen, pero no se limitan a pLJ, pZip, pWe y pEM, muy conocidos por los expertos en la técnica. Las líneas de virus encapsulantes adecuadas para los retrovirus defectuosos en la replicación incluyen, por ejemplo, ΨCrip, ΨCre, Ψ2 y ΨAm.

Otros vectores útiles incluyen vectores de adenovirus, virus adenoasociados, virus SV40, virus de vaccinia, HSV y poxvirus. Un vector preferido es el adenovirus. Los vectores de adenovirus son muy conocidos por los expertos en la técnica y se han empleado para transportar genes a numerosos tipos de células, incluyendo el epitelio de las vías respiratorias, el músculo esquelético, el hígado, el cerebro y la piel (Hitt, M.M., Addison, C.L. y Graham, F.L. (1997), Human adenovirus vectors for gene transfer into mammalian cells, *Advances in Pharmacology*, **40**, 137-206; y Anderson, W.F. (1998), Human gene therapy, *Nature*, **392** (6679 supl.):25-30).

40 Otro vector preferido es el vector adenoasociado (AAV). Los vectores AAV son muy conocidos por los expertos en la técnica y se han empleado para transducir de modo estable linfocitos T, fibroblastos, pólipos nasales, células del músculo esquelético, cerebro, eritroides y precursores hemopoyéticas humanas para aplicaciones de terapia génica (Philip *et al.*, 1994, Mol. Cell. Biol., **14**, 2411-2418; Russell *et al.*, 1994, PNAS USA, **91**, 8915-8919; Flotte *et al.*, 1993, PNAS USA, **90**, 10613-10617; Walsh *et al.*, 1994, PNAS USA, **89**, 7257-7261; Miller *et al.*, 1994, PNAS USA, **91**, 10183-10187; Emerson, 1996, Blood, **87**, 3082-3088). La solicitud de patente internacional WO 91/18088 describe vectores basados en AAV específicos.

45 Los vectores episómicos preferidos incluyen vectores episómicos autorreplicadores y vectores episómicos no replicadores transitorios con funciones derivadas de los orígenes de la replicación víricos, tales como los de EBV, papovavirus humano (BK), y BPV-1. Estos vectores integradores y episómicos son muy conocidos por los expertos en la técnica y se describen a fondo en el conjunto de la bibliografía muy conocida por los expertos en la técnica. En particular, se describen vectores episómicos adecuados en el documento WO 98/07876.

50 Los cromosomas artificiales de mamífero también son vectores preferidos. El uso de cromosomas artificiales humanos se analiza en Calos (1996, TIG, **12**, 463-466).

Preferiblemente, el vector es un plásmido. También se prefiere que el plásmido sea un plásmido no replicador y no integrador.

55 El término "plásmido", tal como se emplea en la presente, se refiere a cualquier ácido nucleico que codifique un gen expresable e incluye ácidos nucleicos lineales o circulares, o ácidos nucleicos monocatenarios o bicatenarios. El ácido nucleico puede ser ADN o ARN, y puede comprender nucleótidos o ribonucleótidos modificados, y puede estar

químicamente modificado por medios como la metilación o la inclusión de grupos protectores o estructuras de casquete o de cola.

5 Un plásmido no replicador y no integrador es un ácido nucleico que cuando se transfecta en una célula hospedante no se replica ni se integra específicamente en el genoma de la célula hospedante (es decir, no se integra con altas frecuencias ni se integra en sitios específicos).

Los plásmidos replicadores pueden identificarse utilizando ensayos convencionales, que incluyen el ensayo de replicación convencional de Ustav *et al.*, EMBO J., **10**, 449-457, 1991.

10 Preferiblemente, un plásmido no replicador y no integrador es un plásmido que no puede mantenerse de forma estable en las células, independientemente de la replicación del ADN genómico, y que no persiste en la progenie de las células en tres o más divisiones celulares sin una pérdida significativa de número de copias del plásmido en las células, es decir, con una pérdida mayor que una media de aproximadamente 50% de las moléculas del plásmido en la progenie de las células entre una división celular concreta. En general, en vectores autorreplicadores, se proporciona la función autorreplicadora mediante la utilización de un origen de la replicación vírico y proporcionando uno o más factores de replicación víricos que son necesarios para la replicación mediada por ese origen de la replicación concreto. Los vectores autorreplicadores se describen en el documento WO 98/07876. La expresión "plásmido no integrador, de transfección transitoria" significa en la presente lo mismo que la expresión "plásmido no replicador y no integrador" definido anteriormente.

20 Preferiblemente, el plásmido es un ácido nucleico desnudo. Tal como se emplea en la presente, el término "desnudo" se refiere a una molécula de ácido nucleico que no tiene asociaciones físicas directas con proteínas, lípidos, carbohidratos o proteoglicanos, tanto de forma covalente como a través de enlaces de hidrógeno. El término no se refiere a la presencia o a la ausencia de nucleótidos o ribonucleótidos modificados, o la modificación química de toda o una porción de una molécula de un ácido nucleico por medios tales como la metilación o la inclusión de grupos protectores o estructuras de casquete o de cola.

25 Preferiblemente, el vector comprende la secuencia de la figura 20 entre los nucleótidos 1 y 7627 (que incluyen ambos promotores de hnRNP A2 y HP1H- γ), el promotor de CMV, un sitio de clonación múltiple, una secuencia de poliadenilación, y genes que codifican marcadores seleccionables bajo elementos de control adecuados. Preferiblemente, el vector es el vector CET200 o CET210, que se muestra de modo esquemático en la figura 49.

30 También se proporciona una célula hospedante transfectada con el vector según se describe en la presente. La célula hospedante puede ser cualquier célula, tal como células de levadura, células de insecto, células bacterianas y células de mamífero. Preferiblemente, la célula hospedante es una célula de mamífero y puede derivarse de líneas celulares de mamífero, tales como la línea celular CHO, la línea celular 293, y células NS0.

35 Preferiblemente, el gen unido operablemente es una secuencia de ácido nucleico terapéutica. Las secuencias de ácidos nucleicos terapéuticamente útiles que pueden utilizarse incluyen secuencias que codifican receptores, enzimas, ligandos, factores reguladores, hormonas, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, y proteínas estructurales. Las secuencias de ácidos nucleicos terapéuticos también incluyen secuencias que codifican proteínas nucleares, proteínas citoplásmica, proteínas mitocondriales, proteínas segregadas, proteínas asociadas a membranas, proteínas séricas, antígenos víricos, antígenos bacterianos, antígenos protozoarios y antígenos parasitarios. Las secuencias de ácidos nucleicos útiles también incluyen secuencias que codifican proteínas, péptidos, lipoproteínas, glicoproteínas, fosfoproteínas y ácidos nucleicos (por ejemplo, ARN o ácidos nucleicos antisentido). Las proteínas o los polipéptidos que pueden ser codificados por la secuencia de ácido nucleico terapéutica incluyen hormonas, factores del crecimiento, enzimas, factores coagulantes, apolipoproteínas, receptores, eritropoyetina, anticuerpos terapéuticos o sus fragmentos, fármacos, oncogenes, antígenos tumorales, supresores tumorales, antígenos víricos, antígenos parasitarios y antígenos bacterianos. Los ejemplos específicos de estos compuestos incluyen proinsulina, hormona del crecimiento, receptores de andrógenos, factor del crecimiento I de tipo insulínico, factor del crecimiento II de tipo insulínico, proteínas de unión al factor del crecimiento de tipo insulínico, factor del crecimiento epidérmico, factor del crecimiento transformante- α , factor del crecimiento transformante- β , factor del crecimiento derivado de plaquetas, factores angiogénicos (factor del crecimiento de fibroblastos ácido, factor del crecimiento de fibroblastos básico, factor del crecimiento endotelial vascular, y angiogenina), proteínas de matriz (colágeno de tipo IV, colágeno de tipo VII, laminina), fenilalanina hidroxilasa, tirosina hidroxilasa, oncoproteínas (por ejemplo, las codificadas por byras, fos, myc, erb, src, neu, sis, jun), oncoproteínas E6 o E7 de HPV, proteína p53, proteína Rb, receptores de citoquinas, IL-1, IL-6, IL-8, y proteínas de organismos víricos, bacterianos y parasitarios que pueden utilizarse para inducir una respuesta inmunológica, y otras proteínas de importancia útil en el cuerpo. La elección del gen que se va a incorporar sólo está limitada por la disponibilidad de la secuencia del ácido nucleico que lo codifica. Los expertos en la técnica reconocerán con facilidad que, a medida que se van identificando más proteínas y polipéptidos, éstos pueden integrarse en el polinucleótido descrito en la presente y expresarse.

55 Cuando el polinucleótido descrito en la presente está incluido en un plásmido, se prefiere que el plásmido se emplee en una terapia génica monogénica, tal como en el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne y en métodos de

inmunización y vacunación de ADN.

El polinucleótido descrito en la presente puede utilizarse para expresar genes que ya se expresan en una célula hospedante (es decir, un gen nativo u homólogo), por ejemplo para aumentar la dosificación del producto génico. Sin embargo, debe advertirse que la expresión de un gen homólogo puede dar como resultado una expresión desregulada, que puede no estar sujeta a control por el UCOE debido a su sobreexpresión en la célula.

El polinucleótido descrito en la presente puede insertarse en el genoma de una célula en una posición operablemente asociada con un gen endógeno (nativo) y, con ello, conducir a una mayor expresión del gen endógeno. Los métodos para insertar elementos en el genoma en sitios específicos son muy conocidos por los expertos en la técnica, y se describen en los documentos US-A-5.578.461 y US-A-5.641.670. Como alternativa, el polinucleótido descrito en la presente, en su posición endógena (nativa) en el genoma, puede tener un gen insertado en una posición operablemente asociada, de forma que se produce la expresión del gen. De nuevo, los métodos para insertar genes en el genoma en sitios específicos son muy conocidos por los expertos en la técnica, y se describen en los documentos US-A-5.578.461 y US-A-5.641.670.

También se proporciona el uso del polinucleótido descrito en la presente para aumentar la expresión de un gen endógeno, que comprende insertar el polinucleótido en el genoma de una célula en una posición operablemente asociada con el gen endógeno, aumentando con ello el nivel de expresión del gen.

Se conocen numerosas técnicas y son útiles para transportar los vectores descritos en la presente a las células, incluyendo el uso de agentes condensadores de ácidos nucleicos, electroporación, formación de complejos con amianto, polibreno, DEAE-celulosa, dextrano, liposomas, liposomas catiónicos, lipopoliaminas, poliornitina, bombardeo de partículas y microinyección directa (divulgado por Kucherlapati y Skoultschi, *Crit. Rev. Biochem.*, 16:349-379 (1984); Keown *et al.*, *Methods Enzymol.*, 185:527 (1990)).

Un vector puede transportarse hasta una célula hospedante de modo no específico o específico (es decir, a un subconjunto concreto de células hospedantes) a través de un medio de transporte vírico o no vírico. Los métodos de transporte preferidos de origen vírico incluyen líneas celulares de encapsulación que producen partículas víricas como receptores de la transfección para el vector descrito en la presente, en las que se han introducido señales de encapsulación vírica, tales como las de adenovirus, herpesvirus y papovavirus. Los métodos y medios de transporte de genes con base no vírica preferidos que también pueden emplearse incluyen inyección de ácidos nucleicos desnudos directa, péptidos y no péptidos condensadores de ácidos nucleicos, liposomas catiónicos y encapsulación en liposomas.

Se ha descrito el transporte directo del vector hacia el tejido y se ha logrado cierta expresión génica a corto plazo. El transporte directo del vector hacia el músculo (Wolff *et al.*, *Science*, **247**, 1465-1468, 1990), tiroides (Sykes *et al.*, *Human Gene Ther.*, **5**, 837-844, 1994), melanoma (Vile *et al.*, *Cancer Res.*, **53**, 962-967, 1993), piel (Hengge *et al.*, *Nature Genet.*, **10**, 161-166, 1995), hígado (Hickman *et al.*, *Human Gene Therapy*, **5**, 1477-1483, 1994) y después de la exposición del epitelio de las vías respiratorias (Meyer *et al.*, *Gene Therapy*, **2**, 450-460, 1995) se describe con claridad en la técnica anterior.

Se han empleado diversos péptidos derivados de las secuencias de aminoácidos de proteínas de la envuelta vírica para la transferencia de genes cuando se coadministran con complejos de polilisina-ADN (Plank *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269:12918-12924 (1994)); Trubetsky *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 3:323-327 (1992); documento WO 91/17773; documento WO 92/19287; y Mack *et al.*, *Am. J. Med. Sci.*, 307:138-143 (1994)) y sugieren que la co-condensación de conjugados de polilisina con lípidos catiónicos puede conducir a una mejora en la eficacia de la transferencia de genes. La solicitud de patente internacional WO 95/02698 describe el uso de componentes víricos para intentar aumentar la eficacia de la transferencia de genes lipídica catiónica.

Los agentes condensadores de ácidos nucleicos útiles incluyen espermina, derivados de la espermina, histonas, péptidos catiónicos, no péptidos catiónicos, tales como polietilimina (PEI) y polilisina. Los derivados de la espermina se refieren a análogos y derivados de la espermina e incluyen compuestos como los indicados en la solicitud de patente internacional WO 93/18759 (publicada el 30 de septiembre, 1993).

Se han utilizado enlaces disulfuro para conectar los componentes peptídicos de un vehículo de transporte (Cotten *et al.*, *Meth. Enzymol.*, 217:618-644 (1992)); véase también Trubetsky *et al.* (*supra*).

Los vehículos de transporte para el transporte de construcciones de ADN a células son conocidos en la técnica e incluyen complejos de ADN/policationes que son específicos para un receptor de la superficie celular, tal como se describe, por ejemplo, en Wu y Wu, *J. Biol. Chem.*, 263:14621 (1988); Wilson *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 267:963-967 (1992); y la patente de EEUU nº 5.166.320.

Se contempla el transporte de un vector empleando péptidos condensadores de ácidos nucleicos. Los péptidos condensadores de ácidos nucleicos, que son particularmente útiles para condensar el vector y transportar el vector hacia una célula, se describen en el documento WO 96/41606. Pueden unirse grupos funcionales a los péptidos útiles para el transporte de un vector, según se describe en el documento WO 96/41606. Estos grupos funcionales

pueden incluir un ligando que se dirija a un tipo celular específico, tal como un anticuerpo monoclonal, insulina, transferrina, asialoglicoproteína, o un azúcar. Por tanto, el ligando puede dirigirse a células de una manera no específica o de una manera específica que se restringe con respecto al tipo de célula.

5 Los grupos funcionales también pueden comprender un lípido, tal como palmitoílo, oleílo o estearoílo; un polímero hidrófilo neutro, tal como polietilenglicol (PEG), o polivinilpirrolidona (PVP); un péptido fusogénico, tal como el péptido HA del virus de la gripe; o una recombinasa o una integrasa. El grupo funcional también puede comprender una proteína de tráfico intracelular, tal como una secuencia de localización nuclear (NLS) y una señal de escape de endosomas o una señal que dirige una proteína directamente al citoplasma.

10 También se proporciona el polinucleótido, el vector o la célula hospedante descritos en la presente para su uso en terapia.

Preferiblemente, el polinucleótido, el vector o la célula hospedante se emplea en terapia génica.

También se proporciona el uso del polinucleótido, del vector o de la célula hospedante tal como se describen en la presente, para la fabricación de una composición para su uso en terapia génica.

15 También se proporciona un método de tratamiento, que comprende administrar a un paciente que necesite dicho tratamiento una dosis eficaz del polinucleótido, del vector o de la célula hospedante tal como se describen en la presente. Preferiblemente, el paciente padece una enfermedad que puede tratarse mediante terapia génica.

También se proporciona una composición farmacéutica que comprende el polinucleótido, el vector o la célula hospedante descritos en la presente, en combinación con un receptor farmacéuticamente aceptable.

20 También se proporciona el uso de un polinucleótido, un vector o una célula hospedante tal como se describen en la presente, en un sistema de cultivo celular para obtener el producto génico deseado. Los sistemas de cultivo celular adecuados son muy conocidos por los expertos en la técnica, y se describen a fondo en el conjunto de la bibliografía conocida por los expertos en la técnica.

25 También se proporciona el uso del polinucleótido tal como se describe en la presente, para producir una planta transgénica por métodos genéticos. La generación de plantas transgénicas que tienen mayor rendimiento, resistencia, etc. es muy conocida por los expertos en la técnica. También se proporciona una planta transgénica que contiene células que contienen el polinucleótido tal como se describe en la presente.

También se proporciona un animal no humano transgénico que contiene células, que contienen el polinucleótido descrito en la presente.

30 Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente pueden comprender el polinucleótido, el vector o la célula hospedante tal como se describen en la presente, si se desea mezclados con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, para una terapia para tratar una enfermedad o para proporcionar a las células de un tejido concreto una proteína o una función ventajosas.

35 El polinucleótido, el vector o la célula hospedante tal como se describen en la presente, o la composición farmacéutica, pueden administrarse a través de una vía que incluye la vía sistémica intramuscular, intravenosa, aerosol, oral (en forma sólida o líquida), tópica, ocular, como un supositorio, o como una inyección directa local e intraperitoneal y/o intratecal.

Por supuesto, el régimen de dosificación exacto debe ser determinado por los médicos individuales para los pacientes individuales y esto, a su vez, vendrá controlado por la naturaleza exacta de la proteína expresada por el gen de interés y por el tipo de tejido al que se dirige el tratamiento.

40 La dosificación también dependerá de la indicación de la enfermedad y de la vía de administración. De forma ventajosa, la duración del tratamiento será en general continuo, o hasta que las células mueran. El número de dosis dependerá de la enfermedad y de los datos de eficacia procedentes de ensayos clínicos.

45 La cantidad de polinucleótido o ADN vector administrado para una terapia génica eficaz preferiblemente estará en el intervalo de aproximadamente 50 ng-1000 µg del ADN vector/kg de peso corporal, y más preferiblemente estará en el intervalo de aproximadamente 1-100 µg del ADN vector/kg.

50 Aunque se prefiere administrar el polinucleótido, el vector o la célula hospedante a un mamífero para la captación *in vivo* por las células, puede utilizarse una estrategia *ex vivo*, en la que las células se retiran de un animal, se transducen con el polinucleótido o con el vector, y después se reimplantan en el animal. Al hígado, por ejemplo, puede accederse mediante una estrategia *ex vivo* retirando hepatocitos de un animal, transduciendo los hepatocitos *in vitro*, y reimplantando los hepatocitos transducidos al animal (por ejemplo, tal como se describe para conejos en Chowdhury *et al.*, *Science*, 254:1802-1805, 1991; o en seres humanos en Wilson, *Hum. Gene Ther.*, 3:179-222, 1992). Estos métodos también pueden ser eficaces para la administración a diversas poblaciones de células en los sistemas circulatorio o linfático, tales como eritrocitos, células T, células B y células precursoras hematopoyéticas.

- También se proporciona un modelo de mamífero para determinar la especificidad de tejido y/o la eficacia de la terapia génica que emplea el polinucleótido, el vector o la célula hospedante tal como se describen en la presente. El modelo de mamífero comprende un animal transgénico no humano cuyas células contienen el vector, tal como se describe en la presente. Los métodos para fabricar ratones transgénicos (Gordon *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:7380 (1980); Harbers *et al.*, *Nature*, 293:540 (1981); Wagner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:5016 (1981); y Wagner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:6376 (1981)), ovejas, cerdos, pollos (véase Hammer *et al.*, *Nature*, 315:680 (1985)), etc., son muy conocidos en la técnica y se contemplan para su uso. Dichos animales permiten el ensayo antes de las pruebas clínicas en seres humanos.
- Los animales transgénicos no humanos que contienen el polinucleótido tal como se describe en la presente también pueden utilizarse para la producción a largo plazo de una proteína de interés.
- En la presente también se proporciona el uso del polinucleótido tal como se describe en la presente en aplicaciones de genómica funcional. La genómica funcional se refiere principalmente a la secuenciación de genes expresados de forma específica en tipos celulares o estados de enfermedad concretos, y en la actualidad proporciona miles de nuevas secuencias génicas de interés potencial para objetivos de descubrimiento de fármacos o de terapia génica. El principal problema para utilizar esta información para el desarrollo de nuevas terapias es la manera de determinar las funciones de estos genes. Los UCOE pueden utilizarse en una serie de aplicaciones de la genómica funcional para determinar la función de secuencias génicas. Las aplicaciones de genómica funcional descritas en la presente incluyen, pero no se limitan a:
- (1) El uso del polinucleótido descrito en la presente para lograr una expresión sostenida de versiones antisentido de las secuencias génicas o de bancos de inactivación de ribozimas, determinando con ello los efectos de la inactivación del gen sobre el fenotipo celular.
 - (2) El uso del polinucleótido descrito en la presente para preparar bancos de expresión para las secuencias génicas, de forma que la administración a las células producirá una expresión fiable, reproducible y sostenida de las secuencias génicas. Las células resultantes, que expresan las secuencias génicas, pueden utilizarse en una diversidad de estrategias para la determinación de la función y el descubrimiento de fármacos. Por ejemplo, la generación de anticuerpos contra el producto génico para la neutralización de su actividad; la purificación rápida del producto de proteína del propio gen para su uso en estudios de selección estructural, funcional o de fármacos; o en la selección de fármacos basada en células.
 - (3) El uso del polinucleótido descrito en la presente en estrategias que implican a células precursoras embrionarias (ES) de ratón y ratones transgénicos. Una de las estrategias de la genómica funcional más poderosa implica la inserción aleatoria en genes de células ES de ratón de construcciones que sólo permitir la selección de fármacos tras su inserción en los genes expresados, y que pueden rescatarse con facilidad para la secuenciación (G. Hicks *et al.*, *Nature Genetics*, **16**, 338-334). Entonces pueden fabricarse con facilidad ratones transgénicos con mutaciones de inactivación en genes con secuencias nuevas para investigar su función. En la actualidad, esta tecnología funciona bien para 10% de los genes de ratón que se expresan bien en células ES de ratón. La incorporación de UCOE en las construcciones integradoras permitirá que esta técnica se extienda para identificar todos los genes expresados en ratones.
- Los siguientes ejemplos, que hacen referencia a las figuras, se ofrecen como ilustración. La preparación, el ensayo y el análisis de varios polinucleótidos representativos se describe en detalle a continuación. Los expertos en la técnica pueden adaptar estos procedimientos para la preparación y el ensayo de otros polinucleótidos.
- Las figuras muestran:
- La figura 1 muestra el locus del gen TBP humano.
- A: Representación esquemática de los clones pCYPAC-2 que contienen el gen TBP humano utilizado en este estudio. Las posiciones de los sitios de restricción *NotI* y *SacII* que pueden indicar las posiciones de genes no identificados están marcadas.
- B: Ilustración de la isla de CpG que abarca las regiones 5' TBP/C5. La densidad de los restos dinucleotídicos CpG implica que la isla exenta de metilación tiene una longitud de 3,4 kb y se extiende entre el sitio *FspI* dentro del intrón 1 de C5, y el sitio *HindIII* dentro del primer intrón de TBP.
- C: Es otra representación esquemática de los clones de la región TBP/C5. La disposición de los genes se ha invertido con respecto a la que aparece en la figura 1A. Nótese que el gen C5 también se denomina gen PSMB1. Se muestra una región contigua de 257 kb desde el telómero del cromosoma 6q con las posiciones de los 3 genes muy relacionados y los sitios de restricción pertinentes (B, *BssHII*; N, *NotI*; S, *SacII*). Se indican los clones PAC con sus nombres designados. También se muestra el subclon pBL3-TPO-puro. La distancia entre el sitio *NotI* dentro del primer exón de PDCD2 y el comienzo de la repetición telomérica es de aproximadamente 150 kb.
- La figura 2 muestra el análisis del fragmento terminal de ratones transgénicos TLN:3 y TLN:8. Un análisis de la

transferencia Southern de muestras de ADN de biopsia de la cola de ratones transgénicos se sondó con pequeños fragmentos de ADN localizados (a) en el extremo 3' del transgén, (b) en el extremo 5', (c) en el promotor, (d) -7,7 kb desde el sitio CAP del ARNm de TBP, (e) -12 kb desde el sitio CAP del ARNm de TBP. Los resultados para TLN:3 (a,b) demuestran que sólo aparece una banda de hibridación con ambas sondas de los extremos, lo cual no se corresponde con el tamaño predicho para cualquier concatámero de cabeza a cabeza, cabeza a cola, o cola a cola. Por tanto, parece que sólo existe una copia del transgén en esta línea. Sin embargo, el panel (c) muestra que, con una sonda de promotor, aparecen dos bandas que indican que también debe haber una segunda copia delecionada del transgén presente en esta línea. El análisis de TLN:8 en (a) muestra una banda de concatámero del transgén a 6 kb y una banda del fragmento del extremo a 7,8 kb. Como la banda de concatámero tiene el doble de intensidad que la del fragmento del extremo, esto indica un número de copias de tres para esta línea. La falta de hibridación en (b) sugiere que se ha producido una deleción en el extremo 5' de las tres copias, y se está trabajando para cartografiar esto. Los paneles (d) y (e) indican que los transgenes parecen estar intactos hasta 12 kb 5' del gen TBP.

La figura 3A muestra el análisis de ratones TLN:28. Se hibridaron transferencias Southern de ADN de TLN:28 con una sonda localizada en el mismo extremo 3' del locus del transgén. Se observó que múltiples bandas se hibridaban con esta sonda, lo cual sugiere múltiples acontecimientos de integración. Sin embargo, se observa una intensa banda de concatámero en la posición esperada para un acontecimiento de integración de cabeza a cola. La comparación de las intensidades de señal entre esto y los fragmentos de los extremos sugiere un número de copias de aproximadamente 4 en esta línea.

La figura 3B muestra un resumen de la organización de los transgenes en líneas de ratón TLN. TLN:3 contiene dos copias del transgén en una disposición de cabeza a cola. Se ha producido una deleción en ambos extremos 5' y 3' de esta disposición. La deleción 5' se extiende hacia la región flanqueante 5' de TBP, delecionando completamente el gen C5 en esta copia. En el extremo 3', la deleción se extiende hacia la 3' UTR de TBP, dejando el gen C5 intacto. Por tanto, este animal posee una única copia del gen C5 y una única copia funcional del gen TBP. TLN:8 contiene una disposición de cabeza a cola de tres copias. Cada copia parece poseer una deleción en la misma región 5', aunque la extensión de esta deleción no se conoce hasta la fecha, pero no se extiende al gen C5 porque se detecta ARNm de C5 humano en esta línea. TLN:28 contiene 5 copias en una configuración de cabeza a cola, pero también se observa una serie de fragmentos adicionales, lo cual indica que esta disposición puede ser más compleja.

La figura 3C muestra un resumen actualizado de la organización de los transgenes en las líneas de ratón TLN. La figura muestra las organizaciones predichas de las disposiciones de transgenes de TLN en cada una de las líneas de ratón. Sólo se muestran los genes funcionales y sólo se indica una de las 3 posibles disposiciones del ratón TLN:3.

La figura 4 muestra el análisis de la deleción en ratones TLN:3. Una serie de sondas se hibridaron con transferencias Southern de ADN de TLN:3. Sólo la sonda más 5' produjo una única banda, lo cual indica que la copia delecionada no contenía esta secuencia. La deleción se extiende hasta una región cadena arriba de los principales sitios CAP del ARNm de TBP, el sitio de unión al factor Ets, y el sitio hipersensible a la ADNasa I. En la actualidad no se sabe si la región 5' completa está delecionada en esta copia o si se ha producido una pequeña deleción interna.

La figura 5 muestra la comparación de las secuencias de ARNm de TBP y C5 de ser humano y de ratón. (a) La secuencia de ARNm de C5 humano del nt 358 al 708 (nº de registro de GenBank D00761) muestra una significativa homología con la secuencia de ratón (indicada por una barra vertical) del nt 355 al 705 (nº de registro de GenBank X80686). Una amplificación mediante RT-PCR de ARNm humano y de ratón produce una mezcla de moléculas de ADN de 350 pb de ambas especies. Las localizaciones de los cebadores (destacadas, 5' cebador C5RTF, 3' cebador C5R) están colocadas para que abarquen una serie de exones, eliminando el error de la amplificación mediante PCR por ADN genómico contaminante. Aunque la estructura de intrón/exón del gen humano o de ratón es limitada, la distancia entre los cebadores es tal que están colocados en diferentes exones. Los productos de la PCR de ratón y humanos pueden distinguirse mediante una incubación con *Pst*I que sólo cortará la secuencia de ratón. El radiomarcaje del cebador C5RTF produce un producto de 173 nt cuando se resuelve en un gel de poliacrilamida desnaturizante. (b) Análisis similar para la secuencia de ARNm de TBP humano desde el nt 901 en el exón 5 al nt 1185 en el exón 7 (nº de registro de GenBank M55654) y de ARNm de TBP de ratón desde las posiciones 655 a 939 (nº de registro de GenBank D01034). El último nucleótido de un exón y el primer nucleótido del siguiente exón se muestran en rojo. Los cebadores utilizados (destacados) fueron 5' TB-22 y 3' TB-14. El tamaño del producto amplificado de ambas especies con los cebadores mostrados (recuadrados) es de 284 pb. El sitio *Bsp*14071 a 63 nt del extremo 5' de los productos de la PCR permite distinguir las transcripciones de ratón y humana. El tamaño del producto específico humano sobre un gel de poliacrilamida con TB-14 radiomarcado es de 221 nt.

La figura 6 muestra el análisis de la expresión de TBP humana en los ratones transgénicos TLN. Se usó el ARN total (1 µg) de diversos tejidos de ratón en una reacción de transcripción inversa utilizando la transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar. Como control también se utilizó ARN humano de células K562 y ARN de ratón no transgénico. (a) Localización del sitio de reconocimiento para endonucleasas de restricción específicas humanas dentro de los productos de la RT-PCR de TB22/14. (b) Análisis de la expresión de TLN:3 en diversos tejidos. Tal como puede observarse, el nivel de expresión humana es fisiológica en todos los tejidos. (c) Análisis similar para

- TLN:8. (d) El análisis de TLN:28 indica que los niveles de ARNm de TBP humana de nuevo se expresan a niveles comparables con el gen endógeno.
- 5 La figura 7 muestra el análisis de la expresión de C5 humana en los ratones transgénicos TLN. El análisis se realizó como en la figura 6. El panel superior (a) muestra la localización del sitio de reconocimiento para endonucleasas de restricción específicas de ratón dentro de los productos de la RT-PCR de C5RTF/C5R. (b) Puede observarse el análisis de la expresión de C5 en diversos tejidos de transgénicos TLN, y el nivel de expresión humana es fisiológica en todos los tejidos ensayados.
- La figura 8 muestra un resumen de la cuantificación de (a) la expresión del gen TBP humano, y (b) la expresión del gen C5 humano en ratones transgénicos TLN.
- 10 La figura 9 muestra una representación esquemática del cósmido pWE-TSN.
- La figura 10 muestra la determinación del número de copias de transgenes de los clones de células L de pWE-TSN. Células L de ratón fueron transfectadas con el cósmido pWE-TSN, se aisló el ADN y se utilizó para generar transferencias Southern. Las transferencias se sondaron con un fragmento de ADN procedente de un locus *vav* murino de dos copias y una sonda localizada -7 kb del gen TBP. Se determinó el número de copias a partir de la proporción del control de TLN:8 de tres copias, y se indican en la parte inferior de cada carril. El número de copias varía de 1 a 60.
- 15 La figura 11 muestra un resumen de la expresión de clones de cósmidos pWE-TSN en células L de ratón.
- La figura 12 muestra el análisis de sitios hipersensibles a la ADNasa I en el locus TBP humano. Se utilizaron sondas localizadas en una región de 40 kb que rodea al gen TBP para sondear transferencias Southern de núcleos de K562 digeridos con concentraciones crecientes de ADNasa I. Sólo se encontraron dos sitios hipersensibles, en los promotores de los genes PSMB1 y TBP. El aumento en la concentración de la ADNasa I se muestra de izquierda a derecha en todos los casos.
- 20 La figura 13A muestra una representación esquemática del locus del gen hnRNP A2 humano que muestra el gran clon MA160 de 160 kb derivado de pCYPAC. La flecha inversa indica el gen HP1H- γ . Los dos sitios *SacII*, que pueden representar la presencia de islas exentas de metilación, están recuadrados.
- 25 La figura 13B muestra el subfragmento *AatII* de 60 kb derivado de MA160. Ambos se han utilizado para la generación de ratones transgénicos.
- La figura 13C muestra el grado en que la isla de CpG (barra roja) abarca el extremo 5' del gen hnRNP A2. Los restos CpG se indican como líneas verticales. Los números están en relación con el sitio de inicio de la transcripción (+1) del gen hnRNP A2 (flecha continua). La flecha discontinua indica la posición del gen HP1H- γ transcrito de modo divergente. El subfragmento de 16 kb que contiene el gen hnRNP A2 intacto también se muestra.
- 30 La figura 14 muestra la cuantificación de la expresión del gen hnRNP A2 humano y de ratón. El ARN humano (K562) y de ratón se sometió a una transcripción inversa con un cebador para el exón 12 del gen hnRNP A2. Las muestras posteriormente se amplificaron mediante PCR con los cebadores Hn9 y Hn11 que abarcan los exones 10 a 12. El producto producido entonces se digirió con enzimas aleatorias para descubrir un sitio de corte exclusivo de cada especie. Puede observarse que el producto de ratón contiene un *HindIII* que no está presente en el producto humano.
- 35 La figura 15 muestra el análisis de la expresión de hnRNP A2 humana en ratones transgénicos microinyectados con el fragmento Aa60 (figura 13B). El ARN total de diversos tejidos se analizó como se describe en la figura 15. Después de una RT-PCR, las muestras no se trataron (-) o se digirieron con *HindIII* (+), y después se separaron en un gel de poliacrilamida para resolver los productos humanos (H) y de ratón (M). La intensidad de las bandas se midió mediante análisis con PhosphorImager.
- 40 La figura 16 muestra el análisis de la expresión de hnRNP A2 humana por ratones transgénicos microinyectados con el fragmento *Nrul* de 160 kb (figura 13A). Un ratón transgénico se diseccionó y se extrajo el ARN total de los tejidos. El ARN total se sometió a transcripción inversa con Hn11 y después se amplificó mediante PCR utilizando los cebadores Hn9 y Hn11, de los cuales Hn9 estaba radiomarcado en su extremo con ³²P. Las muestras no se trataron (-) o se digirieron con *HindIII* (+), y después se separaron en un gel de poliacrilamida al 5% en presencia de urea 8 M como desnaturalizante para resolver los productos humano (H) y de ratón (M). La intensidad de las bandas se midió mediante análisis con PhosphorImager.
- 45 La figura 17 muestra la cuantificación de la expresión del transgén hnRNP A2. El análisis de RT-PCR de la expresión del transgén hnRNP A2 humano en diversos tejidos de ratón se cuantificó mediante PhosphorImager. Los niveles se indican como porcentaje de expresión de hnRNP A2 murina sobre una base de número de copias del transgén. A: Ratones que portan MA160 (véase la figura 15). B: Ratones que portan Aa60 (véase la figura 16).
- 50 La figura 18 muestra el cartografiado de los sitios hipersensibles a la ADNasa I del locus del gen hnRNP A2 humano.

- Se digirieron núcleos de K562 con concentraciones crecientes de ADNasa I. El ADN de estos núcleos posteriormente se digirió con una combinación de las endonucleasas de restricción *AatII* y *NcoI* y se realizó un análisis de la transferencia Southern. La transferencia entonces se sondó con un fragmento *EcoRI/NcoI* de 766 pb del exón II del gen hnRNP A2. Se identificaron tres sitios hipersensibles que se corresponden con las posiciones -1,1, -0,7 y -0,1 kb 5' del sitio de inicio de la transcripción de hnRNP A2.
- La figura 19 muestra el análisis bioinformático y las comparaciones de las secuencias entre los loci de hnRNP A2 y TBP.
- La figura 20 muestra la secuencia de nucleótidos de un clon genómico del locus de TBP comenzando en el sitio 5' *HindIII* (nucleótidos 1 a 9098).
- La figura 21 muestra la secuencia de nucleótidos de un clon genómico del locus de hnRNP comenzando en el sitio 5' *HindIII* mostrado en la figura 22 (nucleótidos 1 a 15071).
- La figura 22 muestra los vectores de expresión que contienen subfragmentos localizados en la región del promotor dual entre RNP y HP1H- γ que se diseñaron utilizando los genes indicadores GFP y Neo^R. Los vectores son: un vector control con el promotor de RNP (RNP) que dirige la expresión de GFP/Neo; un vector que comprende el fragmento de 5,5 kb cadena arriba de la región del promotor de RNP y el promotor de RNP (5,5RNP); vectores contruidos utilizando una estrategia aceptora de corte y empalme, en la que las secuencias consenso de la ramificación/aceptor de corte y empalme (derivadas del exón 2 del gen RNP) se clonaron enfrente del gen GFP, dando como resultado el exón 1/parte del intrón 1 cadena arriba de GFP (7,5RNP, que porta aproximadamente 7,5 kb del gen RNP que precede al gen GFP); y un vector que comprende el fragmento de 1,5 kb cadena arriba de la región del promotor de RNP y el promotor de RNP (1,5RNP).
- La figura 23 muestra los vectores de expresión que contienen subfragmentos localizados en la región del promotor dual entre RNP y HP1H- γ que se diseñaron utilizando los genes indicadores GFP y Neo^R. Los vectores comprenden el promotor de CMV heterólogo. Los vectores son: vectores control con el promotor de CMV que dirige la expresión de GFP/Neo con (a) secuencias de sitios de entrada a ribosomas internos (CMV-EGFP-IRES), y (b) sin secuencias de sitios de entrada a ribosomas internos y un promotor de SV40 cadena arriba del gen indicador Neo^R (CMV-EGFP); un vector que comprende el fragmento de 5,5 kb cadena arriba de la región del promotor de RNP y el promotor de CMV que dirige la expresión de GFP/Neo con secuencias de sitios de entrada a ribosomas internos (5,5CMV); un vector que comprende una secuencia de 4,0 kb que incluye los promotores de RNP y HP1H- γ , y el promotor de CMV que dirige la expresión de GFP/Neo con un promotor de SV40 cadena arriba del gen indicador Neo^R (4,0CMV); y un vector que comprende secuencias de 7,5 kb del gen RNP que incluyen el exón 1 y parte del intrón 1, y el promotor de CMV que dirige la expresión de GFP/Neo con un promotor de SV40 cadena arriba del gen indicador Neo^R (7,5CMV).
- La figura 24 muestra el número de colonias de G418^R producidas mediante la transfección de las construcciones de RNP y CMV en células CHO.
- La figura 25 muestra la comparación de la expresión de GFP en clones de CHO seleccionados con G418 transfectados con construcciones de RNP y CMV con y sin elementos cadena arriba.
- La figura 26 muestra la media de la mediana de los niveles de fluorescencia de GFP en clones de CHO seleccionados con G418 transfectados con construcciones de RNP con y sin elementos cadena arriba a lo largo de un periodo de 40 días.
- La figura 27 muestra los perfiles de FACS de la expresión de GFP de agrupaciones de CMV-GFP cultivadas en ausencia de G418, seguidos a lo largo de un periodo de 103 días.
- La figura 28 muestra los perfiles de FACS de la expresión de GFP de agrupaciones de 5,5CMV-GFP cultivadas en ausencia de G418, seguidos a lo largo de un periodo de 103 días.
- La figura 29 muestra el porcentaje de células transfectadas que expresan GFP reduciéndose a lo largo de un periodo de 68 días.
- La figura 30 muestra la mediana de la fluorescencia de células seleccionadas con G418 transfectadas con construcciones de CMV a lo largo de un periodo de 66 días.
- La figura 31 muestra el porcentaje de células seleccionadas con G418 positivas transfectadas con construcciones de CMV a lo largo de un periodo de 66 días.
- La figura 32 muestra la mediana de la fluorescencia de células seleccionadas con G418 transfectadas con construcciones de CMV en el día 13 después de la transfección.
- La figura 33 muestra el porcentaje de células seleccionadas con G418 positivas transfectadas con construcciones de CMV a lo largo de un periodo de 27 días.

La figura 34 muestra el número de colonias después de la transfección de células CHO con diversas construcciones de CMV.

La figura 35 muestra el análisis de la transferencia por puntos de ARNm de PMSB1, PDCD2 y TBP humanos. Distribución tisular de los ARNm procedentes de los genes dentro del agrupamiento de TBP utilizando un análisis de la transferencia por puntos de ARNm de múltiples tejidos humanos: cada segmento se carga con una cantidad concreta de ARN poli(A)⁺ (A, mostrado en ng debajo de cada tejido). La transferencia por puntos se hibridó con (B) ADNc de PSMB1, (C) un fragmento genómico de 4,7 kb (MA445) que contiene un gen PDCD2 parcial, y (D) ADNc de TBP. Una sonda control de ubiquitina (E) demuestra que el proceso de normalización tuvo éxito y que el ARN estaba intacto.

La figura 36 muestra el efecto del cultivo a largo plazo en clones de pWE-TSN. Una serie de clones de células L de ratón pWE-TSN se cultivaron de modo continuo durante 60 generaciones. Para la congelación/descongelación, los clones se conservaron en nitrógeno líquido durante al menos 2 días, se descongelaron y se cultivaron durante 1 semana antes de recolectar el ARN, y las células se congelaron para el siguiente ciclo. Los experimentos se realizaron con y sin G418 presente en el medio. La expresión de TBP se ensayó utilizando oligonucleótidos TB14 y una endonucleasa de restricción específica de seres humanos (indicado por +), tal como se describe en la presente. Todas las muestras se analizaron sin la enzima y eran idénticas. También se ofrece una muestra representativa (-).

La figura 37 muestra el análisis de la expresión del gen TBP en clones de pBL3-TPO-puro. El análisis de la expresión del gen TBP se realizó utilizando los cebadores TB14 con el ARN total aislado de células L de ratón transfectadas con la construcción de pBL3-TPO-puro, tal como se describe en la presente. Un (+) por encima del carril indica que el producto de la PCR había sido digerido con una enzima específica humana, (-) indica que no hubo digestión (control). También se muestran los controles de ARN humano (K562) y de ratón (pulmón no transgénico), así como un control sin ARN (dH₂O). Las flechas indican las posiciones de los productos específicos humanos y no cortados (humano y de ratón o de ratón). Los valores de la expresión están corregidos para el número de copias, de tal forma que una expresión del 100% significa que una única copia del transgén se está expresando al mismo nivel que uno de los dos genes de ratón endógenos. Todos los números de copias variaban de 1-2 y se indican por encima de cada barra.

La figura 38 muestra unos análisis de transferencias por puntos de (B) la expresión de ARNm de HP1 γ humano, y (C) ARNm de hnRNP A2 humano. Distribución tisular del ARNm de HP1 γ y del ARNm de hnRNP A2 procedente del agrupamiento de hnRNP A2 utilizando un análisis de la transferencia por puntos de ARNm de múltiples tejidos humanos: cada segmento se carga con una cantidad concreta de ARN poli(A)⁺ (A, mostrado en ng debajo de cada tejido). La transferencia se hibridó con (B) un fragmento de 717 nt procedente de la secuencia de ADNc de HP1 γ , y con (C) una sonda de PCR de 1237 nt generada utilizando los cebadores de PCR 5' GCTGAAGCGACTGAGTCCATG 3' y 5' CCAATCCATTGACAAAATGGGC 3' para la expresión de hnRNP A2.

La figura 39 muestra los resultados del análisis FISH del transgén TBP integrado en células Ltk de ratón que demuestra la integración en la heterocromatina centromérica. (A) muestra una integración no centromérica, (B) y (C) muestran dos integraciones centroméricas distintas.

La figura 40 muestra la expresión de eritropoyetina (EPO) en agrupaciones de células CHO transfectadas de modo estable con construcciones de CET300 y CET301 que comprenden el subfragmento de 7,5 kb localizado en las regiones de los promotores duales entre RNP y HP1H- γ , el promotor de CMV y el gen que codifica EPO.

La figura 41 muestra la expresión de EGFP fluorescente de clones de células Ltk de ratón transfectadas con 16RNP-EGFP y su relación con el número de copias. Los clones F1, G6 e I3 muestran a 16RNP-EGFP colocalizado con la heterocromatina centromérica murina.

La figura 42 muestra el análisis FISH de células Ltk de ratón transfectadas con 16RNP-EGFP. (A) demuestra que el clon H4 tiene una integración no centromérica. (B, C y D) demuestran que los clones G6, F1 e I3 tienen integraciones centroméricas, respectivamente. t es el 16RNP-EGFP y c es el centrómero de ratón.

La figura 43 muestra los perfiles FACS de la expresión de EGFP de células HeLa transfectadas con EBV que comprende 16RNP cultivadas en presencia de higromicina B a lo largo de un periodo de 41 días.

La figura 44 muestra los perfiles FACS de la expresión de EGFP de células HeLa transfectadas con EBV que comprende 16RNP cultivadas en presencia de higromicina B a lo largo del periodo y cuando la higromicina B se retira desde el día 27.

La figura 45 muestra la producción de EPO en células transfectadas de modo transitorio con CET300, CET301 y CMV-EPO.

La figura 46 muestra los resultados de ELISA que detecta la expresión de NTR para diversas construcciones de AFP en células HepG2 (AFP+ve) y KLN205 (AFP-ve).

La figura 47 muestra la expresión de NTR en tumores HepG2 e hígados de ratones hospedantes tras una inyección intratumoral de CTL102/CTL208.

La figura 48 muestra la inhibición del crecimiento de tumores HepG2 tras la inyección intratumoral de CTL102/CTL208 y la administración de CB1954.

5 La figura 49 muestra de modo esquemático la estructura de los vectores CET200 y CET210.

La figura 50 muestra las construcciones generadas y los fragmentos utilizados en comparación con el locus genómico endógeno de hnRNP A2.

La figura 51 muestra una gráfica del análisis FACS con la mediana de la fluorescencia de poblaciones de HeLa transfectadas de modo transitorio con un plásmido no replicador.

10 La figura 52 muestra vistas representativas de campos de pequeño aumento de poblaciones de células HeLa transfectadas de modo transitorio con un plásmido no replicador.

Ejemplos

Materiales y métodos

Selección de bancos

15 Clones genómicos que abarcan los loci de TBP y hnRNP A2 humanos se aislaron a partir de un banco de cromosomas artificiales derivados de P1 (pCYPAC-2 (CING-1; Ioannou *et al.*, 1994). La selección se realizó mediante una reacción en cadena de polimerasa (PCR) de lisados bacterianos.

Cebadores para TBP

20 Se diseñaron cebadores utilizando la secuencia genómica parcial descrita por Chalut *et al.* (1995), y fueron los siguientes:

TB3 [5' ATGTGACAACAGTGCATGAACTGGGAGTGG 3'] (-605) y TB4 [5' CACTTCCTGTGTTTCCATAGGTAAGGAGGG 3'] (-119) se hibridan con la región no traducida 5' (5'UTR) del gen TBP y producen un producto de la PCR de 486 pb procedente sólo del gen humano (véanse los resultados). Los números entre paréntesis son con respecto al sitio CAP del ARNm definido por Peterson *et al.* (1990).

25 TB5 [5' GGTGGTGTGTGAGAAGATGGATGTTGAGG 3'] (1343) y TB6 [5' GCAATACTGGAGAGGTGGAATGTGTCTGGC 3'] amplifican una región de la 3'UTR y producen un producto de 415 pb procedente de ADN humano y de ratón debido a una significativa homología de secuencia en esta región. Los números entre paréntesis son con respecto a la secuencia de ADNc definida por Peterson *et al.* (1990).

Cebadores para hnRNP A2

30 Se diseñaron cebadores para hnRNP A2 a partir de la secuencia genómica descrita por Biamonti *et al.* (1994).

Hn1 [5' ATTTCAAACCTGCGCAGCTTTCTCACCGC 3'] (-309) y Hn2 [5' CATTGATTTCAAACCCGTTACCTCC 3'] (199) en la 5'UTR producen un producto de la PCR de 508 pb. Hn3 [5' GGAAACTTTGGTGGTAGCAGGAACATGG 3'] (7568) y Hn4 [5' ATCCATCCAGTCTTTTAAACAAGCAG 3'] (8176) amplifican una región en el penúltimo exón (número 10) para producir un producto de la PCR de 607 pb. Los números entre paréntesis son con respecto al punto de inicio de la transcripción definido por Biamonti *et al.* (1994).

35

Protocolo de PCR

Se realizó una PCR utilizando 1 µl de material de clones agrupado en una reacción que contenía 25 mM de cada uno de dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 1 x tampón de reacción (Tris-HCl 50 mM [pH 9,1], (NH₄)₂SO₄ 16 mM, MgCl₂ 3,5 mM, albúmina de suero bovina 150 µg/ml), 2,5 unidades de polimerasa Taq Supreme (Fermentas), y 1 µM de cada cebador en un volumen total de reacción de 25 µl. Las condiciones de los ciclos fueron: 4 ciclos de 94 °C durante 1 minuto, 62 °C durante 1 minuto, 72 °C durante 1 minuto, seguido de 30 ciclos de 94 °C durante 1 minuto, 58 °C durante 1 minuto, 72 °C durante 1 minuto. Los clones identificados positivamente se cultivaron en caldo de cultivo T (12 g de tripton, 24 g de extracto de levadura (ambos de Difco), 23,1 g de KH₂PO₄, 125,4 g de K₂HPO₄, glicerol al 0,4% por 1 litro de agua destilada, Tartof y Hobbs, 1987) que contenía kanamicina 30 µg/ml. Se prepararon cepas permanentes de bacterias congelando suspensiones individuales en 1 x tampón de conservación (K₂HPO₄ 3,6 mM, KH₂PO₄ 1,3 mM, citrato de sodio 2,0 mM, MgSO₄ 1 mM, glicerol al 4,4%) a -80 °C.

45

Aislamiento de ADN de CYPAC-2

Se aisló ADN plasmídico utilizando un método de lisis alcalina modificada (Birnboim y Dolly, 1979) como sigue. Matraces de vidrio de 2 litros amortiguados que contenían 1 litro de caldo de cultivo T se inocularon con una única

5 colonia bacteriana y se incubaron a 37 °C durante 16 horas con agitación constante. Las bacterias se recolectaron mediante centrifugación en una centrífuga Beckman J6 a 4200 rpm (5020 x g, de forma similar en todas las etapas posteriores) durante 10 minutos. Los sedimentos se agitaron en vórtice, se resuspendieron en Tris-HCl 15 mM [pH 8,0], EDTA 10 mM, ARNasa 10 µg/ml (200 ml) y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadió disolución de lisis (NaOH 0,2 M, SDS al 1%; 200 ml) con mezclado suave durante 2 minutos, seguido de la adición de 200 ml de disolución de neutralización (acetato de potasio 3 M [pH 5,5]) con mezclado suave durante 5 minutos más. Se dejó que los restos bacterianos precipitasen durante 1 hora a 4 °C y después se retiraron mediante una centrifugación durante 15 minutos y la filtración del sobrenadante a través de una gasa estéril. Se añadió isopropanol (400 ml; concentración final al 40%) para precipitar el ADN plasmídico a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de una centrifugación durante 15 minutos y del lavado del sedimento con etanol al 70%, el ADN se resuspendió en 4 ml de una disolución de 1 x TNE (Tris-HCl 50 mM [pH 7,5], EDTA 5 mM, NaCl 100 mM), SDS al 0,1% y proteinasa-K 0,5 mg/ml (Cambio) para retirar las proteínas residuales. Tras una incubación a 55 °C durante 1 hora y una posterior extracción en fenol:cloroformo (1:1 en v/v), el ADN precipitó con 1 volumen de etanol o isopropanol al 100% y se vertió en 2 ml de tampón TE (Tris-HCl 10 mM [pH 8,0], EDTA 1 mM). Se obtuvieron habitualmente unos rendimientos de 50 µg/ml.

Cartografiado de enzimas de restricción

20 El cartografiado de enzimas de restricción se realizó hibridando oligonucleótidos derivados de las secuencias de los genes pCYPAC-1 y TBP con transferencias Southern (Southern, 1975) del ADN clonado digerido con enzimas de restricción según se describió anteriormente. Se utilizaron oligonucleótidos que se hibridan con las secuencias de pCYPAC-2 justo proximales al sitio *Bam*HI en el que se clonan los fragmentos genómicos, cuyas secuencias fueron:

EY2: [5'-TGCGGCCGCTAATACGACTCACTATAGG-3']

189: [5'-GGCCAGGCGGCCGCGCCAGGCCTACCCACTAGTCAATTCGGGA-3']

25 La excisión de cualquier inserto genómico procedente de pCYPAC-2 con *Not*I significa que el fragmento liberado retendrá una pequeña cantidad de la secuencia plasmídica a ambos lados. En el lado de EY2, serán 30 pb con la mayoría de la secuencia EY2 dentro del fragmento escindido. La hibridación de este oligonucleótido con los clones pCYPAC-2 digeridos con *Not*I debería, por tanto, destacar la banda genómica liberada en un análisis de la transferencia Southern. En el lado de 189, el fragmento escindido contendrá 39 pb de la secuencia plasmídica, y la mayoría de la secuencia del oligonucleótido 189 está 3' con respecto al sitio *Not*I, dentro de pCYPAC-2. Por tanto, este oligonucleótido se hibridará con el vector en digeridos de *Not*I de los clones de pCYPAC-2. Aproximadamente 100 ng de ADN plasmídico se sometió a una digestión con endonucleasas de restricción utilizando las condiciones recomendadas por los fabricantes (Fermentas), y después se sometió a una electroforesis en geles de agarosa al 0,7% en 0,5 x tampón TAE (Tris-acetato 20 mM [pH 8,0], EDTA 1 mM, bromuro de etidio 0,5 µg/ml) o en geles de campo pulsado. La electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) se realizó en un sistema CHEF-DRII (Biorad) en geles de PFGE al 1%-agarosa (FMC)/0,5 x TAE a 6 V/cm durante 14 horas con unos tiempos de conmutación de 1 segundo a 30 segundos. Se emplearon condiciones idénticas para todos los análisis de PFGE en este estudio. Los geles se tiñeron con una disolución de bromuro de etidio 1 µg/ml antes de ser fotografiados bajo luz ultravioleta.

40 Para la preparación de los análisis de la transferencia Southern, el ADN se despurinó exponiendo en primer lugar los geles de agarosa a luz ultravioleta de 254 nm (180.000 µJ/cm² en un reticulador de UVP, UVP) y después desnaturalizando mediante una inmersión en NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M durante 40 minutos con un cambio de disolución después de 20 minutos. El ADN se trasladó a una membrana de nailon HYBOND-N (Amersham) mediante acción capilar en un volumen fresco de disolución de desnaturalización durante 16 horas. La reticulación de los ácidos nucleicos al nailon se logró mediante la exposición a luz ultravioleta de 254 nm a 120.000 µJ/cm². Las membranas se neutralizaron en Tris-HCl 0,5 M [pH 7,5], NaCl 1,5 M durante 20 minutos y se enjuagaron en 2 x SSC antes del uso (1 x SSC es NaCl 150 mM, citrato de sodio 15 mM [pH 7,0]).

45 Las sondas oligonucleotídicas se marcaron en el extremo 5' con polinucleótido quinasa de T4 y ³²P-γATP para permitir la detección de fragmentos específicos en análisis de la transferencia Southern. Cada experimento empleó 100 ng de oligonucleótido marcado en una reacción que contenía 2 µl de ³²P-γATP (>4000 Ci/mmol; 10 mCi/ml, Amersham) y 10 unidades de polinucleótido quinasa de T4 (Fermentas) en el tampón especificado por los fabricantes. Después de una incubación a 37 °C durante 2 horas, los nucleótidos no incorporados se retiraron mediante una cromatografía en columnas de Sephadex G50 (Pharmacia) equilibradas con agua. Las sondas marcadas en el extremo se marcaron generalmente hasta una actividad específica de >1 x 10⁸ dpm/µg.

55 La hibridación se realizó con membranas intercaladas entre mallas de nailon dentro de botellas de vidrio (Hybaid) que contenían 25 ml de mezcla de hibridación precalentada (EDTA 1 mM [pH 8,0], Na₂HPO₄ 0,25 M [pH 7,2], SDS al 7%; Church y Gilbert, 1984) y ADN de testículo de salmón cizallado desnaturalizado 100 µg/ml. Después de una prehibridación a 65 °C durante 1 hora, la disolución se decantó y se reemplazó por una disolución idéntica que contenía la sonda marcada. Se determinó la temperatura óptima de hibridación de forma experimental y se descubrió que era 20 °C por debajo de la T_m para el oligonucleótido en tampón TE, calculada como T_m = 59,9 + 41[% de GC] - [675/longitud del cebador]). Después de 16 horas se retiraron las membranas de hibridación y se lavaron

con tres lavados de dos minutos con 6 x SSC, SDS al 0,1%, seguido de una exposición a una película de rayos X (BioMAX, Kodak).

Construcciones de ADN

5 Una región de ADN genómico de 44 kb, que abarca el gen TBP con 12 kb de ambas secuencias flanqueantes 5' y 3', se derivó del clon de pCP2-TNN de pCYPAC-2 (véase la figura 9) como un fragmento *NotI*. Éste se clonó en el vector cosmidico pWE15 (Clontech) para generar pWE-TSN (figura 9). El cambio de vector fue necesario, ya que el plásmido pCYPAC-2 no contiene un marcador seleccionable para los estudios de transfección de células eucariotas. La digestión de pCP2-TNN con *NotI* libera un fragmento de 44 kb que se extiende desde el extremo 5' del inserto genómico hasta el sitio *NotI* presente en la secuencia genómica localizado 12 kb cadena abajo del último exón de TBP (véase la figura 9). Además, se produjeron fragmentos que contenían los 20 kb restantes de la secuencia flanqueante 3' en este clon y el vector pCYPAC-2. La reacción de acoplamiento se realizó utilizando aproximadamente 1 µg de pCP2-TNN digerido con *NotI* y 200 ng de pWE15 cortado de manera similar en una reacción de 10 µl utilizando condiciones según se describió anteriormente. Después de una inactivación con calor de la ADN ligasa de T4, la mezcla de acoplamiento completa se encapsuló en partículas de fago lambda infecciosas con Gigapack Gold III (Stratagene). El bacteriófago recombinante se conservó en tampón SM (500 µl de Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, MgSO₄ 8 mM, gelatina al 0,01% (en p/v), cloroformo al 2%). La infección se realizó como sigue: se centrifugaron 5 ml de un cultivo realizado durante la noche de *E. coli* DH5α (3000 x g, 5 minutos) y las bacterias se resuspendieron en 2,5 ml de MgCl₂ 10 mM. Se mezclaron volúmenes iguales de material encapsulado y *E. coli* y se incubaron a 25 °C durante 15 minutos, tras lo cual se añadieron 200 µl de caldo de cultivo L y la mezcla se incubó a 37 °C durante 45 minutos más. La suspensión se cultivó en placas de agar de LB-ampicilina y se analizaron las colonias individuales como minipreparaciones al día siguiente. Se prepararon grandes cantidades de pWE-TSN a partir de los cultivos de 1 litro como en el caso de los clones de pCYPAC-2.

Métodos de subclonación del ADN de pCYPAC-2

25 Se empleó el siguiente procedimiento para subclonar fragmentos de enzimas de restricción pequeños (menos que 10 kb) derivados de los clones de pCYPAC-2. El ADN se digirió con enzimas de restricción y se sometió a una electroforesis en geles de agarosa de bajo punto de fusión al 0,6% (FMC) con fotografía de ultravioleta realizada a una longitud de onda de 365 nm para minimizar la mella del ADN teñido con bromuro de etidio (Hartman, 1991). El área del gel que contenía los fragmentos con la gama de tamaños deseada se cortó del gel, se fundió a 68 °C durante 10 minutos, y se dejó que se equilibrase a 37 °C durante 5 minutos más. El vector plasmídico pBluescriptKS(+) (Stratagene) se digirió con enzimas de restricción de forma similar para producir unas terminaciones compatibles con el ADN derivado de pCYPAC-2, se trató con 10 unidades de fosfatasa intestinal de ternera (Fermentas) durante 1 hora para minimizar el autoacoplamiento y se purificó mediante una extracción con fenol:cloroformo (1:1, en v/v), seguido de una precipitación en etanol. Los cortes del gel fundidos se mezclaron con 50 ng de esta preparación de vector para producir un exceso molar de 4:1 de moléculas del fragmento al vector. Se añadió ADN ligasa de T4 (10 unidades, Fermentas), junto con el tampón especificado, y la mezcla se incubó a 16 °C durante 16 horas, tras lo cual la enzima se inactivó con calor (65 °C durante 20 minutos) para mejorar la eficacia de la transformación (Michelsen, 1995). Se realizó una preparación de *E. coli* DH5α competente en cloruro de calcio y una posterior transformación utilizando procedimientos establecidos (Sambrook *et al.*, 1989). La transformación se logró fundiendo y equilibrando la mezcla de acoplamiento hasta 37 °C antes de la adición de 100 µl de células competentes, manteniendo una concentración final de agarosa no mayor que 0,02%. Las bacterias se incubaron sobre hielo durante 2 horas, seguido de un choque térmico a 37 °C durante 5 minutos y la posterior adición de 1 ml de medio SOC (20 g de triptona, 5 g de extracto de levaduras, 0,5 g de NaCl, glucosa 20 mM [pH 7,0] por 1 litro de agua destilada; Sambrook *et al.*, 1989). Después de otra hora a 37 °C, las células se mezclaron con 50 µl de disolución de selección (Xgal 36 mg/ml, IPTG 0,1 M) y se cultivaron en placas de LB-antibiótico apropiadas (10 g de NaCl [pH 7,0], 10 g de triptona, 5 g de extracto de levaduras, 20 g de agar por litro de agua destilada) que contenía ampicilina 20 µg/ml. Después de una incubación a 37 °C durante 16 horas, las colonias bacterianas que contenían plásmidos recombinantes se identificaron por su color blanco (en oposición al azul) debido a la alteración de la actividad del gen de la β-galactosidasa. Las colonias seleccionadas se analizaron mediante una digestión de restricción del ADN aislado a partir de minipreparaciones de colonias individuales. Utilizando este procedimiento fue posible subclonar fragmentos de hasta 20 kb de tamaño en el vector pBluescriptKS(+).

Los productos amplificados mediante PCR se clonaron utilizando el siguiente procedimiento. Después de una reacción de PCR convencional utilizando 1 ng del ADN del clon derivado de pCYPAC-2 como molde en un volumen de 50 µl, se añadieron 10 unidades de ADN polimerasa de T4 (Fermentas) a la reacción y se incubó durante 30 minutos a 37 °C. Después de la inactivación de la enzima polimerasa (96 °C, 20 minutos), se acoplaron 7 µl del producto de la PCR a 50 ng del vector pBluescriptKS(+) digerido con *EcoRV* en un volumen final de 10 µl. El uso de la ADN polimerasa de T4 para crear extremos romos en los productos de la PCR produjo una alta proporción de clones recombinantes (los datos no se muestran).

Generación de pBL3-TPO-puro

El pBL3-TPO-puro contiene el gen TBP de 19 kb entero con aproximadamente 1,2 kb de la secuencia flanqueante 5'

y 4,5 kb de la secuencia flanqueante 3' y un módulo génico de resistencia a la puromicina, subclonado en el vector pBL3. Esto se logró con 3 etapas de clonación consecutivas.

En primer lugar, los 4,5 kb de la secuencia que flanquea el extremo 3' del gen TBP humano en el plásmido pCP2-TLN se subclonaron de pCP2-TLN como un fragmento *NotI*-*SacII*. Este fragmento se extiende desde el sitio *SacII* en la 3'UTR del gen TBP hasta el sitio *NotI* proximal a OL189 dentro del vector pCYPAC-2. Este fragmento se clonó en pBL3 digerido con *SacII* y *NotI*, y se denominó MA426. El resto de la secuencia del gen TBP reside en un fragmento *SacII* de 19 kb que se extiende desde aproximadamente 1,2 kb cadena arriba del sitio CAP del ARNm hasta el sitio *SacII* en la 3'UTR. Este fragmento se acopló en MA426 que se linealizó con *SacII*, y los clones se seleccionaron para la orientación correcta.

10 *Secuenciación del ADN y análisis informático de la secuencia*

Se preparó ADN utilizando el sistema Flexi-Prep (Pharmacia), y una secuenciación fluorescente automática fue proporcionada como servicio en BaseClear (Países Bajos). Las bases de datos dBEST y GenBank no redundante se indagaron utilizando herramientas de búsqueda previamente descritas (Altschul *et al.*, 1997). Todas las secuencias expresadas de clones marcados utilizadas en este estudio se obtuvieron a través del consorcio I.M.A.G.E. (Lennon *et al.*, 1996). Se realizaron múltiples alineamientos de secuencias y predicciones de patrones de digestión con enzimas de restricción de secuencias de ADN conocidas utilizando el programa PCGENE (Intelligenetics Inc., EEUU). Se produjeron gráficas de la frecuencia de dinucleótidos CpG utilizando el programa informático VectorNTI (Informax Inc., EEUU).

Generación de animales transgénicos no humanos

20 *Preparación de fragmentos de TBP para la microinyección*

El fragmento genómico de 90 kb (TLN) que incluye la región de los genes TBP/PSMB1 se aisló mediante digestión con *NotI* del clon pCP2-TLN y se preparó para la microinyección utilizando un método de gradiente de cloruro de sodio modificado (Dillon y Grosveld, 1993). En primer lugar, se retiró el lipopolisacárido bacteriano (LPS) de una maxipreparación de pCP2-TLN patrón utilizando un kit de eliminación del LPS (Quiagen) según las instrucciones del fabricante. Entonces se digirieron aproximadamente 50 µg del ADN durante 1 hora con 70 unidades de *NotI* (Fermentas) y se analizó una pequeña parte alícuota mediante PFGE para comprobar que la digestión había sido completa. Se prepararon 14 ml de un gradiente de cloruro de sodio al 5-30% en presencia de EDTA 3 mM en tubos de centrifuga ultratransparentes (Beckman) utilizando un formador de gradiente comercial (Life Technologies). El ADN digerido se colocó sobre la parte superior del gradiente utilizando puntas de pipeta de orificio ancho para minimizar el cizallamiento, y el gradiente se centrifugó a 37.000 rpm durante 5,5 horas (a 25 °C) en un rotor basculante SW41Ti (Beckman). Se retiraron fracciones de aproximadamente 300 µl comenzando desde la parte inferior del gradiente (mayor densidad) hacia tubos de microcentrifuga individuales que contenían 1 ml de etanol al 80%, seguido de una incubación a -20 °C durante 1 hora. Los precipitados de ADN se recogieron mediante una centrifugación a (14900 x g, 15 minutos). Los sedimentos se lavaron en etanol al 70%, se disolvieron en 20 µl de tampón de microinyección para transgénicos (Tris-HCl 10 mM [pH 7,4], EDTA 0,1 mM) y se analizaron partes alícuotas de 5 µl procedentes de fracciones alternantes mediante una electroforesis en gel para evaluar la contaminación del ADN cromosómico y del vector. Las fracciones que parecían exentas de dichos contaminantes se reunieron y se evaluó la concentración de ADN mediante la absorbancia a 260 nm.

Se aisló el fragmento genómico de 40 kb (TSN) del pWE-TSN mediante una digestión con *NotI* y una purificación utilizando una electroelución, tal como ha sido descrito previamente (Sambrook *et al.*, 1989). Después de la electroelución, el ADN se purificó mediante una extracción secuencial con fenol saturado con tampón TE, fenol:cloroformo (1:1, en v/v) y dos veces con *n*-butanol saturado con agua para eliminar el bromuro de etidio residual. El ADN se precipitó con 2 volúmenes de etanol al 100% y se resuspendió en tampón de microinyección. Se evaluó la integridad de los fragmentos mediante PFGE y se determinó la concentración mediante la absorbancia a 260 nm. El fragmento genómico de 25 kb (TPO) se aisló del pBL3-TPO utilizando un procedimiento idéntico, excepto que el inserto se liberó del vector mediante una digestión con *SalI*.

Preparación de fragmentos de hnRNP A2 para la microinyección

El fragmento genómico de 160 kb (MA160) que incluye la región del gen hnRNP A2 se aisló y se preparó para la microinyección mediante una digestión con *NruI* de pCP2-HLN (figura 13A) y una ultracentrifugación en gradiente de cloruro de sodio tal como se describió anteriormente.

El fragmento genómico de 60 kb (HSN, figura 13B) se aisló a partir de MA160 mediante una digestión con *AaflI* y una purificación mediante PFGE tal como se describió anteriormente. La banda de 60 kb se cortó del gel y se volvió a cortar en cortes. Cada corte se fundió a 65 °C y se analizaron 30 µl mediante PFGE. La fracción que mostraba la muestra más pura del fragmento de 60 kb se mantuvo. Se midió el volumen del gel fundido, se hizo 1 x con tampón gelasa, se equilibró a 42 °C durante 10 minutos y se añadió 1 unidad de la enzima gelasa (Epicentre Technologies) por 500 µl. Las muestras se incubaron durante la noche a 42 °C y después se centrifugaron durante 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante se decantó con una punta de orificio ancho y se dializó en gotas contra 15 ml de tampón de

microinyección para transgénicos sobre un filtro de 0,25 μm en una placa Petri de 10 cm durante 4 horas. La disolución dializada se trasladó a un tubo de microcentrífuga y se centrifugó durante 30 minutos a 4 °C. La integridad de los fragmentos se evaluó mediante PFGE y se determinó la concentración mediante la absorbancia a 260 nm.

Generación de ratones transgénicos

- 5 Se produjeron ratones transgénicos mediante inyección pronuclear de óvulos fertilizados de ratones C57/B16. Cada fragmento de ADN se inyectó a una concentración de 1 ng/ μl en tampón para transgénicos. Esto fue realizado como un servicio por the UMDS Transgenic Unit (St. Thomas's Hospital, Londres) utilizando tecnología convencional. Los fundadores transgénicos se identificaron utilizando una selección con PCR de ADN de una biopsia de cola aislado como sigue. Aproximadamente 0,5 cm de biopsias de colas de ratones de 10-15 días de edad se incubaron a 37 °C
- 10 durante 16 horas en 500 μl de tampón para colas (Tris-HCl 50 mM [pH 8,0], EDTA 0,1 M, NaCl 0,1 M, SDS al 1%, proteinasa-K 0,5 mg/ml). El hidrolizado se extrajo mediante un inversión suave con un volumen idéntico de fenol:cloroformo (1:1, en v/v), seguido de una centrifugación (14900 x g, 15 minutos). El ADN precipitó de la fase acuosa mediante la adición de 2 volúmenes de etanol al 100% y se lavó en etanol al 70%. El ADN se vertió y se disolvió en 100 μl de tampón TE. Generalmente, se obtuvieron 50-200 μg de ADN, según se determina mediante
- 15 mediciones de la absorbancia a 260 nm. Las condiciones para las reacciones de PCR fueron como se describió para la selección del banco de pCYPAC-2 utilizando 100 ng de ADN de biopsias de colas como molde y el conjunto de cebadores TB3/TB4. Los fundadores positivos se cruzaron mediante retrocruzamiento con ratones C57/B16 de tipo salvaje para generar descendientes F1 totalmente transgénicos.

Integridad y número de copias del transgén

- 20 Se evaluó la integridad y el número de copias del transgén mediante un análisis de la transferencia Southern de ADN de biopsias de colas digerido con *Bam*HI, *Bgl*II, *Eco*RI, y *Hind*III. Se digirieron aproximadamente 10 μg de ADN con 20-30 unidades de la endonucleasa de restricción específica y se sometieron a una electroforesis en geles de agarosa al 0,7%/0,5 x TBE (Tris-borato 45 mM [pH 8,0], EDTA 1 mM) durante 16 horas a 1,5 V/cm. La tinción y la transferencia del ADN a membranas de nailon se realizó como en las transferencias Southern del plásmido, excepto que se utilizó una matriz con carga positiva (HYBOND N+, Amersham).
- 25

- Se prepararon sondas de ADN mediante digestión con enzimas de restricción para eliminar cualquier secuencia del vector de clonación y se purificaron de la agarosa de bajo punto de fusión utilizando el sistema Gene-Clean (Bio101, EEUU). Se realizó el marcaje radiactivo de 100 ng de muestras de las sondas mediante desplazamiento de mella utilizando un kit disponible en el mercado (Amersham) y 200 pmol de cada uno de dCTP, dGTP, dTTP y 3 μl de α - P^{32} -dATP (actividad específica >3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml, Amersham). La disolución de enzimas que se añadió
- 30 consistió en 0,5 unidades de ADN polimerasa I/10 pg de ADNasa I en un tampón convencional, y la reacción se incubó a 15 °C durante 2,5 horas. Las sondas se purificaron mediante una cromatografía de Sephadex G-50 y se hirvieron durante 5 min inmediatamente antes de su uso. Generalmente, se obtuvieron unas actividades específicas de $>1 \times 10^8$ cpm/ μg .

- 35 La hibridación se realizó igual que para las tranferencias Southern del plásmido descritas anteriormente. Las membranas se incubaron en 15 ml de disolución de prehibridación (3 x SSC, SDS al 0,1%, 5 x disolución de Denhardt [100 x disolución de Denhardt es Ficoll al 2% (tipo 400, Pharmacia), polivinilpirrolidona al 2%, albúmina de suero bovina al 2% (fracción V, Sigma) por litro de agua destilada]), que contenía ADN de testículo de salmón desnaturalizado 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a 65 °C durante 1 hora. La disolución entonces se reemplazó por 15 ml de disolución de hibridación (como una disolución de prehibridación con la adición de sulfato de dextrano hasta 10%) que contenía
- 40 ADN de testículo de salmón desnaturalizado 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y la sonda radiomarcada termodesnaturalizada. Después de una hibridación a 65 °C durante 16 horas, las membranas se lavaron tres veces con 2 x SSC/SDS al 0,1% durante 30 minutos cada una y se expusieron a pantallas de PhosphorImager (Molecular Dynamics) o a películas de rayos X a -80 °C. En las transferencias que se iban a volver a analizar se retiró la sonda unida mediante una inmersión en NaOH 0,2 M durante 20 minutos, seguido de una neutralización tal como se describió anteriormente.
- 45

- La mayoría de las sondas utilizadas en este estudio se derivaron de regiones de los clones genómicos en las que no había información disponible de la secuencia (por ejemplo, sondas de fragmentos terminales de pCP2-TLN y las derivadas de las regiones intrónicas de TBP). Una serie de sondas se hibridaron de forma no específica con ADN genómico humano, lo cual sugiere la presencia de elementos de secuencia repetitivos. Para evitar este problema,
- 50 partes alicuotas de ADN de las sondas se digirieron de forma individual con una serie de enzimas de restricción, se sometieron a electroforesis y a un análisis de la transferencia Southern. Se eligieron enzimas con sitios de reconocimiento cortos (que deberían aparecer con mucha frecuencia dentro del ADN) para digerir la sonda en una serie de fragmentos más pequeños. Se empleó un ADN C_{θ} t-1 humano radiomarcado para indicar los fragmentos que contenían secuencias repetitivas. Utilizando este procedimiento fue posible obtener fragmentos >500 pb que no se
- 55 hibridan con la sonda C_{θ} t-1, para todas las sondas que contenían elementos repetitivos.

Preparación de ADN cosmídico y generación de clones de células L de una sola copia

Se preparó ADN de pWE-TSN mediante la lisis alcalina de cultivos de 1 litro según se describió anteriormente hasta

la etapa de precipitación con isopropanol. Después de una incubación a 25 °C durante 1 hora, el sedimento se resuspendió en 300 µl de TE y después se añadió, con agitación continua, a 10 ml de matriz de unión a ADN Sephaglas FP (Pharmacia). La disolución se invirtió constantemente durante 10 minutos y el ADN unido a la matriz se recogió mediante centrifugación (280 x g, 1 minuto). El sedimento se lavó en primer lugar con tampón WS (Tris-HCl 20 mM [pH 7,5], EDTA 2 mM, etanol al 60%), se recogió mediante centrifugación, se lavó con etanol al 70% y se volvió a centrifugar. El ADN se eluyó de la matriz resuspendiendo el sedimento en 2 ml de tampón TE y con una incubación a 70 °C durante 10 minutos con mezclado periódico. La disolución se centrifugó (1100 x g, 2 minutos) y el sobrenadante que contenía ADN se dividió en partes iguales en dos tubos de microcentrifuga. El Sephaglass residual se eliminó mediante centrifugación (14950 x g, 15 minutos), los sobrenadantes se reunieron y el ADN se precipitó con 2 volúmenes de etanol. El ADN reunido se lavó una vez en etanol al 70% y se resuspendió a 1 µg/ml en agua estéril. Se obtuvieron aproximadamente 75-100 µg de ADN cosmídico puro utilizando este procedimiento, lo cual representa un rendimiento del 60-80% del ADN obtenido sin una purificación con Sephaglas.

La transfección con células L de ratón adherentes (Earle *et al.*, 1943) se realizó como sigue. Aproximadamente 1×10^7 células cultivadas en DMEM que contenía suero de ternera fetal inactivado con calor al 10% (PAA Laboratories) y L-glutamina 2 mM, se mezclaron con 1 µg de ADN de pWE-TSN linealizado con *Sall* e incubado en hielo durante 10 minutos. El ADN se introdujo en las células mediante electroporación (Chu *et al.*, 1987) con unos ajustes de 960 µF, 250 V en un Biorad Gene-Pulser. Las células transfectadas se seleccionaron, y se mantuvieron en el mismo medio que incluía sulfato de geneticina 400 µg/ml (G418, Life Technologies Inc.). Se aislaron clones individuales utilizando anillos de clonación (Freshney, 1994). Los anillos de clonación de acero inoxidable de pared gruesa (Life Technologies Inc.) se sometieron a un autoclave en grasa de silicio y se trasladaron a la placa de cultivo de tejidos de forma que se aisle una colonia. Se añadió una disolución de tripsina (300 µl de tripsina al 0,25% [pH 7,6] (Difco), Tris-HCl 0,25 M [pH 8,0], EDTA al 0,4% [pH 7,6], NaCl 0,12 M, glucosa 5 mM, KH₂OP₄ 2,4 mM, Na₂HPO₄ 0,84 mM, rojo fenol al 1%) y la placa se incubó a 37 °C durante 5 minutos. Las células se trasladaron a placas de 24 pocillos y se establecieron líneas celulares clonales. Los clones se conservaron como sigue. Se recolectaron aproximadamente 1×10^7 células mediante una centrifugación, se resuspendieron en 0,75 ml de mezcla de congelación (medio de crecimiento convencional al 70% pero que incluía suero de ternera fetal al 20% y DMSO al 10%) y se congelaron instantáneamente en hielo seco durante 1 hora antes de trasladarlos a una conservación en nitrógeno líquido.

Se preparó ADN genómico de estos clones de células L utilizando procedimientos convencionales (Sambrook *et al.*, 1989). Se cultivaron células en matraces T75 hasta la confluencia (aproximadamente 4×10^7), se retiró el medio y el matraz se lavó con PBS (KCl 2,68 mM, KH₂OP₄ 1,47 mM, MgCl₂ 0,51 mM, NaCl 136,89 mM, Na₂HPO₄ 8,1 mM [pH 7,3]) y se añadió 2 ml de tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM [pH 7,5], EDTA 10 mM, NaCl 10 mM, SDS al 0,5%, proteinasa-K 1 mg/ml). Las células se desprendieron del matraz de cultivo mediante raspado y se trasladaron a un tubo de centrifuga de 15 ml utilizando una punta de pipeta de orificio ancho. Se dejó que la lisis se desarrollase a 68 °C durante 16 horas tras lo cual la disolución se extrajo una vez con fenol:cloroformo (1:1, en v/v) y el ADN se precipitó con un volumen idéntico de isopropanol. Después de lavar en etanol al 70%, el ADN se resuspendió en 1 ml de tampón TE y se evaluó la concentración mediante la absorbancia a 260 nm.

Se determinó el número de copias del gen transfectado mediante un análisis de la transferencia Southern de ADN genómico digerido con *Bgl*III. Se detectó el TBP humano utilizando una sonda específica (1,4HX) localizada en el gen C5, 4 kb 5' de la región de inicio de la transcripción de TBP, y que detecta un fragmento de 4,2 kb (véase la figura 10). Además, las transferencias fueron sondadas de modo simultáneo con un fragmento *Not*I de 1 kb derivado del locus *vav* murino endógeno (Ogilvy *et al.*, 1998) que produce una banda de 5,2 kb y que actúa como un patrón de referencia de una sola copia. Se determinó el número de copias del transgén TBP humano comparando la proporción de la señal de TBP a *vav* obtenida con la línea de ratón transgénico de 3 copias TLN:8 después del análisis de las transferencias con PhosphorImager.

Se preparó el ADN total de aproximadamente 4×10^7 células mediante precipitación selectiva en 1 ml de LiCl 3 M, urea 6 M (Auffrey y Rougeon, 1980; véase Antoniou, 1991).

Análisis de los sitios hipersensibles a la ADNasa I

Esto se realizó como ha sido descrito previamente (Forrester *et al.*, 1987; Reitmann *et al.*, 1993). Los núcleos se prepararon a partir de aproximadamente 1×10^9 células K562 (Lozzio y Lozzio, 1975). Las células recolectadas se lavaron en PBS y se resuspendieron en 4 ml de RSB enfriado en hielo (Tris-HCl 10 mM [pH 7,5], NaCl 10 mM, MgCl₂ 3 mM) y se colocaron en un homogeneizador Dounce de vidrio equipado con una mano de mortero suelta. Después de la adición de 1 ml de NP40 al 0,5%/RSB, las células se homogeneizaron lentamente con 10-20 golpes y los núcleos se recuperaron mediante la adición de 50 ml de RSB y una centrifugación a 4 °C (640 x g, 5 minutos). El sobrenadante se rechazó y los núcleos se resuspendieron en 1 ml de RSB con CaCl₂ 1 mM. Inmediatamente se tomó una parte alícuota de 100 µl (que representa aproximadamente 1×10^8 núcleos) y el ADN se purificó según se describe a continuación, para controlar la actividad nucleasa endógena durante el procedimiento de aislamiento.

La digestión con ADNasa I se realizó como sigue. Una gama de partes alícuotas (0, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 µl) de ADNasa I 0,2 mg/ml (Worthington) se añadió a tubos de microcentrifuga individuales que contenían 100 µl de

núcleos y se incubaron a 37 °C durante 4 minutos. La digestión se detuvo mediante la adición de 100 µl de 2 x mezcla de detención (Tris-HCl 20 mM [pH 8,0], EDTA 10 mM, NaCl 600 mM, SDS al 1%), 10 µl de proteinasa-K (concentración 10 mg/ml) y una incubación a 55 °C durante 60 minutos. El ADN se purificó mediante una extracción con fenol:cloroformo (1:1, en v/v) y una precipitación en etanol. Las muestras se sometieron a una electroforesis en geles de agarosa al 0,7%/0,5 x TBE y se realizaron análisis de la transferencia Southern utilizando sondas radiomarcadas con ³²P.

Preparación del ARN

Se sacrificaron ratones adultos de 10-40 semanas mediante dislocación cervical y se aislaron los tejidos completos, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se conservaron a -80 °C hasta que fueron necesarios. El ARN total se preparó mediante precipitación selectiva en LiCl 3 M, urea 6 M (Auffray y Rougeon, 1980). Los tejidos se trasladaron a tubos de 14 ml que contenían 1 ml de la disolución de LiCl-urea y se homogeneizaron durante 30 segundos con un Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel). Las muestras entonces se sometieron a tres pulsos de sonicación de 30 segundos (Cole-Parmer Instrument Co., EEUU), el homogeneizado se trasladó a tubos de microcentrifuga estériles y se dejó que el ARN precipitase a 4 °C durante 16 horas. El ARN se recogió mediante centrifugación (4 °C, 14900 x g, 20 minutos), se lavó en 500 µl de una disolución de LiCl-urea y se resuspendió en 500 µl de TES (Tris-HCl 10 mM [pH 7,5], EDTA 1 mM, SDS al 0,5%). Después de una extracción con fenol:cloroformo las muestras se llevaron a 0,3 M con acetato de sodio, y el ARN precipitó mediante la adición de 1 ml de etanol al 100% y se conservaron a -20 °C durante al menos 1 hora. El ARN se recogió mediante centrifugación y se resuspendió en 20 µl de agua estéril, y se evaluó la concentración mediante la absorbancia a 260 nm.

20 Ensayo basado en RT-PCR competitiva

Análisis de la expresión de TBP humano

Se empleó una estrategia de RT-PCR competitiva modificada (Gilliland *et al.*, 1990) para cuantificar de modo preciso la expresión de los genes TBP y PSMB1 humanos en un entorno de ratón. El ARN total (1 µg) de líneas celulares o tejidos de ratón transgénico se sometió a una transcripción inversa en una reacción de 25 µl que consistía en 10 unidades de transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV) (Promega), DTT 10 mM, 2,5 mM de cada dNTP, 25 unidades de inhibidor de ribonucleasa (Fermentas) con cebador inverso 1 µM (TB14 o C5R) en 1 x tampón RT (Tris-HCl 25 mM [pH 8,3], KCl 25 mM, MgCl₂ 5 mM, DTT 5 mM, espermidina 0,25 mM). Se dejó que se desarrollase la síntesis del ADNc a 42 °C durante 1 hora, seguido de otra hora a 52 °C y una inactivación con calor de la enzima a 95 °C durante 5 minutos. Las reacciones de PCR contenían 1 µl de ADNc amplificado utilizando la mezcla de reacción descrita para la selección de la biopsia de la cola, y contenían conjuntos de cebadores específicos para la secuencia en cuestión (tal como se detalló anteriormente, uno de los cuales estaba marcado en un extremo utilizando el protocolo descrito anteriormente). Los cebadores se purificaron con dos rondas de cromatografía de Sephadex-G25 (Pharmacia) y se supuso una recuperación del 80%. Las condiciones de la PCR fueron 94 °C durante 1 minuto, 58 °C durante 1 minuto, y 72 °C durante 1 minuto con un número de ciclos entre 5 y 30.

Para distinguir entre los productos de la PCR humanos y de ratón se incubaron 2-10 µl de cada muestra con 5 unidades de la enzima de restricción apropiada a 37 °C durante 2 horas. Esta reacción se realizó en un gran volumen (250 µl) para diluir las sales y los detergentes del tampón de PCR para evitar la inhibición de la actividad de las enzimas de restricción (unos experimentos control demostraron que este era, en efecto, el caso). Las muestras digeridas y no digeridas se precipitaron en etanol en presencia de 25 µg de ARNt de levadura (Sigma) como coprecipitante, se recogieron mediante centrifugación y se resuspendieron en 5 µl de tampón de carga de gel (Tris-borato 5 mM [pH 8,3], EDTA 1 mM, urea 7 M, xilencianol al 0,1%, azul de bromofenol al 0,1%). Las muestras se analizaron en un preensayo, con geles de poliacrilamida al 5% en presencia de urea 7 M (National Diagnostics) como desnaturizante y 0,5 x tampón TBE. Después de una electroforesis a 40 V/cm durante 1 hora, el gel se cortó para retirar los nucleótidos no incorporados residuales que corren por debajo del frente del tinte de xilencianol, se secó y se expuso a una película de rayos X o a pantallas de PhosphorImager.

Análisis de la expresión de hnRNP A2 humano

Se empleó una estrategia de RT-PCR competitiva similar (Gilliland *et al.*, 1990) para cuantificar de forma precisa la expresión del gen hnRNP A2 humano en un entorno de ratón. Después de una transcripción inversa, las muestras de ADNc se amplificaron mediante una PCR utilizando los conjuntos de cebadores Hn9 y Hn12 [5'-CTCCACCATATGGTCCCC-3'], uno de los cuales estaba marcado en un extremo utilizando el protocolo descrito anteriormente. Para distinguir entre los productos de la PCR de hnRNP A2 humano y de ratón se digirieron 2-10 µl de cada muestra con 5 unidades de *Hind*III a 37 °C durante 2 horas, se purificaron, se resolvieron en geles de poliacrilamida desnaturizante al 5% y los resultados se cuantificaron según se describió anteriormente.

55 Secuenciación y análisis bioinformático de los clones

Los clones genómicos de *Hind*III para los loci de TBP (nucleótido 1-9098, figura 20) y hnRNP A2 (nucleótidos 1-

15071, figura 21) fueron secuenciados por Baseclear, Leiden, Países Bajos. Utilizando una estrategia de paseo con cebadores, comenzando con cebadores preparados para secuencias conocidas, se generaron regiones de secuencia desconocida: nucleótidos 1-5642 de TBP, y nucleótidos 1-3686 de hnRNP A2.

5 Estas secuencias se cortaron y empalmaron juntas con datos de secuencias previamente conocidas y después se emplearon en los análisis bioinformáticos.

Se realizaron comparaciones directas entre las secuencias de TBP y hnRNP A2 utilizando una búsqueda de Smith-Waterman convencional. Esto mostró que no había regiones obvias de homología más que varias repeticiones Alu, tal como se muestra en la figura 19. Ocultando estas repeticiones y realizando una comparación utilizando el programa informático GCG Bestfit se obtuvieron dos regiones cortas de homología como sigue:

10 RNP 3868-3836: TBP 8971-9003 longitud = 33 % de coincidencia = 75,758
RNP 3425-3459: TBP 9049-9083 longitud = 35 % de coincidencia = 74,286

También se identificaron las islas de CpG y se muestran en la figura 19. Las posiciones de los nucleótidos son las siguientes:

RNP 4399-5491, 5749-6731
15 TBP 5285-5648, 6390-6966

Se realizaron estudios de secuenciación como se describió anteriormente para proporcionar más datos de la secuencia de la región inmediatamente cadena arriba de los genes RNP y TBP.

20 Los datos de secuencia que aparecen en las figuras 20 y 21 comienzan en el sitio 5' *HindIII* e incluyen la secuencia generada en Baseclear y los datos de secuencia ya publicados cortados y empalmados juntos. En el caso de la secuencia de TBP, la secuencia de Baseclear se indica en mayúsculas.

El análisis de estas secuencias demuestra la existencia de un gen previamente caracterizado, HP1H- γ , o proteína H-gamma asociada a heterocromatina cadena arriba del gen RNP (figura 19 y 22). Este gen también se ha demostrado que se expresa de modo ubicuo mediante un análisis de la transferencia por puntos de tejidos humanos (los datos no se muestran).

25 El análisis bioinformático y las comparaciones de secuencias no muestran homologías obvias de secuencia entre los loci. Sin embargo, en la figura 19 se ofrece un resumen de los datos. Como puede observarse, varios sitios de unión al factor de transcripción Sp1 putativos están localizados en las regiones de los promotores bidireccionales de los dos loci. También se indican las islas de CpG exentas de metilación.

Ambos loci muestran una estructura bidireccional que contiene un agrupamiento de genes de expresión ubicua.

30 *Construcción de construcciones indicadoras de hnRNP A2 EGFP*

Se construyó CMV-EGFP-IRES digiriendo pEGFP-N1 (Clontech) con *KpnI* y *NotI* para liberar la secuencia de EGFP, y después se acopló a pIRESneo (Clontech) que había sido parcialmente digerido con *KpnI* y después con *NotI*. Esto creó un vector con el gen EGFP 3' con respecto al promotor de CMV y 5' con respecto a IRESneo (CMV-EGFP-IRES).

35 El promotor de CMV se cambió por el promotor de RNP para crear la construcción indicada en la figura 22 como RNP. Se digirió CMV-EGFP-IRES con *AgeI*, se crearon extremos romos con ADN polimerasa de T4 (Tris 50 mM, pH 7,5, MgCl₂ 0,05 mM, DTT 0,05 mM, dNTP 1 mM, 1 u de ADN polimerasa de T4/ μ g de ADN) y después se cortó con *NruI* para liberar el promotor de CMV y producir EGFP-IRES. El promotor de RNP se retiró de un clon *HindIII* de hnRNP A2 de 8 kb (Hind BKS de 8 kb) que contenía los promotores y los primeros exones de los genes RNP A2 y HP1H- γ . Se cortó Hind BKS de 8 kb con *BspEI* y *TthIII* (para liberar el promotor de 630 pb), se crearon extremos romos con la ADN polimerasa de T4, y el promotor de RNP aislado se acopló en EGFP-IRES.

40 Se construyó 5,5RNP insertando el módulo de EGFP-IRES en Hind BKS de 8 kb de tal forma que la expresión de EGFP queda bajo control del promotor de RNP. Este último se digirió parcialmente con *TthIII*, se crearon extremos romos con ADN polimerasa de T4, y después se digirió con *SaII*, y esto elimina todas las secuencias 3' del promotor de RNP. El módulo de EGFP-IRES se retiró de CMV-EGFP-IRES mediante una digestión con *AgeI* y se crearon extremos romos antes de la digestión con *XhoI*. Esto entonces se acopló en Hind BKS de 8 kb restringido.

45 Se construyó 5,5CMV insertando el módulo de CMV-EGFP-IRES en Hind BKS de 8 kb con la posterior eliminación del promotor de RNP. Se cortó Hind BKS de 8 kb con *BspEI*, se crearon extremos romos y después se digirió con *SaII* para eliminar el promotor de RNP y todas las secuencias 3' del promotor. El módulo de CMV-EGFP-IRES se retiró de CMV-EGFP-IRES mediante una digestión con *NruI* y *XhoI*, y se acopló en el Hind BKS de 8 kb digerido.

50

Se eliminaron aproximadamente 4 kb del ADN de 5,5RNP para dejar 1,5 k 5' del promotor de RNP, creando 1,5RNP. Esto se logró digiriendo 5,5BNP con *Bam*HI que produjo fragmentos de 4, 2,9 y 5 kb. Los fragmentos de 2,9 y 5 kb entonces se aislaron y se reaclaron para crear 1,5RNP, cuando el fragmento de 2,9 kb se inserta en la orientación correcta.

- 5 La construcción 5,5RNP se extendió para que incluyese las secuencias de hnRNP A2 3' del promotor de RNP (construcciones 7,5RNP y 8,5RNP), incluyendo esta región el primer exón e intrón de hnRNP A2. Para incluir el indicador EGFP-IRES en estas construcciones fue necesario colocar la secuencia aceptora de corte y empalme de hnRNP A2 del exón 2 dentro de marco con el gen EGFP, de forma que el primer exón de hnRNP A2 pueda cortar y empalmar con el gen EGFP y, por tanto, la expresión de EGFP puede desconectarse del promotor de RNP. Se fabricaron dos construcciones que incluían el aceptor de corte y empalme de hnRNP A2, que contenían 80 pb y aproximadamente 1 kb de la secuencia 5' del segundo exón, obteniéndose estas secuencias mediante PCR a partir de MA160 que incluye la secuencia genómica de hnRNP A2 completa. La secuencia de 80 pb se aisló mediante PCR (Tris-HCl 20 mM, pH 8,4, KCl 50 mM, cebador 1 μ M, MgCl₂ 2 mM, dNTP 0,2 mM, 3,5 μ g de ADN de MA160, 5 U de ADN polimerasa Taq Platinum) utilizando los cebadores [5' ACCGGTTCTCTCTGCAAAGGAAAATACC 3'] y [5' GGTACCCTCTGCCAGCAGGTCACCTC 3'], aislándose el fragmento de 1 kb utilizando los cebadores [5' ACCGGTTCTCTCTGCAAAGGAAAATACC 3'] y [5' GGTACCGAGCATGCGAATGGAGGGAGAGCTCCG 3']. Los cebadores se diseñaron de tal forma que el producto de la PCR contenía sitios *Kpn*I y *Age*I en los extremos 5' y 3', respectivamente. Los productos de la PCR entonces se clonaron en el vector de clonación de TA pCR3.1 (Invitrogen).
- 10
- 15
- 20 Los fragmentos de 80 pb y 1 kb se aislaron de pCR3.1 como fragmentos *Kpn*I-*Age*I y se acoplaron en CMV-EGFP-IRES que había sido parcialmente digerido con *Kpn*I y después cortado con *Age*I, y esto crea fusiones dentro de marco del aceptor de corte y empalme (SA) con el gen EGFP.

- 25 Se construyó 7,5BNP digiriendo Hind BKS de 8 kb con *Cl*aI, creando extremos romos con ADN polimerasa de T4, y después digiriendo con *Sa*II. El módulo de SA-EGFP-IRES de 80 pb se aisló mediante una digestión parcial con *Kpn*I, seguido de la creación de extremos romos con ADN polimerasa de T4 y una digestión con *Xho*I. Esto se acopló en Hind BKS de 8 kb digerido con *Cl*aI-*Sa*II.

- 30 Se construyó 8,5BNP mediante la digestión parcial con *Sph*I de Hind BKS de 8 kb, seguido de una digestión con *Sa*II, y el módulo de SA-EGFP-IRES de 1 kb se aisló de modo similar mediante una digestión parcial con *Sph*I, seguido de una restricción con *Xho*I. El módulo se acopló en Hind BKS de 8 kb para crear 8,5RNP.

- 35 Se construyó 4,0CMV escindiendo un fragmento de 4 kb de Hind BKS de 8 kb con una digestión con *Bam*HI/*Hind*III/*Bst*EII. Los extremos de los fragmentos entonces se rellenaron con fragmentos de Klenow y ADN polimerasa de T4.

Se linealizó pEGFP-N1 (Clontech) con *As*eI, se crearon extremos romos como se indicó anteriormente, y después se trató con fosfatasa intestinal de ternera (CIP). Entonces ambos fragmentos se acoplaron durante la noche.

- 40 Se construyó p7,5CMV escindiendo el fragmento de 8,3 kb de p8kb Hind BKS con una digestión con *Hind*III. Los extremos de los fragmentos entonces se rellenaron con fragmentos de Klenow y ADN polimerasa de T4. Se linealizó pEGFP-N1 (Clontech) con *As*eI, se crearon extremos romos como se indicó anteriormente, y después se trató con fosfatasa intestinal de ternera (CIP). Entonces ambos fragmentos se acoplaron durante la noche. Los clones resultantes se seleccionaron para las orientaciones directa e inversa del inserto de UCOE de 8,3 kb.

- 45 Se construyó p16CMV escindiendo un fragmento de 16 kb de MA5551 (clon genómico de hnRNP A2 que contiene 5 kb de la secuencia 5' y 1,5 kb de la secuencia 3' que incluye la región codificadora completa (fragmento de 16 kb que aparece en la figura 13C)) mediante digestión con *Sa*II. Los extremos del fragmento entonces se rellenaron con fragmentos de Klenow y ADN polimerasa de T4. Se linealizó pEGFP-N1 (Clontech) con *As*eI, se crearon extremos romos como se indicó anteriormente, y después se trató con fosfatasa intestinal de ternera (CIP). Entonces ambos fragmentos se acoplaron durante la noche. Los clones resultantes se seleccionaron para las orientaciones directa e inversa del inserto de UCOE de 16 kb.

Transfección de CHO

- 50 Se recolectaron células CHO a 2 x 10⁷ células/ml en medio exento de suero. Se utilizaron 1 x 10⁷ células (0,5 ml) por transfección, junto con 1 μ g (5 μ l) de ADN lineal y 50 μ g (5 μ l) de ADN vehículo de esperma de salmón. El ADN y las células se mezclaron y se dejaron en hielo durante 10 minutos. Las células se electroporaron utilizando BioRad Gene Pulser II™ a 975 μ F/250 V y se dejaron en hielo durante 10 minutos. La mezcla entonces se coloca sobre 10 ml de medio completo (HF10) y se centrifuga a 1400 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se retira y el sedimento se resuspende en 5 ml de HF10. Las células entonces se cultivan en placa a 5 x 10⁴ ó 1 x 10⁴ en placas de 10 cm, y a 2 x 10⁵ células por matraz T225. Después de 24 horas, las células se colocan en medio de selección, inicialmente en G418 300 μ g/ml y después de 4 días en G418 600 μ g/ml. Diez días después de la transfección las colonias se tiñeron con azul de metileno (disolución al 2% constituida en etanol al 50%) y se contaron. Las placas por duplicado se mantuvieron en cultivo como agrupaciones restringidas o como clones de células individuales.
- 55

Análisis de la expresión de GFP en clones de CHO transfectadas

Las células transfectadas se mantuvieron en la selección con G418 600 µg/ml. Las células se separaron de placas de 6 pocillos para el análisis de la expresión de GFP. Las células se lavaron con disolución salina tamponada con fosfato (PBS, Gibco) y se incubaron en tripsina/EDTA (Sigma) hasta que se desprendieron de la superficie de las placas. Se añadió un exceso de medio de mezcla de nutrientes F12 (HAM) (Gibco) suplementado con suero de ternera fetal al 10% (FCS, Sigma) a las células, y las células se trasladaron a tubos de fondo redondo de poliestireno de 5 ml. Las células entonces se analizaron con un citómetro de flujo FACS Scan de Becton-Dickinson para la detección de la expresión de GFP en comparación con la autofluorescencia de la población celular parental. Se analizaron 19 clones de RNP, 24 clones de 5,5RNP, 21 clones de CMV, y 12 clones de 5,5CMV, y se tomó la media de la mediana de la fluorescencia de todos los clones positivos.

Análisis de la expresión de GFP en agrupaciones de CHO transfectadas

Colonias de células CHO transfectadas que había sido sometidas a selección con G418 se desprendieron de un matraz de cultivo de tejidos T225 y se cultivaron en placas Petri de 10 cm para producir aproximadamente 100 colonias/placa. Cuando las colonias se hubieron desarrollado, las células se desprendieron y esta agrupación limitada de células transfectadas se analizó para la expresión de GFP. La expresión de GFP se controló de forma regular, dividiéndose las agrupaciones 1:10 cada 3-4 días. Las células siempre se dividieron en placas de 24 pocillos el día antes del análisis, de modo que las células era aproximadamente 50% confluentes en el día del análisis. Las células entonces se desprendieron de las placas de 24 pocillos y se analizaron de la misma forma que en la sección anterior. Para el desarrollo en el tiempo de la expresión, se estableció una región marcadora (M1) que contenía sólo una pequeña proporción de la población positiva de células y se empleó para investigar cualquier pérdida de expresión de GFP desde el nivel inicial a lo largo del tiempo.

Análisis FISH de integradores de una sola copia/bajo número de copias

Análisis FISH empleando el cósmido de TBP de 40 kb pWE-TSN o pBL3-TPO-puro

Células Ltk- de ratón cultivadas en DMEM-suero de ternera fetal al 10% se electroporaron con el cósmido de TBP de 40 kb pWE-TSN (figura 9) o el plásmido de 25 kb pBL3-TPO-puro. Los transfectantes se seleccionaron con G418 200 mg/ml (TSN) o puromicina 5 mg/ml (TPO) y se generaron clones de una sola copia o de bajo número de copias como se ha indicado previamente. Las células en crecimiento logarítmico de los clones seleccionados se trataron con colchicina 0,4 mg/ml durante 1 h antes de la recolección. Las células entonces se hincharon hipotónicamente en KCl 0,056 M, se fijaron en metanol-ácido acético 3:1, y se extendieron sobre portaobjetos para microscopio para obtener los cromosomas en metafase. Los portaobjetos se pretrataron con 100 mg de ARNasa A/ml en 2 x SSC (1 x SSC es NaCl 0,15 M, citrato de sodio 0,015 M) durante 1 h a 37 °C, se lavaron en 2 x SSC, y se sometieron a una serie de deshidrataciones en etanol (etanol al 70%, 90% y 100%). Los cromosomas se desnaturalizaron a 70 °C durante 5 min en formamida al 70%-2 x SSC, se sumergieron en etanol al 70% enfriado en hielo, y se deshidrataron como se indicó anteriormente. Se marcaron 100 nanogramos de sonda de TBP (el plásmido TPO completo que porta 25 kb de ADN genómico humano que comprende el gen TBP) y 50 nanogramos de sonda de satélite-gamma de ratón (según se describe en Horz *et al.*, Nucl. Acids Res., 9:683-696, 1981) con digoxigenina-11-dUTP y biotina-16-dUTP, respectivamente, mediante desplazamiento de mella (Boehringer) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las sondas marcadas se precipitaron con 1 mg de ADN cot-1 y 5 mg de ADN de esperma de arenque, se resuspendieron en formamida al 50%-2 x SSC-Tween 20 al 1%-sulfato de dextrano al 10%, se desnaturalizaron a 75 °C, la sonda de TBP se prerreasoció durante 30 min a 37 °C, se reunió y se aplicó a los portaobjetos. La hibridación se realizó durante la noche a 37 °C. Los portaobjetos se lavaron cuatro veces durante 3 min cada vez en formamida al 50%-2 x SSC a 45 °C, cuatro veces durante 3 min cada vez en 2 x SSC a 45 °C, y cuatro veces durante 3 min cada vez en 0,1 x SSC a 60 °C. Después de lavar durante 5 min en 4 x SSC-Tween 20 al 0,1%, los portaobjetos se bloquearon durante 5 min en 4 x SSC-leche desnatada al 5%. La sonda marcada con biotina fue detectada mediante una incubación durante 30 min a 37 °C con cada uno de los siguientes: rojo Texas conjugado con avidina (Vector Laboratories Inc., EEUU) seguido de anti-avidina biotinilada (Vector Laboratories Inc., EEUU) y rojo Texas conjugado con avidina (Vector Laboratories Inc., EEUU). La sonda marcada con digoxigenina fue detectada al mismo tiempo que la detección de la biotina con cada uno de los siguientes: antidigoxigenina-fluoresceína (FITC, Boehringer) seguido de anti-FITC de ratón (DAKO) y anti-IgG de ratón conjugado con fluoresceína de caballo (Vector Laboratories Inc., EEUU). Entre cada dos incubaciones, los portaobjetos se lavaron tres veces durante 2 min cada vez en 4 x SSC-Tween 20 al 0,1%. Los portaobjetos se contratiñeron con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) y se montaron en Vectashield (Vector Laboratories Inc., EEUU). Las imágenes se estudiaron con un objetivo 100 x de aceite en un microscopio de fluorescencia. Las imágenes se capturaron utilizando una cámara con dispositivo de carga acoplada enfriada Photometrics y un programa informático Vysis Smartcapture.

Análisis FISH utilizando la construcción de 16RNP-EGFP

Se construyó el vector de 16RNP-EGFP insertando el módulo de expresión EGFP-IresNeo y algunas secuencias 5' de RNP del 8,5RNP en MA551. Se digirió 8,5RNP con *Xho*I, se crearon extremos romos con ADN polimerasa T4 y después se digirió con *Pac*I, el fragmento resultante se acopló en MA551 que se había cortado con *Nhe*I, creado extremos romos y después digerido con *Pac*I. Al igual que con 8,5RNP, la expresión se desacopló del promotor de

RNP dando como resultado una fusión dentro de marco del exón 1 de RNP con EGFP.

Se cultivaron clones de células LTK de ratón transfectadas con 16RNP-EGFP en DMEM-suero de ternera fetal al 10% y G418 200 µg/ml. Las células en crecimiento logarítmico se trataron con colchicina 0,4 µg/ml durante 1 h antes de la recolección. Las células entonces se hincharon hipotónicamente en KCl 0,056 M, se fijaron en metanol-ácido acético 3:1, y se extendieron sobre portaobjetos para microscopio para obtener los cromosomas en metafase. Los portaobjetos se pretrataron con 100 µg de ARNasa A/ml en 2 x SSC (1 x SSC es NaCl 0,15 M, citrato de sodio 0,015 M) durante 1 h a 37 °C, se lavaron en 2 x SSC, y se sometieron a una serie de deshidrataciones en etanol (etanol al 70%, 90% y 100%). Los cromosomas se desnaturalizaron a 70 °C durante 5 min en formamida al 70%-2 x SSC, se sumergieron en etanol al 70% enfriado en hielo, y se deshidrataron como se indicó anteriormente. Se marcaron 100 nanogramos de 16RNP-EGFP y 50 nanogramos de satélite-gamma de ratón (Horz *et al.*, Nucl. Acids Res., 9:683-696, 1981) con digoxigenina-11-dUTP y biotina-16-dUTP, respectivamente, mediante desplazamiento de mella (Boehringer) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las sondas marcadas se precipitaron con etanol con 5 µg de ADN de esperma de arenque, y la sonda de RNP con 1 µg de ADN cot-1, se resuspendieron en formamida al 50%-2 x SSC-Tween 20 al 1%-sulfato de dextrano al 10%, se desnaturalizaron a 75 °C, la sonda de RNP se prereasoció durante 30 min a 37 °C, se reunió y se aplicó a los portaobjetos. La hibridación se realizó durante la noche a 37 °C. Los portaobjetos se lavaron cuatro veces durante 3 min cada vez en formamida al 50%-2 x SSC a 45 °C, cuatro veces durante 3 min cada vez en 2 x SSC a 45 °C, y cuatro veces durante 3 min cada vez en 0,1 x SSC a 60 °C. Después de lavar durante 5 min en 4 x SSC-Tween 20 al 0,1%, los portaobjetos se bloquearon durante 5 min en 4 x SSC-leche desnatada al 5%. La biotina fue detectada mediante una incubación durante 30 min a 37 °C con cada uno de los siguientes: rojo Texas conjugado con avidina (Vector Laboratories Inc., EEUU) seguido de anti-avidina biotinilada (Vector Laboratories Inc., EEUU) y rojo Texas conjugado con avidina (Vector Laboratories Inc., EEUU). La digoxigenina fue detectada al mismo tiempo que la biotina con cada uno de los siguientes: antidigoxigenina-fluoresceína (FITC, Boehringer) seguido de anti-FITC de ratón (DAKO) y anti-IgG de ratón conjugado con fluoresceína de caballo (Vector Laboratories Inc., EEUU). Entre cada dos incubaciones, los portaobjetos se lavaron tres veces durante 2 min cada vez en 4 x SSC-Tween 20 al 0,1%. Los portaobjetos se contratiñeron con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) y se montaron en Vectashield (Vector Laboratories Inc., EEUU). Las imágenes se estudiaron con un objetivo 100 x de aceite en un microscopio de fluorescencia Olympus BX40. Las imágenes se capturaron utilizando una cámara con dispositivo de carga acoplada enfriada Photometrics y un programa informático Vysis Smartcapture.

Determinación del número de copias

Se preparó ADN genómico a partir de clones de células mediante procedimientos convencionales (Sambrook *et al.*, 1989). Se determinó el número de copias del gen transfectado mediante un análisis de la transferencia Southern de ADN genómico digerido con *HindIII*. El transgén se detectó como una banda de 2,5 kpb por la hibridación con un fragmento de 1 kpb de 16RNP-EGFP, que comprende el gen de resistencia a la neomicina, marcado con [α -³²P]-dCTP siguiendo las instrucciones del fabricante (sistema de marcaje de ADN Megaprime, Amersham). Para la normalización, las transferencias se hibridaron de modo simultáneo con un fragmento *NotI* de 1 kpb, marcado como se indicó anteriormente, derivado del locus *vav* murino (Ogilvy *et al.*, 1998) que produjo una banda de 1,4 kpb. Como patrones del número de copias, se digirió ADN de varios clones de pWE-TSN con *PstI* y se hibridaron con las anteriores sondas. Se realizó la cuantificación de la señal de hibridación con un Cyclone PhosphorImager (Packard).

Análisis de la expresión de GFP en clones de Ltk transfectados

Las células transfectadas se mantuvieron en una selección con G418 a 200 µg/ml. Las células con una confluencia del 80-100% se desprendieron de las placas de 6 pocillos para el análisis de la expresión de GFP. Las células se lavaron con PBS y se incubaron en tripsina/EDTA (Sigma) hasta que se desprendieron de la superficie de las placas. Se añadió un exceso de DMEM (Gibco) suplementado con suero de ternera fetal al 10% (Sigma) a las células, y se trasladaron a tubos de fondo redondo de poliestireno de 5 ml. Las células entonces se analizaron con un citómetro de flujo FACS Scan de Becton-Dickinson para la medición de la fluorescencia de GFP en comparación con la autofluorescencia de un control no transfectado.

Producción de una construcción indicadora de EBV

Un fragmento de ADN que contenía el promotor de citomegalovirus (CMV), la proteína fluorescente verde potenciada (EGFP) y la secuencia de poliadenilación del virus de simio 40 (SV40) se retiró del vector, pEGFP-N1 (Clontech), mediante digestión con endonucleasas de restricción *AseI* y *AflII* utilizando las condiciones recomendadas por los fabricantes (NEB). El ADN se sometió a una electroforesis en un gel de agarosa al 0,5% para separar el fragmento del esqueleto del vector. El fragmento de ADN se cortó del gel y se purificó del corte del gel utilizando una técnica de purificación de leche en vidrio convencional. Se crearon extremos romos en el fragmento utilizando ADN polimerasa de T4 (NEB) según las condiciones del fabricante, y se purificó mediante una extracción 1:1 (en v/v) con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), seguido de una precipitación en etanol.

El módulo indicador entonces se clonó en el vector del virus de Epstein-Barr (EBV) p220.2 (descrito en la solicitud de patente internacional WO 98/07876). El vector p220.2 se digirió con las enzimas de restricción *HindIII* (un sitio

5 exclusivo en la secuencia de clonación múltiple (MCS) del vector), se crearon extremos romos y se purificó de la misma forma que se describió anteriormente. El módulo indicador se acopló en p220.2 utilizando ADN ligasa de T4 (Promega). La reacción de acoplamiento se realizó en un volumen de 10 µl utilizando 200 ng de p220.2 linealizado y un equivalente molar o un exceso 5 molar del fragmento CMV-EGFP-SV40pA, en 1 x tampón de acoplamiento (Promega). La reacción se incubó durante la noche a temperatura ambiente. Se transformaron 2,5 µl de los acoplamientos en células *E. coli* DH5α electrocompetentes mediante electroporación a 2,5 kV, 400 Ω, 25 µF, seguido de la adición de 900 µl de medio SOB y una incubación a 37 °C durante 1 hora. Se cultivaron 200 µl de cada una de las transformaciones en placas de agar con LB-ampicilina y se incubaron durante la noche a 37 °C.

10 Las colonias resultantes se seleccionaron para la presencia del módulo indicador mediante una reacción en cadena de polimerasa de colonias (PCR) con cebadores de ADN en la secuencia de CMV y EGFR, utilizando Taq polimerasa (Advanced Biotechnologies) con las condiciones convencionales de los fabricantes. Las colonias positivas se cultivaron durante la noche en el medio de LB-ampicilina y se analizaron como minipreparaciones de ADN de lisis alcalina (Qiagen). Los ADN se seleccionaron para la orientación correcta del fragmento utilizando una digestión con la endonucleasa de restricción *Bam*HI. La construcción resultante se denominó p220.EGFP.

15 Se demostró que p220.EGFP expresaba EGFP mediante un análisis en citómetro de flujo FACS Scan de Becton-Dickinson después de la electroporación en células K562, utilizando fundamentalmente el mismo método que el descrito a continuación.

Producción de construcciones de indicador de EBV que contienen el fragmento de UCOE de hnRNP A2 de 16 kb (RNP16)

20 Se eliminó un sitio *Sa*II de p220.EGFP mediante una digestión parcial con endonucleasas de restricción del vector con *Sa*II, seguido de la creación de extremos romos y el reacoplamiento del vector, dejando con ello un sitio *Sa*II exclusivo en el sitio de clonación múltiple (MCS) del vector que puede utilizarse para la clonación del fragmento de RNP de 16 kb. El vector resultante se digirió con la endonucleasa de restricción *Sa*II, se trató con fosfatasa intestinal de ternera (para evitar la recircularización del vector durante el acoplamiento) y se purificó mediante una extracción con fenol:cloroformo y una precipitación en etanol.

25 El fragmento de RNP de 16 kb se eliminó del vector, MA551, utilizando la endonucleasa de restricción *Sa*II y se crearon extremos romos, se purificó mediante electroelución y se acopló en el vector linealizado. Las reacciones de acoplamiento se dispusieron de la misma manera que se ha descrito previamente (utilizando un equivalente molar del fragmento), seguido de la transformación y la selección de las colonias para la presencia de los fragmentos. Las colonias se seleccionaron en forma de minipreparaciones de ADN, confirmándose los clones positivos mediante un análisis de electroforesis en gel de agarosa. Se determinó la orientación correcta del fragmento de RNP de 16 kb mediante un análisis con endonucleasas de restricción utilizando *Not*I. La construcción resultante se denominó p220.RNP16.

Transfección de construcciones de indicador de EBV en células HeLa

35 Se transfectaron células HeLa en placas de 6 pocillos con p220.EGFP y p220.RNP16, utilizando el sistema de transporte mediado por el péptido CL22 descrito en la solicitud de patente internacional WO 98/35984 y descrito a continuación. Después de un cultivo durante 24 horas, se añadió una selección con higromicina B (Calbiochem) a una concentración final de 400 µg/ml. Las colonias de células resistentes a la higromicina B se mantuvieron en cultivo y se analizaron de forma periódica para la expresión de GFP en un FACS Scan de Becton-Dickinson. Las células se dividieron rutinariamente en placas de 24 pocillos el día antes del análisis, de forma que eran aproximadamente 50% confluentes el día del análisis. Para el desarrollo en el tiempo de la expresión, se estableció una región marcadora que contenía la población de células que expresan GFP, y este marcador se utilizó para investigar la estabilidad de la expresión de GFP a lo largo del tiempo. Las células HeLa transfectadas también se retiraron de la selección con higromicina B para investigar la estabilidad de la expresión de GFP, en la presencia/ausencia del UCOE, sin presión de selección.

Clonación de CET200

PEGFPN1 se restringió con *Nhe*I/*Not*II, y los siguientes oligos se reasociaron e insertaron para crear el sitio de clonación múltiple (MCS):

5' CTAGCGTTCGAAGTTTAAACGC 3'

50 5' GGCCGCGTTTAAACTTCGAACG 3'

El plásmido resultante se restringió con *As*eI con extremos romos y se insertó el fragmento *Hind*III de RNP A2 con extremos romos de 8,3 kb. Entonces se determinó la orientación resultante creando el vector final CET200 (véase la figura 49).

Clonación de CET201

Se restringió pUC19 con *EcoRI/Arl* y se crearon extremos romos, eliminando un sitio *PvuI* y creando con ello un sitio *PvuI* exclusivo para la linealización (pUC19 Δ). El MCS se eliminó de pEGFPN1 mediante digestión con *NheI/Agel* y se crearon extremos romos. Esto crea el sitio *NheI*. El módulo CMV EGFP SV40 se retiró como un fragmento *Asel* con extremos romos por *AflII* y se insertó en pUC19 Δ que había sido restringido con *PvuII*, y se insertó pGK-puro-bGH (de pGK-puro-BKS) con *NdeI*. El vector resultante entonces se restringió con *NheI/NotI* eliminando EGFP y el MCS insertado tal como se describió anteriormente. El vector que contenía MCS entonces se restringió con *HindIII* y se insertó el fragmento *HindIII* de RNP de 8,3 kb creando el vector final CET210 (véase la figura 49).

Preparación de un plásmido que contiene un UCOE10 Clonación de las construcciones de indicador que contienen RNP-UCOE

p8kb Hind BKS contiene un fragmento genómico *HindIII* del locus de RNP de 8,3 kb que contiene los promotores y los primeros exones de los genes RNP A2 y HP1H- γ .

Se construyó pCMV EGFP-IRES digiriendo pEGFP-N1 (Clontech, igual que CMV-EGFP, figura 35) con *KpnI* y *NotI* para liberar la secuencia de EGFP, y esto entonces se acopló en pIRESneo (Clontech) que había sido parcialmente digerido con *KpnI* y después con *NotI*. Esto creó un vector con el gen EGFP 3' al promotor de CMV y 5' a IRESneo.

Se clonó el Intrón A-CMV tomando el fragmento Intrón A-CMV de 1,5 kb de pTX0350 (un plásmido CMV Intrón A-MAGE1 basado en pUC) con *NruI* (un cortador creador de extremos romos) y *HindIII*. Se digirió pEGFP-N1 con *Asel* y los extremos del fragmento entonces se rellenaron con fragmentos de Klenow y ADN polimerasa de T4. Esto entonces se digirió con *HindIII* para obtener un fragmento de 4,2 kb. Ambos fragmentos entonces se acoplaron durante la noche.

Se construyó p4.0CMV cortando un fragmento de 4 kb de p8kb Hind BKS con una digestión con *BamHI/HindIII/BstEIII*. Los extremos del fragmento se rellenaron con fragmentos de Klenow y ADN polimerasa de T4.

Se linealizó pEGFP-N1 (Clontech) con *Asel*, se crearon extremos romos como anteriormente y después se trató con fosfatasa intestinal de ternera (CIP). Entonces ambos fragmentos se acoplaron durante la noche. Los clones resultantes se seleccionaron para las orientaciones directa e inversa del inserto de UCOE de 4 kb.

Se construyó p7,5CMV cortando el fragmento de 8,3 kb de p8kb Hind BKS con una digestión con *HindIII*. Los extremos del fragmento entonces se rellenaron con fragmentos de Klenow y ADN polimerasa de T4. Se linealizó pEGFP-N1 (Clontech) con *Asel*, se crearon extremos romos como anteriormente y después se trató con fosfatasa intestinal de ternera (CIP). Entonces ambos fragmentos se acoplaron durante la noche. Los clones resultantes se seleccionaron para las orientaciones directa e inversa del inserto de UCOE de 8,3 kb.

Se construyó p16CMV cortando un fragmento de 16 kb de MA550 (clon genómico de hnRNP A2 que contiene 5 kb de la secuencia 5' y 1,5 kb de la secuencia 3' que incluye la región codificadora completa) mediante una digestión con *SalI*. Los extremos del fragmento entonces se rellenaron con fragmentos de Klenow y ADN polimerasa de T4. Se linealizó pEGFP-N1 (Clontech) con *Asel*, se crearon extremos romos como anteriormente y después se trató con fosfatasa intestinal de ternera (CIP). Entonces ambos fragmentos se acoplaron durante la noche. Los clones resultantes se seleccionaron para las orientaciones directa e inversa del inserto de UCOE de 16 kb.

Transfección de células HeLa utilizando el péptido CL22

El péptido CL22 tiene la secuencia de aminoácidos:

40 NH₂-KKKKKKGGFLGFWRGENGRKTRSAYERMKNILKGGK-COOH

El péptido CL22 se utilizó como agente transfectante según los métodos descritos en el documento WO 98/35984.

Células HeLa se cultivaron de modo rutinario en medio EF10, dividiendo un matraz confluyente 1:10 cada 3 a 4 días. Veinticuatro horas antes de la transfección las células se sembraron a 5×10^4 por pocillo (placa de 6 pocillos). Los complejos se formaron 1 hora antes de la transfección mezclando volúmenes iguales de ADN:CL22, que están a concentraciones de 40 $\mu\text{g/ml}$ y 80 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente, en disolución salina tamponada con Hepes (Hepes 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM), y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. El medio se retiró de las células, que entonces se lavaron con disolución salina tamponada con fosfato al 1%. Entonces se añadieron 2,5 μg de ADN:complejo (125 μl) a las células y el volumen se constituyó hasta 1 ml con RAQ (medio RPMI (Sigma), albúmina humana al 0,1%, cloroquina 137 μM (añadida fresca)) que produce una concentración final de cloroquina de 120 μM . Las células y el complejo se incubaron durante 5 horas a 37 °C. El complejo entonces se retiró y se sustituyó por medio EF10 (medio esencial mínimo (Sigma), suero de ternera fetal al 10%, penicilina 100 unidades/ml/estreptomomicina 0,1 mg/ml, 1 x aminoácidos no esenciales (Sigma)).

Análisis de la expresión de GFP en células HeLa transfectadas

5 Las células se desprendieron de placas de 6 pocillos para el análisis de la expresión de GFP. Las células se lavaron con disolución salina tamponada con fosfato (PBS, Gibco) y se incubaron en tripsina/EDTA (Sigma) hasta que se desprendieron de la superficie de las placas. Se añadió un exceso de medio EF10 (Gibco) suplementado con suero de ternera fetal al 10% (FCS, Sigma) a las células, y las células se trasladaron a tubos de fondo redondo de poliestireno de 5 ml. Las células entonces se analizaron con un citómetro de flujo FACS Scan de Becton-Dickinson para la detección de la expresión de GFP en comparación con la autofluorescencia de la población celular parental.

Preparación de muestras de ADN total

10 Para estudiar el contenido en ADN episómico de las poblaciones transfectadas, se preparó una preparación de ADN celular total. Las células se lavaron con PBS y después se lisaron con tampón de lisis (Tris 10 mM, pH 7,5, EDTA 10 mM, pH 8,0, NaCl 10 mM y sarcosilo al 0,5% al cual se le añade proteinasa K fresca 1 mg/ml F/C). El lisado celular se raspó de la placa y se trasladó a un tubo Eppendorf con una pipeta de orificio ancho. Tras una incubación durante la noche a 65 °C, el lisado celular se extrajo con fenol/cloroformo y se precipitó con etanol. El sedimento de ADN se resuspendió en TE, pH 8,0.

15 Detección de ADN episómico en muestras de ADN genómico total

20 El ADN genómico total, preparado a partir de las células transfectadas 7 días después de la transfección, se digirió con endonucleasas de restricción utilizando una endonucleasa que linealiza las construcciones de ADN utilizadas en la transfección y, por tanto, cualquier ADN episómico presente en la muestra. Se utilizó Apa I (NEB) para las muestras directa e inversa de simulación, CMV-EGFP, Intrón A-CMV, y 4,0CMV. Se utilizó BspLUIII (Boehringer) para las muestras directa e inversa de 7,5CMV. Se digirieron 10 µl (20% de la muestra) de ADN genómico total con 30 unidades de endonucleasas de restricción durante 16 horas según las condiciones recomendadas por el fabricante. Las muestras se sometieron a electroforesis con 400 voltios/hora en un gel de agarosa al 0,6% junto con 100 pg o 4 ng de controles de plásmidos linealizados. El gel entonces se trasladó a una membrana de transferencia de hibridación Hybond-N (Amersham) mediante transferencia Southern. Brevemente, el gel se incubó en HCl 0,25 M durante 15 minutos para despurinar el ADN, seguido de una desnaturalización en NaCl 1,5 M/NaOH 0,5 M durante 45 minutos y una neutralización en NaCl 1,5 M/Tris-Cl 0,5 M, pH 7,0, durante 45 minutos. Entonces el ADN se trasladó del gel a la membrana mediante transferencia capilar en 20 x SSC (NaCl 3 M, citrato de Na₃-2H₂O 0,3 M, pH 7,0) durante 16 horas. El filtro se secó al aire durante 1 hora y se reticuló durante 2 minutos utilizando un reticulador de ultravioleta UVP CL-100 (GRI) con un ajuste de potencia a 1200. La membrana se sondó utilizando una sonda de EGFP radiactiva empleando "condiciones de hibridación de Church". La membrana se prehibridó en NaPi 0,5 M, pH 7,2, SDS al 1% a 65 °C durante más de 2 horas. Un fragmento EGFP del ADN se retiró de pEGFP-N1 (Clontech) mediante una digestión con endonucleasas de restricción *BglII/NotI* (NEB), se separó mediante electroforesis y se purificó del corte del gel utilizando una PCR de ADN GFX™ y un kit de purificación de bandas de gel (Amersham Pharmacia Biotech). Se marcaron 50 ng del fragmento de EGFP con α-³²P-dCTP (3000 Ci/mmol, Amersham) utilizando un kit de marcaje de ADN Megaprime (Amersham). La sonda marcada se mezcló con 100 µl de ADN de esperma de salmón 10 mg/ml, se incubó a 95 °C durante 10 minutos y se colocó en hielo, seguido de la adición a la hibridación. La membrana se hibridó durante 16 horas a 65 °C, seguido de dos lavados de 30 minutos en NaPi 40 mM, pH 7,2, SDS al 1% a 65 °C. La membrana radiomarcada entonces se analizó en un sistema Phosphor de conservación Cyclone (Packard) después de la exposición a una pantalla Phosphor de altísima resolución.

40 Microscopía de fluorescencia

Las células transfectadas cultivadas en placas de 6 pocillos se visualizaron bajo fluorescencia utilizando un microscopio invertido Zeiss Axiovert S100. Se tomaron fotografías en momentos regulares utilizando una cámara Zeiss MC100 y película Fujichrome Provia 400 ASA.

Ejemplo 145 Análisis del locus del gen TBP humanoCartografiado del dominio del gen TBP

50 El gen TBP humano tiene una longitud de 20 kb (Chalut *et al.*, 1995), localizado en el cromosoma 6q27-tel (Heng *et al.*, 1994) y está muy relacionado con el gen que codifica la proteína C5 que forma parte de un proteosoma ubicuo (figura 1A y C; Trachtulec, Z. *et al.*, 1997). El gen C5 se transcribe de modo divergente desde una posición 1 kb cadena arriba del sitio CAP de TBP. Por tanto, TBP y C5 pueden comprender promotores duales. Esto tiene importantes ramificaciones con respecto a la construcción de vectores de expresión basados en TBP, puesto que los promotores duales no actúan necesariamente con igual eficacia en ambas direcciones (véase Gavalas y Zalkin, 1995).

55 El análisis de la secuencia ha revelado que las regiones del promotor de TBP/C5 están contenidas dentro de una isla de CpG exenta de metilación de 3,4 kb. Se extiende desde un sitio *FspI* dentro del intrón 1 de C5 y un sitio

*Hind*III dentro del intrón 1 de TBP, e incluye 1 kb de las secuencias más 5' del primer intrón de ambos genes, así como la región de 1,4 kb entre sus sitios de inicio de la transcripción (figura 1B).

5 El locus del gen TBP humano consiste en 3 genes muy relacionados. El gen PSMB1 (también denominado en la presente C5) se transcribe de modo divergente desde una posición 1 kb cadena arriba del sitio CAP de TBP. El extremo 3' de un gen recientemente identificado, PDCD2, está localizado 5 kb cadena debajo de TBP. Estas 3 unidades de transcripción abarcan un total de 50 kb. Cadena abajo del gen PSMB1 en la dirección del centrómero existe una región de al menos 80 kb que consiste en bloques de secuencias de ADN repetidas sin genes estructurales identificables. Cadena arriba del gen PDCD2 hacia el telómero existe un tramo de 30 kb de secuencias no codificadoras repetidas, seguidas de una nueva unidad de transcripción potencial. El gen PDCD2 está aproximadamente 150 kb desde el inicio de la región de repetición telomérica. Esto hace que el locus de TBP sea el primer agrupamiento de genes estructurales desde el telómero en el brazo largo del cromosoma 6.

Patrón de la expresión génica del dominio de TBP

15 La distribución tisular de la expresión dentro del agrupamiento del gen TBP se evaluó utilizando una transferencia por puntos disponible en el mercado preparada con poli(A)⁺-ARN derivado de una amplia gama de tejidos y tipos celulares humanos (figura 35A). La hibridación de esta transferencia por puntos con sondas apropiadas demostró que los genes PSMB1 (figura 35B), PDCD2 (figura 35C) y TBP (figura 35D) se expresaban todos de forma ubicua. Estos datos confirman que el locus de TBP consiste exclusivamente en un dominio de cromatina expresado de forma ubicua.

Cartografiado de la integridad del transgén en ratones que portan pCP2-TLN

20 El clon pCP2-TLN derivado de pCYPAC-2 (figura 1) que tiene una longitud de 90 kb se utilizó para generar ratones transgénicos. Este clon comienza en una posición 46 kb cadena abajo del gen C5 (65 kb 5' de TBP) y termina 4,5 kb 3' de TBP. Por tanto, este clon posee ambos genes C5 y TBP en su totalidad.

25 Se produjeron tres líneas transgénicas con pCP2-TLN. Los análisis de la transferencia Southern iniciales con sondas derivadas de los extremos de pCP2-TLN demostraron que la línea TLN:3 posee dos copias del transgén (figura 2a,b, carriles TLN:3) en una configuración de cabeza a cola (figura 3a, carriles TLN:3). Sin embargo, una copia parece haber sufrido una deleción 5', que se extiende hacia el promotor de TBP (figura 4, carriles TLN:3). La línea TLN:8, en un análisis de fragmentos terminales, parece portar 3 copias de pCP2-TLN (figura 2a,b, carriles TLN:8). La línea TLN:28 parece portar varias copias en sitios de integración múltiple (figura 3a, carriles TLN:28).

30 En la figura 3B se muestra un resumen del análisis inicial del número de copias y de la integridad del transgén en estos ratones TLN.

35 Otros análisis de las líneas transgénicas producidas con pCP2-TLN ahora han demostrado que la línea TLN:3 contiene dos copias delecionadas de pCP2-TLN de tal forma que una única copia funcional de los genes TBP y PSMB1 permanece intacta (figura 3C, TLN:3). La línea TLN:8 porta dos copias integradas en tándem de pCP2-TLN (figura 3C, TLN:8). La línea TLN:28 posee 4 copias dispuestas en tándem de pCP2-TLN (figura 4, TLN:28). Las deleciones en los extremos 5' y 3' de las disposiciones en tándem del transgén en TLN:8 y TLN:28 siguen dejando los genes PSMB1 y TBP intactos.

Tal como se esperaba, la isla exenta de metilación de TBP/C5 se conserva en ratones transgénicos (los datos no se muestran), tal como ha sido observado para la región 5' de otros genes que portan un dominio rico en CpG (por ejemplo, Thy-1 murino; Kolsto *et al.*, 1986).

40 *Análisis de la expresión de los transgenes TBP y C5 sobre pCP2-TLN en ratones*

45 Se desarrolló un análisis basado en RT-PCR que detecta de modo simultáneo ambos mensajes de los transgenes TBP y C5 humano y murino endógeno. Se seleccionaron cebadores (TB-14 y TB-22) para la reacciones de RT-PCR de una región de homología entre la secuencia de ADNc de TBP humano y de ratón (figura 5b). Esto permite que un producto de la RT-PCR de 284 pb para ambos ARNm sea producido por una única pareja de cebadores. Para distinguir entre los productos de TBP humano y de ratón se aprovechan las pequeñas diferencias de bases que resultan de cambios en la presencia de sitios de enzimas de restricción. Una digestión con *Bsp*14071 rompe el producto de la PCR humano, produciendo un fragmento de 221 nucleótidos (nt) (figura 6a). De manera similar, a partir de una región de homología entre la secuencia de ADNc de C5 humano y de ratón (figura 5a), se puede generar un producto del RT-PCR de 350 nt de ambas secuencias. La ruptura con *Pst*I reduce el tamaño del producto derivado del ARNm de C5 murino hasta 173 nt (figura 7a).

50 Los cebadores TB14 (figura 5b) y C5RTF (figura 5a) se marcaron en sus extremos con ³²P dando como resultado la generación de productos radiactivos después de la reacción de PCR. Estos productos finalmente se resolvieron mediante una electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (figuras 6b-c y 7b).

55 El ARN total (1 µg) de diversos tejidos de las líneas de ratones transgénicos TLN:3, TLN:8 y TLN:28 se sometieron al anterior procedimiento analítico y se cuantificaron mediante un análisis PhosphorImager (figura 8). Todos los

ratones mostraron niveles significativos de expresión de ambos transgenes TBP y C5 humanos en todos los tejidos analizados incluyendo TLN:3, que porta una única copia intacta de estos dos genes. De manera más importancia, se observó un nivel reproducible de expresión entre los tejidos en una línea de ratón concreta, en especial para C5. Esto indica que el clon de TLN posee con mucha probabilidad una capacidad de apertura de la cromatina ubicua. Sin embargo, se observó cierta variación en el nivel de expresión por número de copias del transgén entre las líneas de ratón. Además, la expresión de TBP en la línea TLN:8 entre tejidos también variaba del 5-40%. Estos resultados sugieren que aunque TLN posee una capacidad de apertura de la cromatina, los promotores de C5, y en especial de TBP, son susceptibles a una interferencia transcripcional positiva y negativa. Esto, a su vez, implica que el potencial activador transcripcional inherente de las regiones de TBP y C5 en este clon es débil y, por tanto, incapaz de ejercer siempre un efecto dominante sobre los efectos de posición. Esto contrasta con los que parece ser un efecto de UCOE de apertura de la cromatina de esta región, que es fuerte y parece anular dichos efectos de posición. Este hipótesis está apoyada por la observación de que el promotor de TBP más débil es más susceptible a la variabilidad; compárese, por ejemplo, la proporción de los niveles de TBP entre el bazo y el músculo con la de C5 para la línea TLN:8 (figura 8).

Se realizó un análisis de la expresión del transgén, tal como se describió previamente, utilizando tejidos de ratones que tenían entre 2 y 6 meses de edad. También se evaluó la estabilidad de la expresión del transgén en ratones de 23 meses de edad de las líneas TLN:3 y TLN:8 analizando el ARNm de PSMB1. Se obtuvieron resultados similares en ambas líneas comparados con los obtenidos con los animales más jóvenes. El resultado también demuestra que los transgenes están manteniendo una estructura de la cromatina abierta transcripcionalmente competente.

Análisis de la expresión de un subclón de 40 kb del locus de TBP

Los niveles fisiológicos reproducibles de la expresión producidos por el clon pCP2-TLN en ratones transgénicos indican que posee una capacidad de apertura de la cromatina ubicua. Como primera etapa para cartografiar con precisión la región o regiones del ADN responsables de esta actividad, los inventores comenzaron a analizar un subclón de 40 kb (pCP2-TSN, figura 1a) del locus de TBP humano. El clon pCP2-TSN posee 12 kb de ambas secuencias flanqueantes 5' y 3' que rodean al gen TBP. Como resultado, sólo porta un gen TBP completo y un mutante truncado 3' de C5.

El trabajo previo con la LCR de la β -globina humana demuestra que una indicación inicial de la presencia de actividad LCR puede obtenerse comparando los niveles de expresión entre clones de células de cultivo de tejido transfectadas de forma estable que portan una única copia del transgén. Se ha descubierto que cuanto más completo esté el elemento LCR, mayor es el grado de reproducibilidad de la expresión entre clones independientes. El análisis de la expresión de pCP2-TSN se realizó utilizando esta estrategia para evaluar la presencia de actividad de tipo LCR.

Primero se clonó pCP2-TSN en el vector cosmiótico pWE15 (Clontech) que posee un gen de resistencia a la neomicina (figura 9). La construcción pWE-TBP resultante entonces se utilizó para generar clones transfectados de modo estable de células L de fibroblastos murinos. Entonces se determinó el número de copias del transgén de 23 clones mediante un análisis de la transferencia Southern (figura 10). Entonces se seleccionó una serie de clones que representan una gama de número de copias y se analizaron para la expresión del transgén como se describió para los ratones transgénicos anteriormente. Los resultados se resumen en la figura 11 y muestran que se obtiene una expresión a niveles fisiológicos, o por encima de éstos, por copia del transgén hasta un número de ocho. Con un número de copias de 20 o mayor, los niveles de expresión del transgén se reducen hasta 30-40% del tipo salvaje.

Estos datos demuestran que pCP2-TSN puede producir unos niveles de expresión fisiológicos reproducibles con una única copia y con múltiples copias del transgén. Esto sugiere en gran medida que este clon genómico posee una capacidad de apertura de la cromatina ubicua. Existe claramente una serie de clones (por ejemplo, n° 4, 33 y 6) que muestra un pronunciado efecto de posición "positivo", produciendo unos niveles de expresión que son mucho mayores que los fisiológicos por copia del transgén. Este sería el resultado anticipado en ciertos casos en los que la integración del transgén se ha producido dentro de la cromatina activa que ya está abierta. Se espera que la presencia cercana de un potenciador transcripcional fuerte bajo estas circunstancias tendría un efecto estimulante sobre el promotor de TBP inherentemente débil.

La estabilidad de la expresión de las construcciones se ensayó a lo largo de un periodo de 60 días. Se descubrió que los niveles de expresión se mantenían constantes (figura 36). Esto fue el caso incluso cuando se eliminó la presión selectiva de fármacos (figura 36, carriles marcados -G418). Además, la expresión permaneció estable a lo largo de sucesivos ciclos de congelación y descongelación de las células, independientemente de si se mantenía la presión selectiva de fármacos.

Análisis de la expresión de un subclón de 25 kb del locus de TBP

El clon genómico de 25 kb (TPO) que abarca el gen TBP con 1 kb de la secuencia flanqueante 5' y 5 kb de la secuencia flanqueante 3' (figura 1C) se clonó en la región del policonector de un vector pBluescript modificado que porta un gen de resistencia a la puomicina para producir pBL-TPO-puro tal como se describió anteriormente. La construcción se utilizó para generar clones transfectados de modo estable de células L de fibroblastos murinos.

La construcción pBL-TPO-puro produjo resultados similares a los obtenidos utilizando la construcción de TSN (figura 37). Los datos demuestran que unos niveles de expresión fisiológicos reproducibles pueden ser producidos por ambos TSN y TPO con una única copia y con múltiples copias del transgén. Los datos son coherentes con los clones genómicos que poseen una capacidad de apertura de la cromatina ubicua. Esta suposición también se ve reforzada por el descubrimiento de que los clones de TPO n° 7 (dos copias), 29 (una única copia) y 34 (dos copias) son acontecimientos de integración centromérica (los datos se muestran abajo), lo cual demuestra que el fragmento genómico tiene la capacidad de expresarse desde dentro de un entorno de heterocromatina.

Existe claramente una serie de clones (por ejemplo, figura 37, clon 11) que muestra un pronunciado efecto de posición "positivo" que produce unos niveles de expresión que son mucho mayores que los fisiológicos por copia del transgén. Este sería el resultado esperado en ciertos casos en los que la integración del transgén se ha producido dentro de la cromatina activa que ya está abierta. Podría esperarse que la presencia cercana de un potenciador transcripcional fuerte bajo estas circunstancias tendría un efecto estimulante sobre el promotor de TBP inherentemente débil.

También se han obtenido resultados similares utilizando células HeLa en lugar de células CHO (los datos no se muestran).

Cartografiado de los sitios hipersensibles a la ADNasa I

Todos los elementos LCR conocidos se han descubierto en regiones de alta hipersensibilidad a la ADNasa I específica de tejido, lo cual indica la configuración de cromatina muy abierta que se cree que generan estos elementos. Por tanto, los inventores comenzaron analizando la presencia de sitios hipersensibles (HS) a la ADNasa I dentro y alrededor del gen TBP humano. La figura 12 resume una serie de experimentos utilizando núcleos de la línea celular de leucemia mielógena humana K562, que cartografía sitios HS a la ADNasa I a lo largo de una región de 40 kb comenzando desde 12 kb 5' del gen TBP y extendiéndose 4,5 kb 3' del gen TBP. Los únicos sitios HS que son evidentes en esta región se cartografiaban hasta las regiones del promotor inmediatas de los genes C5 y TBP (figura 12, panel superior, digestión con *HindIII*/sonda *HindIII-XbaI*). Estos sitios HS se correlacionan bien con elementos de promotores previamente identificados importantes para la expresión de los genes TBP y C5, según se determina mediante ensayos de transfección transitoria (Tumara, T. *et al.*, 1994; Foulds y Hawley, 1997). Sin embargo, podría parecer que si están presentes elementos de tipos LCR en este locus, estarían a una distancia considerable de los sitios de inicio de la transcripción de ambos genes TBP y C5. Esto coloca a cualquier elemento de tipo LCR fuera del clon de 40 kb que abarca el gen TBP al que se ha adjudicado una indicación inicial de capacidad de apertura de la cromatina ubicua.

Análisis FISH

Se analizó un total de 34 clones que portan 1-2 copias del transgén TBP humano mediante FISH. El transgén TBP y el componente de heterocromatina del centrómero de ratón, el satélite gamma o principal, se detectó con fluoresceína y rojo Texas, respectivamente. Esto produce señales fluorescentes verdes y rojas en los clones en los que el transgén se ha integrado dentro del brazo del cromosoma (véase la figura 39A). Sin embargo, en el caso de la integración centromérica, ambas señales se colocalizan y puede detectarse una mezcla de ambos colores como una señal fluorescente amarilla. Dos clones, 344-6 y 344-37, de los 18 generados con pWE-TSN, muestran la señal transgénica en la región centromérica. En el clon 344-6, el transgén TBP se integró en el centrómero de un cromosoma robertsoniano, mientras que la integración en el clon 344-37 fue en un cromosoma acrocéntrico de ratón típico.

Tres clones, 440-7, 440-29 y 440-34, de los 16 generados con pBL3-TPO-puro, mostraron una integración centromérica en cromosomas acrocéntricos típicos. El clon 440-29, que porta una sola copia del transgén TBP, muestra la señal de TBP claramente rodeada de secuencias satélite heterocromáticas (véase la figura 39B y C). También se demuestra que estos clones siguen expresando TBP a niveles fisiológicos durante al menos 12 a 14 semanas en ausencia de selección (los datos no se muestran).

Estos resultados demuestran que una sola copia del fragmento de 25 kb del locus de TBP (TPO) es capaz de asegurar la expresión fisiológica incluso en el contexto de una localización heterocromática (es decir, una integración centromérica) y, por tanto, proporciona una prueba formal de la apertura de la cromatina (Sabbattini P., Georgiou A., Sinclair C., Dillon N. (1999), Analysis of mice with single and multiple copies of transgenes reveals a novel arrangement for the $\lambda 5$ - V_{preB1} locus control region, *Molecular and Cellular Biology*, 19:671-679).

Ejemplo 2

Análisis del locus del gen hnRNP A2 humano

Cartografiado del dominio del gen hnRNP A2 humano

El gen hnRNP A2 está compuesto de 12 exones que abarcan 10 kb y es muy homólogo con el gen hnRNP-A1 en su secuencia codificadora y estructura global de intrón/exón, lo cual indica que puede haberse generado mediante

5 duplicación de genes (Biamonti *et al.*, 1994). Sin embargo, a diferencia del gen A1, no se han descubierto pseudogenes específicos de A2 (Burd *et al.*, 1989; Biamonti *et al.*, 1994). Además, los genes A1 y A2 no están genéticamente relacionados, porque están en los cromosomas humanos 12q13.1 (Saccone *et al.*, 1992) y 7p15 (Biamonti *et al.*, 1994), respectivamente. La figura 13A muestra un mapa genético del locus de hnRNP A2 humano presente en el clon derivado de pCYPAC-2 de 160 kb MA160. Este fragmento genómico posee 110 kb de la secuencia flanqueante 5' y 50 kb de la secuencia flanqueante 3'. Se determinó la secuencia de ADN de la región de 4,5 kb cadena arriba del sitio de inicio de la transcripción conocido del hnRNP A2. Esto identifica la posición del gen para que la proteína asociada a heterocromatina HP1 γ se transcriba de forma divergente desde una posición aproximadamente 1-2 kb 5' del sitio CAP de hnRNP A2 (figura 13C). Un análisis de la transferencia Southern indica que el gen HP1 γ completo está contenido dentro de una región de 10 kb (los datos no se muestran).

10 Por tanto, los loci de los genes TBP y hnRNP A2 comparten la característica común de promotores muy relacionados y transcritos de modo divergente.

15 Se evaluó el patrón de expresión del gen HP1 γ dentro de tejidos humanos en una transferencia por puntos preparada con poli(A)⁺-ARN derivado de una amplia gama de tejidos y tipos celulares humanos. Los resultados (figura 38) demuestran que el gen, al igual que para hnRNP A2, también se expresa de forma ubicua. Por tanto, los dos genes parecen formar un dominio de genes expresados de forma ubicua similar al del locus de TBP.

Análisis funcional del locus de hnRNP A2 en ratones transgénicos

20 Se usó MA160 (figura 13A) para generar ratones transgénicos. Un análisis de la transferencia Southern de los dos fundadores que se han cruzado hasta la etapa F1 demuestra que estas líneas poseen 1-2 copias del transgén (los datos no se muestran).

25 Se empleó un ensayo basado en RT-PCR similar al utilizado para TBP para analizar la expresión del transgén hnRNP A2 humano. La secuencia de ADNc del hnRNP A2 murino es desconocida. Por tanto, los inventores no pudieron seleccionar una región de homología entre hnRNP A2 humano y murino mediante la comparación de la secuencia para la amplificación mediante RT-PCR. En principio se eligieron dos cebadores Hn9 y Hn11, que se corresponden con las secuencias dentro de los exones 10 y 12, respectivamente, de hnRNP A2 humano (figura 14A) y producen un producto de RT-PCR de 270 pb. Sin embargo, se descubrió que estos dos cebadores producen un producto con un tamaño idéntico en ambas preparaciones de ARN humano y de ratón (figura 14B), lo cual indica una región de homología entre estas dos especies. Los ensayos con una gama de enzimas de restricción también revelaron que *HindIII* es capaz de cortar el producto murino (figura 14B, carril *HindIII* M) pero no el humano (figura 14B, carril *HindIII* H) para producir un fragmento de 170 pb.

30 Entonces se analizó el ARN total (1 μ g) preparado a partir de diversos tejidos de un ratón transgénico F1 de la línea Hn35 y Hn55, utilizando el anterior método con Hn9 marcado en el extremo 5' con ³²P (figura 16). Se utilizó un análisis de PhosphorImager para cuantificar la proporción de productos de la RT-PCR humanos a murinos. Los resultados (figura 17A) demuestran que se obtienen unos niveles fisiológicos de expresión reproducibles por número de copias del transgén en todos los tipos de tejidos analizados.

Análisis del subclón de 60 kb del locus de hnRNP A2 en ratones transgénicos

40 Los datos obtenidos con el clon derivado de pCYPAC MA160 indican que este fragmento genómico posee una capacidad de apertura de la cromatina ubicua. Para definir aún más la localización de la región o regiones del ADN responsables de esta actividad, se generaron ratones transgénicos con un subfragmento AaflI de 60 kb (Aa60) obtenido a partir de MA160 (figura 13B). Este fragmento posee 30 kb de la secuencia flanqueante 5' y 20 kb de la secuencia flanqueante 3' alrededor del gen hnRNP A2.

Hasta la fecha se han generado tres ratones transgénicos (Aa7, Aa23 y Aa31) con el fragmento Aa60, dos de los cuales se han cruzado para establecer líneas. El número de copias del transgén estimado es: Aa7, 3; Aa23, 1-2; Aa31, 1-2.

45 Se analizó el ARN total (1 μ g) de una gama de tejidos para la expresión del transgén tal como se describió anteriormente. Los resultados se muestran en la figura 15 y se cuantificaron mediante PhosphorImager (figura 17B). Estos datos demuestran que todos los ratones transgénicos expresan a un nivel reproducible por número de copias del transgén en todos los tejidos analizados. Esto indica que la capacidad de apertura de la cromatina ubicua mostrada por MA160 se conserva en el subfragmento Aa60.

Cartografiado de los sitios hipersensibles a la ADNasa I

50 Los resultados de experimentos preliminares para cartografiar los sitios HS a la ADNasa I a lo largo de una región de 20-25 kb 5' del punto de inicio de la transcripción del gen hnRNP A2 humano se muestran en la figura 18. Una sonda de 766 pb del exón 2 en una doble digestión con las enzimas de restricción AaflI y ClaI produce una serie de tres sitios HS (figura 18, panel superior) que se corresponden con las posiciones -1,1, -0,7 y -0,1 kb 5' del gen hnRNP A2 (figura 18, panel inferior). Los inventores también extendieron el análisis a 12-13 kb cadena abajo del inicio de la

55

transcripción de hnRNP A2 y no se identificaron más sitios HS.

Como en el caso del locus TBP/C5, estos sitios HS se corresponden con la región de 1-2 kb entre el promotor de hnRNP A2 y el gen HP1H- γ . No se detectaron sitios HS de tipo LCR, lo cual indica que la capacidad de apertura de la cromatina de este locus no está asociada con este tipo de elemento.

5 Los datos presentados claramente demuestran que los inventores han sido capaces de obtener unos niveles de expresión fisiológicos, reproducibles y ubicuos con dos loci génicos diferentes (TBP y hnRNP A2) en todos los tejidos de ratones transgénicos. Esto indica que, en efecto, existen elementos de control genético, no derivados de una LCR, con una capacidad de apertura de la cromatina ubicua.

10 Es importante advertir que los datos presentados en la presente demuestran una función totalmente diferente de los resultados previamente publicados utilizando combinaciones de promotor-potenciador de otros genes expresados de forma ubicua, tales como la β -actina humana (por ejemplo, véase Ray, P. *et al.*, 1991; Yamashita *et al.*, 1993; Deprimo *et al.*, 1996), la hidroximetilglutaril Coa reductasa murina (Mehtali *et al.*, 1990), la adenosina desaminasa murina (Winston *et al.*, 1992 y 1996), la ornitina descarboxilasa humana (Halmekytö *et al.*, 1991) y la fosfoglicerato quinasa-1 murina (McBurney *et al.*, 1994). En estos estudios anteriores, se observaron unos niveles altos de expresión sólo en un subconjunto de tejidos y no se demostró ni se ensayó la función de apertura de la cromatina.

15 En el caso del gen TBP, los datos de expresión procedentes de células de cultivo de tejidos (figura 11) indican que esta capacidad de apertura de la cromatina ubicua está contenida dentro de un fragmento genómico de 40 kb con 12 kb de secuencias flanqueantes 5' y 3' (pCP2-TSN, figura 1a).

20 Los datos de ratones transgénicos con un fragmento de 60 kb que abarca el gen hnRNP A2 (Aa60, figura 13B) indican que la región con una capacidad de apertura de la cromatina ubicua está contenida en este fragmento (figuras 15-17).

25 Los únicos sitios HS a la ADNasa I que se han cartografiado en estas regiones hasta la fecha se corresponden con elementos promotores clásicos y no con elementos de tipo LCR. Por tanto, las regiones del ADN que actúan como elementos de apertura de la cromatina ubicuos (UCOE) no cumplen la definición de elementos LCR que están asociados con genes que se expresan de una manera específica o restringida a tejidos. Por tanto, los UCOE y sus actividades pueden distinguirse claramente de las LCR y de los elementos derivados de LCR.

Desarrollo del vector de expresión

Se ensayaron subfragmentos de la región de 60 kb de RNP para la actividad UCOE utilizando ensayos basados en indicadores.

30 Se diseñaron vectores de expresión que contienen subfragmentos localizados en la región del promotor dual entre RNP y HP1H- γ utilizando los genes indicadores GFP y Neo^R, según se describió anteriormente y se muestra en la figura 22. Estos incluyen un vector control con el promotor de RNP que dirige la expresión de GFP/Neo (RNP), un vector que comprende el fragmento de 5,5 kb cadena arriba de la región del promotor de RNP y el promotor de RNP (5,5RNP), vectores construidos utilizando una estrategia aceptora de corte y empalme, en la que las secuencias consenso de la ramificación/aceptor de corte y empalme (derivadas del exón 2 del gen RNP) se clonaron enfrente del gen GFP (asegurando que la isla de CpG completa que incluye las secuencias del intrón 1 de RNP pueda ensayarse en el mismo ensayo basado en indicadores), dando como resultado el exón 1/parte del intrón 1 cadena arriba de GFP (7,5RNP), que porta aproximadamente 7,5 kb del gen RNP que precede al gen GFP; y un vector que comprende el fragmento de 1,5 kb cadena arriba de la región del promotor de RNP y el promotor de RNP (1,5RNP).

35 También se han descrito anteriormente los vectores de expresión que comprenden el promotor heterólogo de CMV y se muestran en la figura 22. Estos incluyen vectores control con el promotor de CMV que dirige la expresión de GFP/Neo con un sitio de unión a ribosomas interno (CMV-EGFR-IRES) y sin un sitio de unión externo (CMV-EGFR), un vector que comprende el fragmento de 5,5 kb cadena arriba de la región del promotor de RNP y el promotor de CMV que dirige la expresión de GFP/Neo (5,5CMV), un vector que comprende una secuencia de 4,0 kb que incluye los promotores de RNP y HP1H- γ y el promotor de CMV que dirige la expresión de GFP/Neo (4,0CMV), y un vector que comprende secuencias de 7,5 kb del gen RNP que incluyen el exón 1 y parte del intrón 1, y el promotor de CMV que dirige la expresión de GFP-Neo.

40 Estas construcciones se transfectaron en células CHO mediante electroporación, tal como se describió anteriormente. La adición de la región de 5,5 kb enfrente del promotor de RNP produjo un aumento en 3,5 veces del número de colonias G418^R, figura 24. La transfección de estas mismas construcciones en células COS7 utilizando una estrategia de transporte de péptidos condensantes de ácidos nucleicos muestra un aumento del número de colonias cercano a 7 veces (los datos no se muestran).

45 También se observó un aumento del número de colonias en 1,5 veces después de la transfección de los vectores basados en CMV (es decir, CMV frente a 5,5CMV) en células CHO, figura 24.

- 5 La clonación con anillos de colonias procedentes de estas transfecciones produce líneas células G418^R estables que entonces pueden analizarse para los niveles de expresión de GFP. Los datos de FACS se muestran en la figura 25. La adición de las secuencias cadena arriba produjo un aumento en 3,5 veces de la expresión de GFP cuando se ensaya con el promotor endógeno (RNP frente a 5,5RNP). También se observa un aumento en la expresión de GFP con la adición de la secuencia de 5,5 kb enfrente del promotor de CMV heterólogo (CMV frente a 5,5CMV).
- 10 La extensión de las construcciones para que incluyan la isla exenta de metilación completa no mostró aumento en el número de colonias G418^R comparado con 5,5RNP, pero sí un aumento en la media de la mediana de la fluorescencia de GFP (5,5RNP comparado con 7,5RNP, véase la figura 26).
- 15 La expresión de GFP de clones individuales y agrupaciones restringidas (aproximadamente 100 colonias) se siguió a lo largo del tiempo cultivando las células con o sin selección con G418. Los clones generados con el promotor de RNP solo mostraron una pronunciada inestabilidad, disminuyendo con rapidez el porcentaje de células que expresan GFP a lo largo del tiempo. Los clones que expresan GFP de la construcción de 5,5RNP, en comparación, fueron estables durante más de 3 meses. Aunque las agrupaciones de CMV-GFP inicialmente mostraron una mejor estabilidad, después de un cultivo prolongado en ausencia de G418 resultó evidente una disminución en el número de células que expresan GFP, en comparación con las poblaciones de 5,5CMV que permanecieron completamente estables. Las figuras 27 y 28 muestran los perfiles de FACS de estas poblaciones, que indican claramente un desplazamiento hacia la izquierda, es decir, una proporción creciente de células no fluorescentes con la construcción de CMV-GFP. En contraste, las agrupaciones de 5,5CMV-GFP muestran un pico de expresión uniforme y estable a lo largo del tiempo. Se calcula el porcentaje de células sin expresión o con expresión baja a partir de una ventana de análisis de población M1.
- 20 Los estudios con el locus de RNP se han reducido a una región de 5,5 kb que cubre los promotores duales de los genes RNP y HP1H- γ . La extensión de este fragmento en la dirección 3' (7,5RNP o 8,5RNP) muestra una potenciación del nivel de la expresión génica y puede estar relacionado con mantener intactas las islas exentas de metilación. También se ha descubierto que la minimización de las secuencias de 5,5 kb a una región de 1,5 kb (1,5RNP, figura 23) no afecta profundamente al resultado de los estudios de transfección de indicadores, en términos del número de colonias G418^R y de la expresión, según se determina por un análisis FACS (figura 29). Sin embargo, 1,5RNP no confiere la estabilidad de la expresión génica mostrada por 5,5RNP y 7,5RNP. La figura 30 muestra que el porcentaje de células que expresan GFP disminuye con rapidez a lo largo de 68 días.
- 25 La construcción 4,0CMV se diseñó de modo que la secuencia de 4 kb que representa la isla de CpG exenta de metilación se mantiene intacta. Además, el módulo se insertó enfrente de CMV-EGFP (4,0CMV-EGFP-F (directo) y 4,0CMV-EGFP-R (inverso)) en ambas orientaciones. La figura 31 muestra una drástica potenciación (mayor que 10 veces) de la mediana de la fluorescencia de GFP, comparado con la construcción de CMV-GFP patrón, CMV-EGFP. También se demuestra que esta potenciación de la expresión de GFP se produce cuando el módulo de 4 kb está en ambas orientaciones directa e inversa.
- 30 En términos de estabilidad de la expresión génica, los vectores que contienen las secuencias de 5,5 kb de RNP cadena arriba, cuando se transfectan en células CHO y se siguen a lo largo del tiempo, muestran una ventaja definitiva. De manera más importante, esta estabilidad no se limita al promotor endógeno, sino que también confiere una ventaja de estabilidad al promotor de CMV heterólogo y ampliamente utilizado.
- 35 La figura 32 muestra las construcciones basadas en CMV 4,0CMV y 7,5CMV con el vector control CMV-EGFP transfectados en células CHO y analizados en el día 13 después de la transfección tras una selección con G418. Puede verse un sustancial aumento (15-20 veces) en la mediana de la fluorescencia añadiendo los fragmentos 4,0 ó 7,5 kb del locus RNP enfrente del promotor de CMV. Este aumento es independiente de la orientación del fragmento (los datos no se muestran).
- 40 La figura 33 muestra el porcentaje de células que expresan GFP en las mismas agrupaciones seleccionadas con G418 que en la figura 32. Puede observarse que la inclusión de los fragmentos de 4,0 y 7,5 kb potencia el porcentaje de células GFP-positivas en la población seleccionada con G418. Además, las poblaciones parecen relativamente estables a lo largo del tiempo, aunque en experimentos previos resultó evidente que la inestabilidad de CMV-EGFP sólo es evidente después de aproximadamente 60 días en cultivo.
- 45 La figura 34 muestra el número de colonias después de la transfección en células CHO con cantidades molares equivalentes de diversas construcciones. Las construcciones de 7,5CMV muestran aproximadamente 2-5 veces más colonias que el vector control de CMV-EGFP. Estas observaciones son coherentes con que 7,5CMV-F asegura un mayor número de acontecimientos de integración productivos y, por tanto, con que existe una capacidad de apertura/mantenimiento de la cromatina del fragmento de 7,5 kb.

Vector adenovirico que contiene un UCOE

- 55 En la actualidad, el adenovirus (Ad) es el sistema de vector que ofrece el transporte más eficaz de genes a muchos tipos celulares de interés para la terapia génica. Muchas de las terapias génicas más prometedoras en el desarrollo clínico utilizan este sistema de vector, en particular vectores derivados del Ad de subtipo 5. La utilidad del Ad para la

5 terapia génica humana puede aumentar sustancialmente mejorando la expresión de los genes terapéuticos de dos maneras principales. La primera implica aumentar el nivel de expresión del transgén para obtener el efecto máximo con la dosis mínima, y esto se aplica independientemente del promotor utilizado. La segunda implica mejorar los promotores específicos de tumores o específicos de tejido, de forma que conserven la especificidad pero produzcan una mayor expresión en las células permisivas. Aunque se conocen varios promotores que producen una buena especificidad por tipos de tejidos o tumores concretos, el nivel de expresión que producen en las células permisivas en general es demasiado débil para que tenga un beneficio terapéutico real. Un ejemplo de esto es el promotor del gen de alfa-fetoproteína (AFP) de ratón, que produce una expresión débil pero muy específica para células de hepatoma (cáncer de hígado) (Bui *et al.*, 1997, Human Gene Therapy, **8**, 2173-2182). Estos promotores específicos de tumores son de particular interés para la terapia de profármacos enzimáticos dirigida por genes (GDEPT) para el cáncer, que emplea el transporte de genes para lograr una quimioterapia dirigida. En la GDEPT, un gen que codifica una enzima convertidora de profármaco se transporta a las células tumorales, por ejemplo inyectando el vector de transporte a los tumores. La posterior administración de un profármaco relativamente inocuo convierte éste en un potente fármaco citotóxico que mata a las células que expresan la enzima *in situ*. Un ejemplo implica a la enzima nitrorreductasa (NTR) y al profármaco CB1954 (Bridgewater *et al.*, 1995, Eur. J. Cancer, **31A**, 2362-2370). Los vectores adenovíricos proporcionan el transporte más eficaz de genes que codifican estas enzimas, por ejemplo mediante inyección directa en los tumores.

Construcción de un Ad que expresa NTR a partir del promotor de AFP y un UCOE

20 Se preparó un vector adenovírico de tipo 5 recombinante que expresa el gen NTR a partir del promotor de AFP precedido por el UCOE de 4 kb de RNP (la secuencia de la figura 20 entre los nucleótidos 4102 y 8286). El UCOE de 4 kb primero se clonó como un fragmento *PmeI* en pTXO379, un vector intermedio que porta el gen NTR precedido por el promotor de AFP (Bui *et al.*, 1997, Human Gene Therapy, **8**, 2173-2182) y flanqueado por secuencias de Ad5 (1-359, 3525-10589), mediante acoplamiento de extremos romos en el sitio *ClaI* localizado 5' del promotor de AFP. Se empleó una digestión de restricción para confirmar la presencia de una única copia de UCOE y para establecer la orientación del UCOE. Entonces se generó una construcción de Ad recombinante utilizando el plásmido pTXO384 que contiene el fragmento de UCOE en orientación inversa y la línea celular de encapsulación de Ad Per.C6, que fue desarrollada y suministrada por Introgene (Fallaux *et al.*, 1998, Human Gene Therapy, **9**, 1909-1917). Se empleó el procedimiento suministrado por Introgene para el rescate vírico. Fundamentalmente, pTXO384 se linealizó con *SwaI* y se cotransfectó en células Per.C6 con el vector estructural linealizado con *SwaI* pPS1160, que porta el extremo derecho de Ad5 y una región de solapamiento con pTXO384, de forma que se genera un Ad recombinante mediante recombinación homóloga. El virus producido por la recombinación homóloga en las células transfectadas se reunió y se denominó CTL208.

Expresión de NTR en líneas celulares *in vitro*

35 Se realizaron preparaciones de virus a mayor escala utilizando procedimientos convencionales para CTL208, y otros dos virus Ad recombinantes. Estos fueron CTL203, que porta el gen NTR precedido por el promotor de AFP y un potenciador mínimo pero sin fragmento de UCOE, y CTL102, que porta el gen NTR precedido por el promotor de CMV. El promotor de CMV se emplea habitualmente en vectores Ad recombinantes para producir una expresión fuerte en una amplia gama de tipos de tejidos y de tumores. CTL203 y CTL102 comparten el mismo esqueleto de Ad5 que CTL208 y son idénticos excepto en los elementos utilizados para la transcripción del gen NTR.

40 Entonces se utilizaron CTL203, 208 y 102 para transducir dos líneas celulares *in vitro* para investigar el nivel y la especificidad de la expresión de NTR. Estas fueron la línea celular de hepatoma humano primario HepG2 que expresa AFP, y KLN205, una línea de carcinoma de células escamosas de ratón que no expresa AFP. Se recolectaron las células en crecimiento exponencial de las placas de cultivo de tejidos mediante una breve tripsinización, se resuspendieron en medio de infección a $1,25 \times 10^4$ células viables/ml y se cultivaron en placas de 6 pocillos. Los virus se añadieron a los pocillos antes de la adhesión a una multiplicidad de 50, y para CTL203 también a unas multiplicidades de 100 y 500. Después de 90 min se ajustó la concentración de suero de ternera fetal al 10% y las células se incubaron durante un total de 24 horas. Se produjeron lisados celulares de las células infectadas mediante lisis hipotónica, y después se aclararon los residuos celulares mediante una centrifugación en tubos Eppendorf. Se realizó un ELISA para cuantificar la proteína NTR en el sobrenadante. Esto implica revestir placas de ensayo Nunc-Immuno Maxisorp con NTR recombinante, añadir 50 μ l de cada lisado hipotónico por pocillo por duplicado e incubar durante la noche a 4 °C. Las muestras entonces se lavaron 3 x con Tween al 0,5% en PBS y se incubaron con un antisuero policlonal anti-NTR de oveja (100 μ l por pocillo de una dilución 1 en 2000 en PBS/Tween durante 30 min a temperatura ambiente). Después de lavar el exceso de anticuerpo primario se aplicó un anticuerpo secundario conjugado con HRP, siendo este anti-oveja de burro (100 μ l por pocillo de 1 en 5000 en PBS/Tween). Después de otros 30 min de incubación, las muestras se lavaron con PBS antes del revelado con 100 μ l por pocillo de sustrato de TMB (1 ml de disolución de TMB, 1 mg/ml en DMSO + 9 ml de tampón fosfato-citrato 0,05 M + 2 μ l de H₂O₂ al 30% en v/v por 10 ml) durante 10 min a temperatura ambiente. Las reacciones se detuvieron mediante la adición de 25 μ l de H₂SO₄ 2 M por pocillo, y se leyeron a 450 nm utilizando un lector de placas.

60 La figura 46 muestra los resultados de estos ELISA. Demuestra que CTL203, con NTR expresado a partir del promotor/potenciador de AFP, produce una expresión de NTR débil pero específica, detectable sólo en la línea

celular AFP-positiva. CTL102 (con NTR expresado a partir del promotor de CMV) produce una expresión mucho mayor y no específica, con unos niveles muy similares de NTR en ambas líneas celulares. De manera sorprendente, las células HepG2 AFP-positivas infectadas con CTL208 (UCOE + promotor de AFP que dirige la expresión de NTR) expresan NTR a un nivel mayor que las células infectadas con CTL102, mientras que las células KLN205 AFP-negativas infectadas con CTL208 expresan significativamente menos NTR que las infectadas con CTL102. Estos datos demuestran que el UCOE potencia notablemente la expresión en el contexto de Ad, con una retención parcial de la especificidad.

Expresión de NTR y efectos antitumorales in vivo

Los promotores específicos de tumores son preferibles a los tumores no específicos para la terapia génica del cáncer desde el punto de vista de la seguridad, porque producen una menor expresión del transgén en tejidos normales. Esto resulta particularmente importante para terapias génicas basadas en Ad porque, después de la inyección en los tumores, algunos virus tienden a escapar del tumor y, tras una diseminación sistémica, tienden a transducirse a tejidos normales. En particular, Ad produce una transducción muy eficaz de células hepáticas, de forma que el daño hepático habitualmente es una toxicidad limitante de la dosis para terapias génicas de Ad. En el caso de la GDEPT, el uso de promotores fuertes capaces de producir expresión en tejidos normales, tales como el promotor de CMV, puede conducir a la eliminación de las células hepáticas normales que expresan NTR. Este problema puede potencialmente evitarse o minimizarse utilizando promotores específicos de tumores, que sería ventajoso siempre que éstos produzcan una expresión suficientemente fuerte en las células tumorales para producir efectos antitumorales. Por tanto, CTL208 se compara con CTL102 para la expresión del gen NTR en células tumorales y células hepáticas después de la inyección en tumores en ratones, y para los efectos antitumorales. Se empleó la raza de ratones congénitamente atímicos BALB/c nu/nu. Los ratones eran machos sin patógenos específicos de ocho a doce semanas de edad al comienzo de los experimentos, y se mantuvieron en jaulas microaislantes equipadas con cubiertas de filtro. Se utilizaron células HepG2 en crecimiento exponencial cultivadas *in vitro* como inóculos de tumor. Las células se cultivaron en matraces de agitación, se recolectaron mediante tripsinización y centrifugación durante 5 min a 800 g, se lavaron y se resuspendieron en disolución salina estéril. Se calculó la viabilidad celular mediante exclusión de tinte de azul de tripano, y sólo se emplearon suspensiones de células individuales con una viabilidad mayor que 90%. Los ratones se inyectaron por vía subcutánea en el flanco con $2-5 \times 10^6$ células, bajo anestesia general, inducida mediante una inyección intraperitoneal de una mezcla de 0,2 ml de xilizina (Chanelle Animal Health Ltd., Liverpool, Reino Unido) y quetamina (Willows Francis Veterinary, Crawley, Reino Unido) a una concentración de 1 mg/ml y 10 mg/ml, respectivamente. En el primer experimento, CTL102 o CTL208 se inyectaron en tumores HepG2 subcutáneos con un tamaño de 25-60 mm² (el tamaño se expresa como la superficie específica determinada multiplicando el diámetro mayor por su diámetro perpendicular mayor, longitud x anchura = mm²) que crecían en ratones atímicos. Se emplearon dosis individuales de $7,5 \times 10^9$ partículas para cada virus. Los animales se sacrificaron 48 horas después, sus tumores e hígados se extirparon, se fijaron en formaldehído al 4%/PBS tamponado durante 24 horas y se procesaron para la inmersión en parafina y el corte de secciones utilizando protocolos convencionales. Se cortaron secciones de 3 µm en serie y se inmunotifieron para detectar las células que expresan NTR mediante tinción con inmunoperoxidasa indirecta utilizando un antisuero anti-NTP de oveja (Polyclonal Antibodies Ltd.) y el kit VECTASTAIN Elite ABC (Vector Labs). Estas secciones histológicas se estudiaron utilizando un equipo microscópico convencional y se calculó el porcentaje de células que expresan NTR en los hígados y tumores completos mediante microscopía. La figura 47 muestra los resultados para cada ratón. Se demuestra que el UCOE en combinación con el promotor de AFP (que por lo demás es débil) produce una fuerte expresión de NTR en tumores AFP-positivos en ratones, de forma que, de media, CTL208 produce un número muy similar de células tumorales que expresan NTR a niveles detectables, que CTL102 tras la inyección en tumores. Sin embargo, la inyección intratumoral de CTL102 conduce a una expresión de NTR detectable en el hígado en 5 de 6 animales para CTL102, pero en 0 de 6 para CTL208. Este resultado confirma que, en CTL208, la combinación UCOE-promotor de AFP produce una expresión en células tumorales AFP-positivas similar o más fuerte que el promotor de CMV, pero muestra mucha menos expresión en tejidos normales (AFP-negativos).

Para confirmar que el UCOE eleva la expresión desde el promotor de AFP a niveles terapéuticamente útiles, se comparó CTL208 y CTL102 por su capacidad para conferir efectos antitumorales en combinación con el profármaco CB1954. Ratones atímicos que portan tumores HepG2 subcutáneos con un tamaño de 25 a 60 mm² recibieron una sola inyección de CTL102 o CTL208, a unas dosis de $7,5 \times 10^9$ o 2×10^{10} partículas. Cuarenta y ocho horas después comenzó la administración de CB1954 a los ratones. Se disolvió CB1954 (Oxford Asymmetry, Oxford, Reino Unido) en DMSO (Sigma, St. Louis, MO, EEUU) para producir una concentración de 20 mg/ml. Inmediatamente antes de la dosificación, esta disolución se diluyó 1:5 en disolución salina estéril para producir una concentración final de 4 mg/ml. Los ratones recibieron cinco dosis diarias iguales por vía intraperitoneal sin anestesia. En un grupo control de ratones, los tumores fueron inyectados con PBS en lugar del virus 48 horas antes de comenzar la administración del profármaco. Se midió el tamaño tumoral a diario utilizando calibradores Vernier durante los siguientes 27 días. La figura 48 muestra los resultados. Para el grupo control que recibió CB1954 y no virus, 7/7 tumores continuaron creciendo con rapidez. Se observaron regresiones de los tumores en algunos de los ratones en todos los grupos que recibieron el virus que expresa NTR y CB1954. Con CTL102, se observaron regresiones en 3/8 ratones que recibieron la dosis más baja, y 4/8 ratones que recibieron la dosis más alta. Con CTL208, se observaron regresiones en 5/8 y 6/8 ratones, respectivamente. Estos resultados confirman que, en CTL208, el UCOE eleva la expresión de

NTR desde el promotor de AFP en células tumorales permisivas a niveles que exceden los producidos por el promotor de CMV fuerte, y esto produce un efecto antitumoral superior en un modelo de ratón de la situación clínica para GDEPT.

- 5 Estos resultados demuestran dos propiedades importantes y útiles del UCOE. En primer lugar, mejora sustancialmente la expresión en el contexto de Ad, un vector no integrador de gran potencial en terapia génica. En segundo lugar, eleva la expresión desde promotores débiles pero específicos a niveles mucho más útiles manteniendo la especificidad útil.

Análisis FISH

- 10 Se determinó el número de copias en 31 clones de 16RNP-EGFP en células Ltk de ratón. Debido a la baja cantidad de ADN utilizada en la transfección (0,5-1,0 µg), el porcentaje de clones de una sola copia fue muy alto (83%). Además, la expresión de EGFP varía en más de dos veces dentro de los clones de una sola copia, lo cual indica que el transgén es susceptible a efectos de posición positivos y negativos. No obstante, tres clones de una sola copia se integraron en la heterocromatina centromérica (figura 42), indicando que esta construcción es capaz de abrir la cromatina. Los clones F1 y G6 demostraron que el transgén 16RNP-EGFP se había integrado en uno de los centrómeros de cromosomas metacéntricos originados por translocaciones robertsonianas (figura B, C), mientras que para el clon 13, la integración se produjo en el centrómero de un cromosoma acrocéntrico típico de ratón (figura D).

Expresión de eritropoyetina (EPO) en los vectores CET300 y CET301

Construcción de los vectores de expresión de EPO CET300 y CET301

- 20 La secuencia codificadora de eritropoyetina (EPO) se amplificó mediante una reacción en cadena de polimerasa (PCR) a partir del banco de ADNc de hígado humano fetal Quick-Clone™ (Clontech, Palo Alto, EEUU) utilizando los cebadores EP2 (5'-CAGGTCGCTGAGGGAC-3' y EP4 (5'-CTCGACGGGGTTCAGG-3'). El producto de 705 pb resultante, que incluye el marco de lectura abierto completo, se subclonó en el vector pCR3.1 utilizando el kit de clonación Eukaryotic TA (Invitrogen, Groningen, Países Bajos) para crear el vector pCR-EPO. La secuencia de EPO se verificó mediante secuenciación de ADN automática en ambas hebras. Un fragmento *NheI-EcoRV* de 790 pb, que contiene la secuencia codificadora de EPO, se cortó de pCR-EPO y se subclonó entre los sitios *NheI* y *PmeI* de los vectores CET200 y CET201 (que contienen los fragmentos de RNP de 7,5 kb en la orientación directa e inversa, respectivamente), para generar los vectores CET300 y CET301, respectivamente. Un vector control, pCMV-EPO, se generó cortando la secuencia codificadora de EGFR de pEGFR-N1 como un fragmento *NheI-NotI* y sustituyéndolo por un fragmento *NheI-NotI* de pCR-EPO que contiene la secuencia codificadora de EPO.

Expresión de eritropoyetina en células CHO

- 35 Se linealizaron los plásmicos CET300, CET301 y pCMV-EPO utilizando la endonucleasa de restricción *DraIII*. El ADN restringido entonces se purificó mediante una extracción con fenol-cloroformo, seguido de una precipitación en etanol. El ADN se resuspendió en agua estéril, y cantidades equimolares de los plásmidos se electroporaron en células CHO. Las células viables se cultivaron en matraces de cultivo de 225 cm³ y las células transfectadas de modo estable se seleccionaron mediante el reemplazo del medio después de 24 horas por medio completo que contenía G418 0,6 mg/ml. Las células se cultivaron en este medio hasta que estuvieron presentes colonias resistentes a G418 (aproximadamente 10 días después de la electroporación). Los matraces entonces se rasparon y las células se sembraron a 10⁶ células/pocillo en una placa de 6 pocillos que contenía 1 ml de medio completo. Después de 48 horas, el medio se retiró y se cuantificaron los niveles de eritropoyetina en el medio mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) utilizando un kit de inmunoensayo de EPO humana Quantikine® IVD® (R & D Systems, Minneapolis, EEUU). Los niveles de EPO producida por las construcciones CET300, CET301 y pCMV-EPO fueron de 1780 U/ml, 1040 U/ml y 128 U/ml, respectivamente (figura 40). Por tanto, las construcciones CET300 y CET301, que contenían el fragmento de RNP de 7,5 kb en la orientación directa e inversa, produjeron EPO en el anterior experimento a unos niveles aproximadamente 14 veces y 8 veces superiores, respectivamente, que el plásmido control pCMV-EPO que contiene el promotor de CMV fuerte y ubicuo para dirigir la expresión de EPO.

Expresión de GFP en células HeLa transfectadas con las construcciones indicadoras de EBV con o sin el fragmento de UCOE de 16 kb de hnRNP A2

- 50 En el experimento inicial con células mantenidas en una selección de higromicina, la construcción que contiene UCOE de RNP16 (p220.RNP16) produjo un alto nivel de expresión homogénea de EGFP para el día 23, mientras que se observó un patrón más heterogéneo de expresión de EGFP con p220.EGFP (construido sin el UCOE). La expresión de EGFP en las agrupaciones transfectadas con p220.EGFP se perdió gradualmente, mientras que la expresión se mantuvo estable durante 160 días con las agrupaciones transfectadas con p220.RNP16.
- 55 Tres experimentos repetidos demostraron que el mismo patrón de expresión de EGFP homogénea de alto nivel en las agrupaciones transfectadas con p220.RNP16, observándose de nuevo una expresión heterogénea en las

agrupaciones transfectadas con p220.EGFP. Al igual que en el experimento inicial, la expresión de EGFP es estable con el UCOE de RNP16 y es inestable sin el UCOE, disminuyendo drásticamente la expresión en 30-40 días (figura 43).

5 Se realizó otro experimento en el que la selección con higromicina se retiró en el día 27. Los resultados demuestran que, incluso sin selección, la expresión de EGFP es estable con el UCOE de RNP16 y es inestable sin el UCOE (figura 44).

Ejemplo 3

Plásmido que contiene un UCOE

10 La figura 50 muestra las construcciones generadas y los fragmentos utilizados en comparación con el locus genómico endógeno de hnRNP A2.

15 La figura 51 muestra una gráfica del análisis FACS con la mediana de la fluorescencia de las poblaciones de HeLa transfectadas de forma transitoria. Las células se transfectaron utilizando los plásmidos indicadores condensados con el péptido CL22 según se indicó anteriormente. Puede observarse que la duración de la expresión de la construcción indicadora de CMV-GFP control tiene vida corta y disminuye drásticamente de 24 a 48 horas después de la transfección.

En contraste con el control, el plásmido que contiene UCOE de 7,5CMV-F sigue mostrando una significativa expresión de GFP a lo largo de un periodo largo de tiempo, al menos 9 días después de la transfección. En experimentos repetidos, puede observarse la expresión de GFP a los 14 días después de la transfección.

20 La figura 52 muestra campos de bajo aumento representativos de vistas de poblaciones de células HeLa transfectadas de modo transitorio. Los datos se correlacionan con los análisis FACS y permiten seguir a las células de modo visual a lo largo de un periodo de tiempo similar. A las 24 horas después de la transfección es visible un número significativo de células GFP-positivas en las poblaciones control de CMV-GFP y 7,5CMV transitoria (figuras 52A y B). De hecho, puede observarse que a las 24 horas había más células GFP-positivas en la población control que en la población transfectada con 7,5CMV. Esto es debido al hecho de que la cantidad de ADN introducido en
25 ambos casos no estaba corregido para la dosificación génica, dando como resultado un número significativamente mayor de copias del plásmido control por transfección. Sin embargo, a los 6 días después de la transfección quedaban muy pocas células fluorescentes o ninguna en la población control de CMV-GFP (figura 52C). En contraste, 6 días después de la transfección, las células HeLa transfectadas con 7,5CMV continuaban mostrando un número significativo de células que expresan GFP (figura 52D). De hecho, incluso 14 días después de la
30 transfección, las células con fluorescencia positiva podían detectarse con facilidad (los datos no se muestran).

El ADN total se recuperó en diversos momentos a lo largo del experimento, se linealizó, se ensayó en un gel y se realizó una transferencia (véase "Materiales y métodos"). De manera interesante, en el día 6, incluso en la población control de células en la que no se detectó o se detectó poca expresión de GFP, el plásmido podía detectarse con facilidad en un estado no integrado (los datos no se muestran). Esto podría sugerir que la pérdida rápida en la
35 expresión génica observada con el plásmido control de CMV-GFP no es debida a la pérdida crónica del molde plasmídico, sino a un mecanismo de cierre de cromatina de la expresión génica.

Transfección transitoria de células CHO con vectores de expresión de eritropoyetina

40 Formas superenrolladas de los plásmidos CET300, CET301 y CMV-EPO se electroporaron en células CHO utilizando condiciones convencionales (975 μ F, 250 V). Las células viables entonces se sembraron a 10^6 células en una placa de 6 pocillos que contiene 1 ml de medio de CHO completo. El medio entonces se eliminó a intervalos de 24 horas y se reemplazó por 1 ml de medio fresco. Las muestras de los medios se recogieron de esta manera durante 9 días y entonces se cuantificaron los niveles de eritropoyetina mediante ELISA utilizando un kit de
45 inmunoensayo de EPO humana Quantikine® IVD® (R & D Systems, Minneápolis, EEUU). La figura adjunta muestra el desarrollo en el tiempo de la expresión de la eritropoyetina por células transfectadas con los plásmidos de CET300, CET301 y CMV-EPO. La expresión de la eritropoyetina continuó aumentando durante 48 horas en todas las poblaciones celulares. Después, la expresión de la eritropoyetina por las células transfectadas con CMV-EFO fue disminuyendo diariamente, mientras que los niveles de expresión de EPO por las células transfectadas con CET300 o CET301 continuaron aumentando a lo largo del periodo de 9 días (figura 45).

Referencias bibliográficas

50 Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, J.Z., Zhang, Z., Miller, W., y Lipman, D.J. (1997), Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of proteina database search programs, *Nucleic Acids Res.*, **25**:3389-3402.

Antoniou, M. (1991), Induction of erythroid-specific expression in murine erythroleukaemia (MEL) cell lines, en: *Methods in Molecular Biology*, vol. 7: Gene Transfer and Expression Protocols, ed. E.J. Murray, Humana Press Inc., Clifton, NJ, EEUU, pp. 421-434.

- Antoniou, M., y Grosveld, F. (1990), The β -globin gene dominant control region interacts differently with distal and proximal promoter elements, *Genes Dev.*, **4**:1007-1012.
- Archer, T.K., Lefebvre, P., Wolford, R.G. y Hager, G.L. (1992), Transcription factor loading on the MMTV promoter: a bimodal mechanism for promoter activation, *Science*, **255**:1572-1576.
- 5 Aronow, B.J., Ebert, C.A., Valerius, M.T., Potter, S.S., Wiginton, D.A., Witte, D.P. y Hutton, J.J. (1995), Dissecting a Locus Control Region: Facilitation of Enhancer Function by Extended Enhancer-Flanking Sequences, *Mol. Cell. Biol.*, **15**:1123-1135.
- Auffray, C., y Rougeon, F. (1980), Purification of mouse immunoglobulin heavy-chain RNAs from total myeloma tumor RNA, *Eur. J. Biochem.*, **107**:303-324.
- 10 Biamonti, G., Ruggiu, M., Saccone, S., Della Valle, G., Riva, S. (1994), Two homologous genes, originated by duplication, encode the human hnRNP proteins A2 and A1, *Nucl. Acids Res.*, **22**:1996-2002.
- Birnboim, H.C., y Dolly, J. (1979), A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic Acids Res.*, **7**:1513.
- 15 Blom van Assendelft, G., Hanscombe, O., Grosveld, F., y Greaves, D.R. (1989), The β -globin dominant control region activates homologous and heterologous promoters in a tissue-specific manner, *Cell*, **56**:969-977.
- Bonifer, C., Vidal, M., Grosveld, F., Sippel, A.E. (1990), Tissue specific and position independent expression of the complete gene domain for chicken lysozyme in transgenic mice, *EMBO J.*, **9**:2843-2848.
- Bonifer, C., Yannoutsos, N., Grosveld, G., y Sippel, A.E. (1994), Dissection of the locus control function located on the chicken lysozyme gene domain in transgenic mice, *Nucleic Acids Res.*, **22**:4202-4210.
- 20 Brines, R.D., y Klaus, G.G. (1993), Polyclonal activation of immature B cells by preactivated T cells: the role of IL-4 and CD40 ligand, *Int. Immunol.*, **5**:1445-1450.
- Burd, C.G., Swanson, M.S., Gorlach, M., Dreyfuss, G. (1989), Primary structures of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2, B1, and C2 proteins: a diversity of RNA binding proteins is generated by small peptide inserts, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**:9788-9792.
- 25 Carson, S., y Wiles, M.V. (1993), Far upstream regions of class II MHC Ea are necessary for position-independent, copy-dependent expression of Ea transgene, *Nucl. Acid Res.*, **21**:2065-2072.
- Chalut, C., Gallois, Y., Poterszman, A., Moncollin, V., y Egly, J.-M. (1995), Genomic structure of the human TATA-box-binding proteins (TBP), *Gene*, **161**:277-282.
- 30 Chu, G., Hayakawa, H., y Berg, P. (1987), Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA, *Nucleic Acids Res.*, **15**:1311-1326.
- Church, G.M., y Gilbert, W. (1984), Genomic sequencing, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**:1991-1995.
- Collis, P., Antoniou, M., y Grosveld, F. (1990), Definition of the minimal requirements within the human β -globin gene and the dominant control region for high level expression, *EMBO J.*, **9**:233-240.
- 35 Cooper, M.J., y Miron, S. (1993), Efficient episomal expression vector for human transitional carcinoma cells, *Hum. Gene Ther.*, **4**:557-566.
- Dai, Y., Roman, M., Naviaux, R.K., y Verma, I.M. (1992), Gene Therapy via primary myoblasts: long-term expression of factor IX protein following transplantation in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**:10892-10895.
- De Benedetti, A., y Rhoads, R.E. (1991), A novel BK virus-based episomal vector for expression of foreign genes in mammalian cells, *Nucl. Acids Res.*, **19**:1925-1931.
- 40 Deprimo, S.E., Stambrook, P.J., y Stringer, J.R. (1996), Human placental alkaline phosphatase as a histochemical marker of gene expression in transgenic mice, *Transgenic Res.*, **5**:459-466.
- Díaz, P., Cado, D., y Winoto, A. (1994), A locus central region in the T cell receptor α/δ locus, *Immunity*, **1**:207-217.
- Dillon, N., y Grosveld, F. (1993), Transcriptional analysis using transgenic animals, en: *Gene Transcription: A practical approach*, B.D. Hames y S.J. Higgins, eds. (Oxford: IRL Press), pp. 153-188.
- 45 Dillon, N., y Grosveld, F. (1994), Chromatin domains as potential units of eukaryotic gene function, *Curr. Opin. Genet. Develop.*, **4**:260-264.

- Dillon, N., Trimborn, T., Strouboulis, J., Fraser, P., y Grosveld, F. (1997), The effect of distance on long-range chromatin interactions, *Mol. Cell*, **1**:131-139.
- Earle, W.R., Schilling, E.L., Stark, T.H., Straus, N.P., Brown, M.F., y Shelton, E. (1943), Production of malignancy in vitro. IV. The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells, *J. Natl. Cancer Inst.*, **4**:165-212.
- 5 Ellis, J., Tan-Un, K.C., Harper, A., Michalovich, D., Yannoutsos, N., Philipsen, S., y Grosveld, F. (1996), A dominant chromatin-opening activity in 5' hypersensitive site 3 of the human β -globin locus control region, *EMBO J.*, **15**:562-568.
- Festenstein, R., Tolaini, M., Corbella, P., Mamalaki, C., Parrington, J., Fox, M., Miliou, A., Jones, M., y Kioussis, D. (1996), Locus control region function and heterochromatin-induced position effect variegation, *Science*, **271**:1123-1125.
- 10 Flotte, T.R., y Carter, B.J. (1995), Adeno-associated virus vectors for gene therapy, *Gene Ther.*, **2**:357-362.
- Foulds, C.E., y Hawley, D.K. (1997), Analysis of the human TATA binding protein promoter and identification of an ets site critical for activity, *Nucl. Acids Res.*, **25**:2485-2494.
- Forrester, W.C., Takegawa, S., Papayannopoulou, T., Stamatoyannopoulos, G., y Groudine, M. (1987), Evidence for a locus activation region: the formation of developmentally stable hypersensitive sites in globin-expressing hybrids, *Nucleic Acids Res.*, **15**:10159-10177.
- 15 Freshney, R.I. (1994), In Culture of animal cells: a manual of basic techniques (Nueva York: Wiley-Liss, Inc.), pp. 169-171.
- Gavalas, A., y Zalkin, H. (1995), Analysis of the chicken GPAT/AIRC bidirectional promoter for de novo purine nucleotide synthesis, *J. Biol. Chem.*, **270**:2403-2410.
- 20 Gilliland, G., Perrin, S., Blanchard, K., y Bunn, H.F. (1990), Analysis of cytokine mRNA and DNA: Detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**:2725-2729.
- Greaves, D.R., Wilson, F.D., Lang, G., y Kioussis, D. (1989), Human CD2 3' flanking sequences confer high-level, T cell specific, position-independent gene expression in transgenic mice, *Cell*, **56**:979-986.
- 25 Grosveld, F., Blom van Assendelft, G.B., Greaves, D.R., y Kollias, G. (1987), Position-independent high level expression of the human β -globin gene in transgenic mice, *Cell*, **51**:975-985.
- Grosveld, F., Dillon, N., y Higgs, D.R. (1993), The regulation of human globin gene expression, *Baillieres Clin. Haematol.*, **6**:31-55.
- 30 Hammekytö, M., Alhonen, L., Wahlfors, J., Sinervirta, R., Janne, O.A., y Janne, J. (1991), Position-independent, aberrant expression of the human ornithine decarboxylase gene in transgenic mice, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **180**:262-267.
- Hanscombe, O., Whyatt, D., Fraser, P., Yannoutsos, N., Greaves, D., Dillon, N., y Grosveld, F. (1991), Importance of globin gene order for correct developmental expression, *Genes Dev.*, **5**:1387-1394.
- 35 Hartman, P.S. (1991), Transillumination can profoundly reduce transformation frequencies, *BioTechniques*, **11**:747-748.
- Heng, H.H., Xiao, H., Shi, X.M., Greenblatt, J., Tsui, L.C. (1994), Genes encoding general initiation factors for RNA polymerase II transcription are dispersed in the human genome, *Hum. Mol. Genet.*, **3**:61-64.
- Hong, N.A., Cado, D., Mitchell, J., Ortiz, B.D., Hsieh, S.N., y Winoto, A. (1997), A targeted mutation at the T cell receptor α locus impairs T cell development and reveals the presence of the nearby anti-apoptosis gene Dad-1, *Mol. Cell. Biol.*, **17**:2151-2157.
- 40 Ioannou, P.A., Amemiya, C.T., Garner, J., Kroisel, P.M., Shizuya, H., Chen, C., Batzer, M.A., y de Jong, P.J. (1994), A new bacteriophage P1-derived vector for the propagation of large human DNA fragments, *Nat. Genet.*, **6**:84-89.
- Jarman, A.P., Wood, W.G., Sharpe, J.A., Gourdon, G., Ayyub, H., y Higgs, D.R. (1991), Characterization of the major regulatory element upstream of the human alpha-globin gene cluster, *Mol. Cell. Biol.*, **11**:4679-4689.
- 45 Jones, B.K., Monks, B.R., Liebhaber, S.A., y Cooke, N.E. (1995), The Human Growth Hormone Gene is Regulated by a Multicomponent Locus Control Region, *Mol. Cell. Biol.*, **15**:7010-7021.
- Kaufman, R.J. (1990), *Methods in Enzymology*, **185**:537-566.

- Kolsto A.-B., Kollias, G., Giguere, V., Isobe K.-I., Prydz, H., y Grosveld, F. (1986), The maintenance of methylation-free islands in transgenic mice, *Nucl. Acids Res.*, **14**:9667-9678.
- Kotin, R.M. (1994), Prospects for the use of adeno-associated virus as a vector for human gene therapy, *Hum. Gene Ther.*, **5**:793-801.
- 5 Kozu, T., Henrich, B., Schafer, K.P. (1995), Structure and expression of the gene (HNRPA2B1) encoding the human hnRNP protein A2/B1, *Genomics*, **25**:365-371.
- Lake, R.A., Wotton, D., y Owen, M.J. (1990), A 3' transcriptional enhancer regulates tissue-specific expression of the human CD2 gene, *EMBO J.*, **9**:3129-3136.
- 10 Lang, G., Wotton, D., Owen, M.J., Sewell, W.A., Brown, M.H., Mason, D.Y., Crumpton, M.J., y Kioussis, D. (1988), The structure of the human CD2 gene and its expression in transgenic mice, *EMBO J.*, **7**:1675-1682.
- Larsen, F., Gundersen, G., López, R., y Prydz, H. (1992), CpG islands as gene markers in the human genome, *Genomics*, **13**:1095-1107.
- Lee, C.C., Pons, F., Jones, P.G., Bies, R.D., Schlang, A.M., Leger, J.J., Caskey, C.T. (1993), Mdx transgenic mouse: restoration of recombinant dystrophin to the dystrophic muscle, *Hum. Gene Ther.*, **4**:273-287.
- 15 Lennon, G.G., Auffray, C., Polymeropoulos, M., y Soares, M.B. (1996), The I.M.A.G.E. Consortium: An integrated molecular analysis of genomes and their expression, *Genomics*, **33**:151-152.
- Lozzio, C.B., y Lozzio, B.B. (1975), Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome, *Blood*, **45**:321-334.
- 20 McBurney, M.W., Staines, W.A., Boekelheide, K., Parry, D., Jardine, K., y Pickavance, L. (1994), Murine PGK-1 promoter drives widespread but not uniform expression in transgenic mice, *Devel. Dynam.*, **200**:278-293.
- Mehtali, M., LeMeur, M., y Lathe, R. (1990), The methylation-free status of a housekeeping transgene is lost at high copy number, *Gene*, **91**:179-184.
- Yeoman, H., y Mellor, A.L. (1992), Tolerance and MHC restriction in transgenic mice expressing a MHC class I gene in erythroid cells, *Int. Immunol.*, **4**:59-65.
- 25 Michelsen, B.K. (1995), Transformation of Escherichia coli increases 260-fold upon inactivation of T4 DNA ligase, *Anal. Biochem.*, **225**:172-174.
- Miller, A.D. (1992), Retroviral vectors, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **158**:1-24.
- Miller, A.D., Miller, D.G., García, J.V., y Lynch, C.M. (1993), Use of retroviral vectors for gene transfer and expression, *Meth. Enzymol.*, **217**:581-599.
- 30 Milot, E., Strouboulis, J., Trimborn, T., Wijgerde, M., de Boer, E., Langeveld, A., Tan-Un, K., Vergeer, W., Yannoutsos, N., Grosveld, F., y Fraser, P. (1996), Heterochromatin effects on the frequency and duration of LCR-mediated gene transcription, *Cell*, **87**:105-114.
- Montoliu, L., Umland, T., y Schütz, G. (1996), A locus control region at -12 kb of the tyrosinase gene, *EMBO J.*, **15**:6026-6034.
- 35 Muzyczka, N. (1992), Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **158**:97-129.
- Needham, M., Egerton, M., Millest, A., Evans, S., Popplewell, M., Cerillo, G., McPheat, J., Monk, A., Jack, A., Johnstone, D., y Hollis, M. (1995), Further development of the locus control region/murine erythroleukemia expression system: high level expression and characterisation of recombinant human calcitonin receptor, *Protein Expression and Purification*, **6**:124-131.
- 40 Needham, M., Gooding, C., Hudson, K., Antoniou, M., Grosveld, F., y Hollis, M. (1992), LCR/MEL: A versatile system for high-level expression of heterologous proteins in erythroid cells, *Nucl. Acids Res.*, **20**:997-1003.
- Ogilvy, S., Elefanty, A.G., Visvander, J., Bath, M.L., Harris, A.W., y Adams, J.M. (1998), Transcriptional regulation of *vav*, a gene expressed throughout the hematopoietic compartment, *Blood*, **91**:419-430.
- 45 Ortiz, B.D., Cado, D., Chen, V., Diaz, P.W., y Winoto, A. (1997), Adjacent DNA elements dominantly restrict the ubiquitous activity of a novel chromatin-opening region to specific tissues, *EMBO J.*, **16**:5037-5045.
- Peterson, M.G., Tanese, N., Pugh, B.F., y Tijan, R. (1990), Functional domains and upstream activation properties of

- cloned human TATA binding protein, *Science*, **248**:1625-1630.
- Philipsen, S., Talbot, D., Fraser, P., y Grosveld, F. (1990), The β -globin dominant control region: hypersensitive site 2, *EMBO J.*, **9**:2159-2167.
- 5 Piiirsoo, M., Ustav, E., Mandel, T., Stenlund, A., y Ustav, M. (1996), *Cis* and *trans* requirements for stable episomal maintenance of the BPV-1 replicator, *EMBO J.*, **15**:1-11.
- Pruzina, S., Hanscombe, O., Whyatt, D., Grosveld, F., y Philipsen, S. (1991), Hypersensitive site 4 of the human β -globin locus control region, *Nucl. Acids Res.*, **19**:1413-1419.
- Raguz, S., Hobbs, C., Yagüe, E., Ioannou, P.A., Walsh, F.S., y Antoniou, M. (1998), Muscle-specific locus control region activity associated with the human desmin gene, *Develop. Biol.* en imprenta.
- 10 Ray, P., Higgins, K.M., Tan, J.C., Chu, T.Y., Yee, N.S., Nguyen, H., Lacy, E., Besmer, P. (1991), Ectopic expression of a c-kit^{W42} minigene in transgenic mice: recapitulation of W phenotypes and evidence for c-kit function in melanoblast progenitors, *Genes Dev.*, **5**:2265-2273.
- Reeves, R., Gorman, C.M., y Howard, B. (1985), Minichromosome assembly of non-integrated plasmid DNA transfected into mammalian cells, *Nucl. Acids Res.*, **13**:3599-3615.
- 15 Reitmann, M., Lee, E., Westphal, H., y Felsenfeld, G. (1993), An enhancer / locus control region is not sufficient to open chromatin, *Mol. Cell Biol.*, **13**:3990-3998.
- Saccone, S., Biamonti, G., Maugeri, S., Bassi, M.T., Bunone, G., Riva, S., Della Valle, G. (1992), Assignment of the human heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 gene (HNRPA1) to chromosome 12q13.1 by cDNA competitive in situ hybridization, *Genomics*, **12**:171-174.
- 20 Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T. (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Smith, C.L., Archer, T.K., Hamlin-Green, G., y Hager, G.L. (1993), Newly expressed progesterone receptor cannot activate stable, replicated mouse mammary tumor virus templates but acquires transactivation potential upon continuous expression, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**:11202-11206.
- 25 Southern, E.M. (1975), Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, *J. Mol. Biol.*, **98**:503-517.
- Sun, T.Q., Fernstermacher, D.A., y Vos, J.M. (1994), Human artificial episomal chromosomes for cloning large DNA fragments in human cells, *Nat. Genet.*, **8**:33-41.
- 30 Talbot, D., Philipsen, S., Fraser, P., y Grosveld, F. (1990), Detailed analysis of the site 3 region of the human β -globin dominant control region, *EMBO J.*, **9**:2169-2178.
- Tamura, T., Osaka, F., Kawamura, Y., Higuti, T., Ishida, N., Nothwang, H.G., Tsurumi, C., Tanaka, K., Ichihara, A. (1994), Isolation and characterization of alpha-type HC3 and beta-type HC5 subunit genes of human proteasomes, *J. Mol. Biol.*, **244**:117-124.
- 35 Tartof, K.D., y Hobbs, C.A. (1987), Improved media for growing plasmid and cosmid clones, *Bethesda Res. Lab., Focus*, **9**:12.
- Tewari, R., Gillemans, N., Wijerde, M., Nuez, B., von Lindern, M., Grosveld, F., y Philipsen, S. (1998), Erythroid Krüppel-like factor (EKLF) is active in primitive and definitive erythroid cells and is required for the function of 5'HS3 of the β -globin locus control region, *EMBO J.*, **17**:2334-2341.
- 40 Trachtulec, Z., Hamvas, R.M., Forejt, J., Lehrach, H.R., Vincek, V., Klein, J. (1997), Linkage of TATA-binding protein and proteasome subunit C5 genes in mice and humans reveals synteny conserved between mammals and invertebrates, *Genomics*, **44**:1-7.
- Vyas, P., Vickers, M.A., Simmons, D.L., Ayyub, H., Craddock, C.F., Higgs, D.R. (1992), Cis-acting sequences regulating expression of the human alpha-globin cluster lie within constitutively open chromatin, *Cell*, **69**:781-793.
- 45 Wijerde, M., Grosveld, F., y Fraser, P. (1995), Transcription complex stability and chromatin dynamics in vivo, *Nature*, **377**:209-213.
- Winston, J.H., Hanten, G.R., Overbeek, P.A., y Kellems, R.E. (1992), 5' flanking sequences of the murine adenosine deaminase gene direct expression of a reporter gene to specific prenatal and postnatal tissues in transgenic mice, *J. Biol. Chem.*, **267**:13472-13479.

Winston, J.H., Hong, L., Datta, S.K., y Kellems, R.E. (1996), An intron 1 regulatory region from the murine adenosine deaminase gene can activate heterologous promoters for ubiquitous expression in transgenic mice, *Som. Cell Mol. Genet.*, **22**:261-278.

5 Yamashita, T., Kasai, N., Miyoshi, I., Sasaki, N., Maki, K., Sakai, M., Nishi, S., y Namioka, S. (1993), High level expression of human alpha-fetoprotein in transgenic mice, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **191**:715-720.

Yates, J.L., Warren, N., y Sugden, B. (1985), Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells, *Nature*, **313**:812-815.

Zhumabekov, T., Corbella, P., Tolaini, M., Kioussis D. (1995), Improved version of a human CD2 minigene based vector for T cell-specific expression in transgenic mice, *J. Immunol. Methods*, **185**:133-140.

10

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método para obtener un producto génico deseado que comprende cultivar una célula hospedante, en el que la célula hospedante comprende un vector, y el vector comprende un polinucleótido, comprendiendo dicho polinucleótido:
- 5 (i) una isla de CpG exenta de metilación extendida que comprende promotores duales o bidireccionales que se transcriben de modo divergente, en el que la isla de CpG exenta de metilación extendida se extiende en más de 300 pb y comprende además un contenido medio en GC del 60%;
- (ii) un gen expresable que codifica un producto génico deseado, en el que el gen expresable está unido operablemente a la isla de CpG; y
- 10 (iii) un promotor, unido operablemente al gen expresable, en el que el promotor no está unido operablemente en la naturaleza a la isla de CpG;
- en el que la isla de CpG exenta de metilación extendida abre la cromatina o mantiene a la cromatina en un estado abierto y facilita la activación de la transcripción reproducible del gen expresable.
- 15 2.- El método de la reivindicación 1, en el que la isla de CpG exenta de metilación extendida comprende al menos un promotor endógeno.
- 3.- El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la isla de CpG exenta de metilación extendida comprende promotores duales que se transcriben de modo divergente.
- 4.- El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la isla de CpG exenta de metilación extendida se extiende en más de 500 pb.
- 20 5.- El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la isla de CpG exenta de metilación extendida comprende un fragmento de ADN de 44 kb que abarca el gen de la proteína de unión a TATA humana, y 12 kb de cada una de las secuencias flanqueantes 5' y 3'.
- 25 6.- El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la isla de CpG exenta de metilación extendida comprende un fragmento de ADN de 25 kb que abarca el gen de la proteína de unión a TATA humana, con 1 kb de la secuencia flanqueante 5' y 5 kb de la secuencia flanqueante 3'.
- 7.- El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la isla de CpG exenta de metilación extendida comprende la secuencia según la figura 21 o un fragmento funcional de ésta.
- 30 8.- El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la isla de CpG exenta de metilación extendida comprende un fragmento de ADN de 60 kb que abarca el gen de la ribonucleoproteína nuclear A2 heterogénea humana, con 30 kb de la secuencia flanqueante 5' y 20 kb de la secuencia flanqueante 3'.
- 9.- El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la isla de CpG exenta de metilación extendida comprende un fragmento de ADN de 16 kb que abarca el gen de la ribonucleoproteína nuclear A2 heterogénea humana, con 5 kb de la secuencia flanqueante 5' y 1,5 kb de la secuencia flanqueante 3'.
- 35 10.- El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el vector comprende un promotor heterólogo que es un promotor específico de tejido o un promotor sustancialmente ubicuo.
- 11.- El método de la reivindicación 10, en el que el promotor es un promotor sustancialmente ubicuo y es un promotor de CMV.
- 12.- El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el gen expresable codifica un polipéptido terapéutico.
- 40 13.- El método de la reivindicación 12, en el que el gen expresable codifica un anticuerpo terapéutico o su fragmento.
- 14.- El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la isla de CpG exenta de metilación extendida aumenta la expresión del gen expresable unido operablemente.
- 45 15.- El uso de un polinucleótido aislado que comprende una isla de CpG exenta de metilación extendida para aumentar la expresión de un gen endógeno, comprendiendo dicho uso insertar el polinucleótido en el genoma de una célula en una posición operablemente asociada con el gen endógeno, aumentando con ello el nivel de expresión del gen;
- en el que el gen endógeno está unido operablemente a un promotor que no está unido operablemente en la naturaleza a la isla de CpG exenta de metilación extendida;

en el que la isla de CpG exenta de metilación extendida comprende promotores duales o bidireccionales que se transcriben de modo divergente;

en el que la isla de CpG exenta de metilación extendida se extiende en mas de 300 pb, y comprende además un contenido medio en GC del 60%; y

5 en el que la isla de CpG exenta de metilación extendida abre la cromatina o mantiene a la cromatina en un estado abierto y facilita la activación de la transcripción reproducible del gen endógeno.

16.- Un polinucleótido que comprende:

10 (i) una isla de CpG exenta de metilación extendida que comprende promotores duales o bidireccionales que se transcriben de modo divergente, en el que la isla de CpG exenta de metilación extendida se extiende en más de 300 pb y comprende además un contenido medio en GC del 60%;

(ii) un gen expresable que codifica un producto génico deseado, en el que el gen expresable está unido operablemente a la isla de CpG; y

(iii) un promotor, unido operablemente al gen expresable, en el que el promotor no está unido operablemente en la naturaleza a dicha isla de CpG;

15 para su uso como un medicamento, en el que la isla de CpG exenta de metilación extendida abre la cromatina o mantiene a la cromatina en un estado abierto y facilita la activación de la transcripción reproducible del gen expresable.

17.- Un polinucleótido que comprende:

20 (i) una isla de CpG exenta de metilación extendida que comprende promotores duales o bidireccionales que se transcriben de modo divergente, en el que la isla de CpG exenta de metilación extendida se extiende en más de 300 pb y comprende además un contenido medio en GC del 60%;

(ii) un gen expresable que codifica un producto génico deseado, en el que el gen expresable está unido operablemente a la isla de CpG; y

25 (iii) un promotor, unido operablemente al gen expresable, en el que el promotor no está unido operablemente en la naturaleza a dicha isla de CpG;

para su uso en el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne, en el que la isla de CpG exenta de metilación extendida abre la cromatina o mantiene a la cromatina en un estado abierto y facilita la activación de la transcripción reproducible del gen expresable.

18.- Un polinucleótido aislado que comprende:

30 (i) una isla de CpG exenta de metilación extendida que comprende promotores duales o bidireccionales que se transcriben de modo divergente, en el que la isla de CpG exenta de metilación extendida se extiende en más de 300 pb y comprende además un contenido medio en GC del 60%;

(ii) una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo terapéutico, en el que la secuencia de nucleótidos está unida operablemente a la isla de CpG exenta de metilación extendida; y

35 (iii) un promotor heterólogo unido operablemente a la secuencia de nucleótidos;

en el que la isla de CpG exenta de metilación extendida abre la cromatina o mantiene a la cromatina en un estado abierto y facilita la activación de la transcripción reproducible de la secuencia de nucleótidos.

19.- Un vector que comprende un polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18.

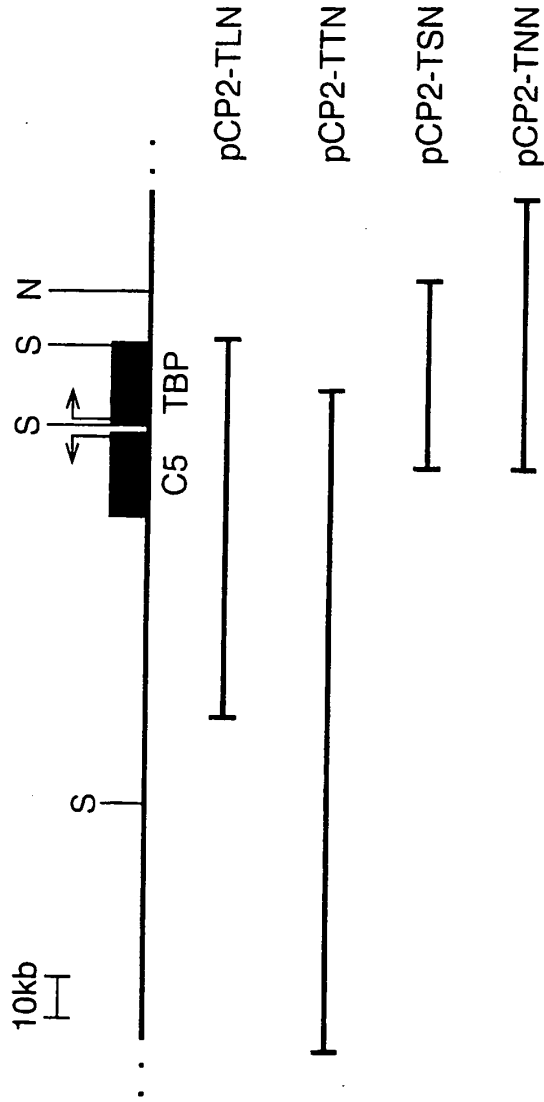


FIG. 1a

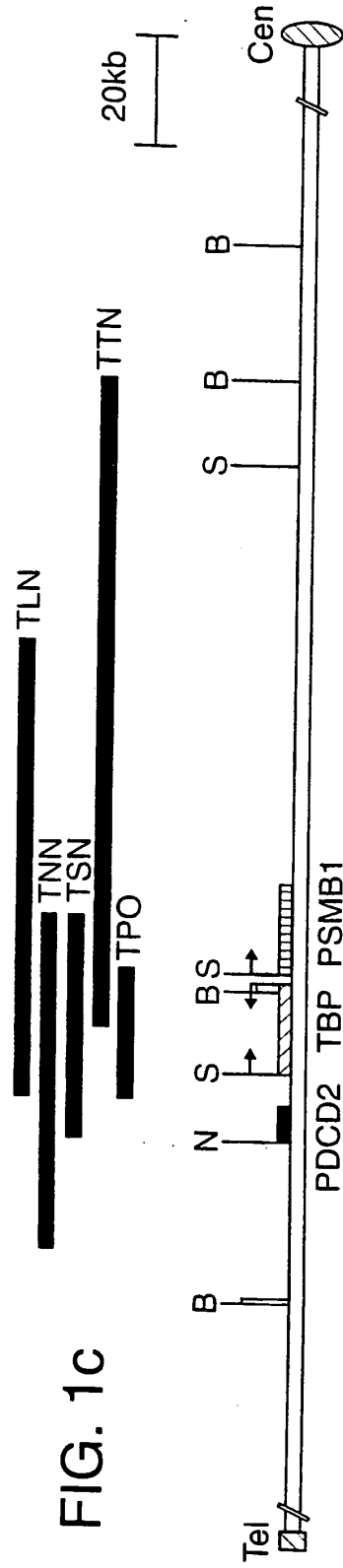
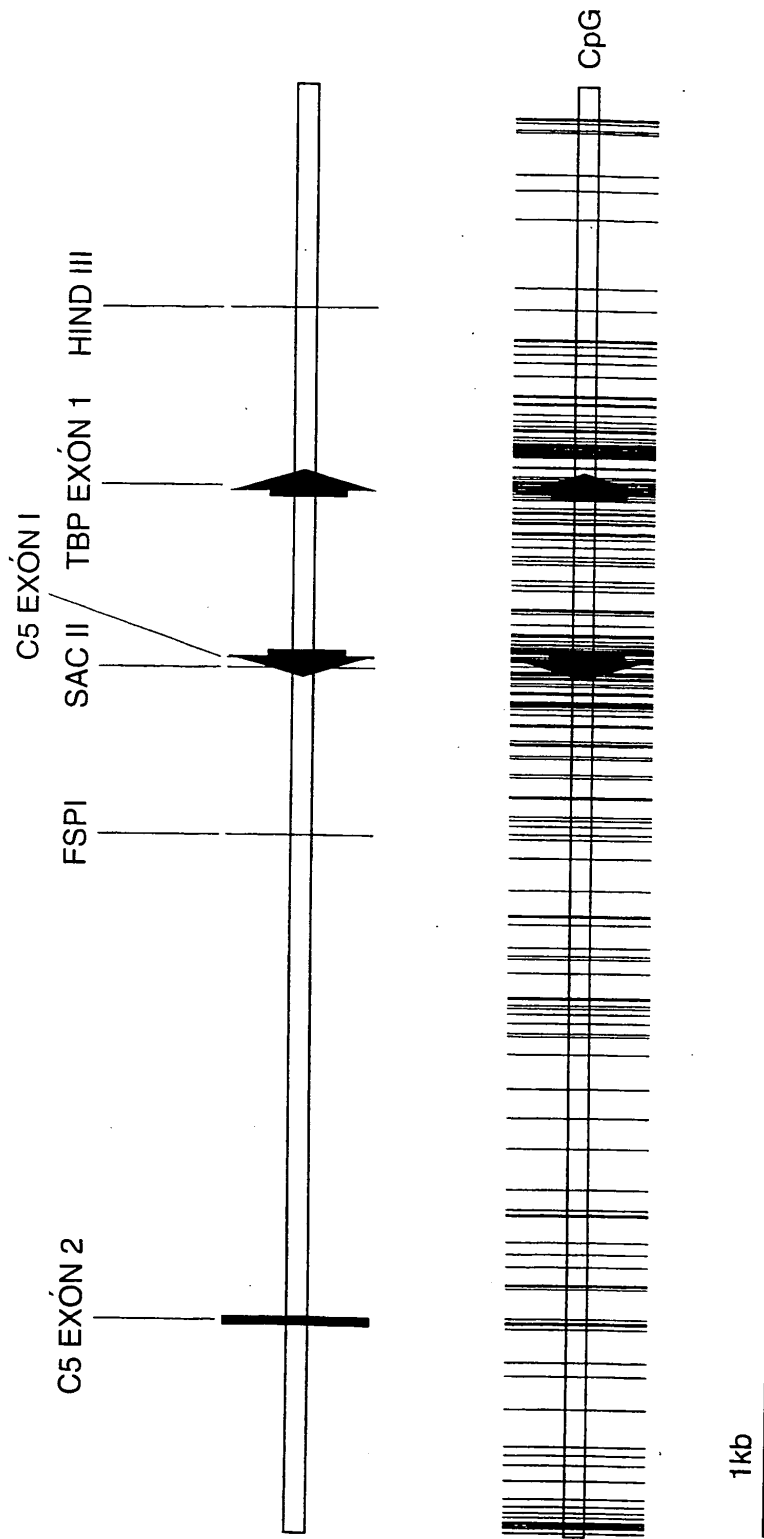


FIG. 1c

FIG. 1b



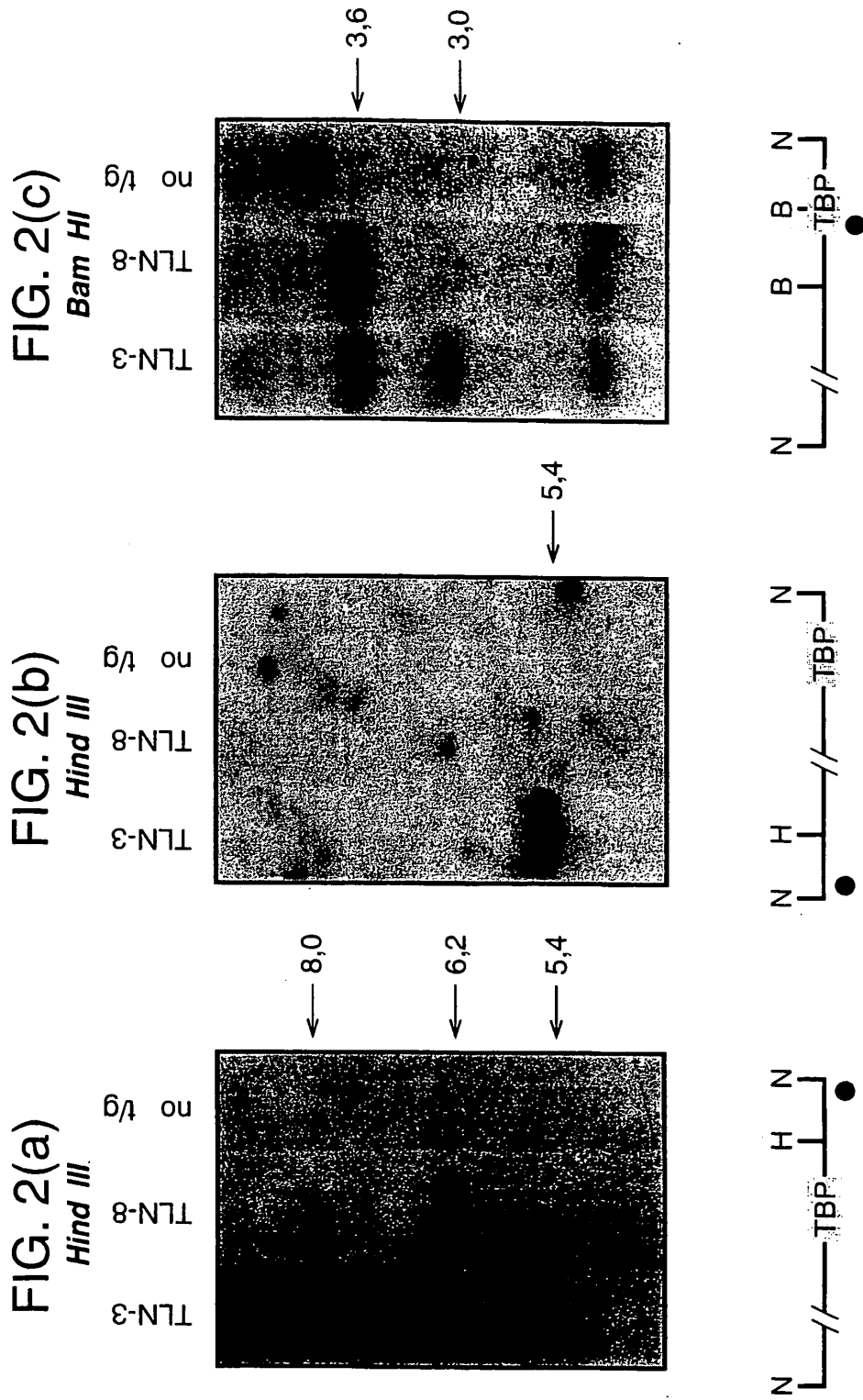
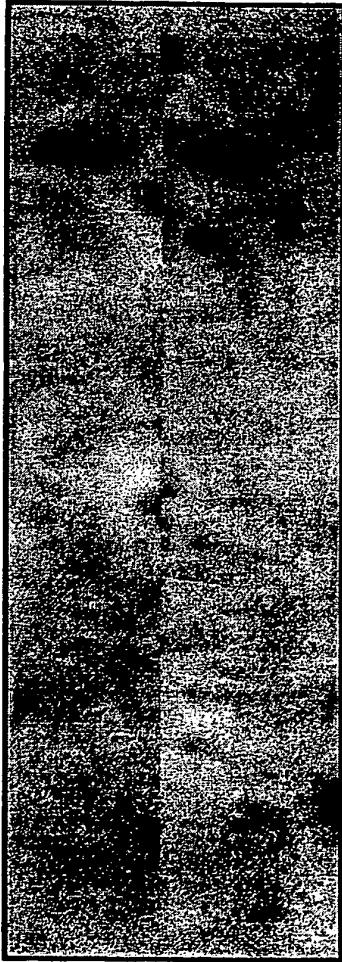


FIG. 2(d)

Hind III

TLN-3 TLN-8 no t/g



← 7,0

FIG. 2(e)

Bam HI

TLN-3 TLN-8 no t/g



← 2,5

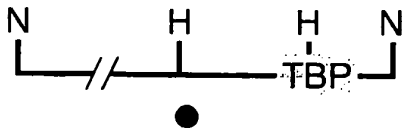
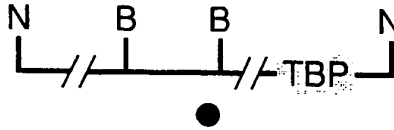


FIG. 3(a)

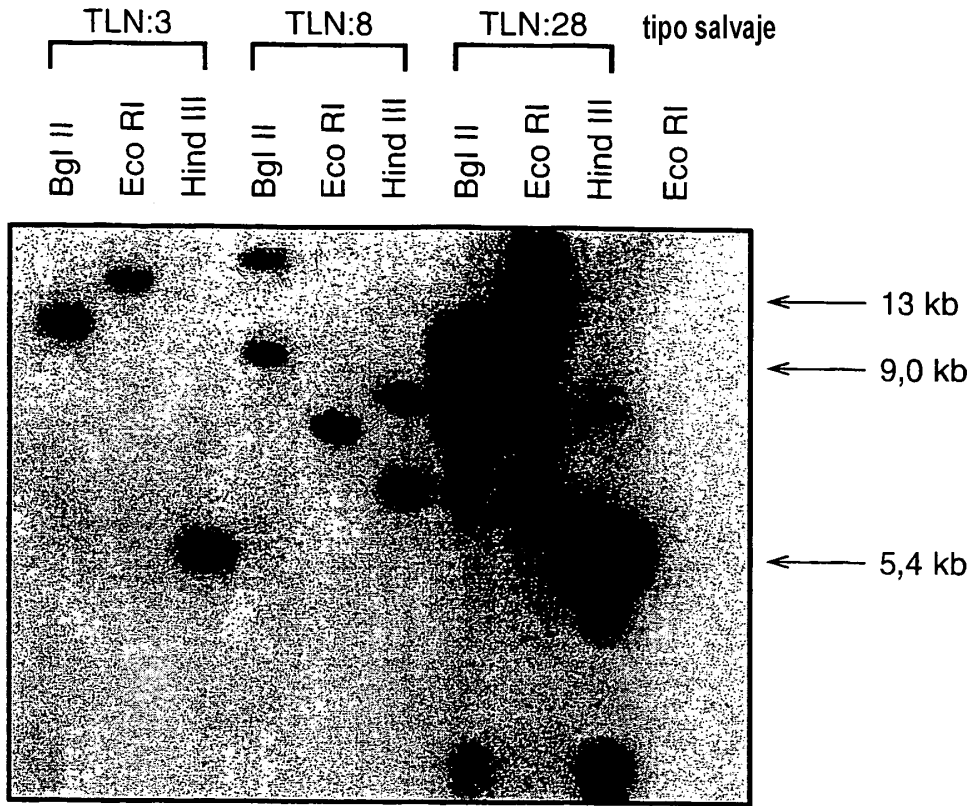


FIG. 3(b)

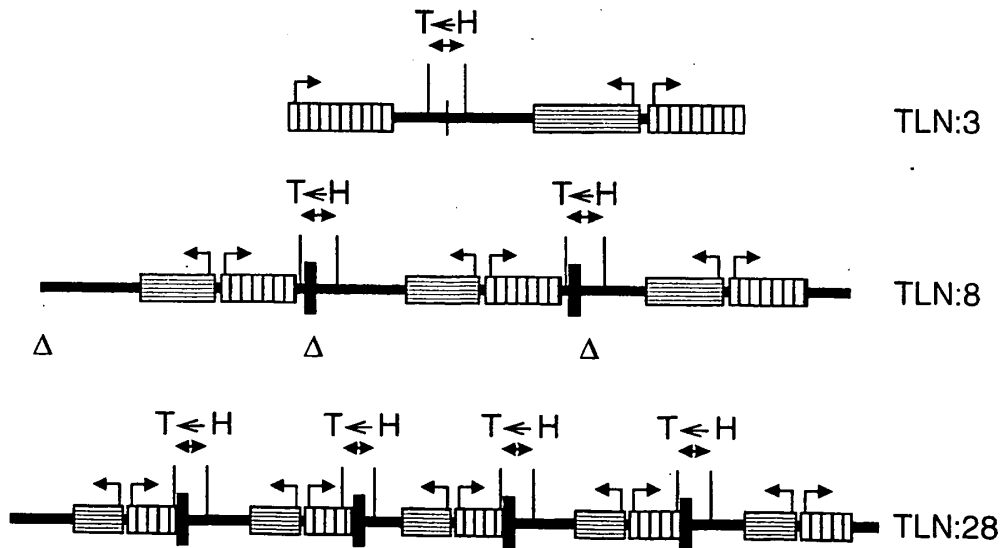


FIG. 3(c)

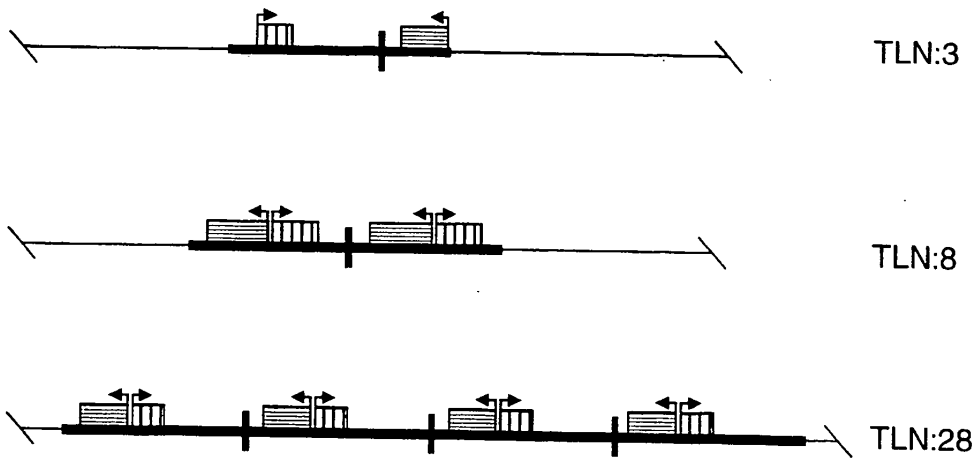


FIG. 4

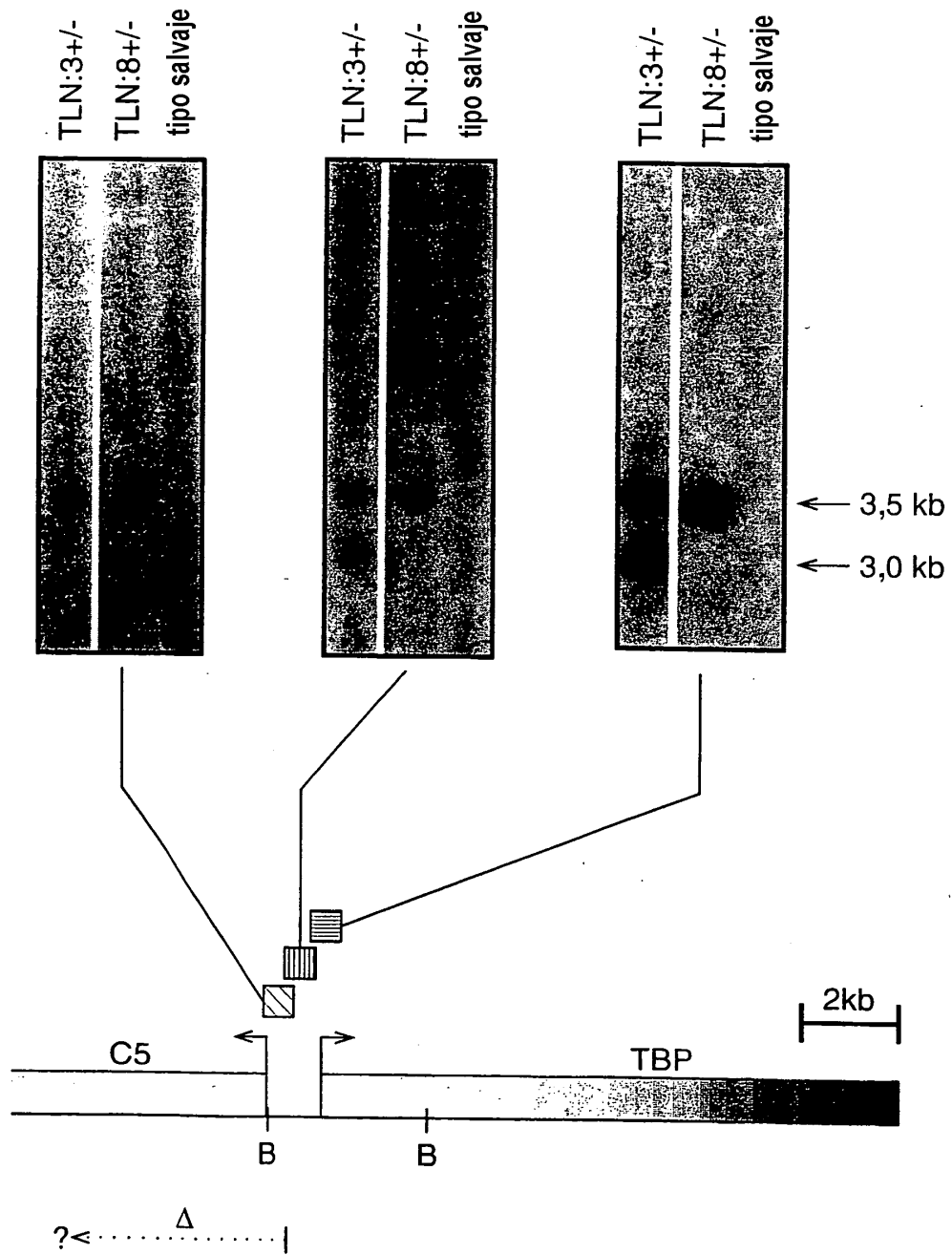


FIG. 5(a)

CSRTF

ARNm de C5

Hu:5' -ATTGCTGCAATGCTGTCTACAAATCCTGTATTCAGGGCCCTTCCACTACTATGTTTCAACATCATCGGTGGACTTGATGAAGAGAAAGGGGCTGTATACAGCT
|||||

Mo:5' -ATTGCTGCAATGCTGTCTACCAATCCTGTACTCAGGGCTTCCCTTACTATGTTTACAAATCATTTGGAGGACTTGATGAAGAGAAAGGGAGCTGTGTACAGCT
|||||

TTGATCCAGTAGGGTCTTACCAGAGAGACTCCTTCAAGGCTGGAGGCTCAGCAAGTGCCATGCTACAGCCCCCTGTGACAAACCAGGTGGTTTAAGAAACATGCAGAAATGTGGA
|||||

TTGACCCAGTGGGCTCTTACCAGAGAGACTCTTTCAGGGGGAGGCTCAGCAAGTGCCATGCTGACGCCCTGCTCGACAAACCAGGTGGCTTCAAAAAATATGCAGAAATGTGGA
|||||

GCATGTTCCGCTGCTTGGACAGAGCCAATGGGCTGGTGAAGAATGTTCTTCAATTTCTGGGCTGAGAGAGATGTGTACACTGGGACCGCACTCCGGATCTGCATAGTGACCAA
|||||

GCACGTCCTCCCTGACGCTGGACAGAGCCATGAGGCTGGTGAAGAATGTTCTTCAATTTCTGCACTCCGAGAGGGAATGTGTATATCTGGAGATGCTCTCAGGATCTGCATCTGTCGACCAA
|||||

GAGGGCATCAGG-3'
|||||

GAGGGCATCAGG-3'
|||||

Psi

CSR

FIG. 5(b)

ARNm de TBP

TB-22

Bsp14071

Hu: 5' - ATGGTGTGGACAGGAGCCAAAGAGT**TTA**GAAACAGTCCAGATGGCAGCAAGAAATAATGCCAGAGT**TTGTA**CA**GA**AGTTGGGTTTCCAGCTAAGTCTTGGACTTCAAG
 |||||
 Mo: 5' - ATGGTGTGGACAGGAGCCAAAGAGT**TTA**GAAACAGTCCAGATGGCAGCAAGAAATAATGCCAGAGT**TTGTA**CA**GA**AGTTGGGTTTCCAGCTAAGTCTTGGACTTCAAG
 |||||

ATTCAACAATGGTGGGAGCTGTGAATGTGAAGTTCCCTATAAGTTAGAAGCCCTTGTGCTCACCCACCAACAAATTTCCGTA**TTA**TAGAGCCAGAGTTAATTCCTGGTTAAATCT
 |||||
ATCCAACAATGGTGGGAGCTGTGAATGTGAAGTTCCCTATAAGTTAGAAGCCCTTGTGCTCACCCACCAACAAATTTCCGTA**TTA**TAGAGCCAGAGTTAATTCCTGGTTAAATCT
 |||||

G A T C

ACAGAA**TGA**TCAAA**CCC**CAGAA**TTG**TTCTCC**TTA**TTTTTGTCTGGAAAAGTTGTATTACAGGGT**G-3'**
 |||||
 ACAGAA**TGA**TCAAA**CCC**CAGAA**TTG**TTCTCC**TTA**TTTTTGTCTGGAAAAGTTGTATTACAGGGT**G-3'**
 |||||

TB-14

FIG. 6(a)



FIG. 6(b)
(TLN3)

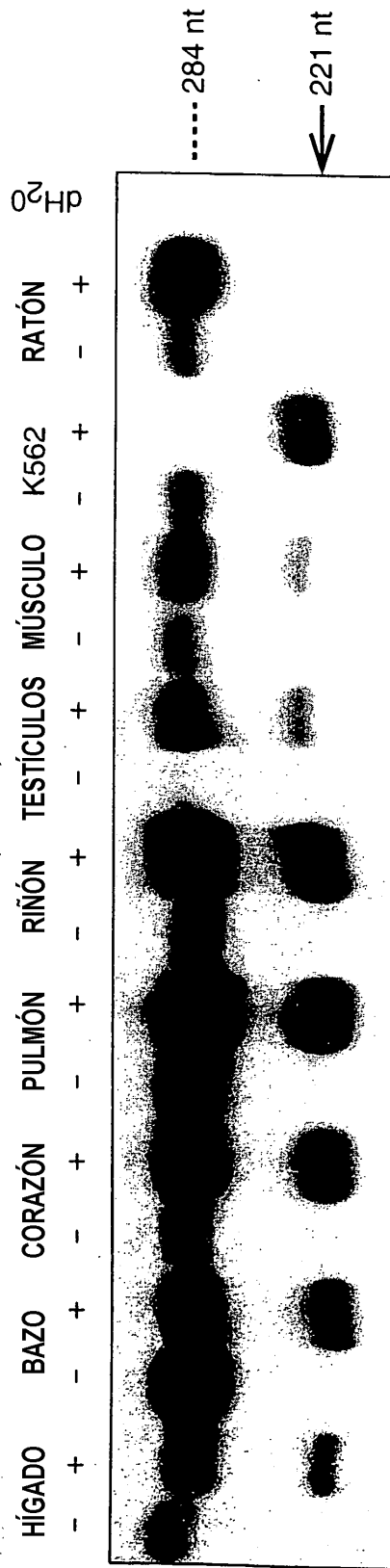


FIG. 6(c)(TLN8)

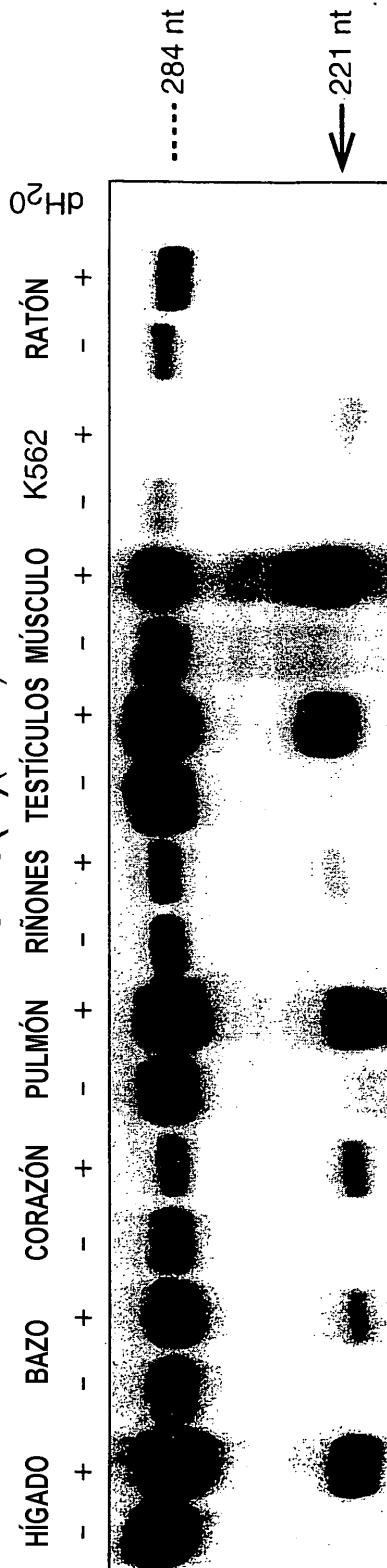
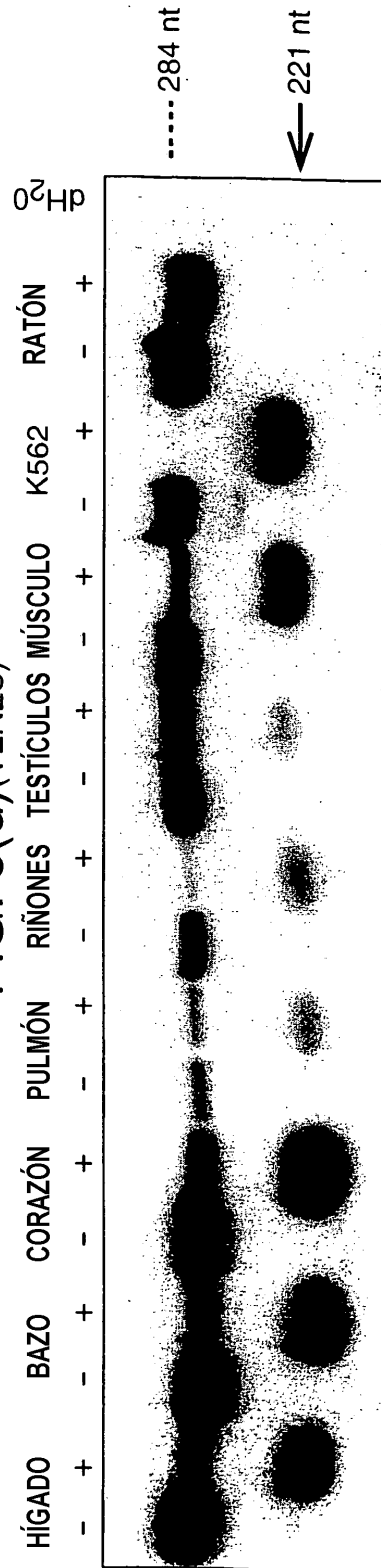
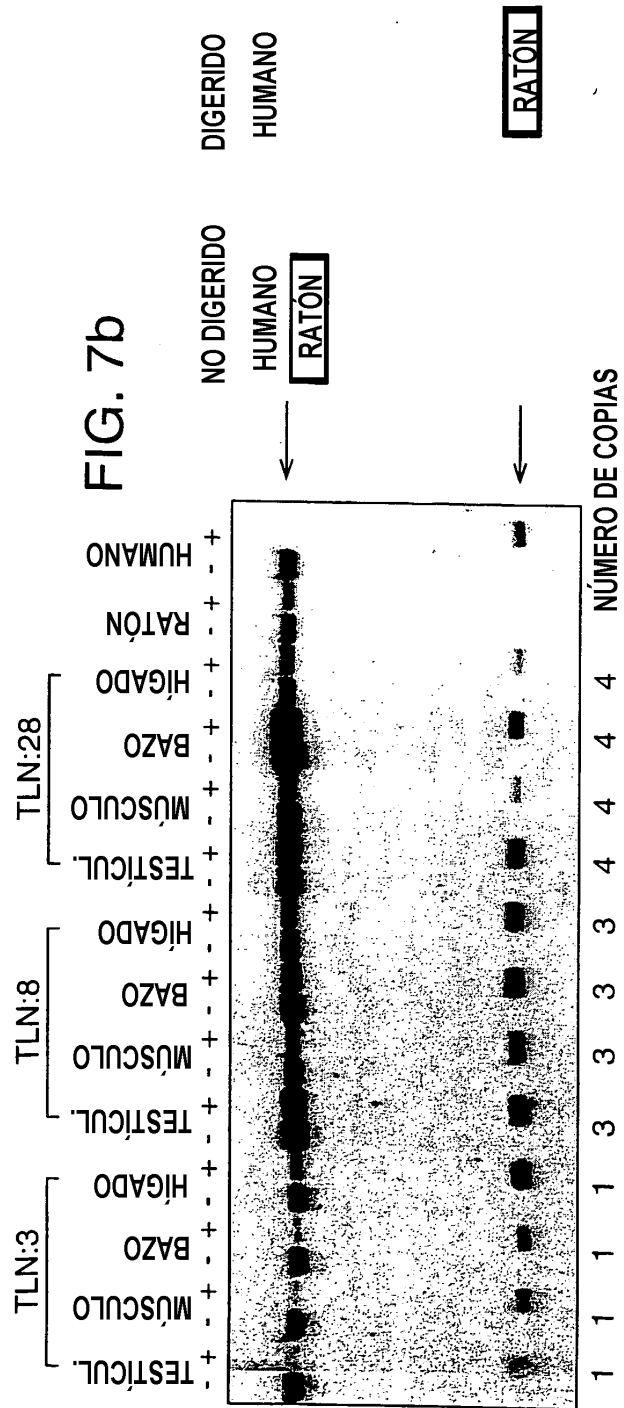
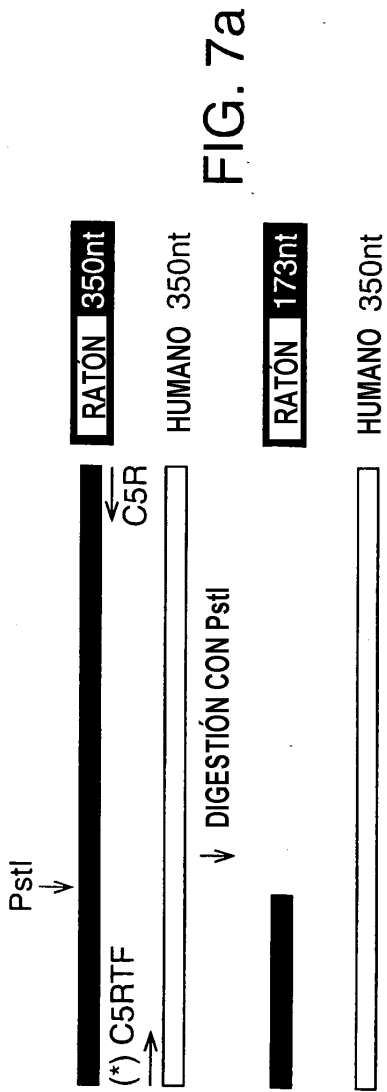


FIG. 6(d)(TLN28)





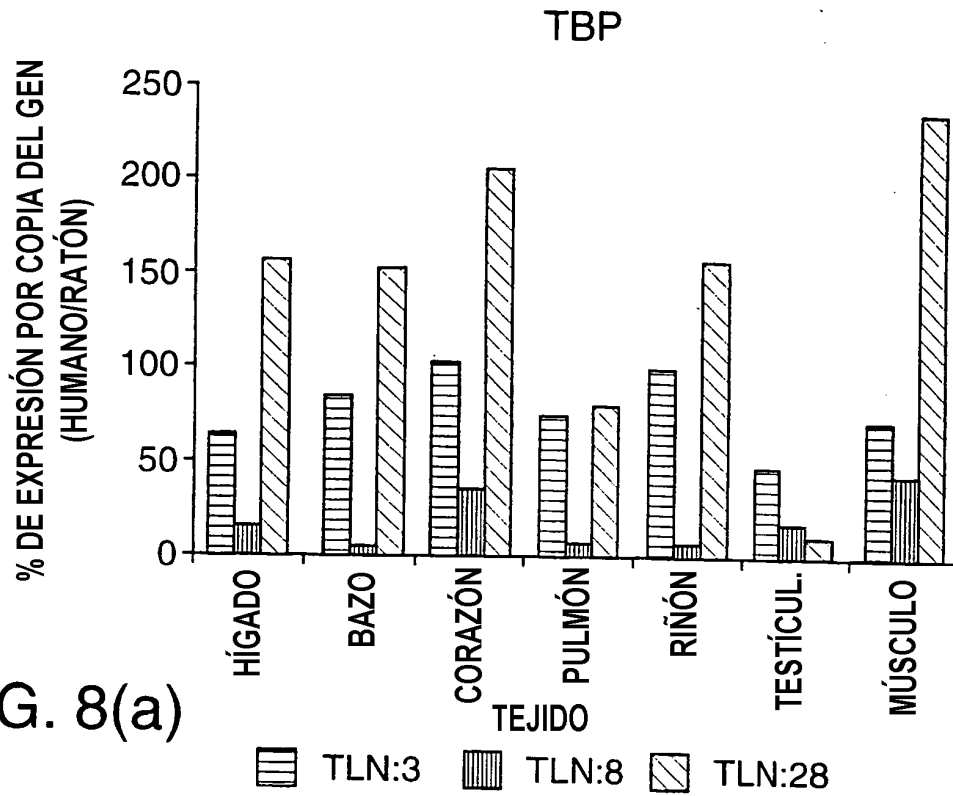


FIG. 8(a)

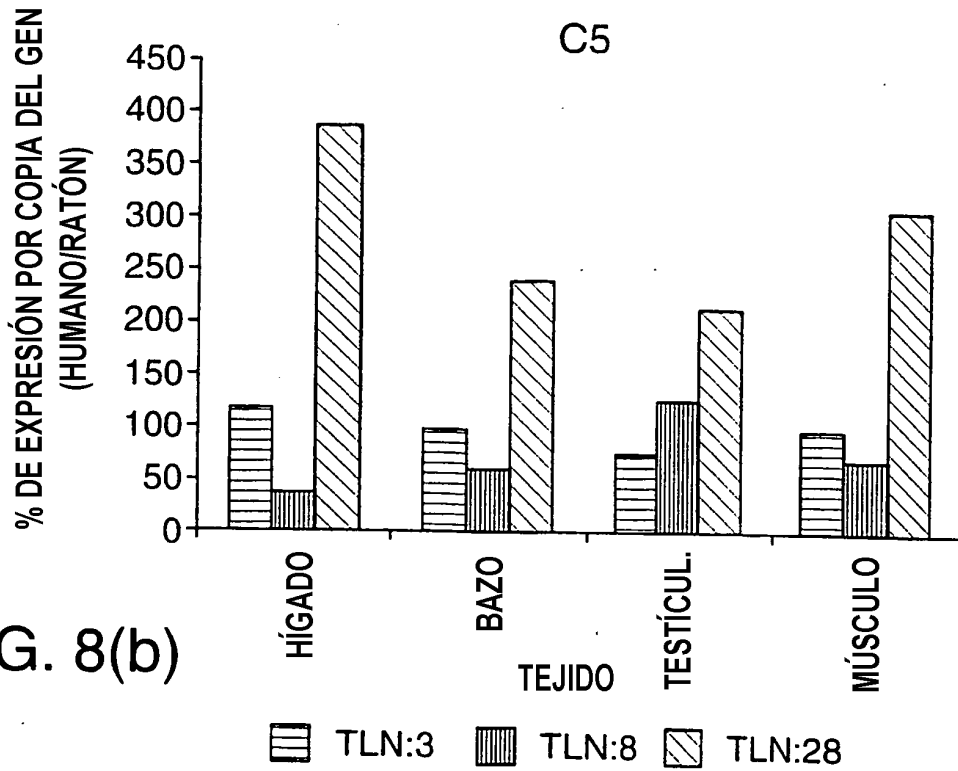


FIG. 8(b)

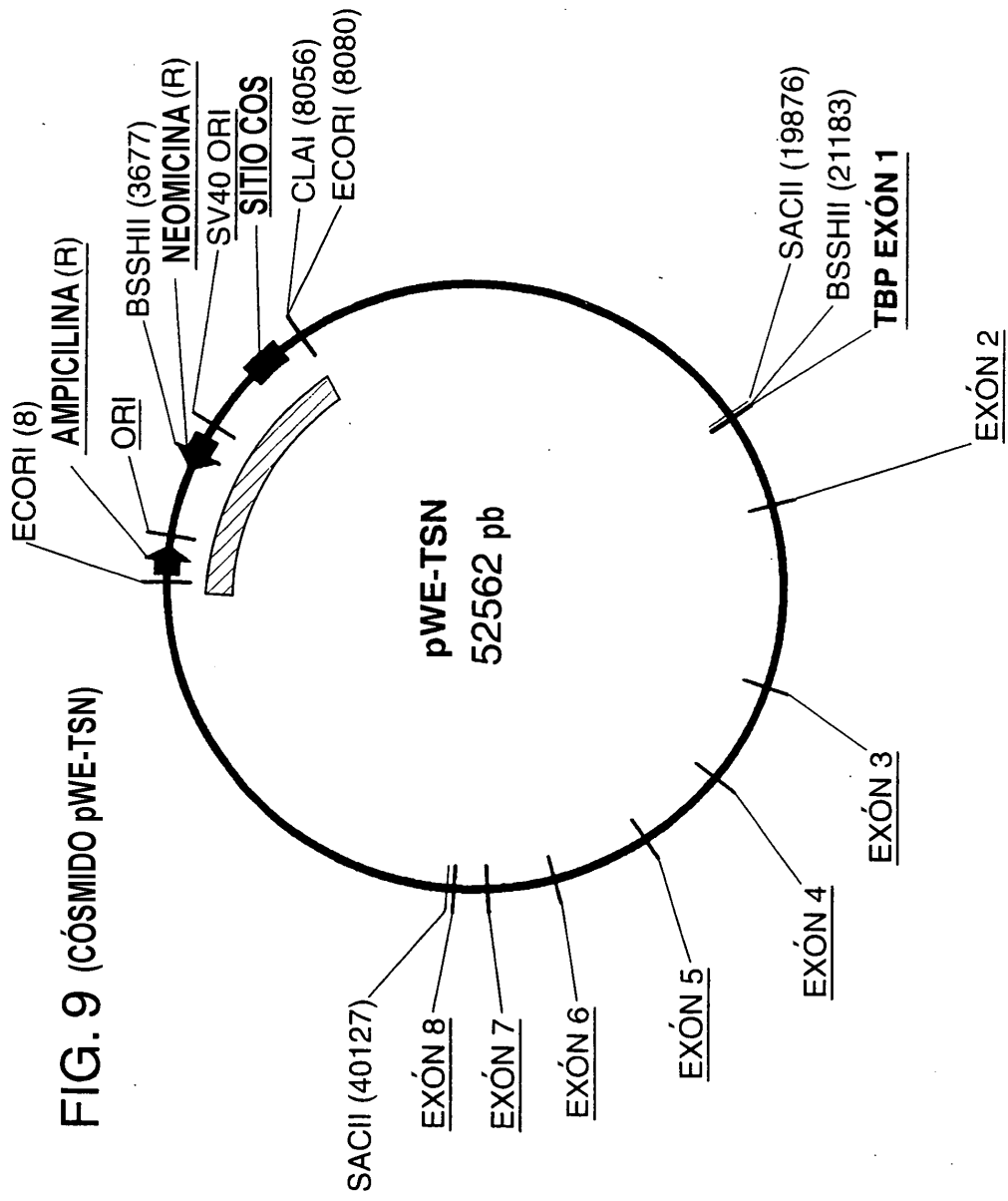


FIG. 9 (CÓSMIDO pWE-TSN)

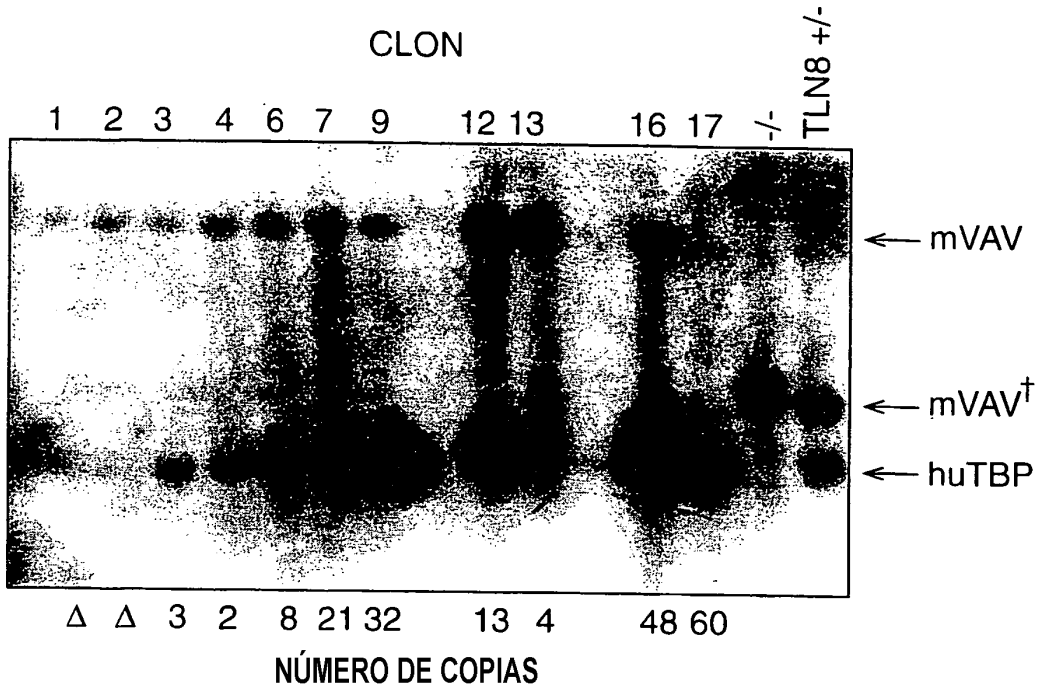
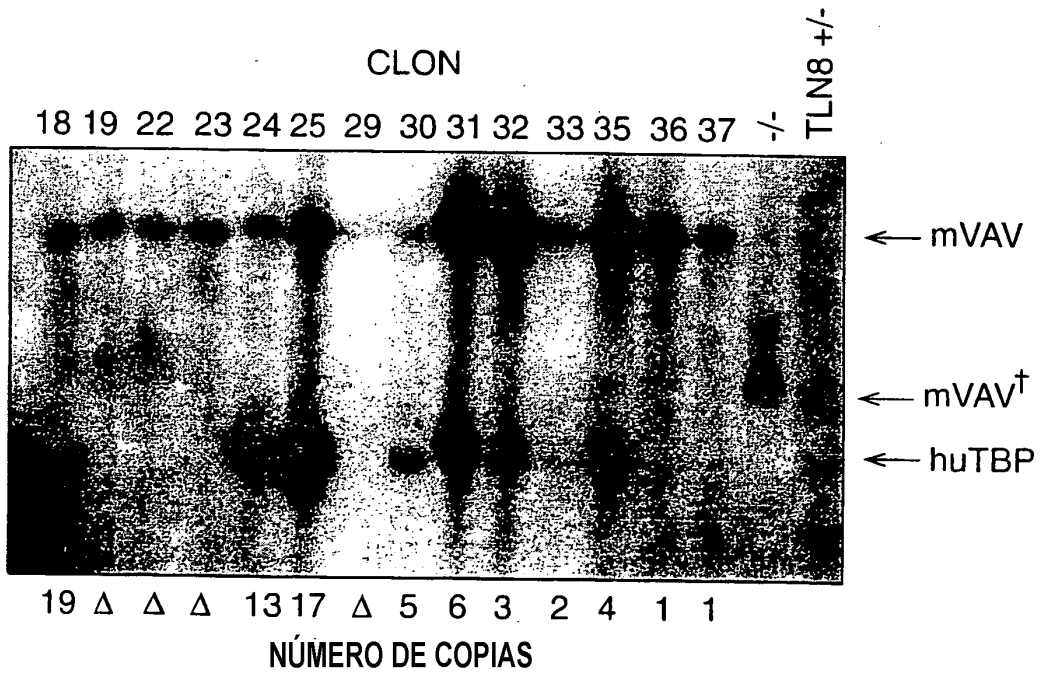


FIG.10



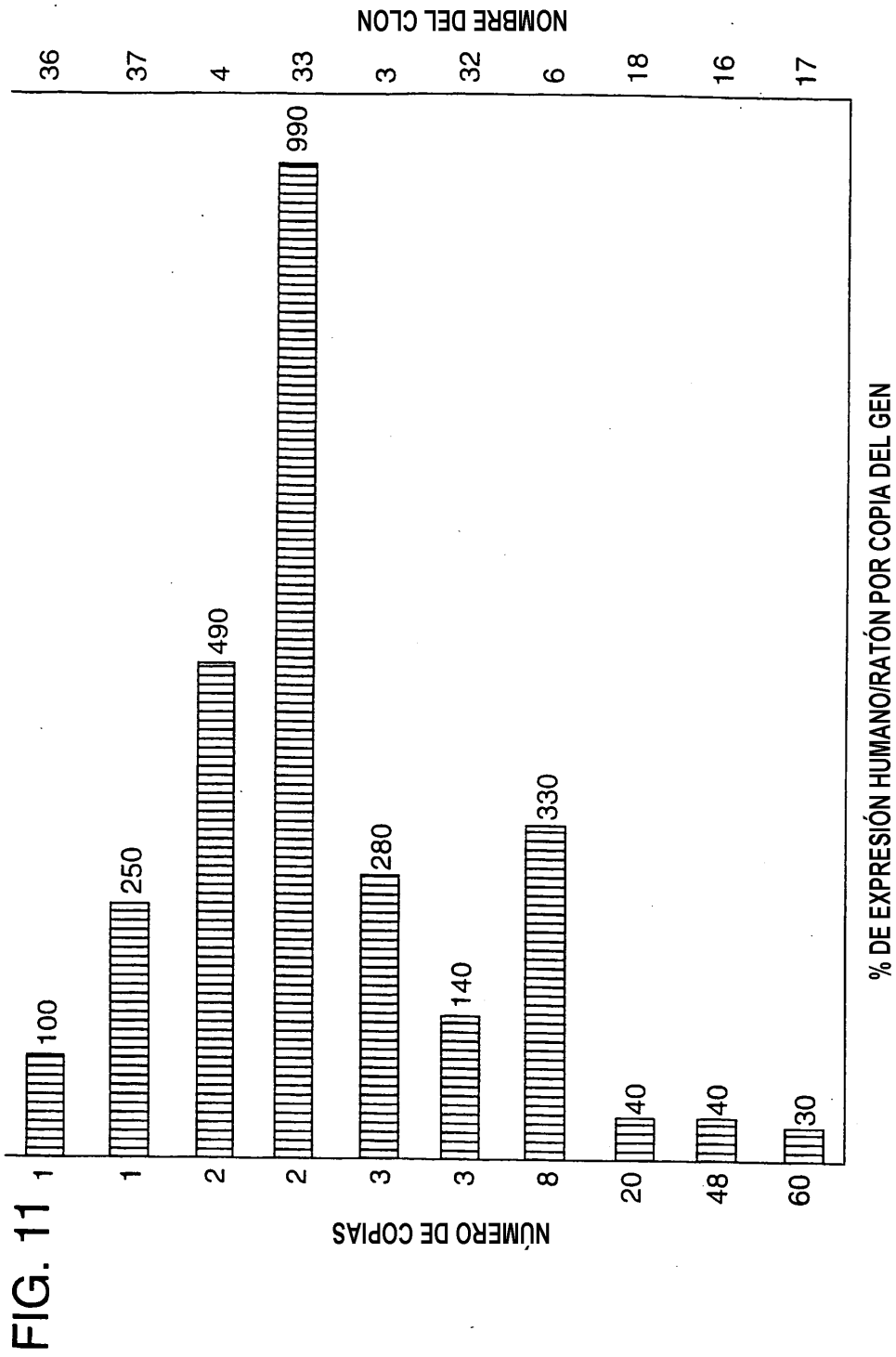


FIG. 12

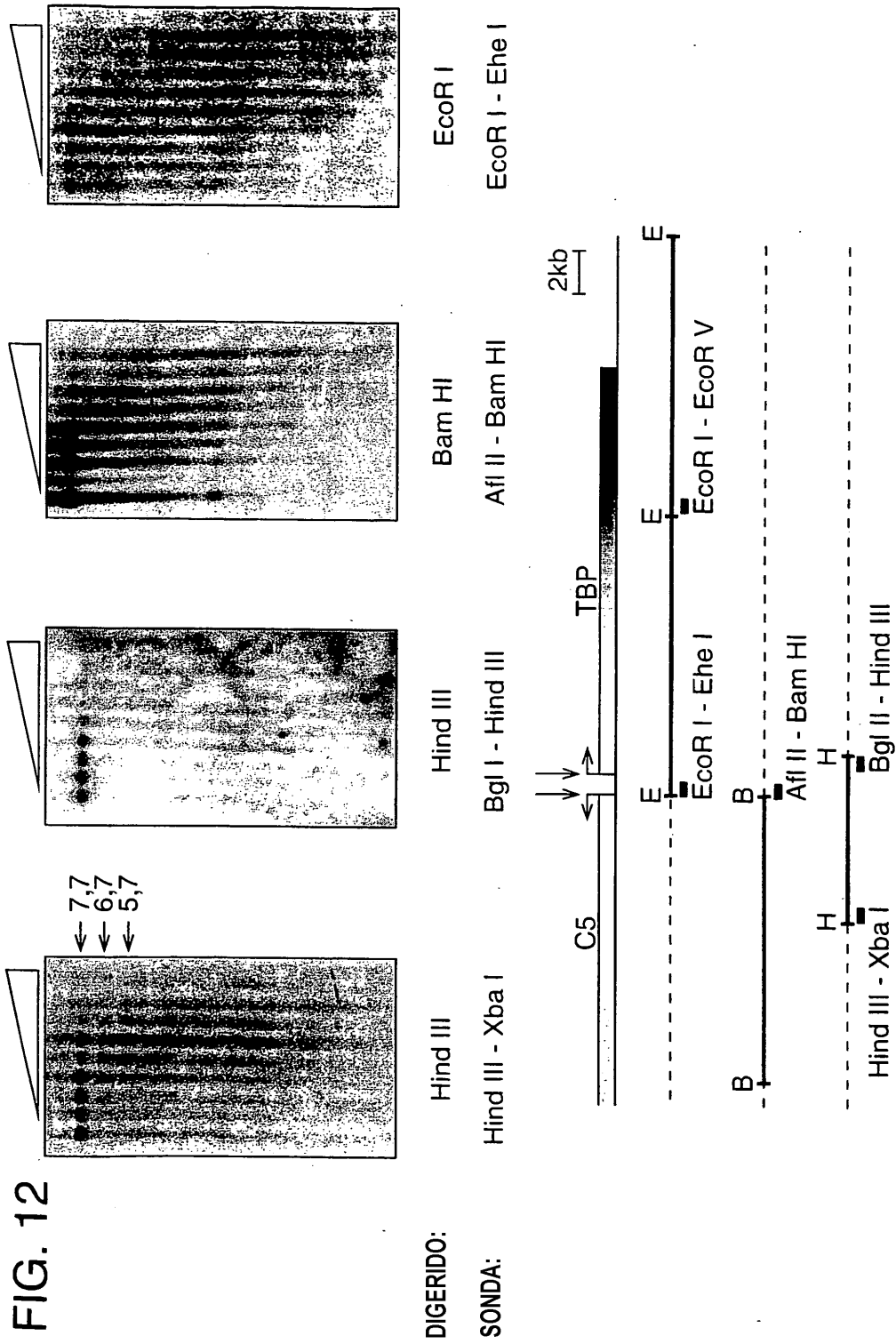


FIG. 13(A) FRAGMENTO Nru I DE 160 kb

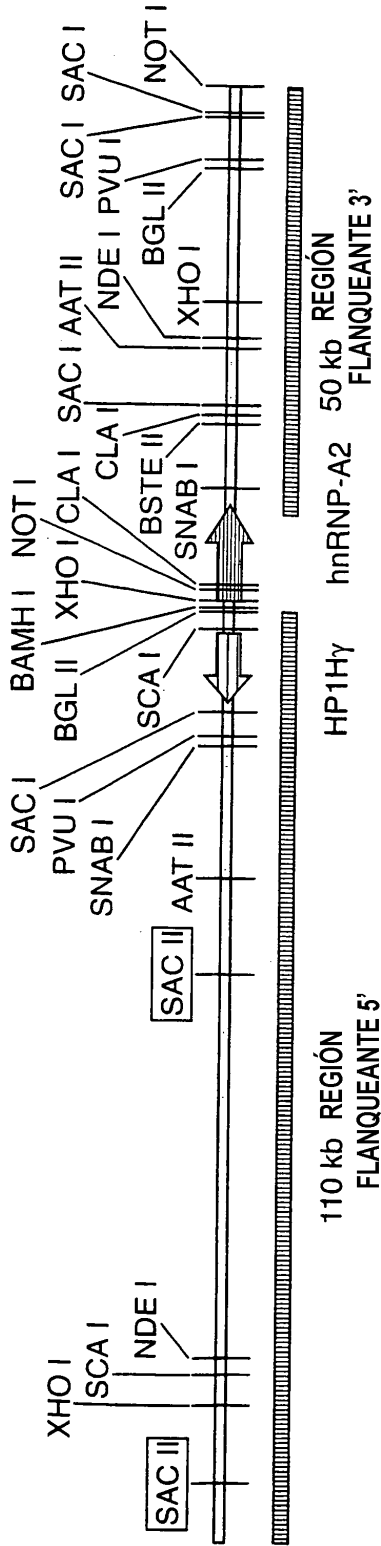


FIG. 13(B)

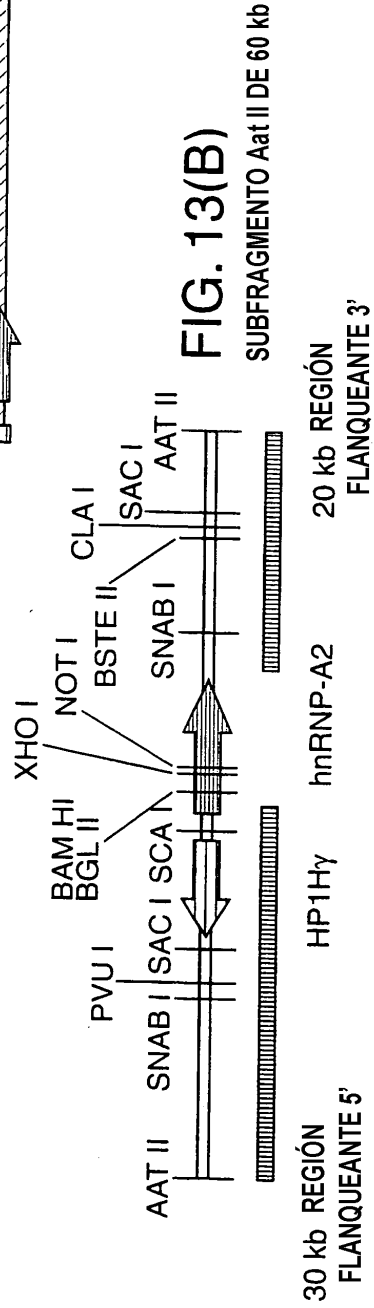


FIG. 13(C)

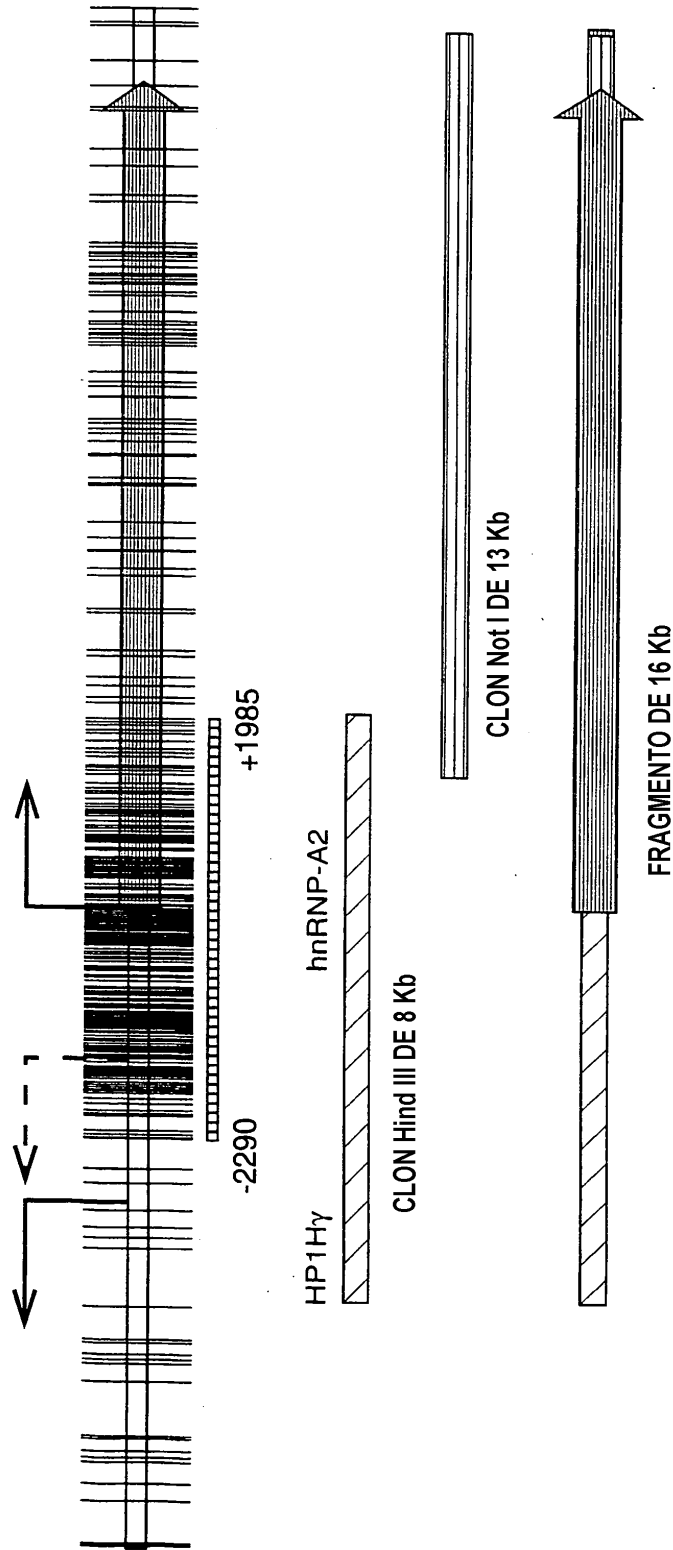


FIG. 14(a)

CEBADORES UTILIZADOS PARA LAS REACCIONES DE RT Y PCR

Hn 9

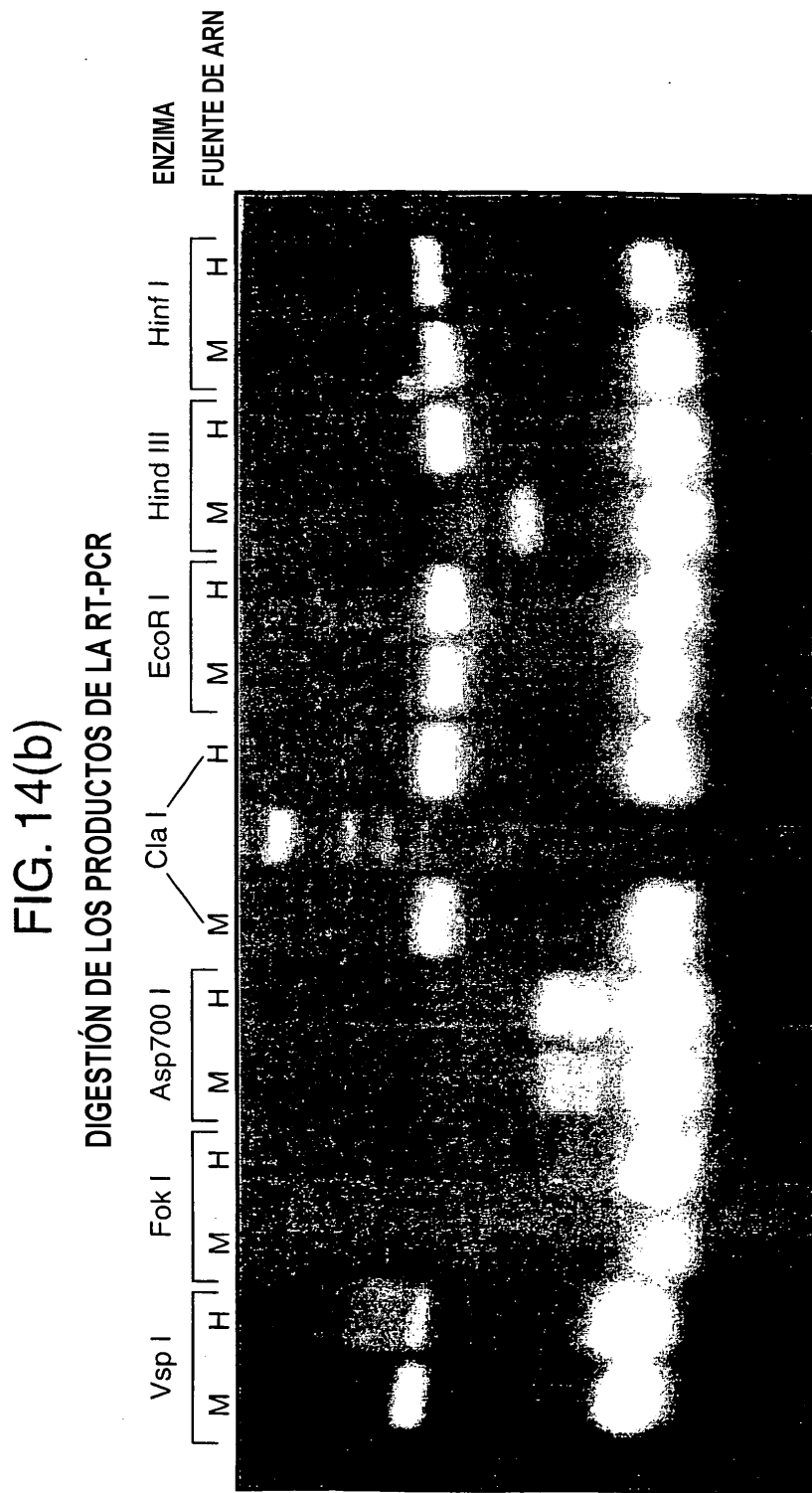
9801 GAAGTGGAAA TTACAATGAT TTTGGAAATT ATAACCAGCA ACCTTCTAAC
 9851 TACGGTCCAA TGAAGAGTGG AAACTTTGGT GGTAGCAGGA ACATGGGGGG
 9901 ACCATATGGT GGAGGTAATT TATAAAAATT GAGGTATTTC AGATTTTGT
 9951 GATTAAAGGA TTAGCCTTTT GTGACTTAAA GGAAGATAA CATACTAAGT
 10001 AGTTTGTACT GTGGGCAGTG CTCCATGTAC GGTCTTAGTG AAAATAAAGA
 10051 AATTTTGCAT AAATCTCCAC AGAAGTACTC AGCAAGCAGT TATGACATCA
 10101 AATTGGGATT AGGTAGTTGG AGGTGGGTGT CAGTAGTTTA ATTTCTGGTG
 10151 GGACTCATAA ACAGCTAAAT ACAGTTGCAA CCCACATTGC AAGTGGTATA
 10201 CATTGGAATG AGGGTCTTTG AAGTAAATC CTTAAACCAT GATTCAAACC
 10251 ATTGCTTAGC TTATTTTGA GGTTTTtagc TAGGAGTAAA CTAGCTTTGT
 10301 CTGGGCTTG ATGTACTTTT AAAAAAATCC CTTACTCAGT CCAAATGAGG
 10351 ATGAGAGGGT GAAAGGACCC TTTATTTAAA AGAATAGGGT CAGCCACGAA
 10401 ATAAAAATGT CTATGAACCC GAGTAATTTA TCTCCTGAGT AATCTGCTA
 10451 ACTGGCTGCA AAGGATTAGG ATCTGCTTGT TAAAAGACT GGATGGATAT
 10501 AAAATAGAAT CACTGTAGT GTTAGGCTGA TCATGGGAAA TCAAAGTAAG
 10551 TTTGTTTCT CTTGCTGTTC CAACAATTAT AGGAACTAT GGTCCAGGAG
 10601 GCAGTGGAGG AAGTGGGGT TATGGTGGGA GGAGCCGATA CTGAGCTTCT
 10651 TCCTATTTGC CATGGGTAAG TAGCTTTTGA GTTTACAAT TATTATTATC
 10701 TTGGGAGACA TAGCTGCAGG AGTAAAAGCT TTTAGGATC ATGGTTATCT
 10751 TTCCTTAAAA TCTGGTTAGA TGGATAATTT CATAACCCAT TTTTTTTTA
 10801 CCCTTTACTT CTGTTGAAAC AGGCTTCACT GTATAATAG GAGAGGATGA
 10851 GAGCCCAGAG GTAACAGAAC AGCTTCAGGT TATCGAAATA ACAATGTTAA
 10901 GGAACTCTT ATCTCAGTCA TGCATAATA TGCAGTGATA TGCAGAAGA
 10951 CACCAGAGCA GATGCAGAGA GCCATTTTGT GAATGGATTG GATTATTTAA
 11001 TAACATTACC TTA CTGTGGA GGAAGGATG TAAAAAATA TGCCTTTGAG

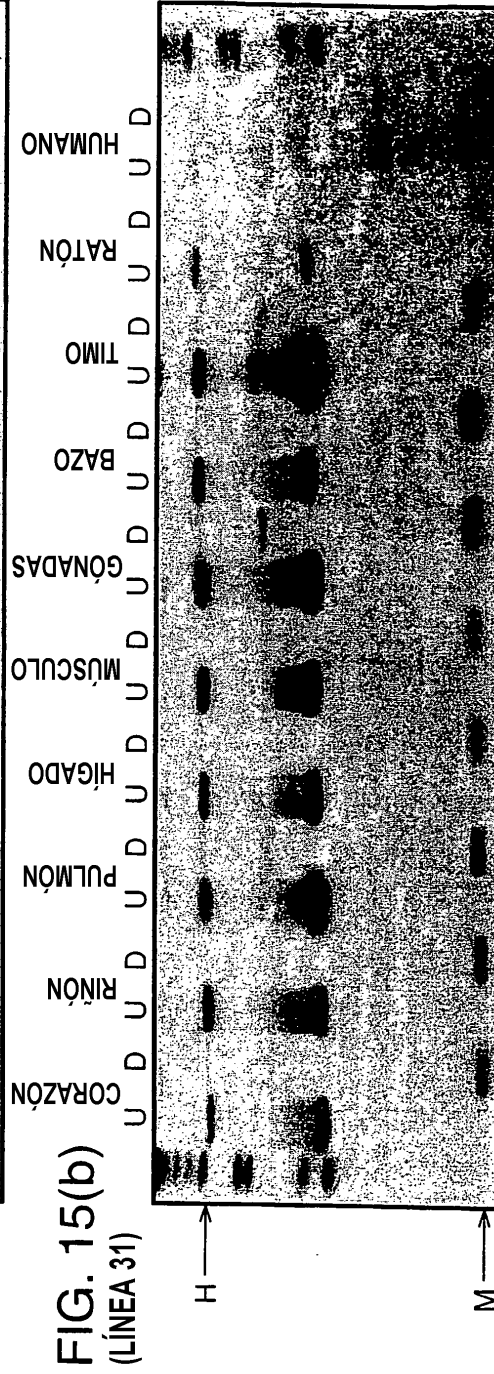
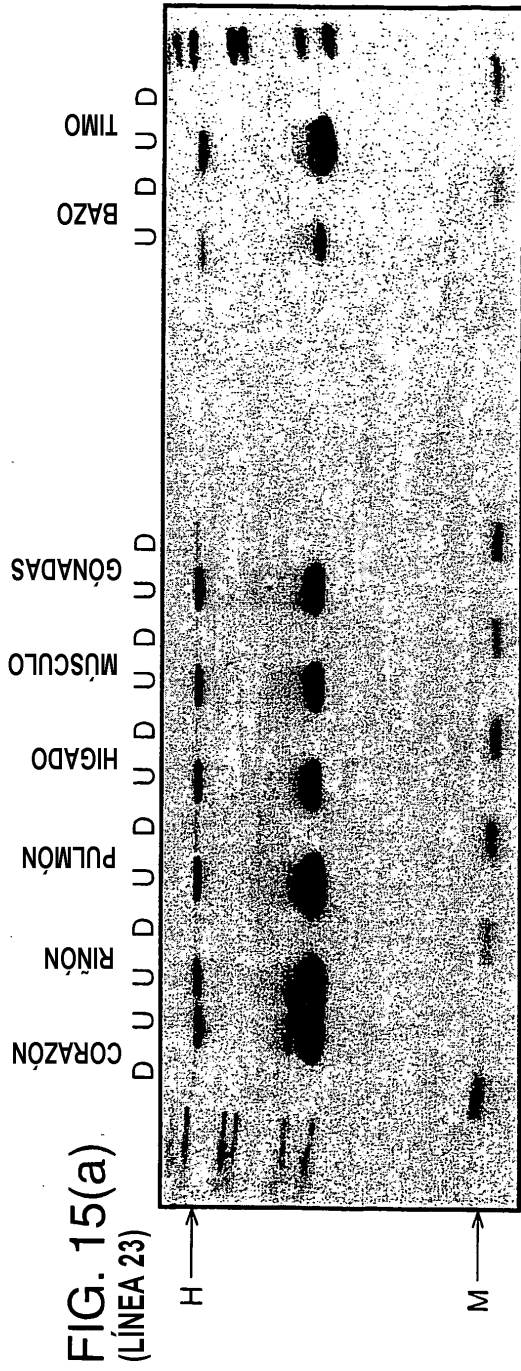
EXÓN 10

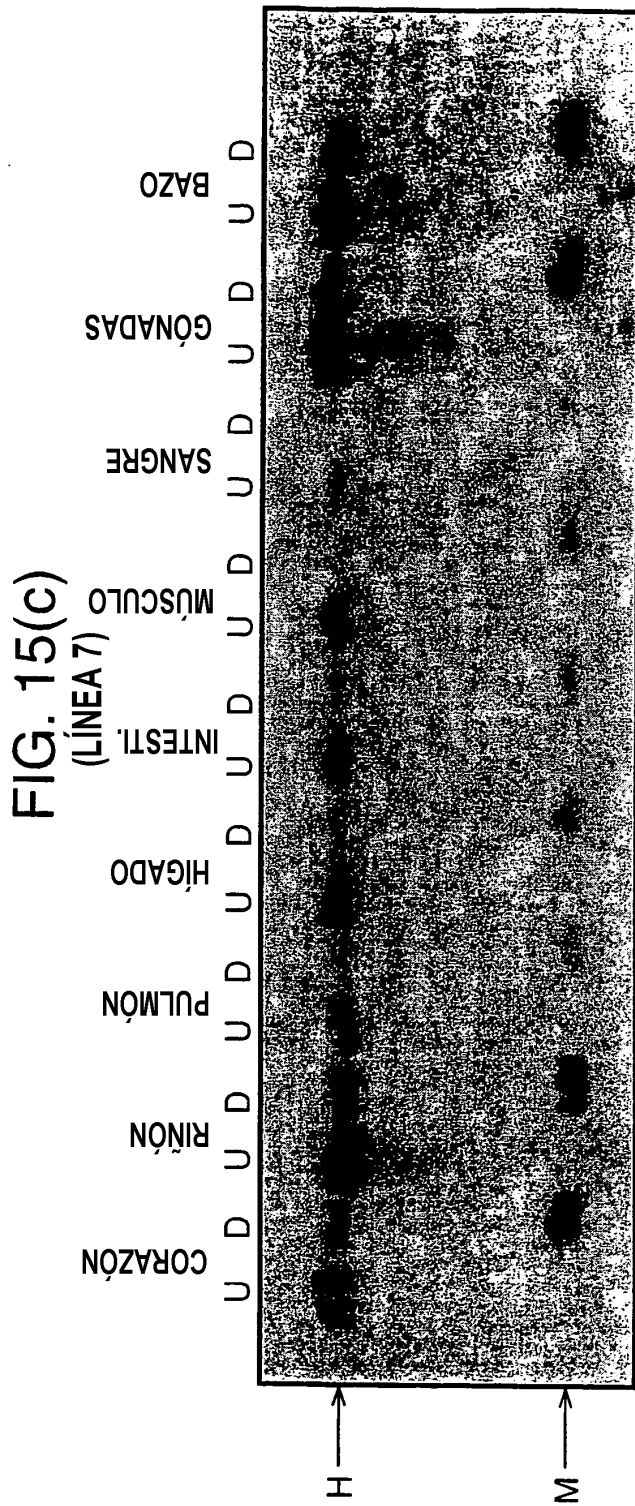
EXÓN 11

EXÓN 12

Hn 11







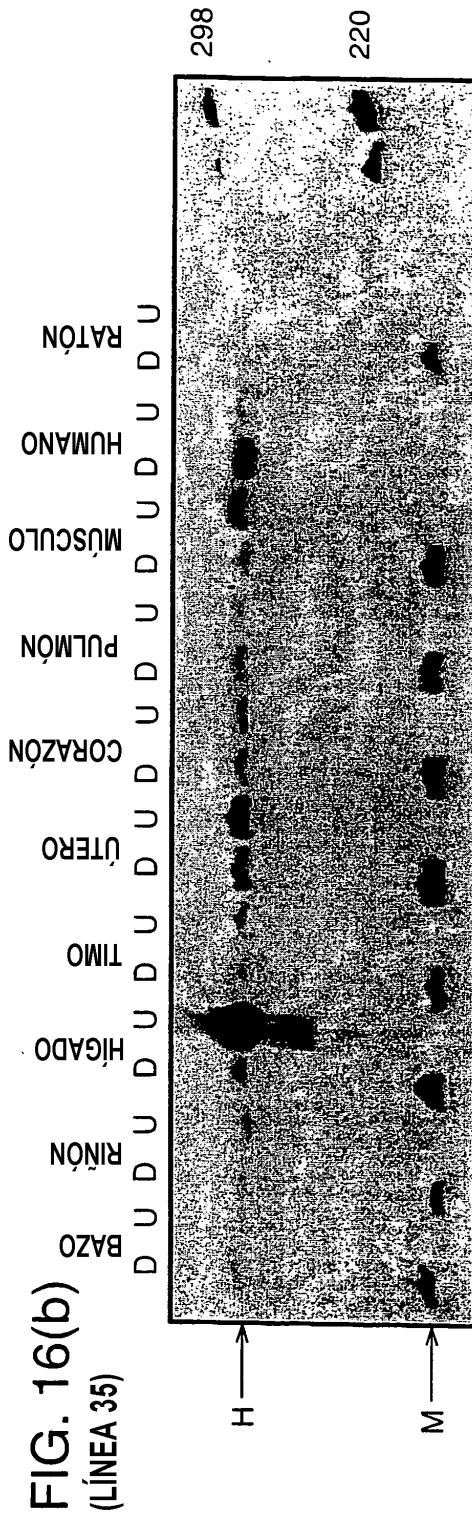
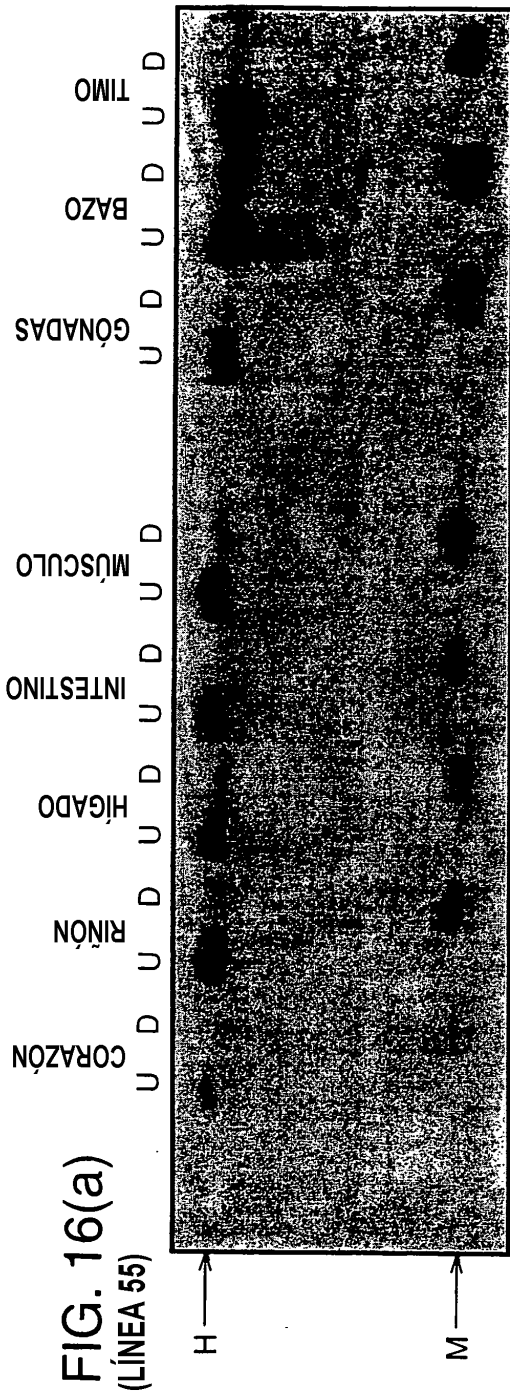


FIG. 17(A)
FRAGMENTO Nr1 I DE 160 kb

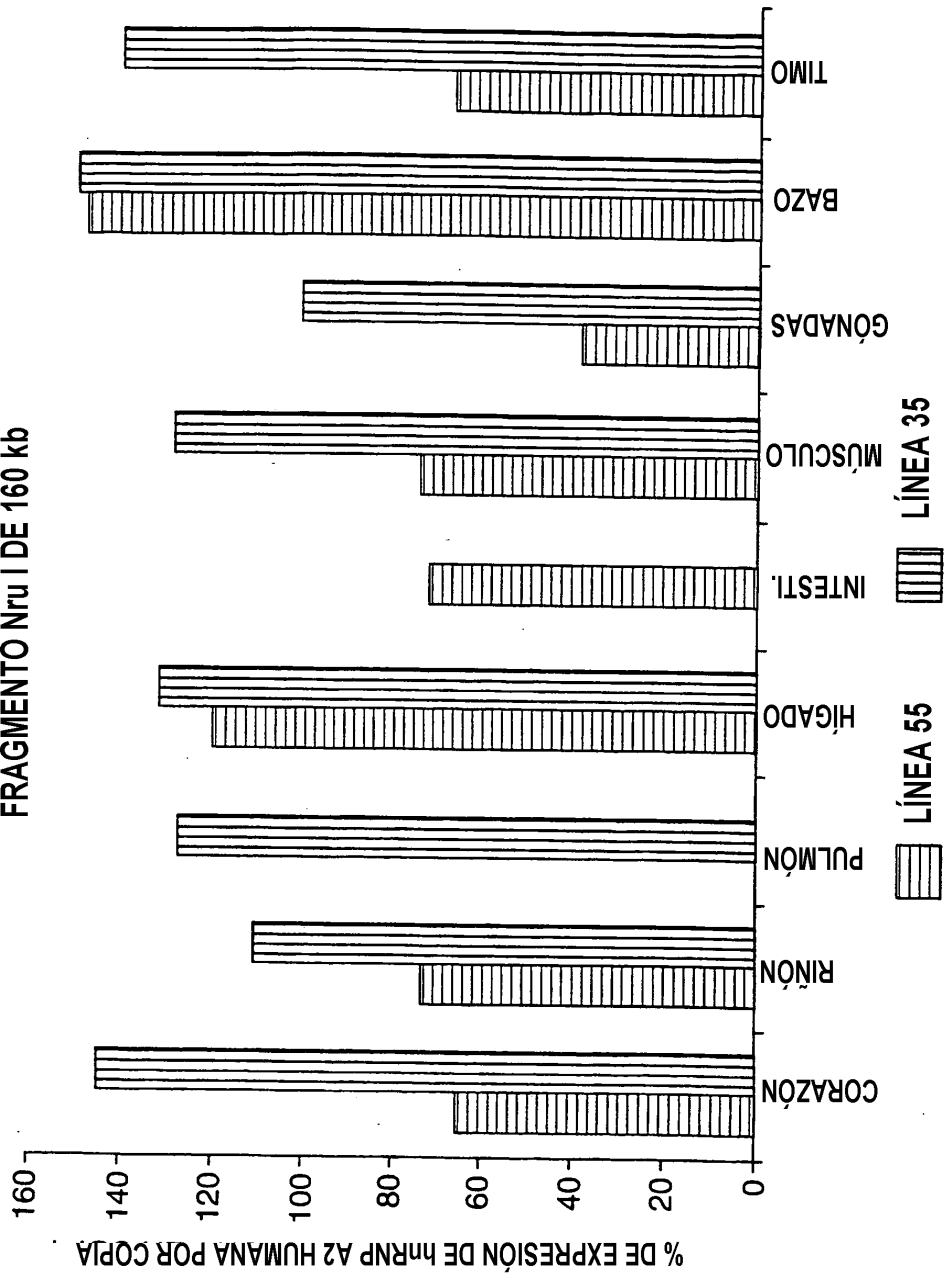
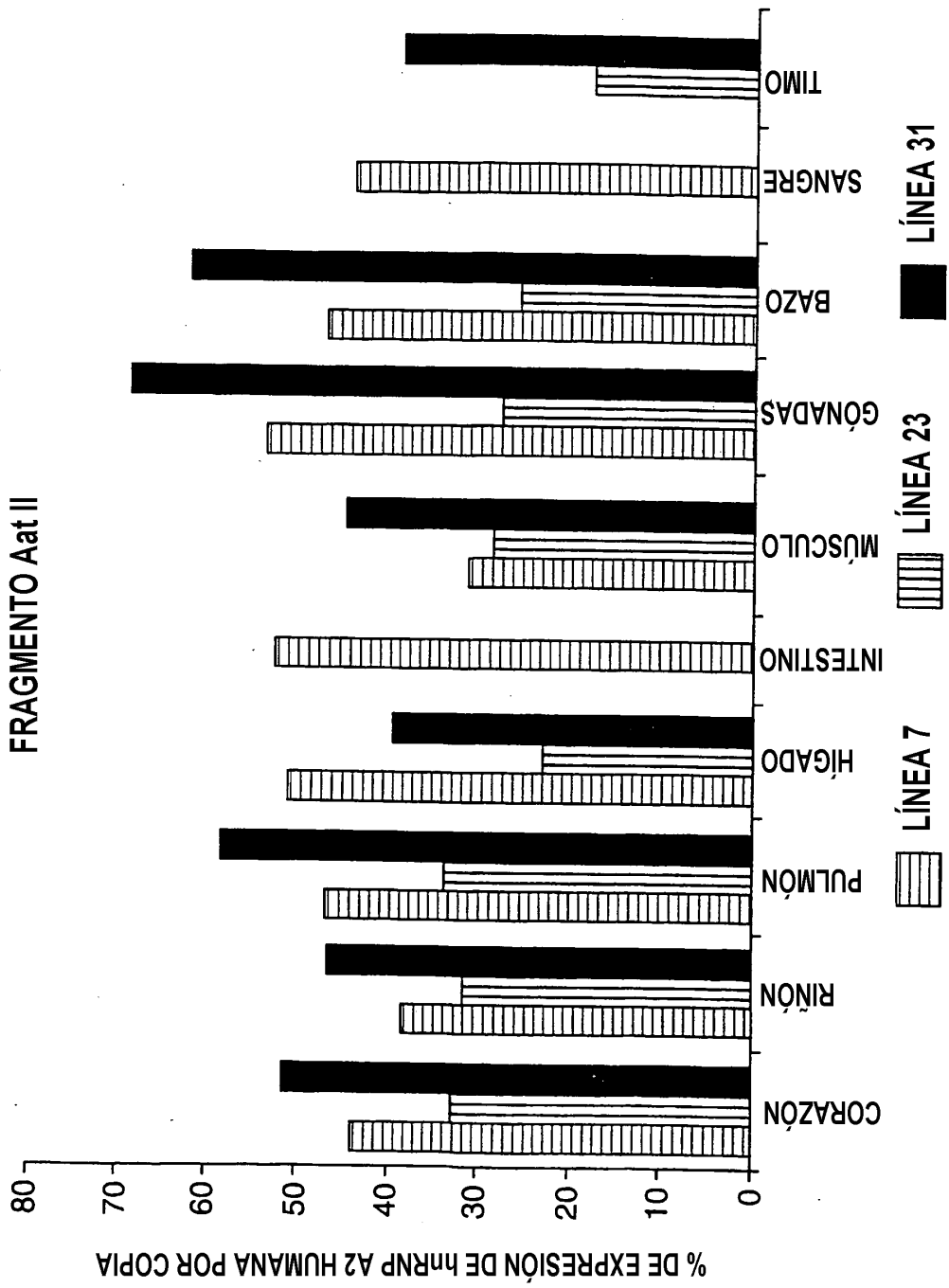


FIG. 17(b)
FRAGMENTO Aat II



DIGERIDO CON Aat II / Cla I
SONDA 766pb EcoR I / Nco I

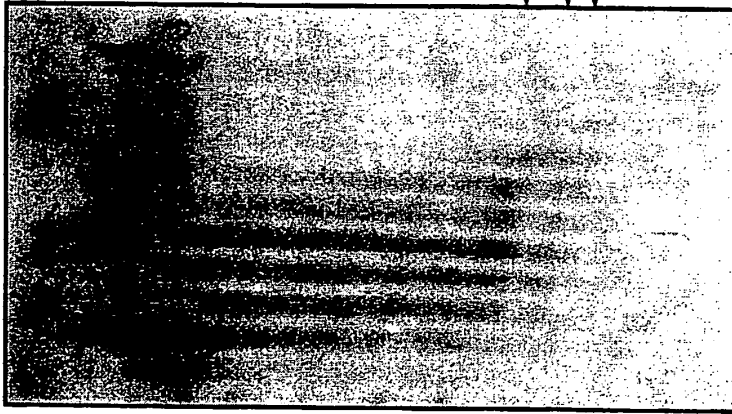


FIG. 18

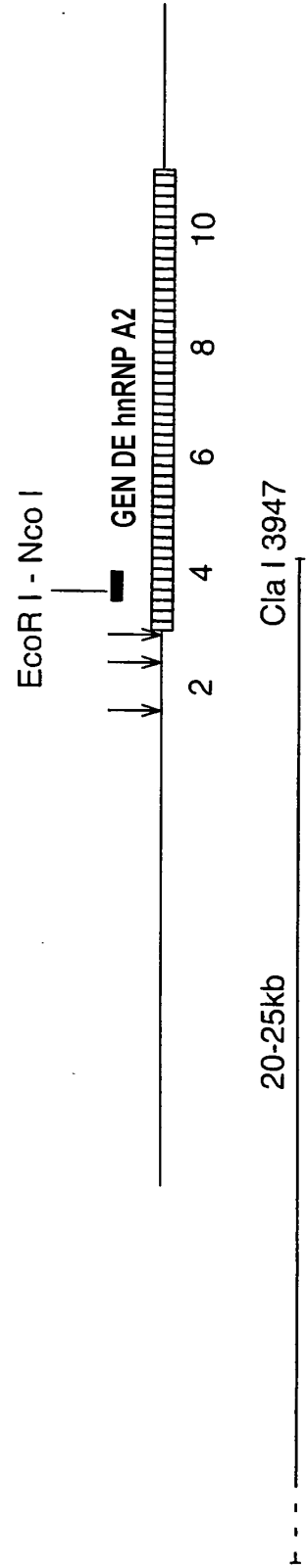


FIG. 19

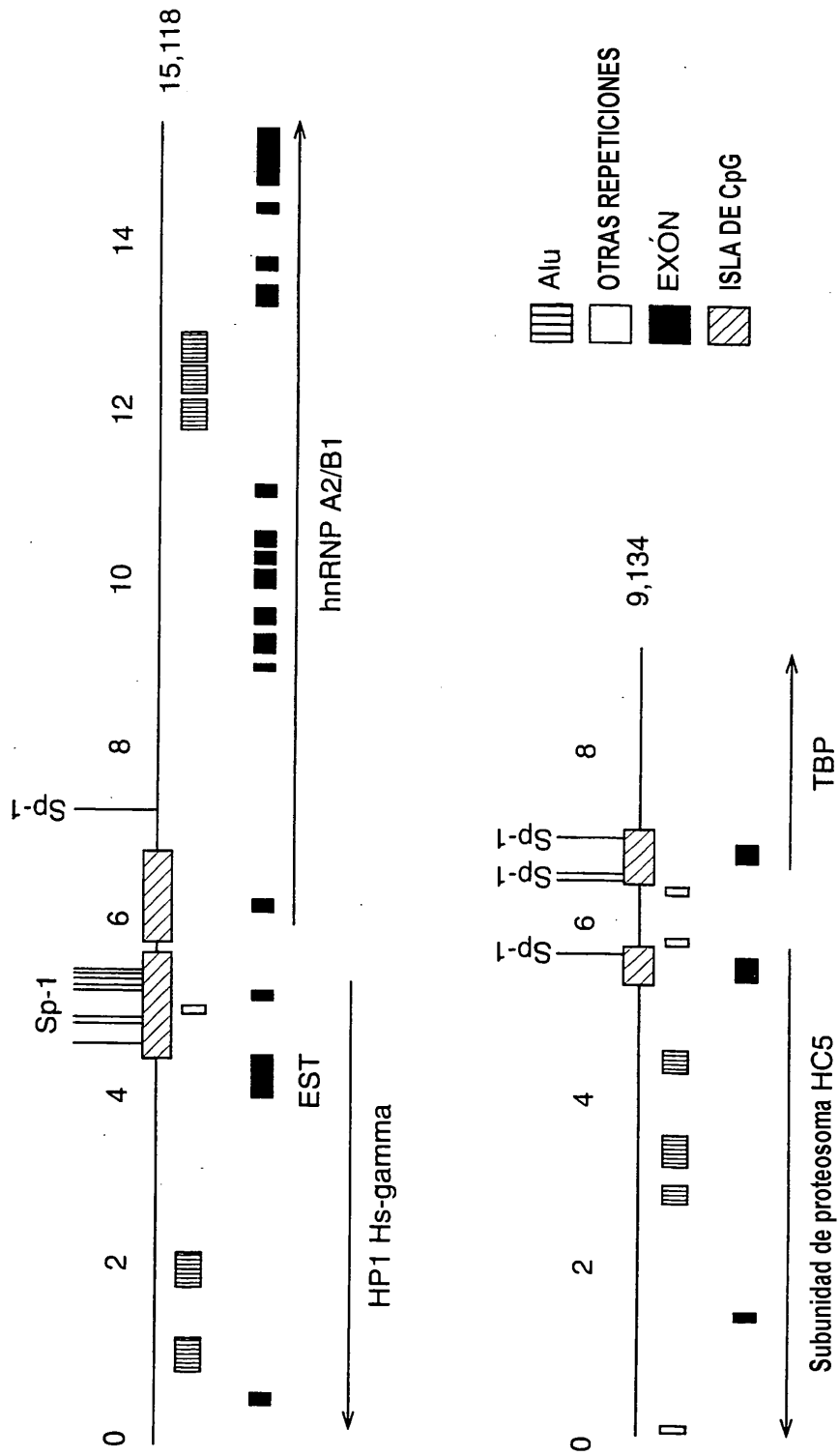


FIG. 20(I)

Hind III 7725

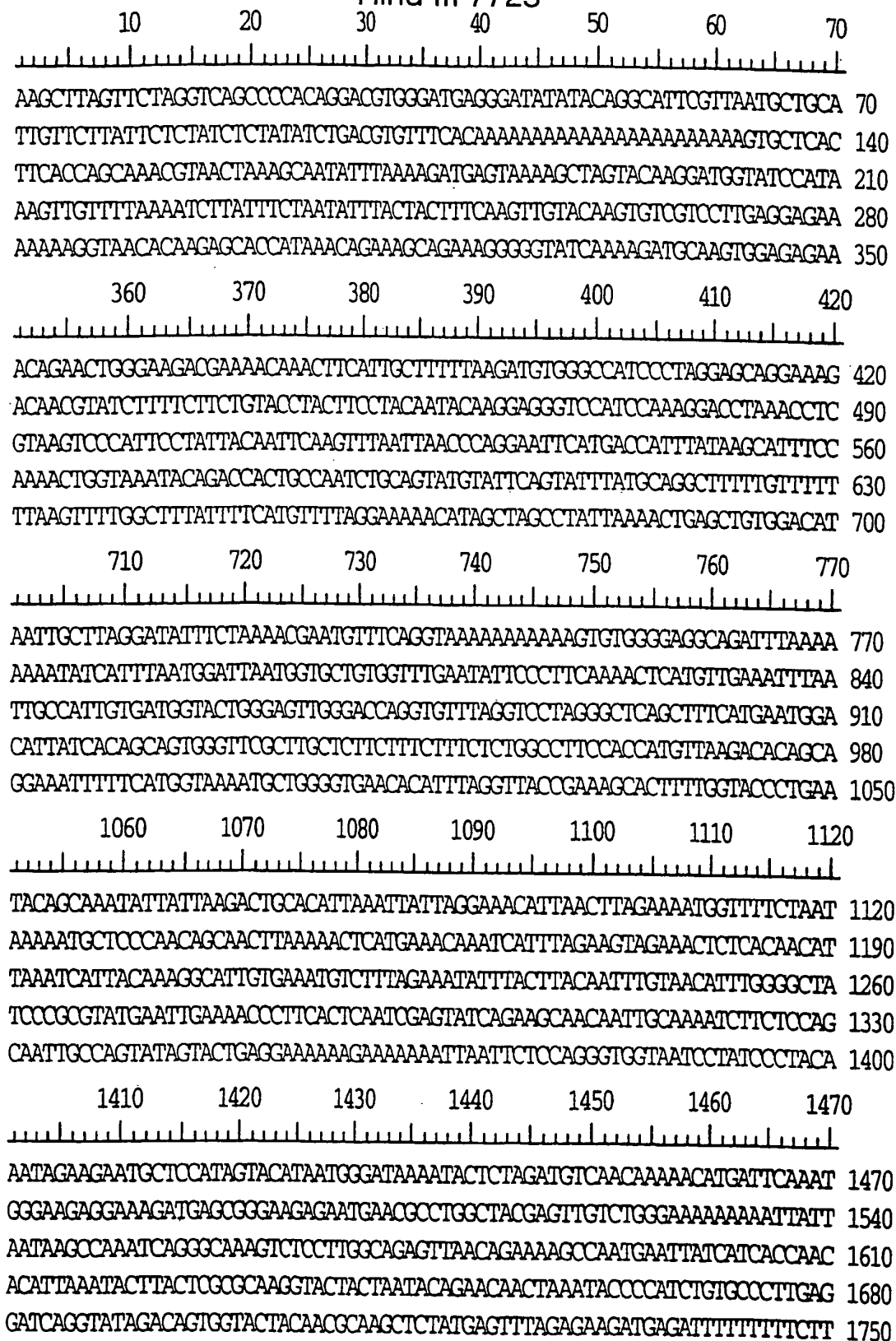


FIG. 20(II)

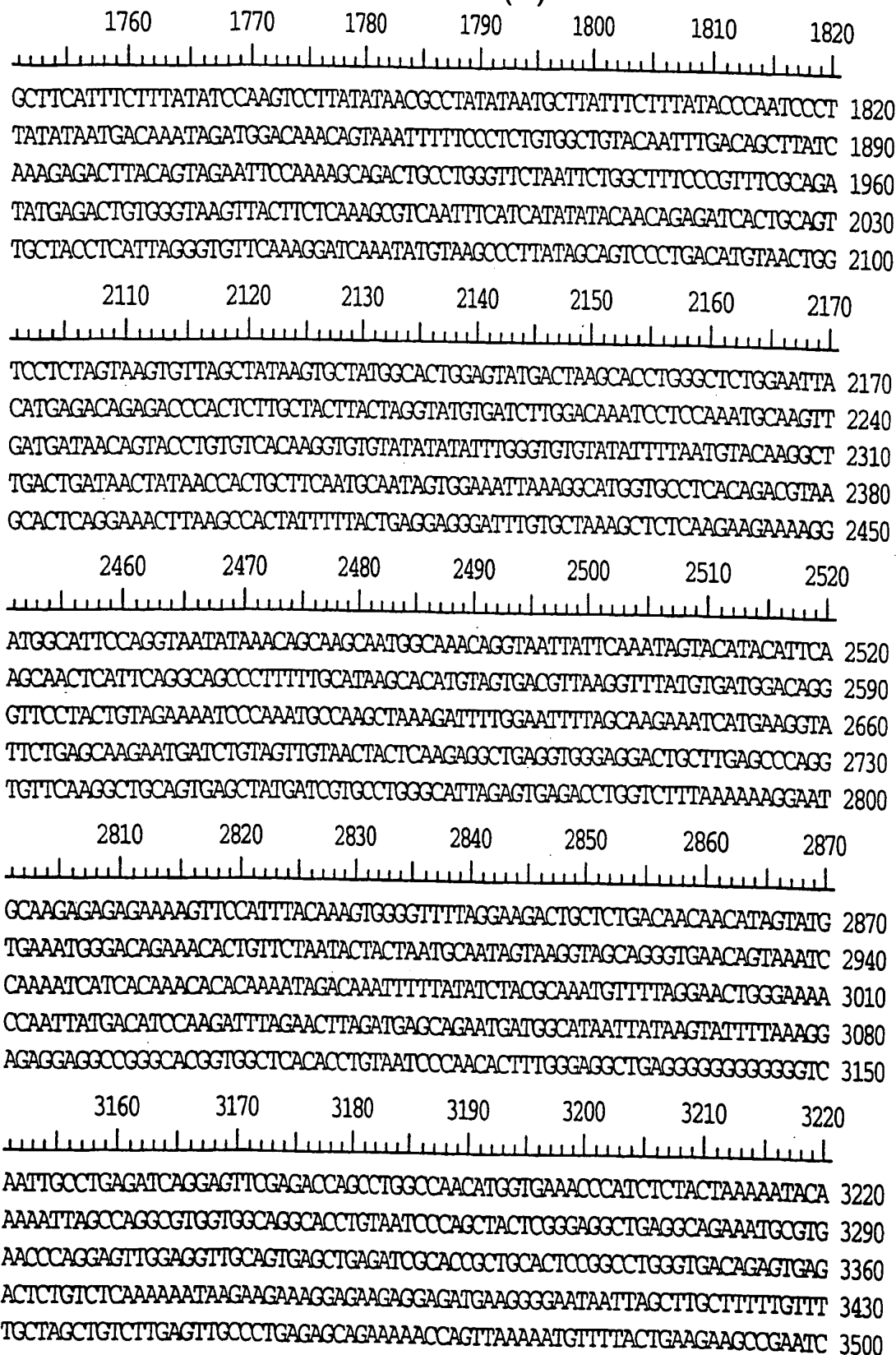


FIG. 20(III)

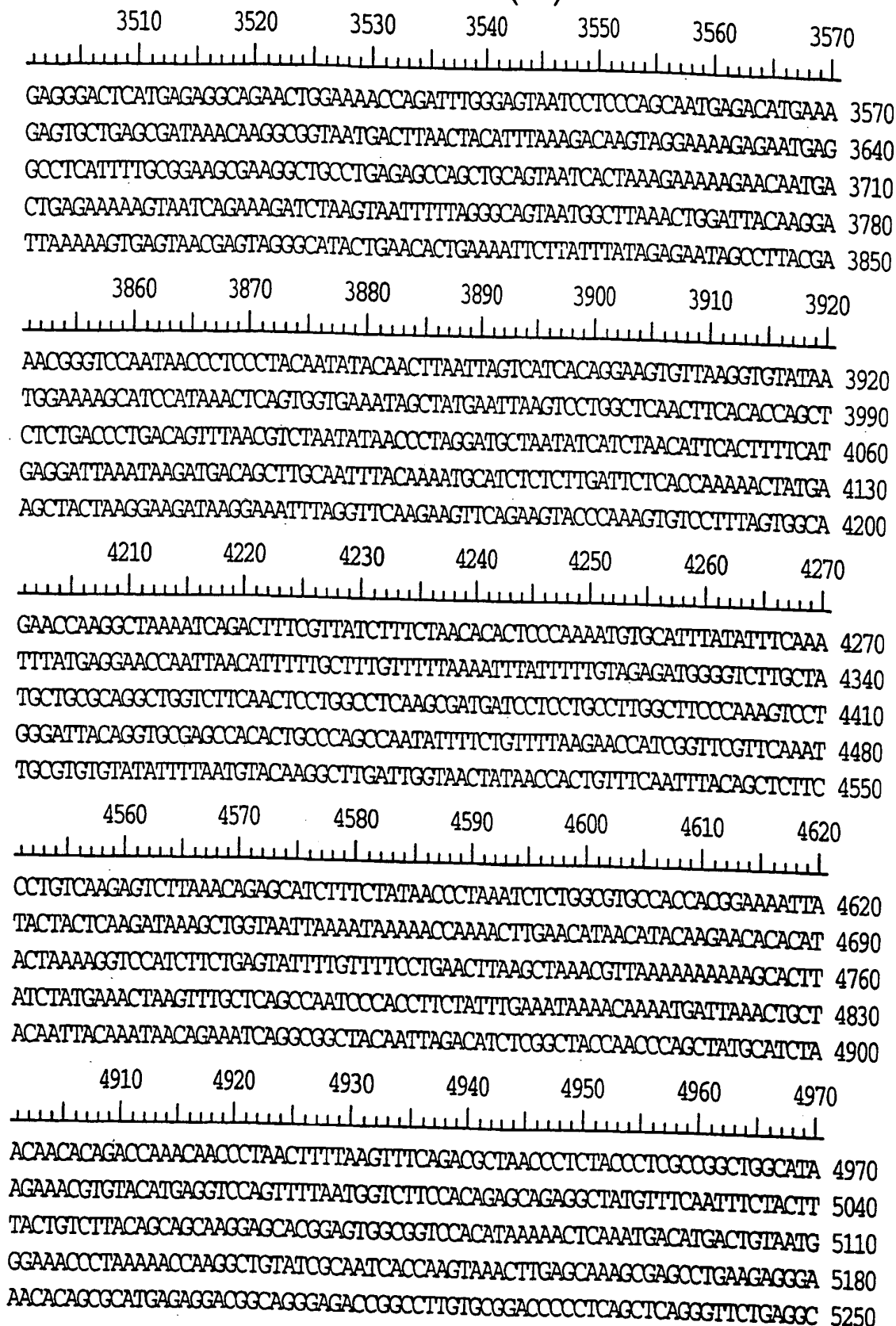


FIG. 20(IV)

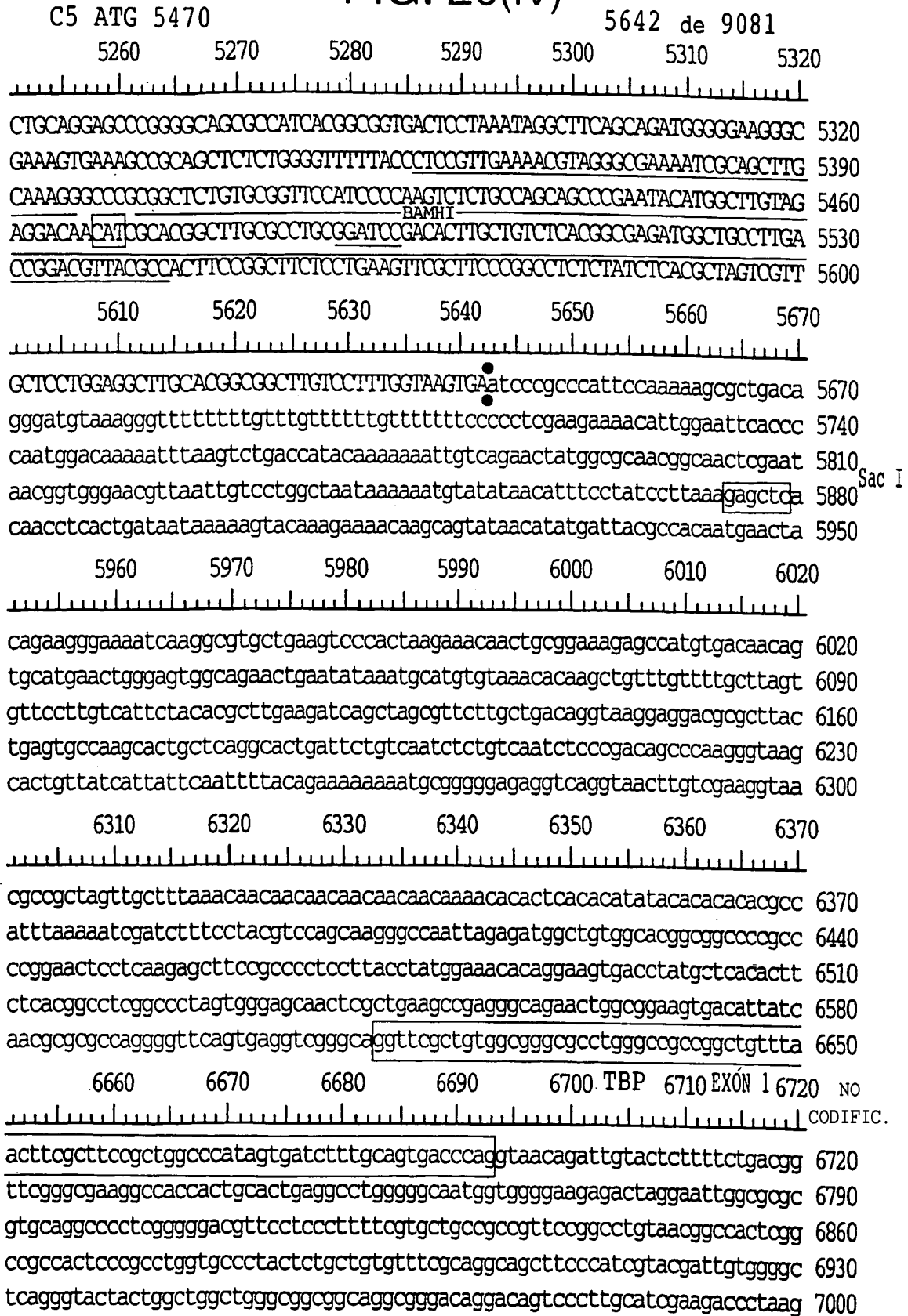


FIG. 20(V)

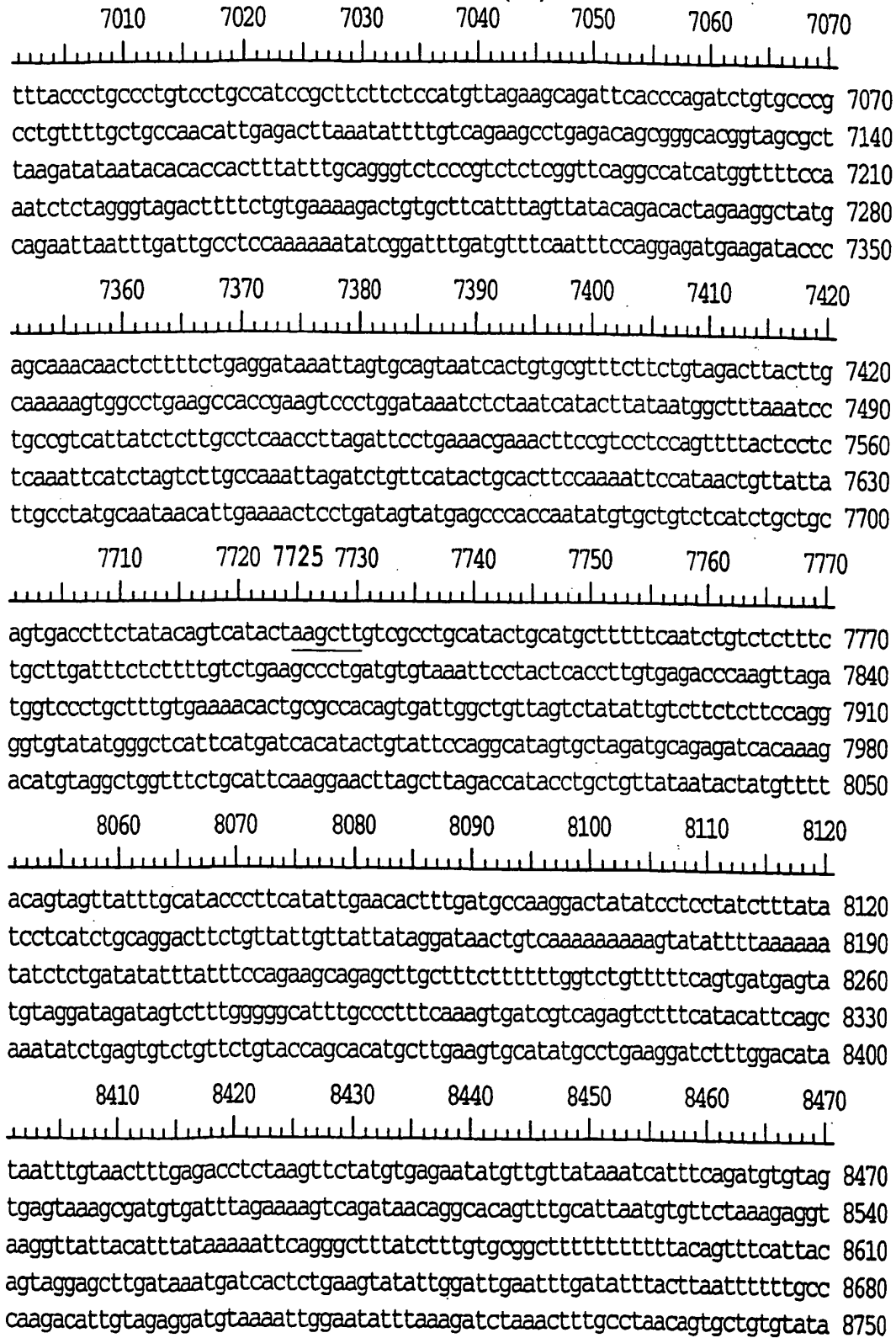


FIG. 21(I)

8286 HIND III

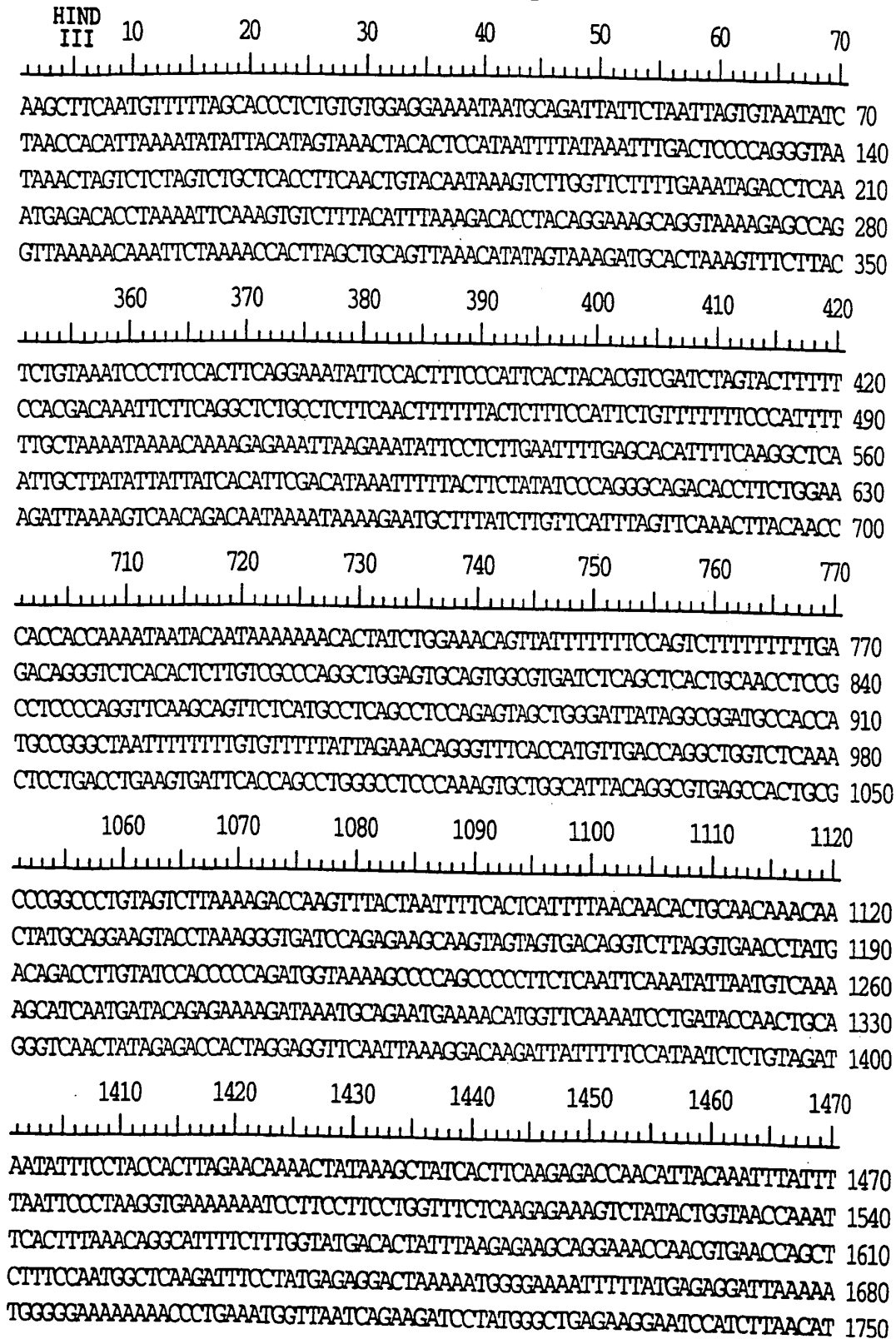


FIG. 21(II)

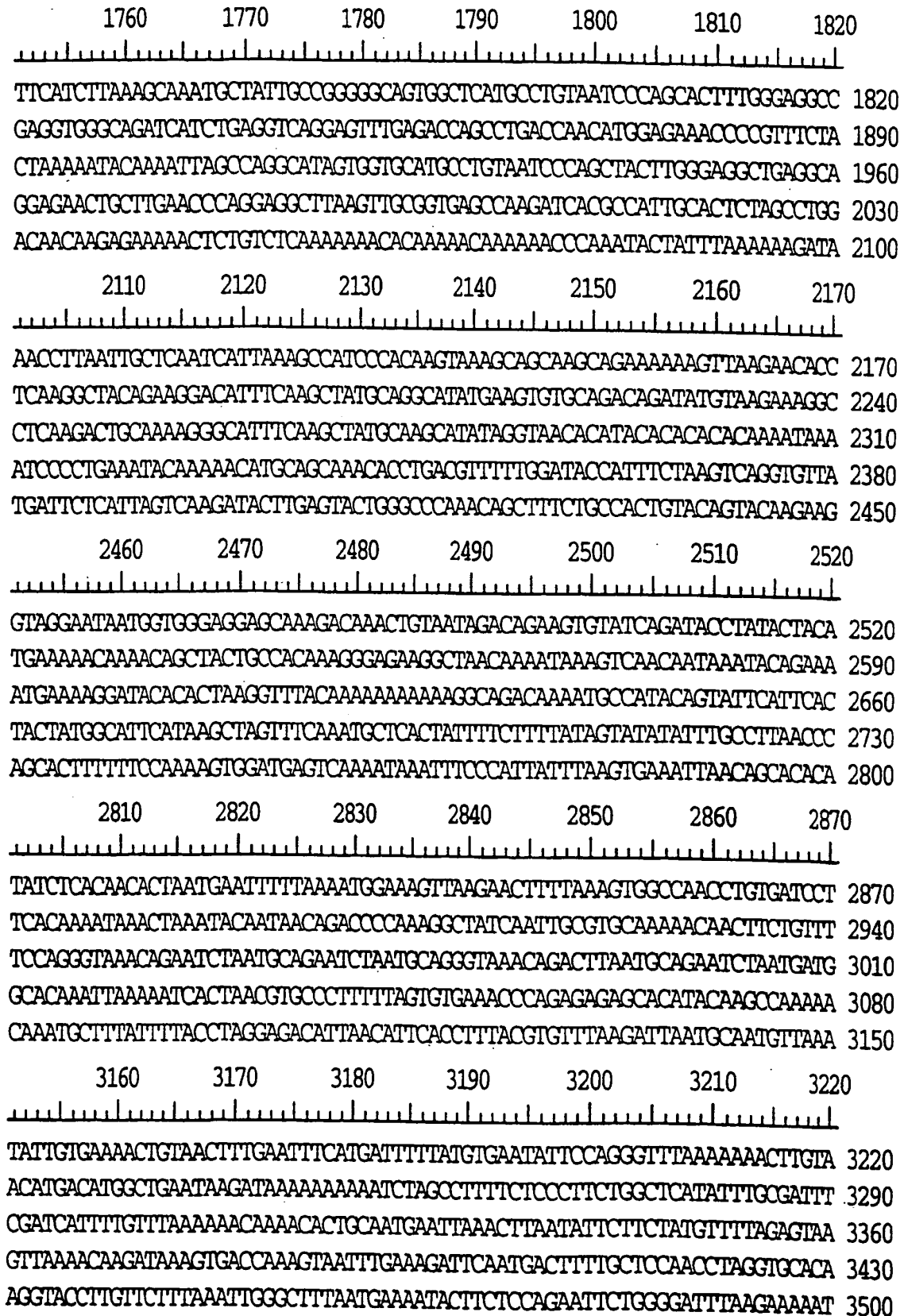


FIG. 21(III)

3686 DE 15071

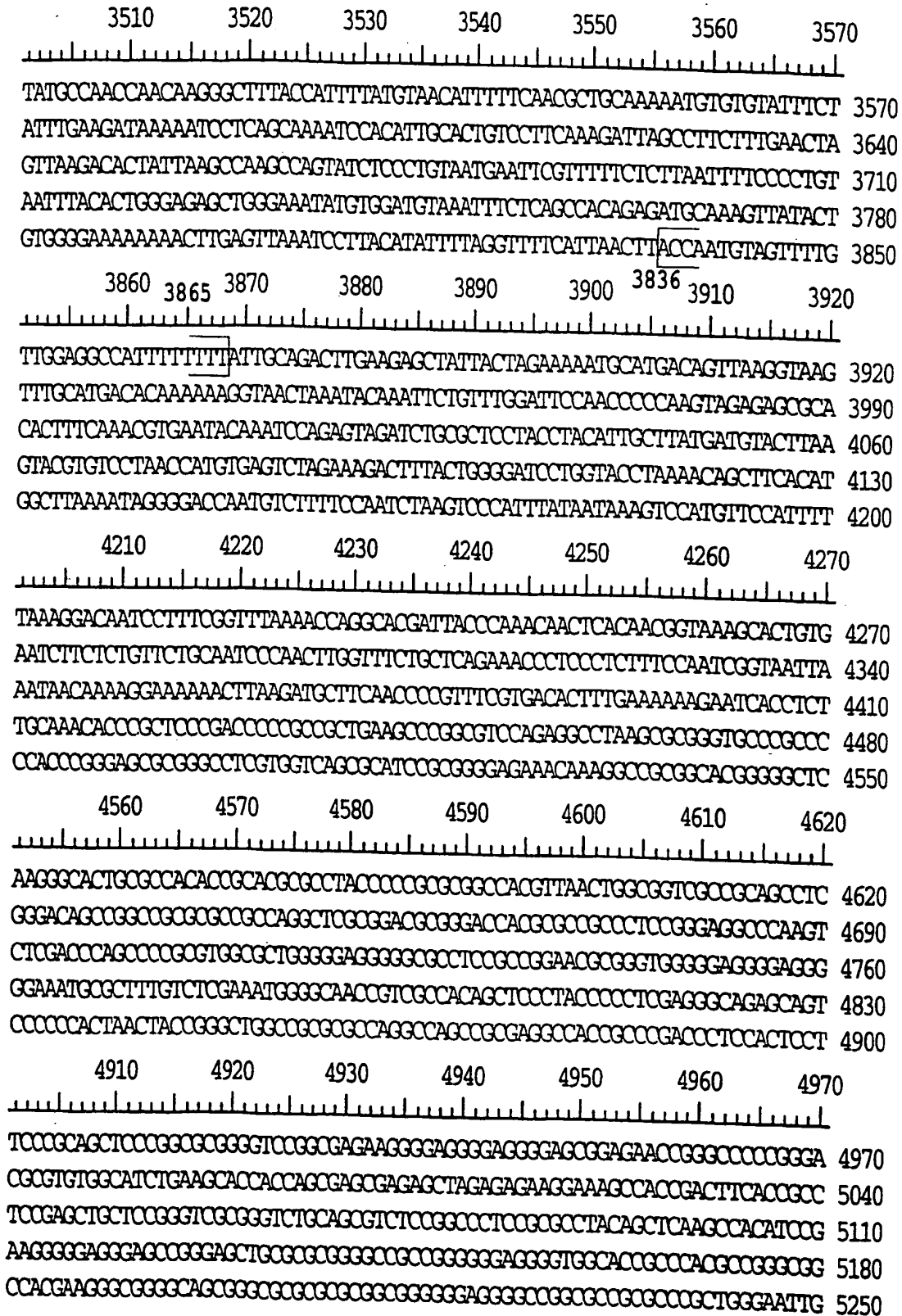


FIG. 21(IV)

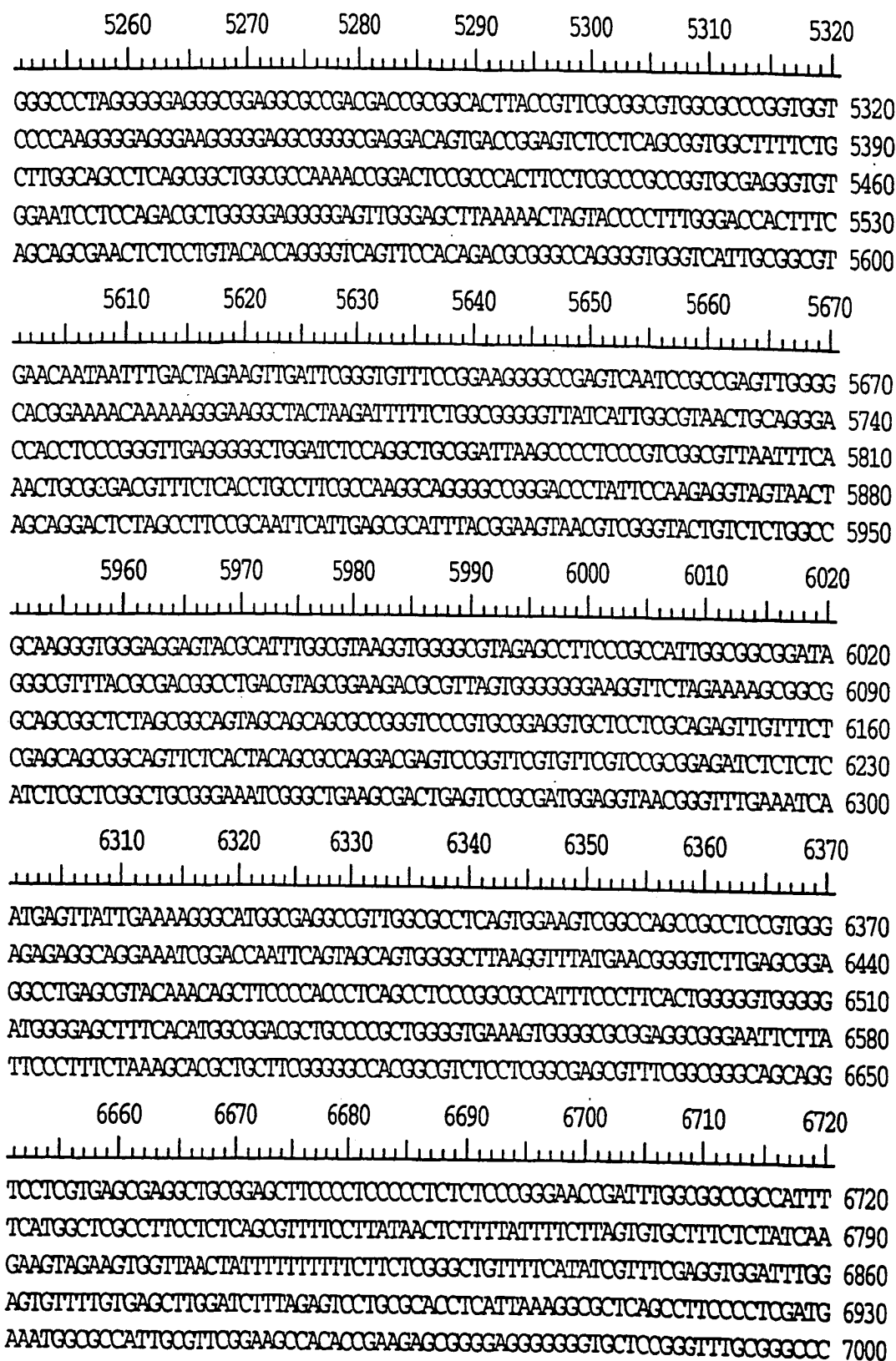


FIG. 21(V)

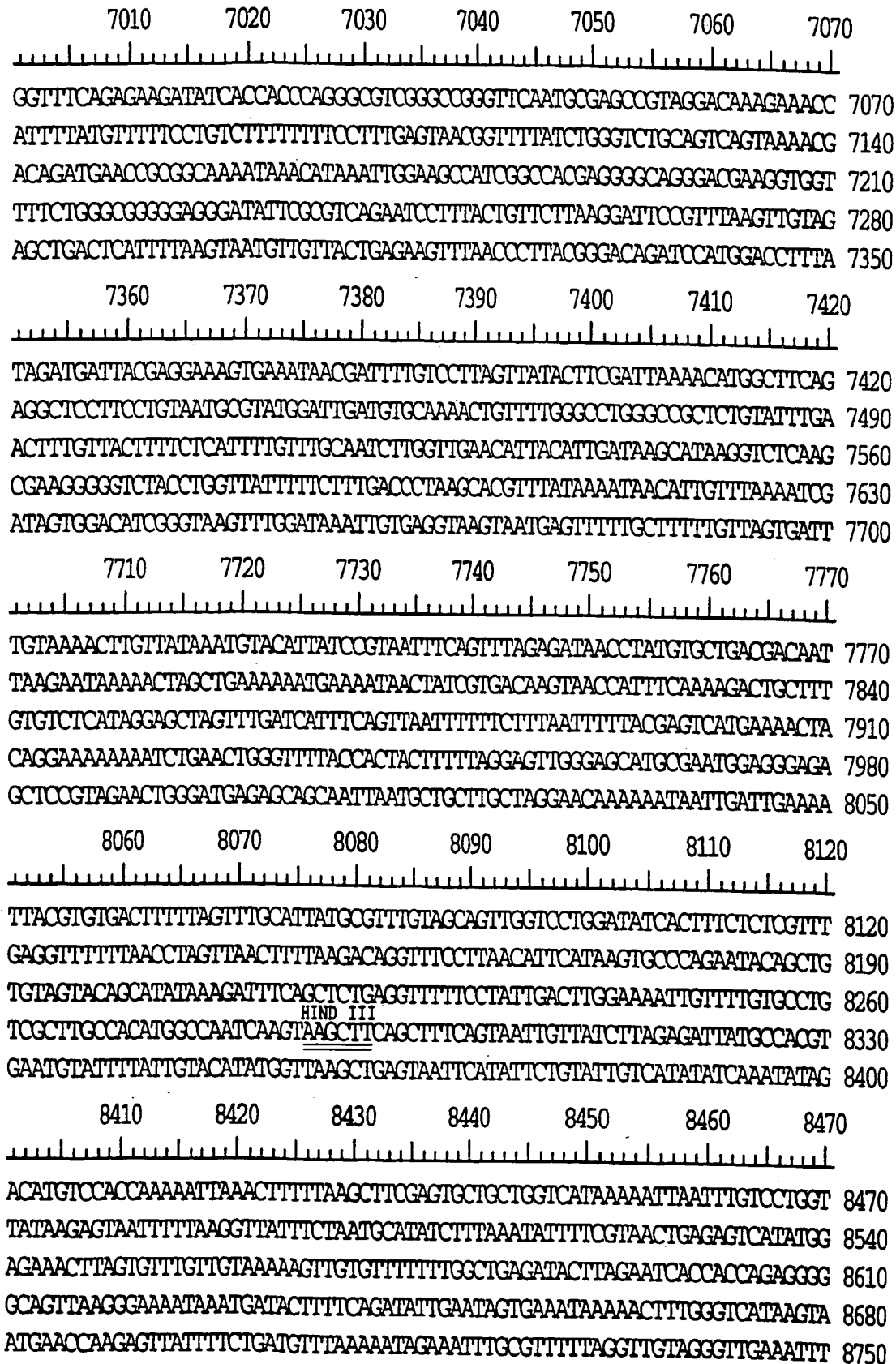


FIG. 21(VI)

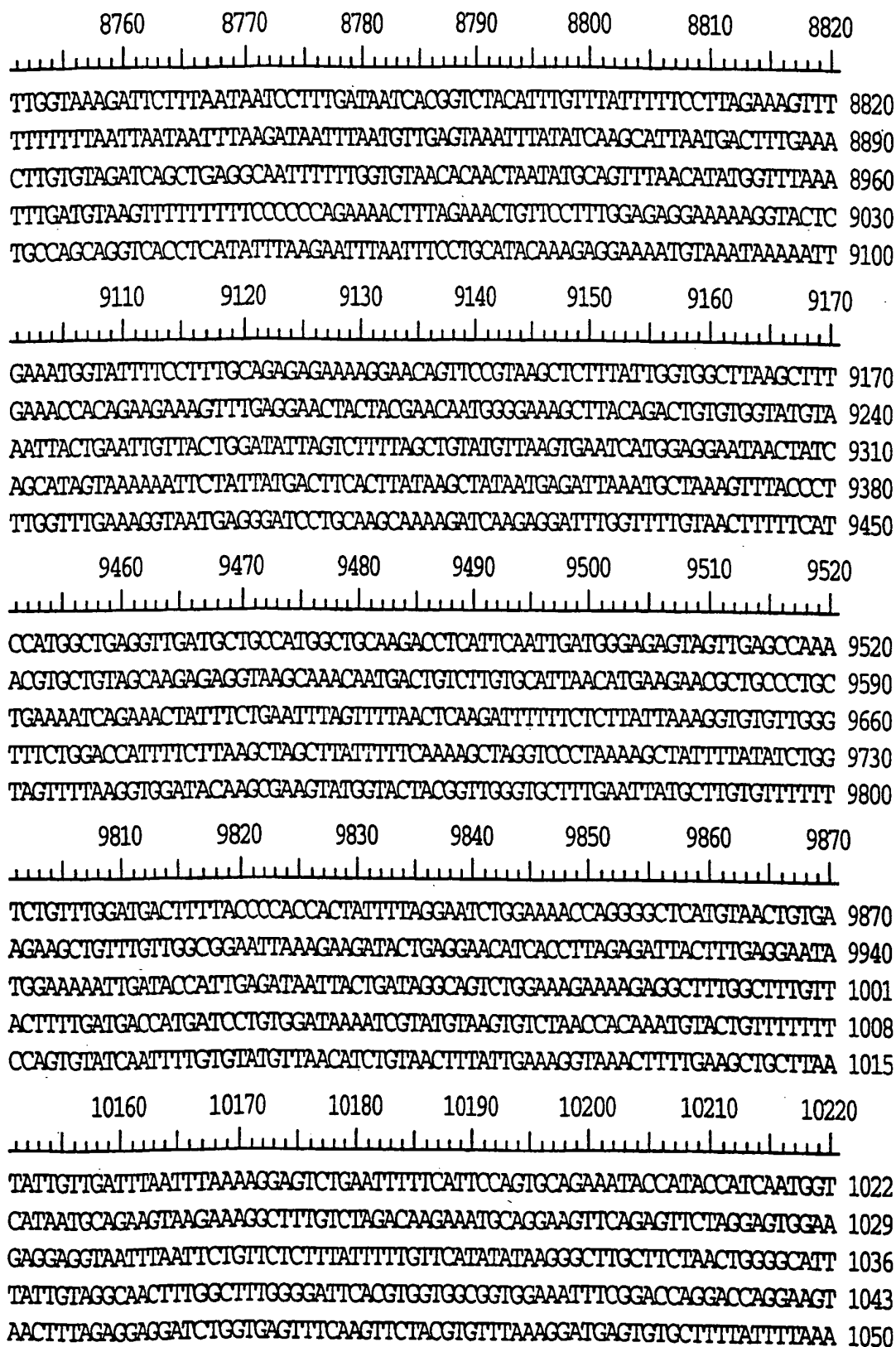


FIG. 21(VII)

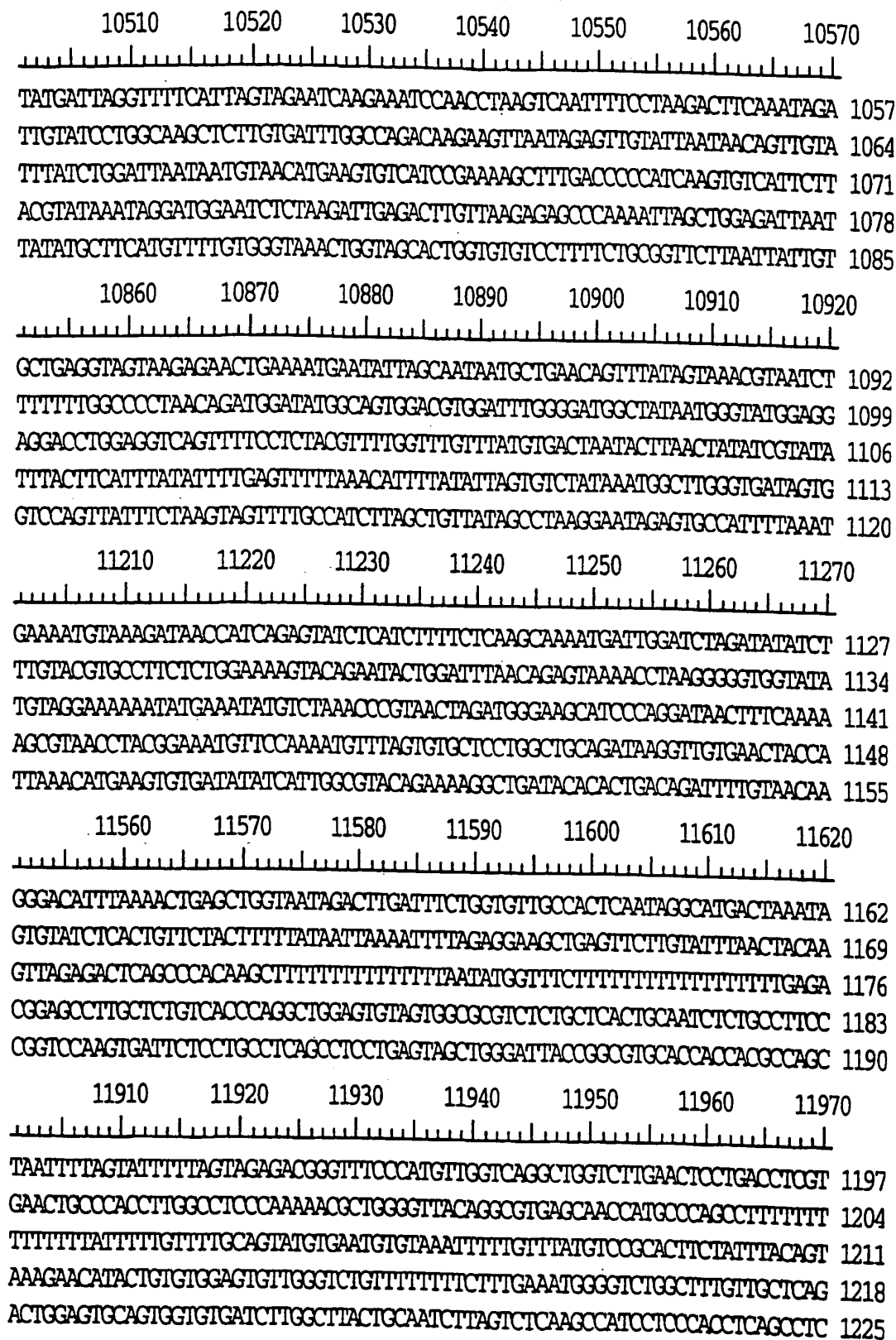


FIG. 21(VIII)

12260 12270 12280 12290 12300 12310 12320
 CTGGGTAGCTGGAAC TACGGGGIGTGCCACCATGACCGGCTAATTTTGTGTTTTTTGTAGAGGTGTGGG 1232
 GGTTTTGCTGTGTGTCGCCCTGGCTGGTCTTGAATTCCTGGGCTCAAGCAATCCAACCGCTCAACTTCCCG 1239
 TACTGCTGGGATACAGGTGTGAGCTGCTGCCGCCAGCCAAGAATTTGTTTTGAGAGGGAGT 1246
 CTCCTCTGTGCGCCAGGCTGGAGTGCAGTGGTGTGATCTCAGCTCACTGCCAACCTCTGCCTCCCGGGTT 1253
 CACGCCATTCCTCTGCCTCAGCTCCAGAGTAGCTAGTACTACAGGTGCTGCCACCATGTCCGGCTAAT 1260

12610 12620 12630 12640 12650 12660 12670
 GTTTTGTATTTTTAGTAGAGATGGGGTTTTCAACCGTGTAGCCAGGGTGGTCTCAATCTCTTGACCTCGTG 1267
 ATCCGTCGCCCTCGGCCCTTCCCAAAGTGTCTGGGATPACAGGCATGAGCCACTGTGCCCAACCGAGAACAT 1274
 TGTTTTAAGATATGTAATTCGTAGAGAGACATAATAGAACTTTATCTTTTGGGCCAGTAGGAGGAAGTG 1281
 CTCTTTTACTTTCCCTCTAGCCACACTACTAGTCTAGCCTCACAGTCTTACCCACAATATACATGAAG 1288
 TATTTCAAGATACTTAAGATTTTTAGTTTTGAGGGAAAGCTGTGGAATPACAGGTATTTAACTGTGTGCA 1295

12960 12970 12980 12990 13000 13010 13020
 CATGGTGTATCCATTTGGCTGAGTAACCCAGCCACCAAAATGTTTTACCAAGGATAGTTATTCAGTCTTT 1302
 GAAGCTATTTTAPAGGAAATTTCAATTAATATTTTCACATGGAAACTTGGAAAGCTGGAAATGGATGTGAGG 1309
 AGACAGTTCAAATGGTATTTGAAAATATTAAGTATTACTTAAAGGCTTATTTTTATAATAGGTGGCAATT 1316
 TTGGAGGTAGCCCCGGTTATGGAGGAGGAAGAGGAGGATATGGTGGTGGAGGACCTGGATATGGCAACCA 1323
 GGGTGGGGCTACGGAGGTGGTTATGACAACCTATGGAGGAGGTAATAAATTCACCTGCAACCTTTATGTG 1330

13310 13320 13330 13340 13350 13360 13370
 GGAATTTGGAATTAATGTCCTTTGTAACTTGAATCTTTTGTTCATGTTTGTCACTAGATGCCATAAA 1337
 ATTTGTGGATAAGTGTGTCTTTTATTTGTTTTTATGGGAGCTTTGTCTAAGTCTTTGGTTTAAATGTTT 1344
 GTATTGTCTGAGTATTCCAATTTTTTAATAGGAAATTAATGGAAGTGGAAATTACAATGATTTTGGAAAT 1351
 TATAACCAGCAACCTTCTAACTACGGTCCAATGAAGAGTGGAACTTTGGTGGTAGCAGGAACATGGGGG 1358
 GACCATATGGTGGAGGTAATTTATAAAAATGAGGTTATTCAGATTTTTGTGATTAAGGATTAGCCTTT 1365

13660 13670 13680 13690 13700 13710 13720
 TGIGACTTAAAGGGAAGATAACATACTAAGTATTTGTACTGTGGCCAGTGTCTCCATGTAACGGTCTTAGT 1372
 GAAAATAAAGAAATTTGCATAAATCTCCACAGAAGTACTCAGCAAGCAGTTATGACATCAAATTTGGGAT 1379
 TAGGTAGTTGGAGGTGGGTGTAGTATTAATTTCTGGTGGACTCATAAACAGCTAAATACAGTTGCA 1386
 ACCACATTTGCAAGTGGTATACATTTGAATGAGGGTCTTTGAAGTTAAATCCTTAAACCATGATTCAAAC 1393
 CATGTCTTAGCTTATTTTTGAGGTTTTTAGCTAGGAGTAAACTAGCTTTGTCTTGGGCTTGATGTACTTT 1400

FIG. 21(IX)

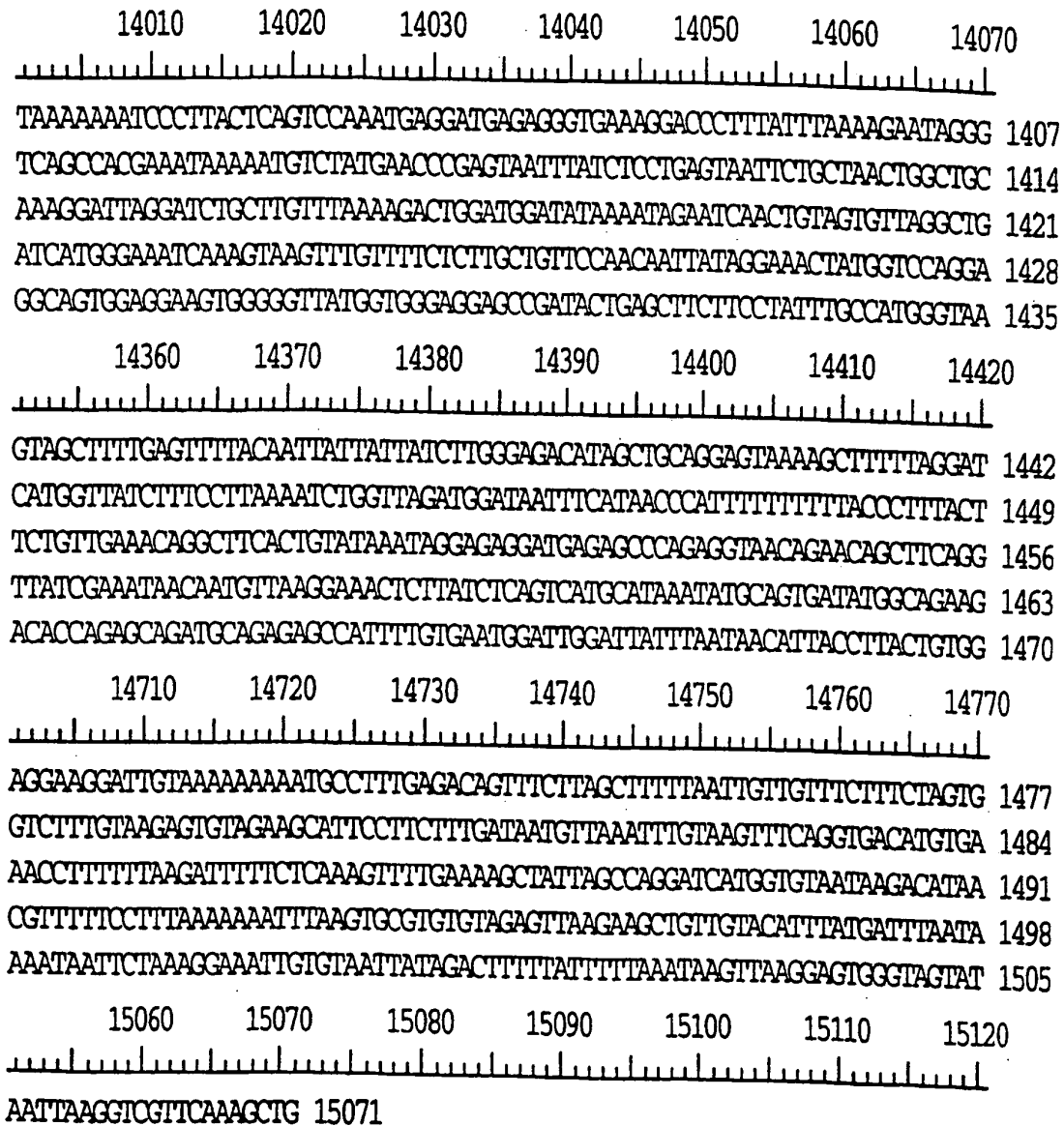


FIG. 22

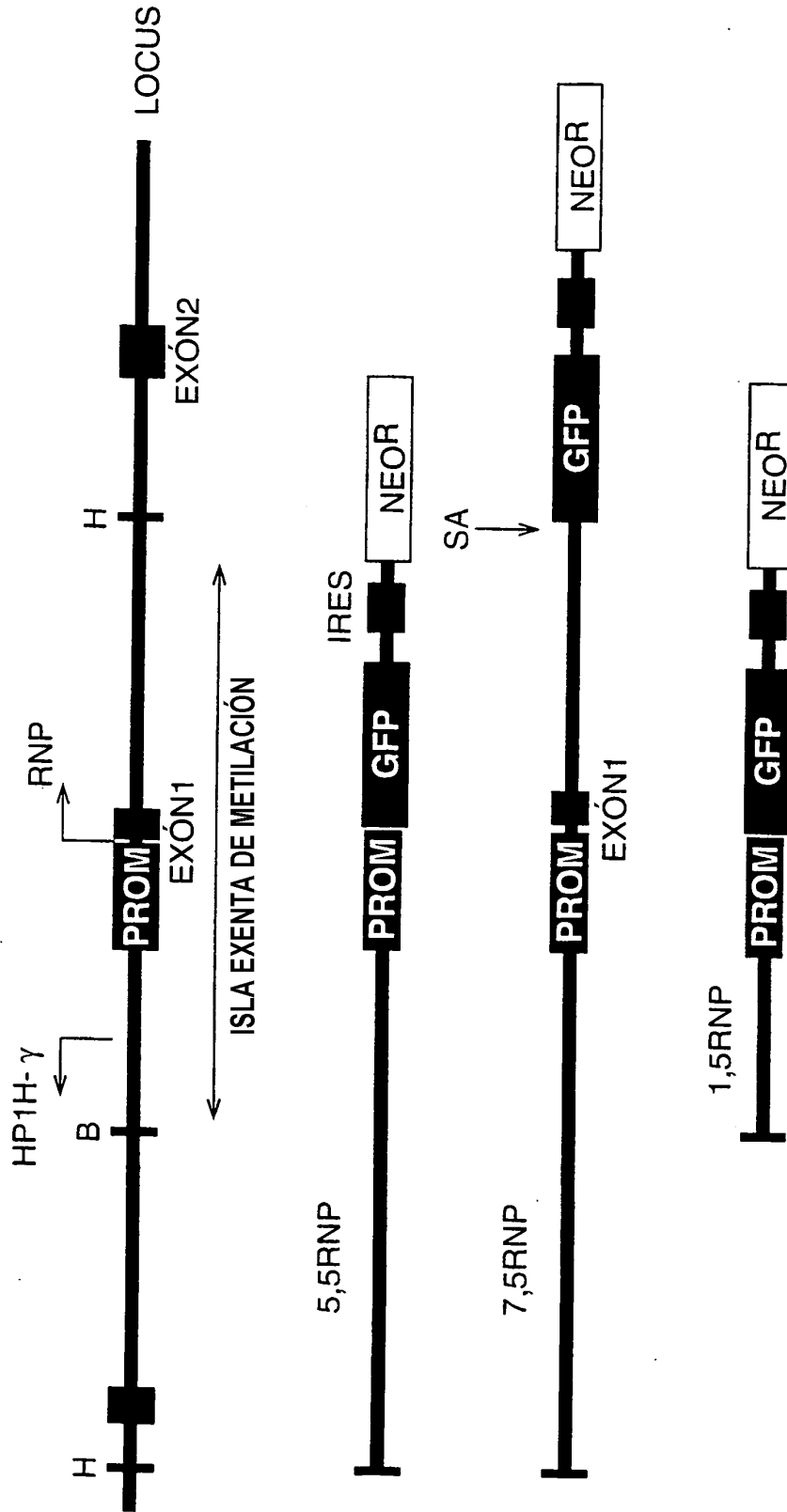


FIG. 23

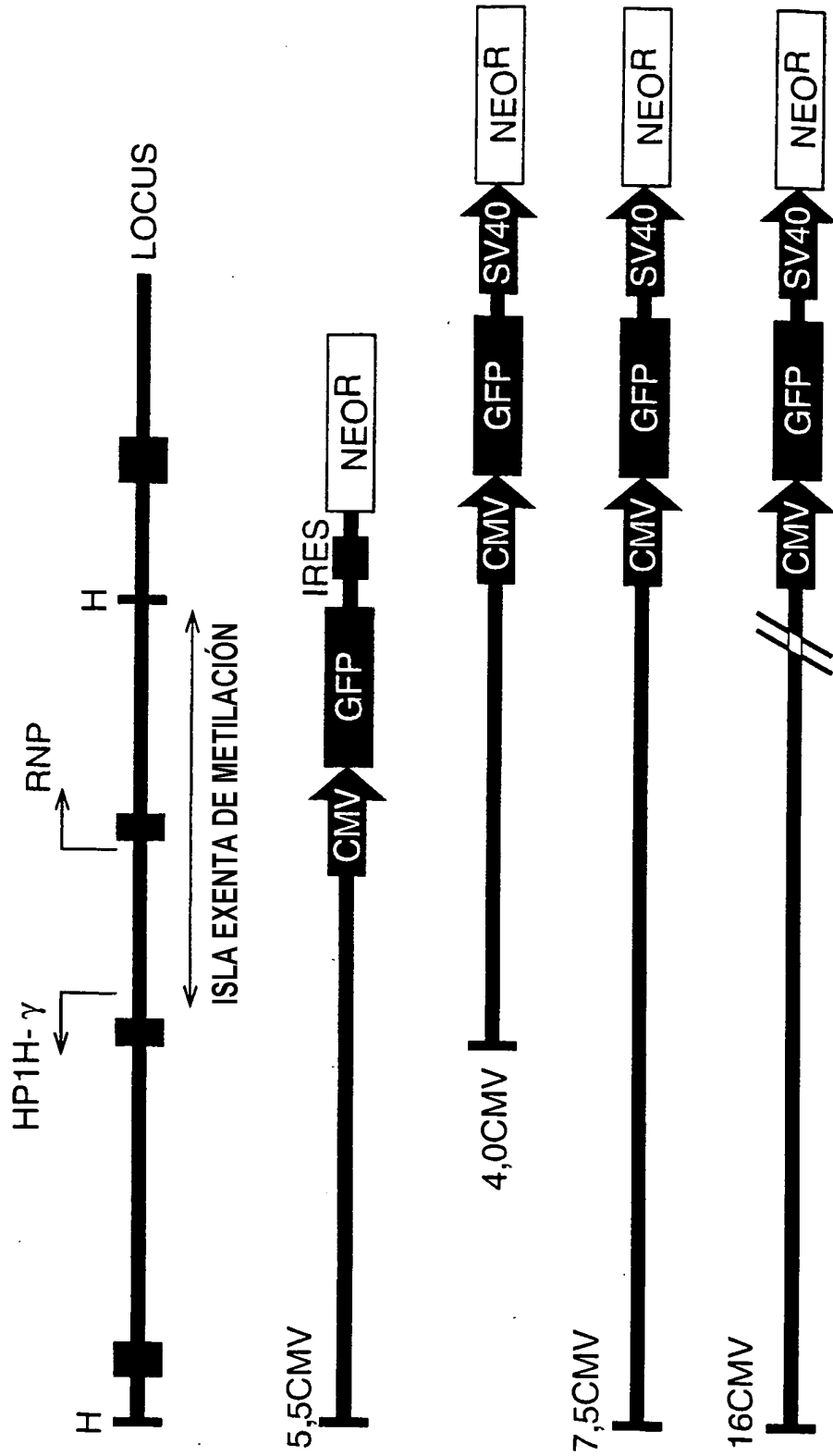


FIG. 24
RECUENTO DE COLONIAS DE LA TRANSFECCION DE CHO (2) T225

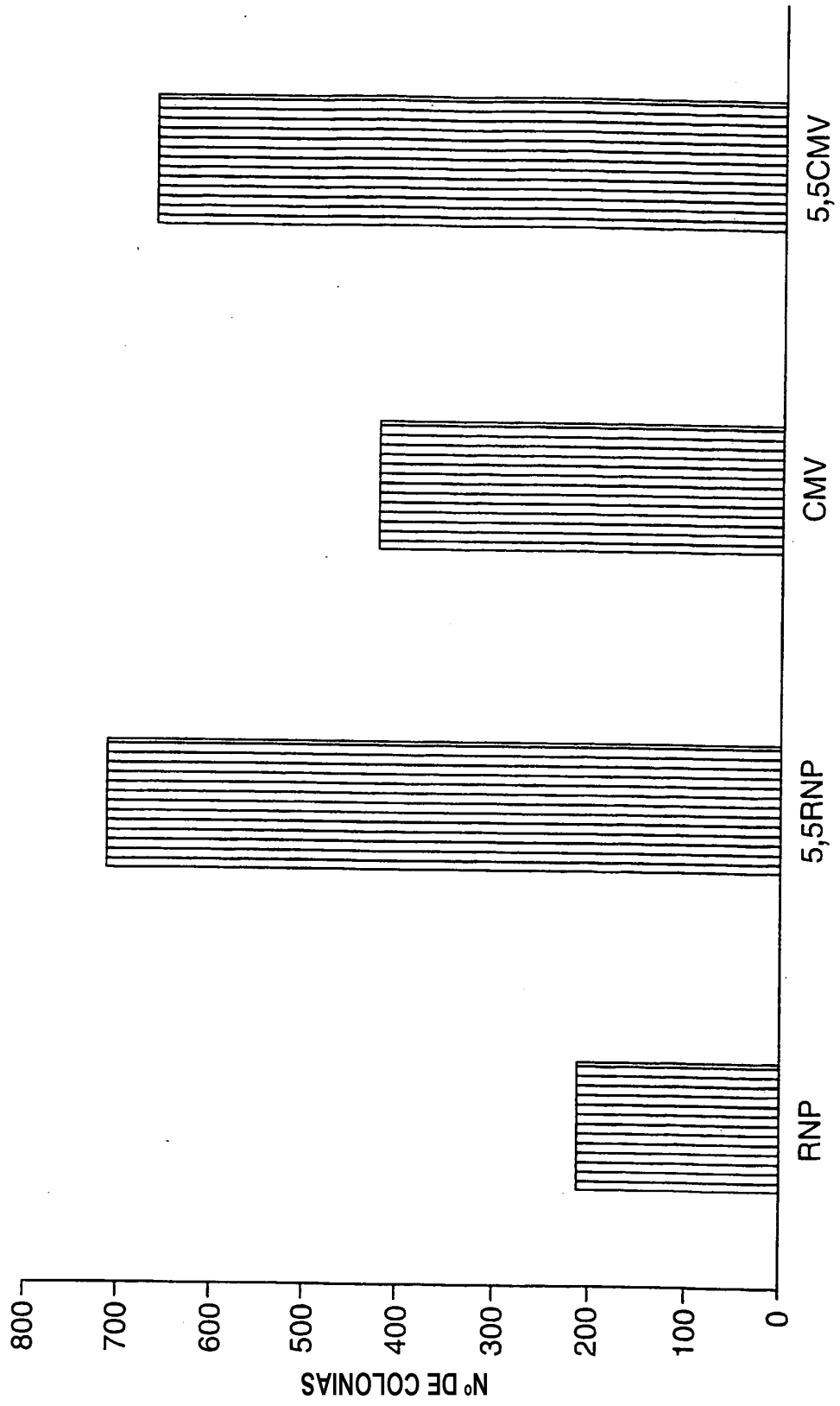


FIG. 25

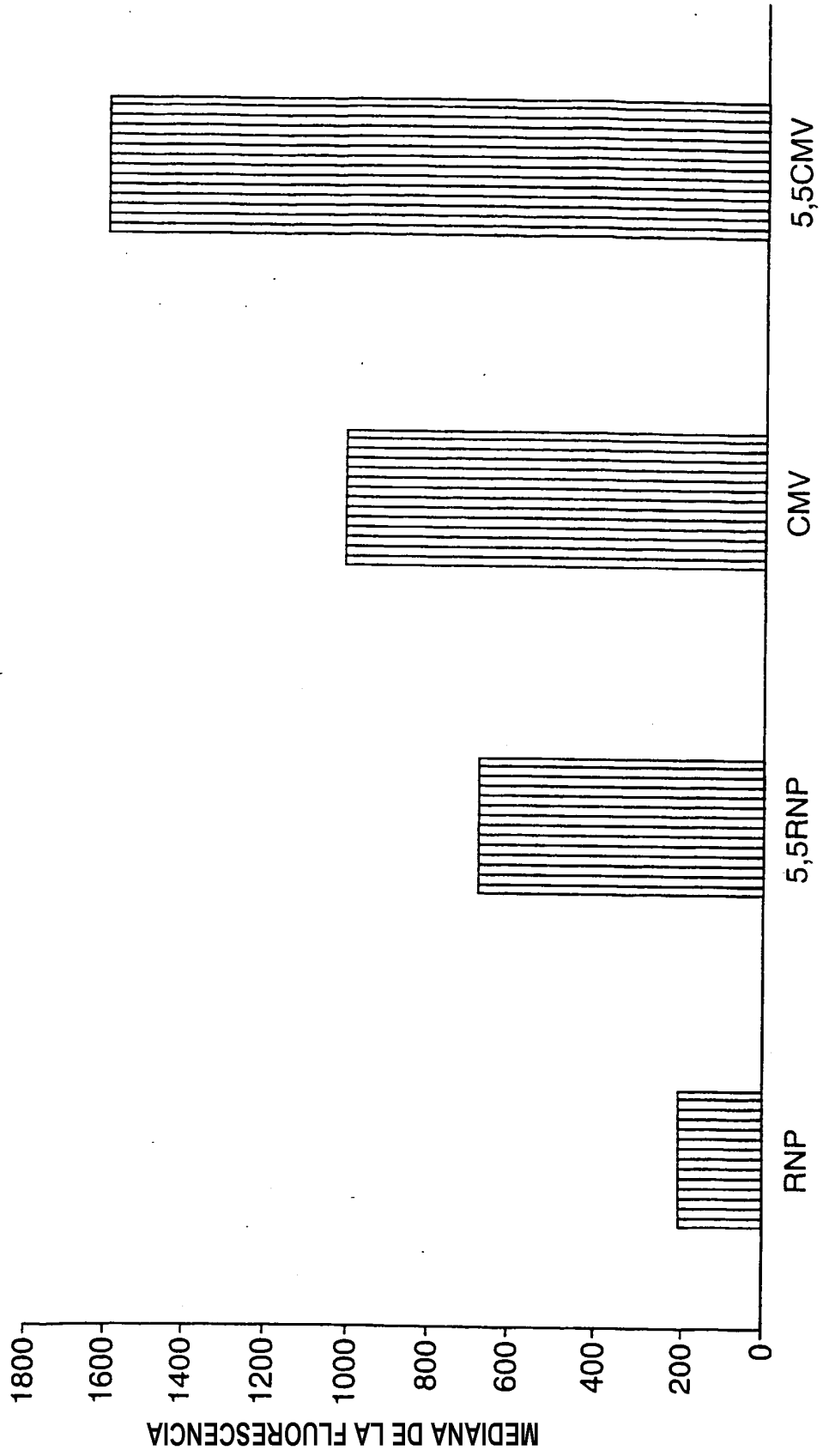
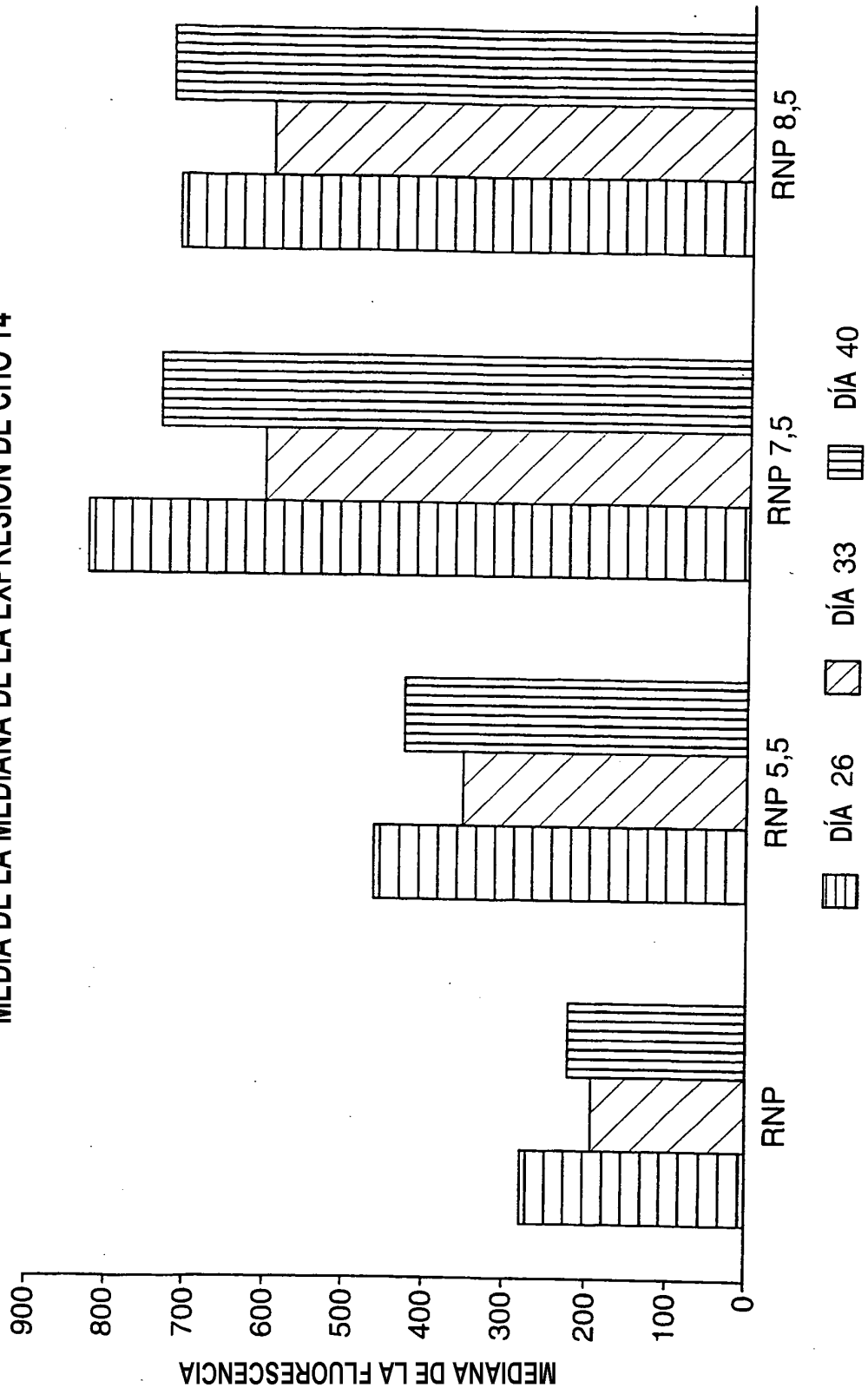


FIG. 26
MEDIA DE LA MEDIANA DE LA EXPRESIÓN DE CHO T4



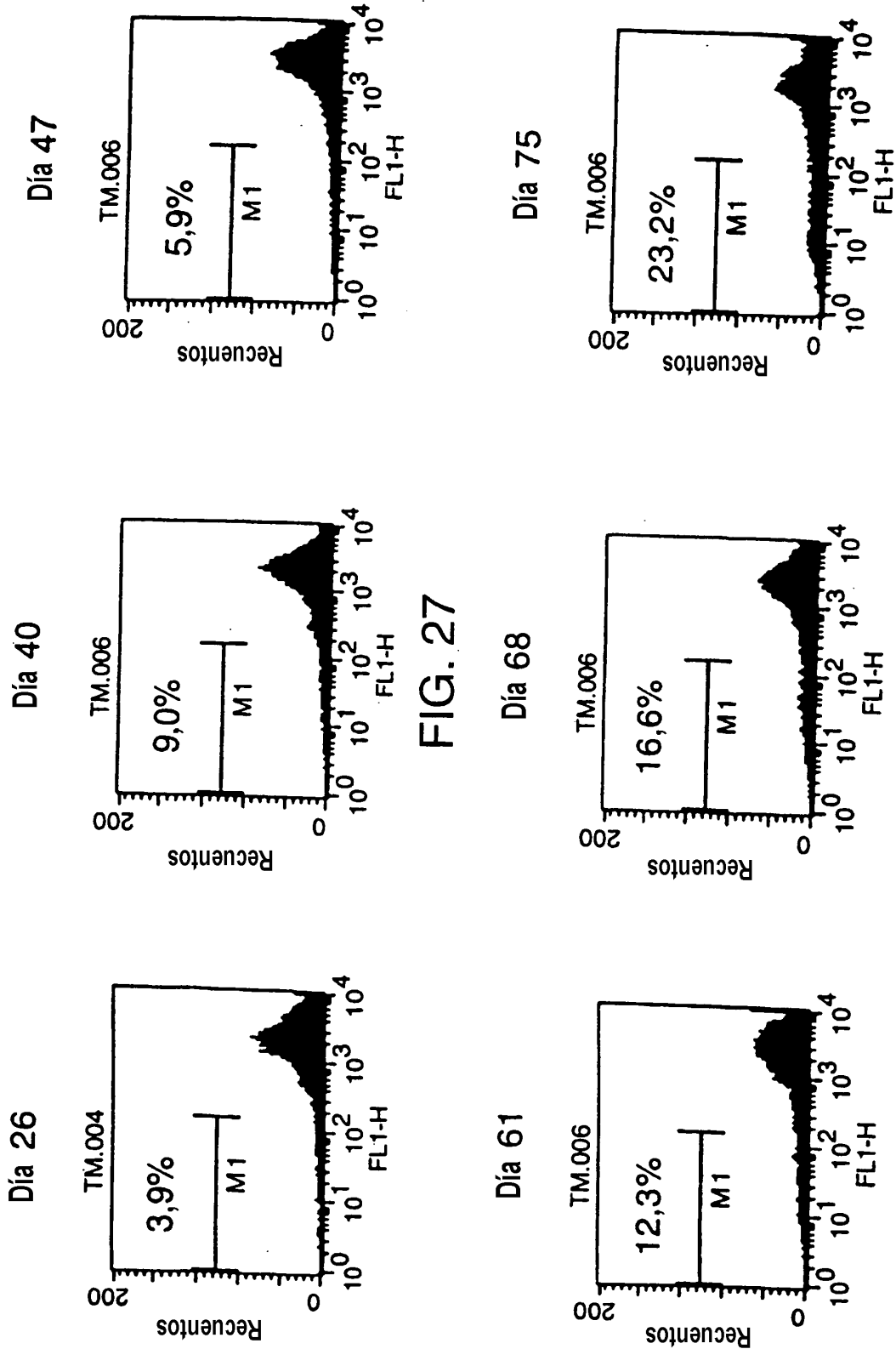


FIG. 27

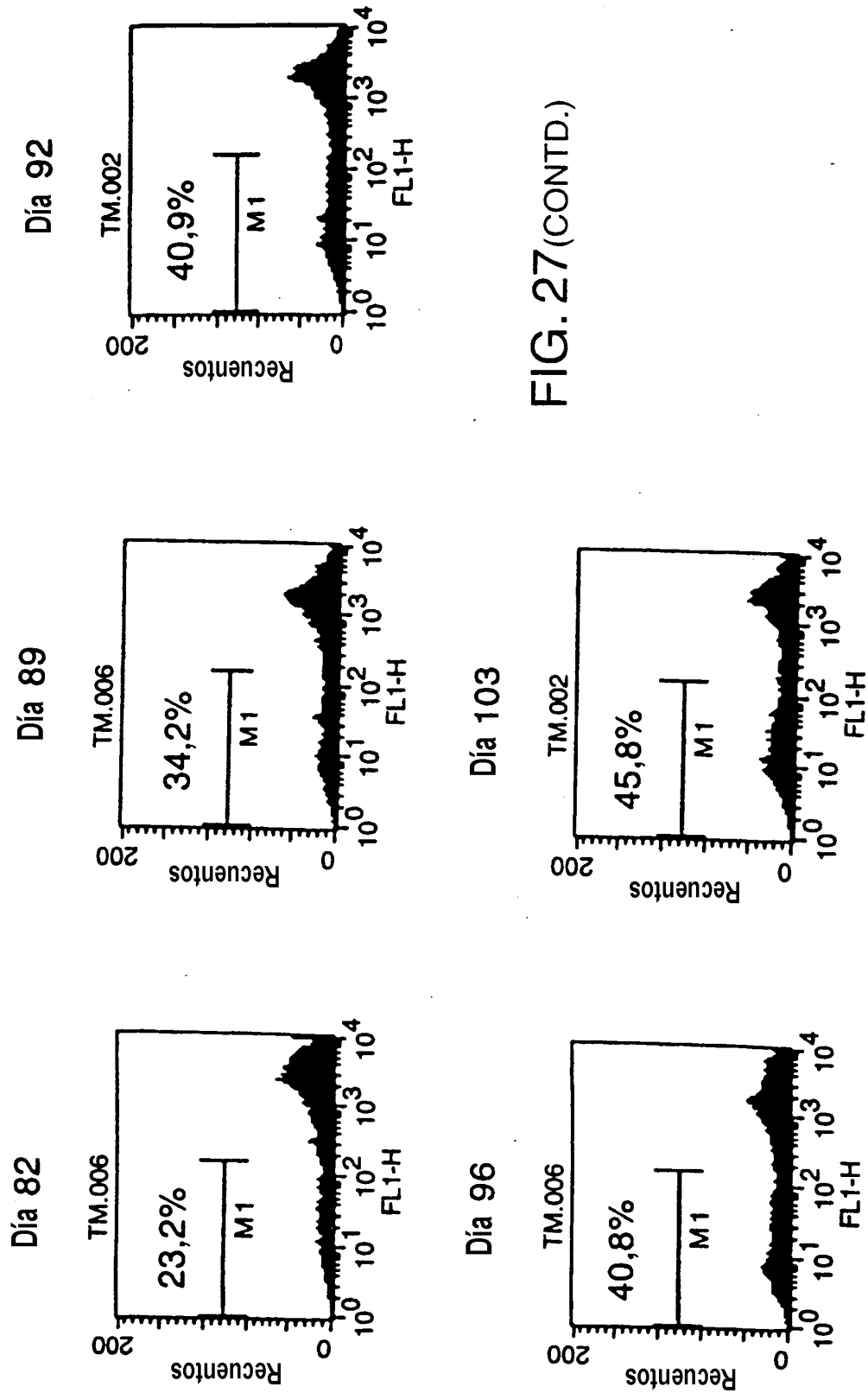


FIG. 27 (CONTD.)

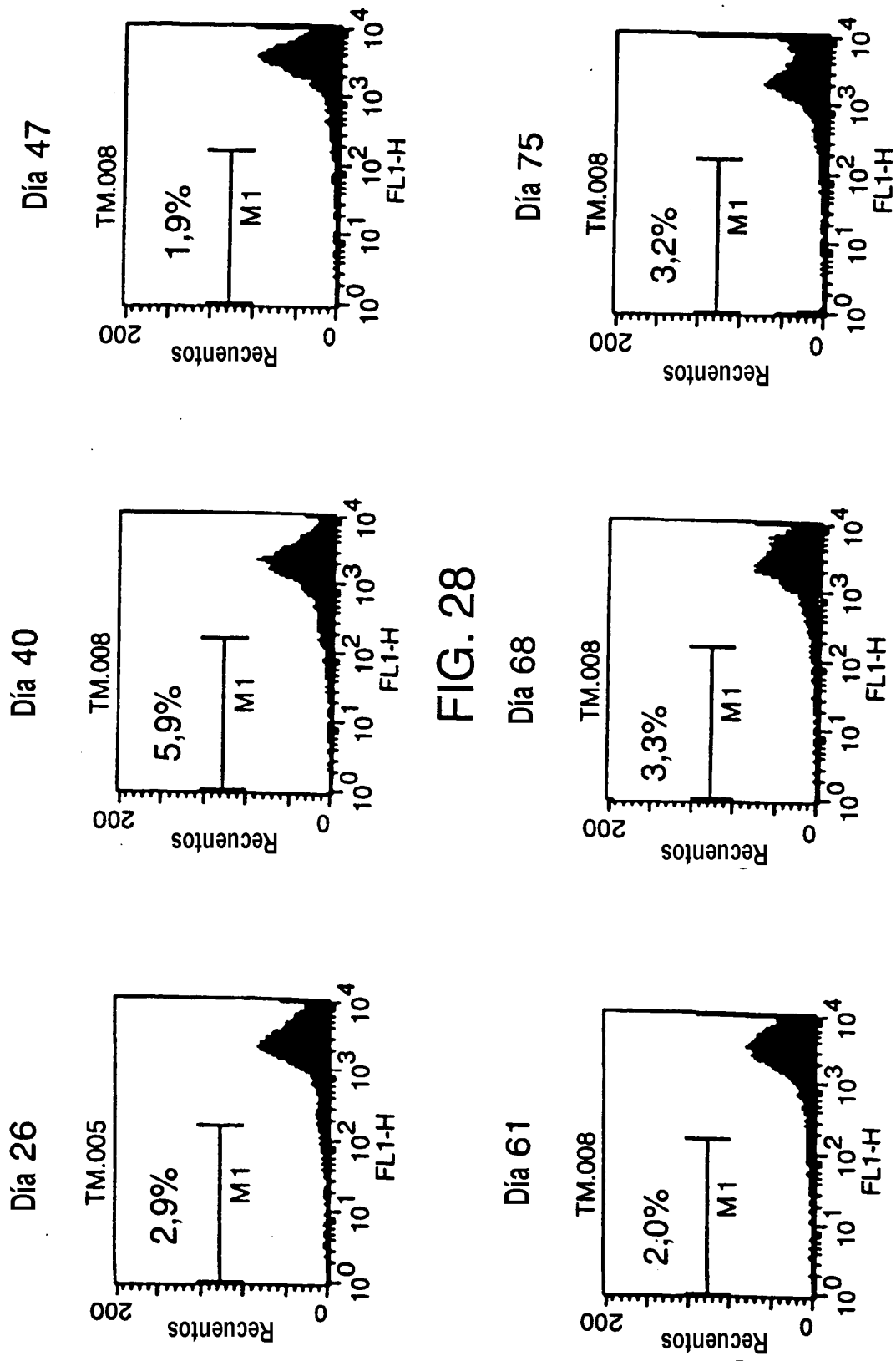


FIG. 28

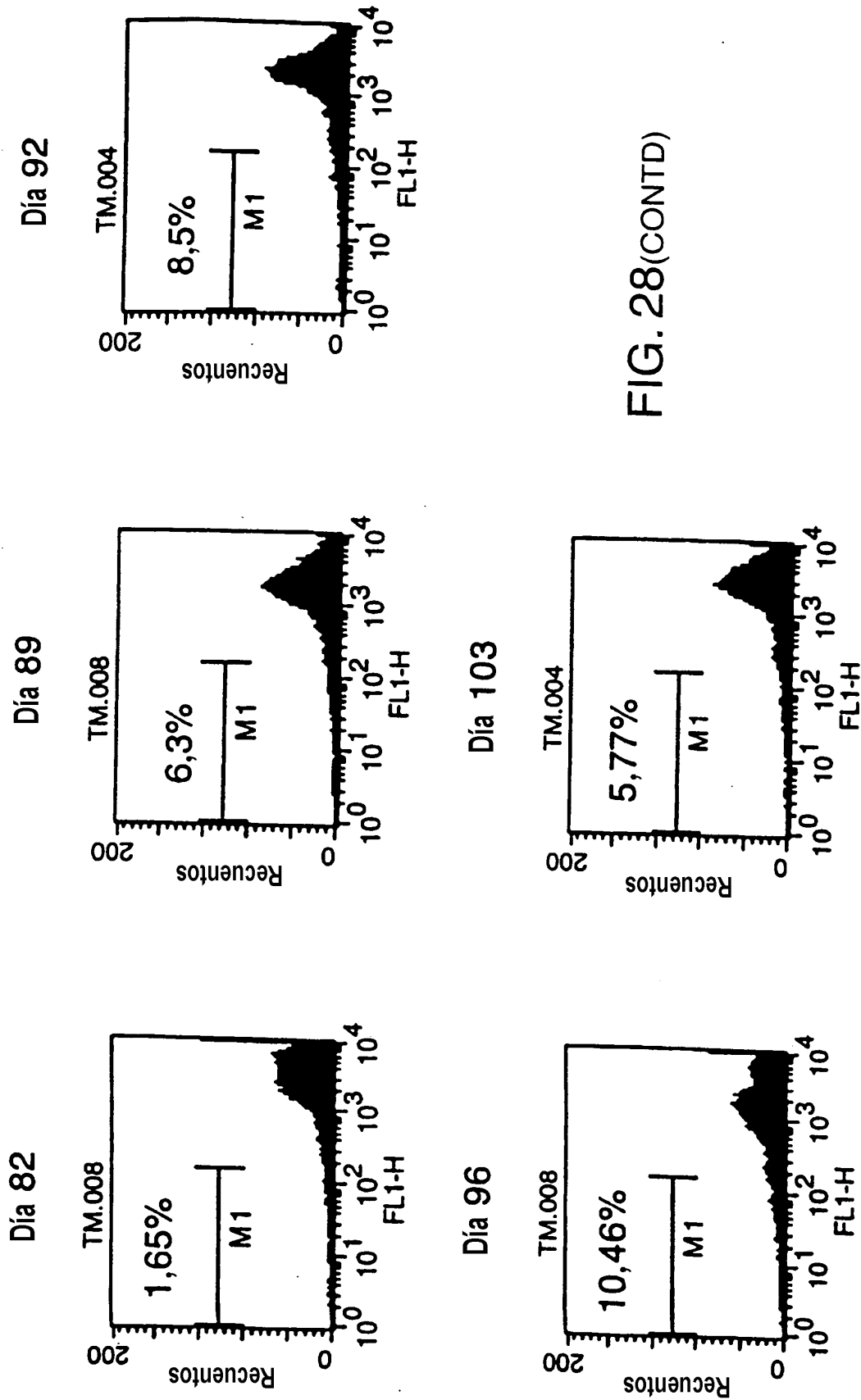


FIG. 28(CONTD)

FIG. 29
% DE CÉLULAS POSITIVAS CHO T7 (MATRACES)

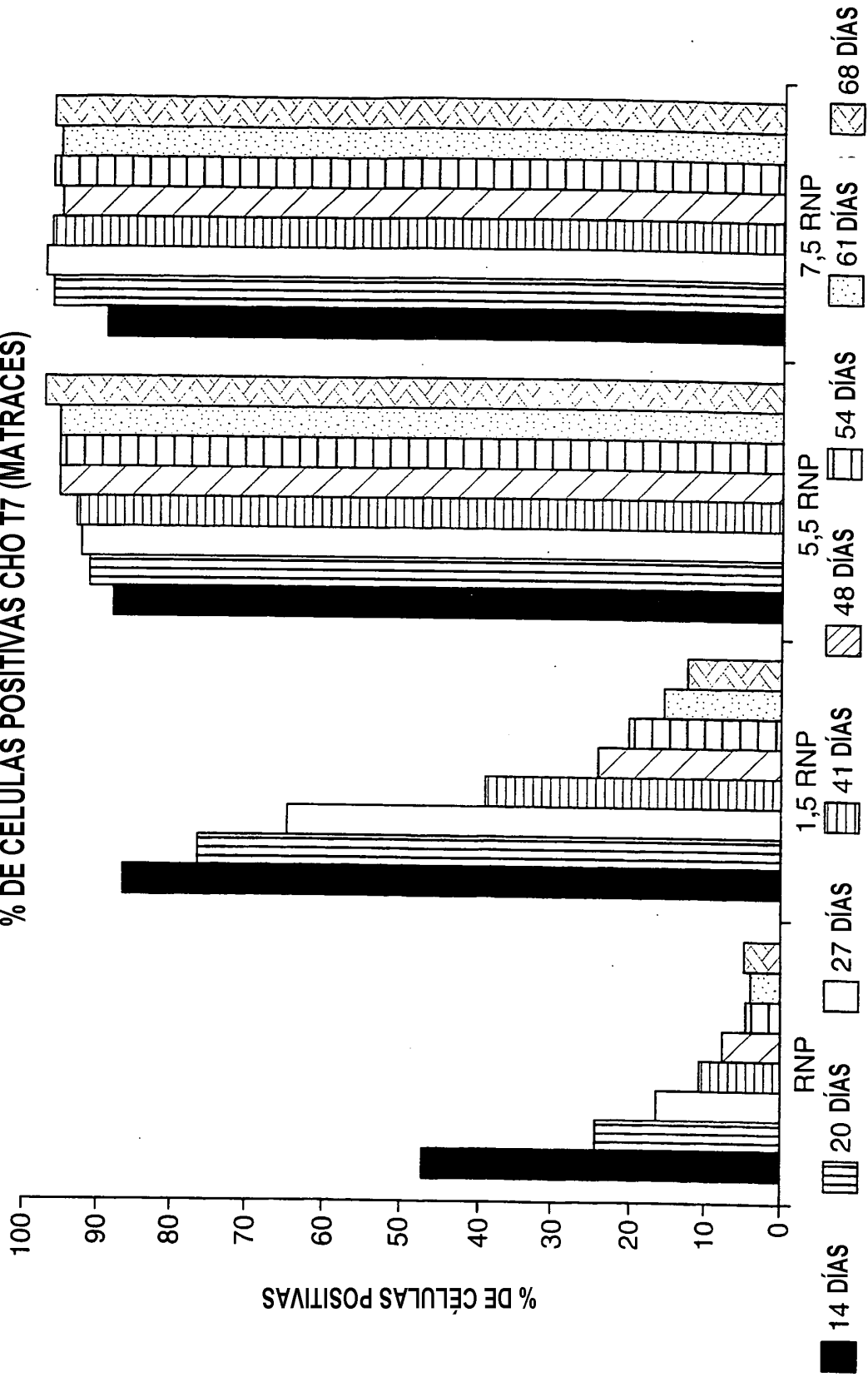


FIG. 30
MEDIANA DE LA FLUORESCENCIA DE AGRUPACIONES DE CHO SELECCIONADAS CON G418

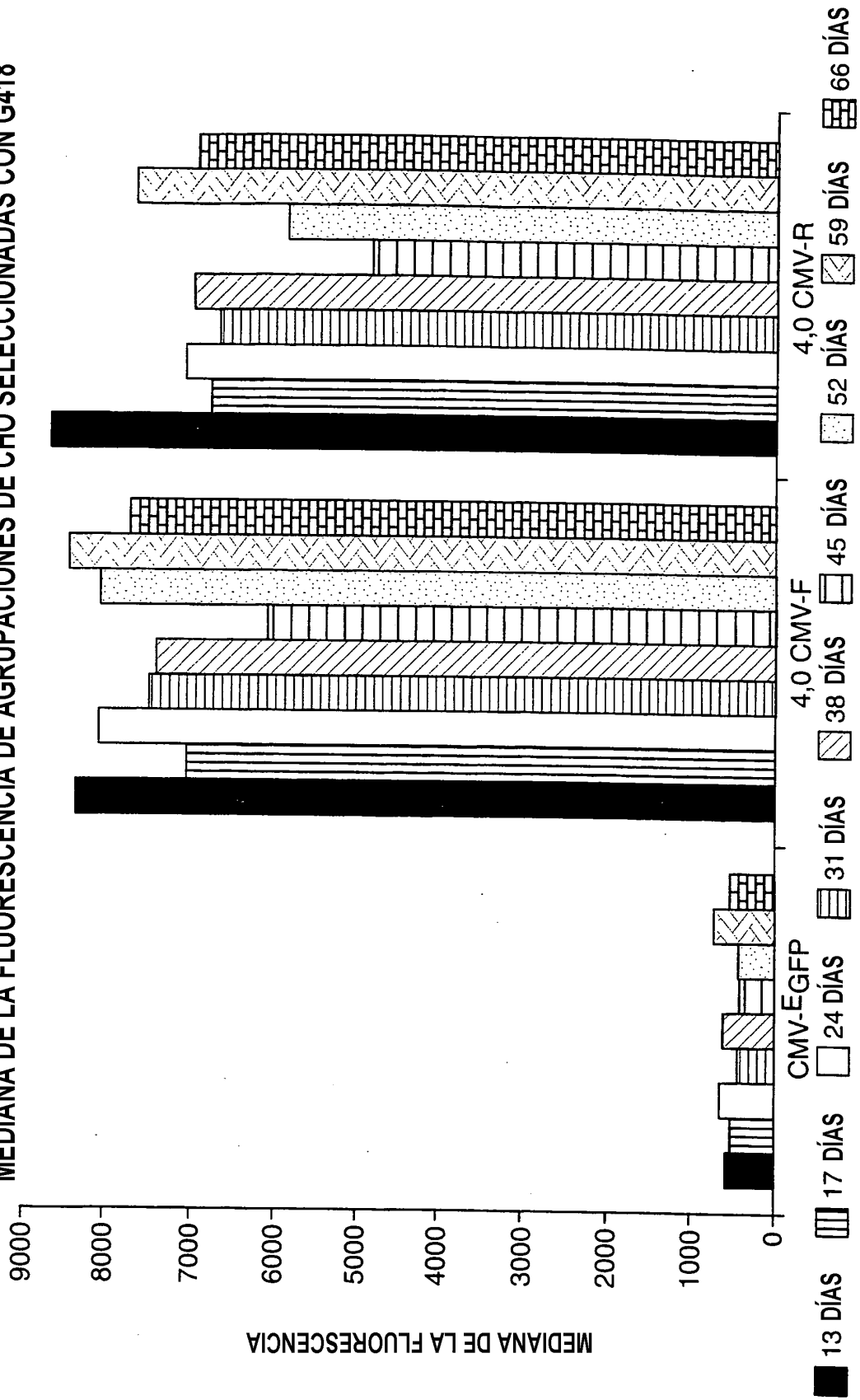


FIG. 31
PORCENTAJE DE CÉLULAS POSITIVAS EN AGRUPACIONES DE CHO SELECCIONADAS CON G418

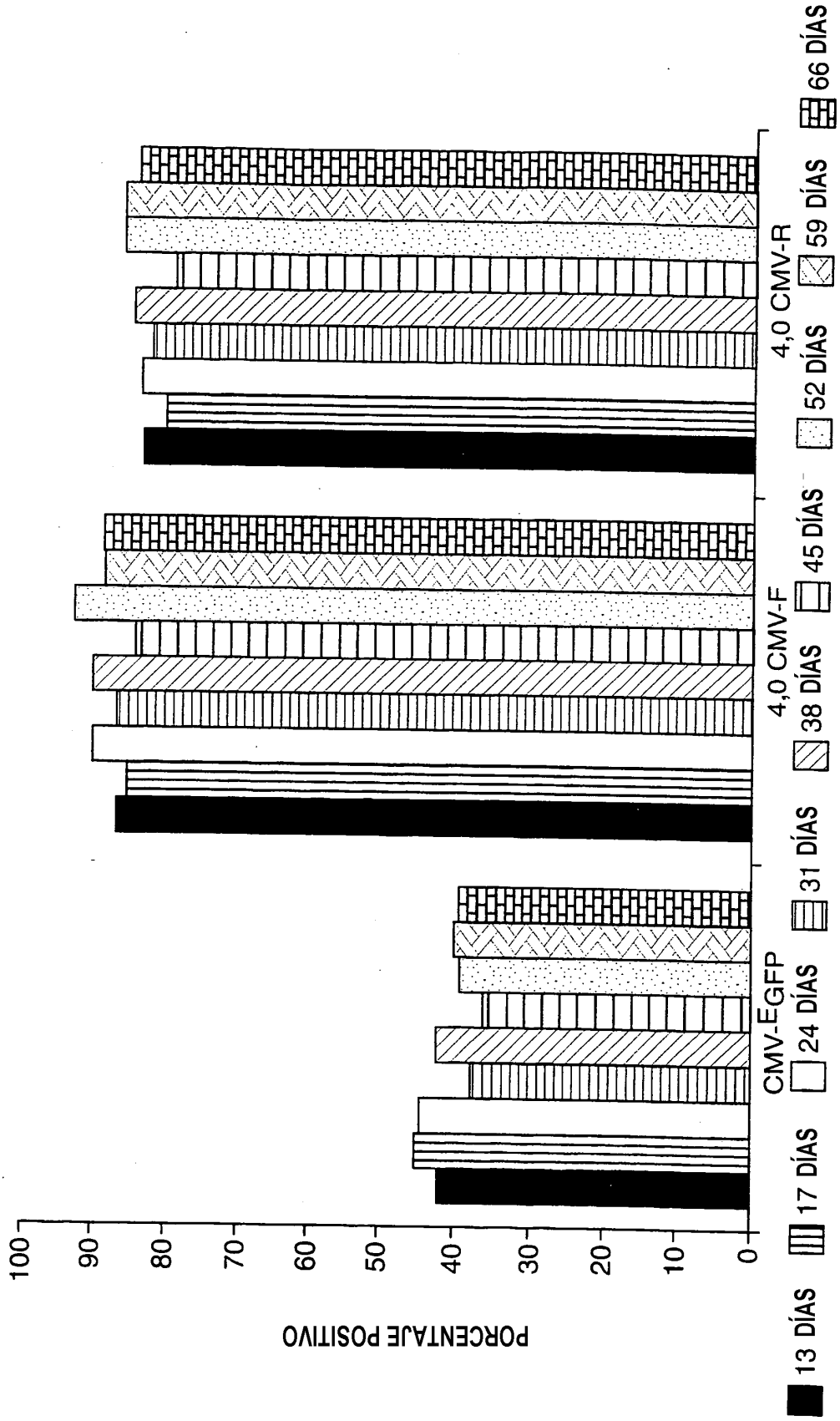
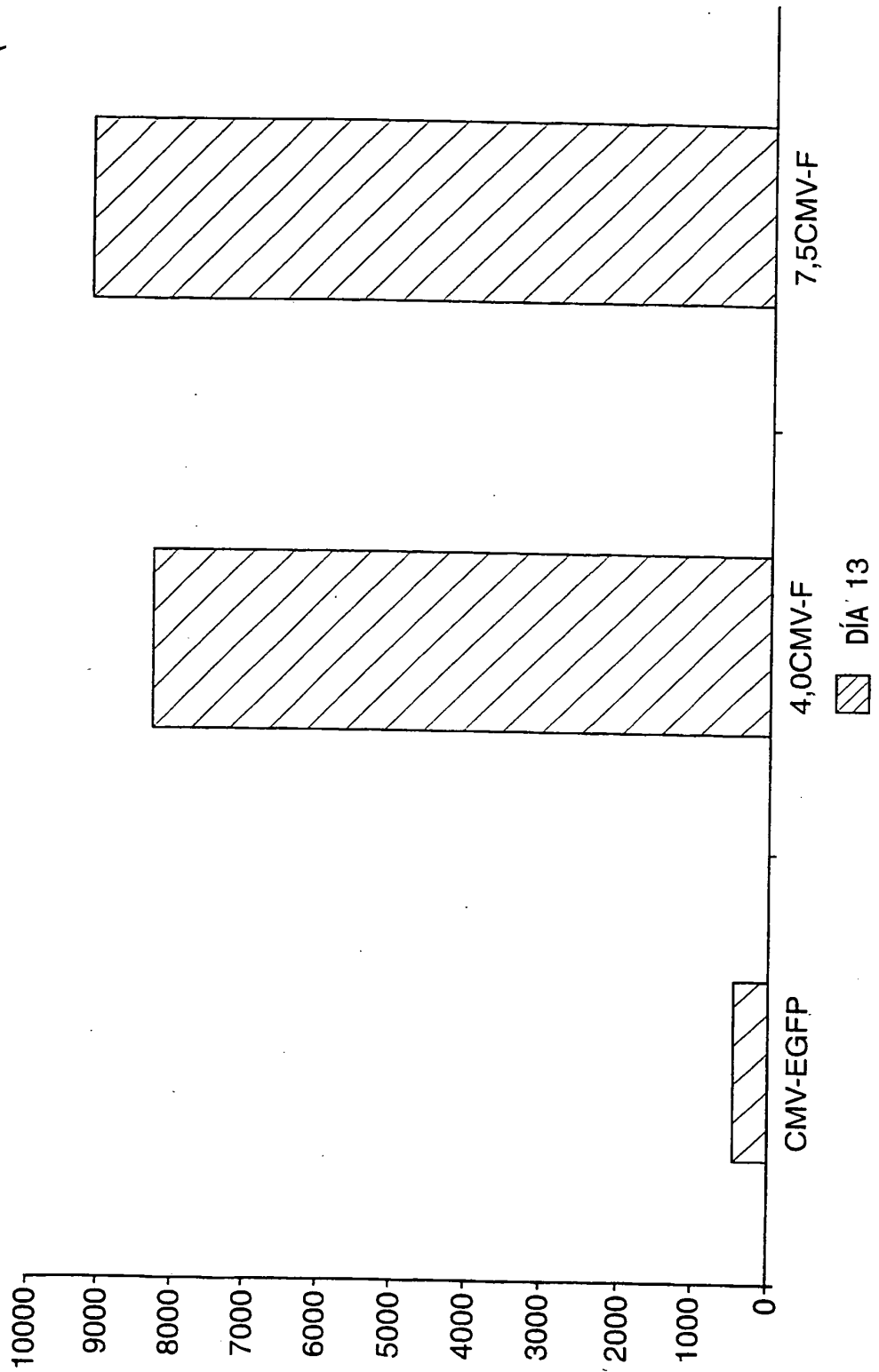


FIG. 32
MEDIANA DE LA FLUORESCENCIA DE AGRUPACIONES DE CHO SELECCIONADAS CON G416 (T13)



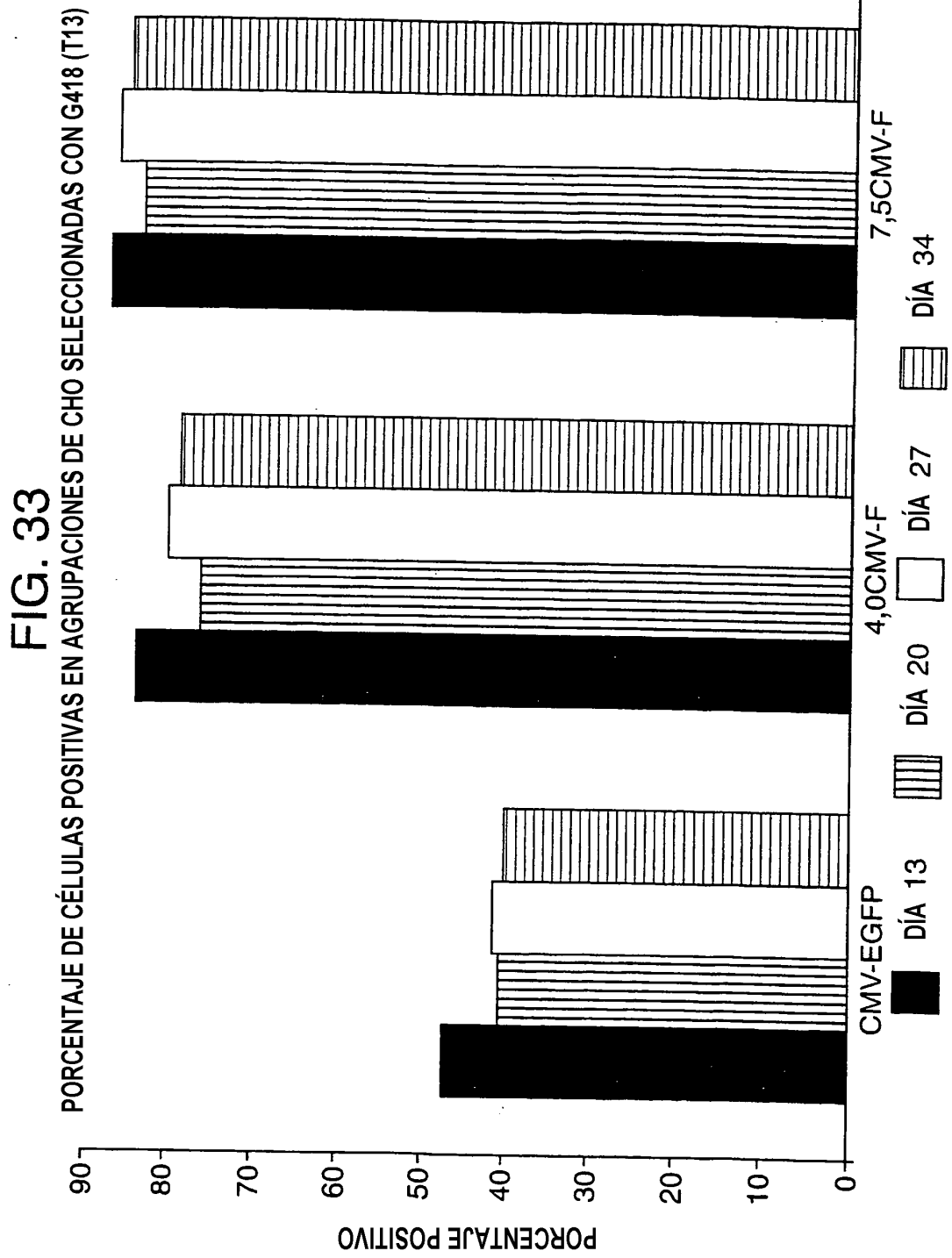


FIG. 34
RECIENTOS DE COLONIAS (T13-T225)

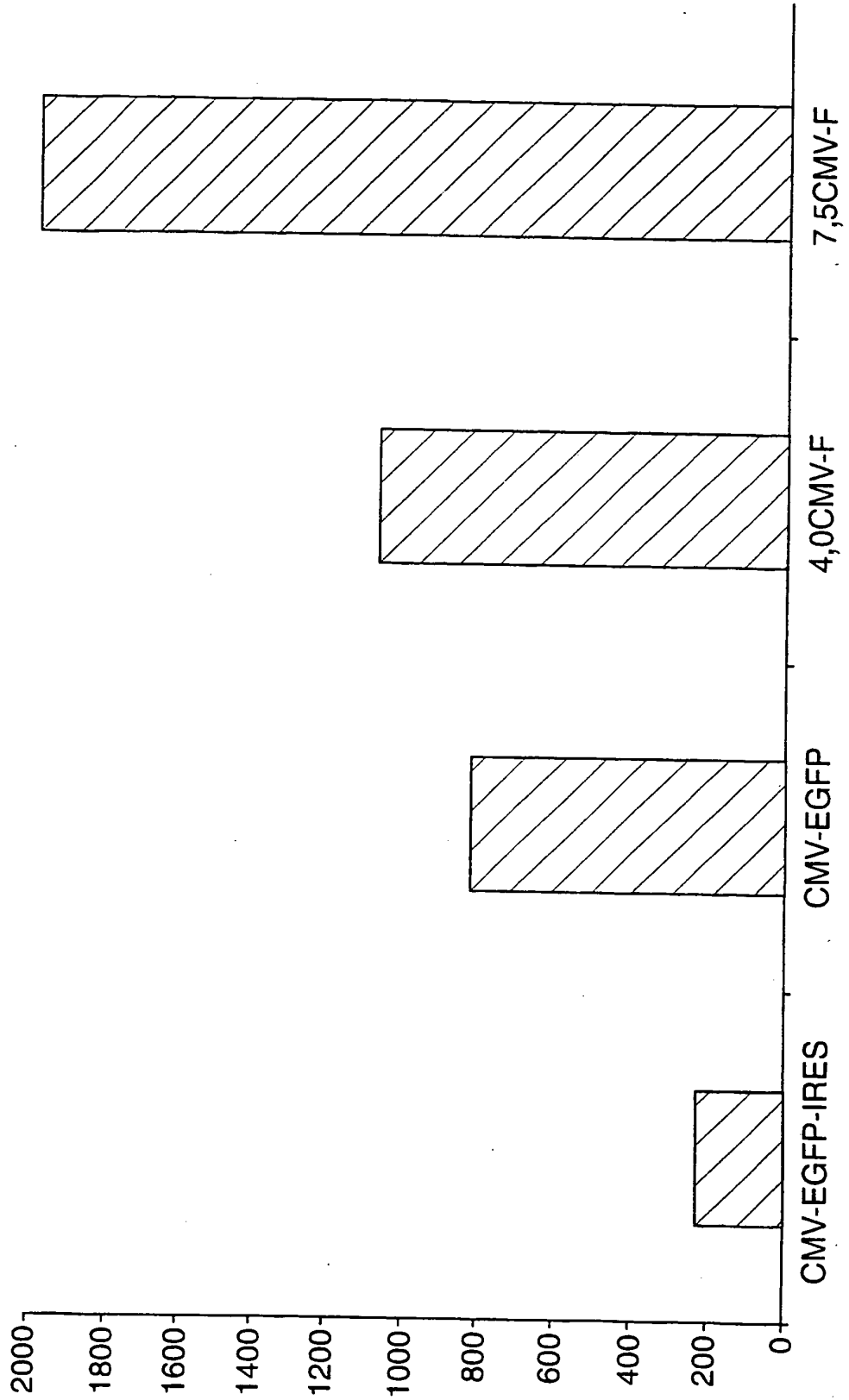


FIG. 35(A)

	1	2	3	4	5	6	7	8
A		Amígdala 135	Núcleo caudado 161	Cerebelo 109	Corteza cerebral 99	Lóbulo frontal 89	Hipocampo 118	Médula oblonga 124
B		Putamen 202	Sustancia negra 132	Lóbulo temporal 117	Tálamo 125	Núcleo subtalámico 127	Médula espinal 169	
C	Corazón 410	Aorta 106	Músculo esquelético 210	Colon 177	Vejiga 100	Útero 114	Próstata 190	Estómago 293
D	Testículos 213	Ovario 205	Páncreas 514	Glándula pituitaria 331	Glándula adrenal 349	Glándula tiroides 169	Glándula salivar 393	Glándula mamaria 93
E	Riñón 213	Hígado 429	Intestino delgado 275	Bazo 175	Timo 209	Leucocitos periféricos 94	Nódulo linfático 164	Médula ósea 147
F	Apéndice 152	Pulmón 243	Tráquea 235	Placenta 361				
G	Cerebro fetal 137	Corazón fetal 135	Riñón fetal 210	Hígado fetal 243	Bazo fetal 149	Timo fetal 104	Pulmón fetal 245	
H	ARN total de levaduras 100 ng	ARNt de levaduras 100 ng	ARNr de E. coli 100 ng	ADN de E. coli 100 ng	poli r(A) 100 ng	ADN C ₀ t 1 humano 100 ng	ADN humano 100 ng	ADN humano 500 ng

5

FIG. 35(B) (PSMB1)

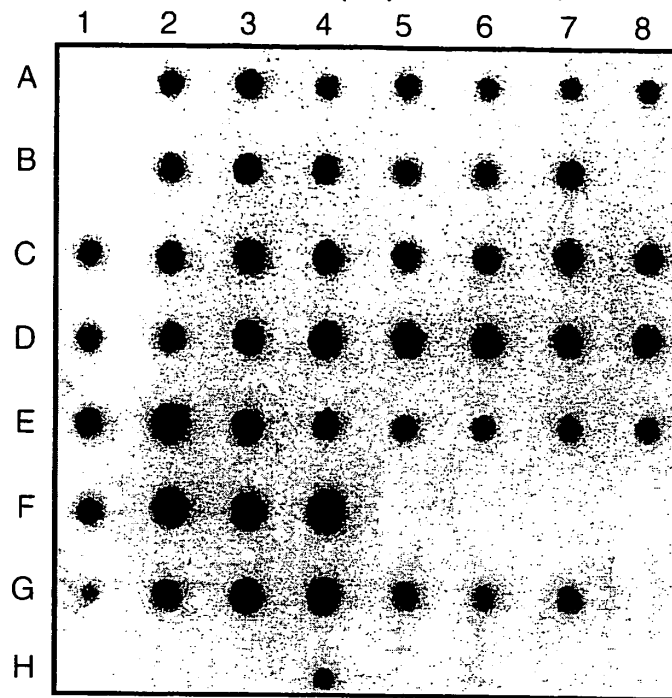


FIG. 35(C) (PDCD2)

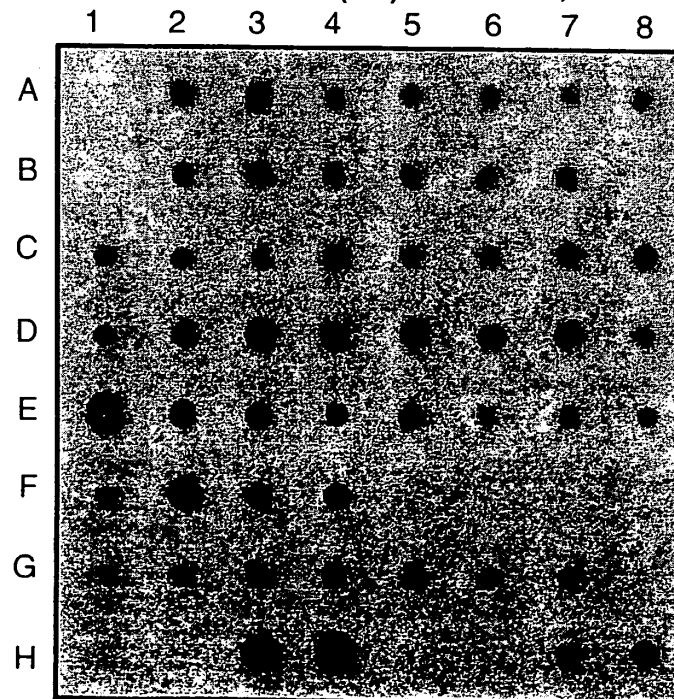


FIG. 35(D) (TBP)

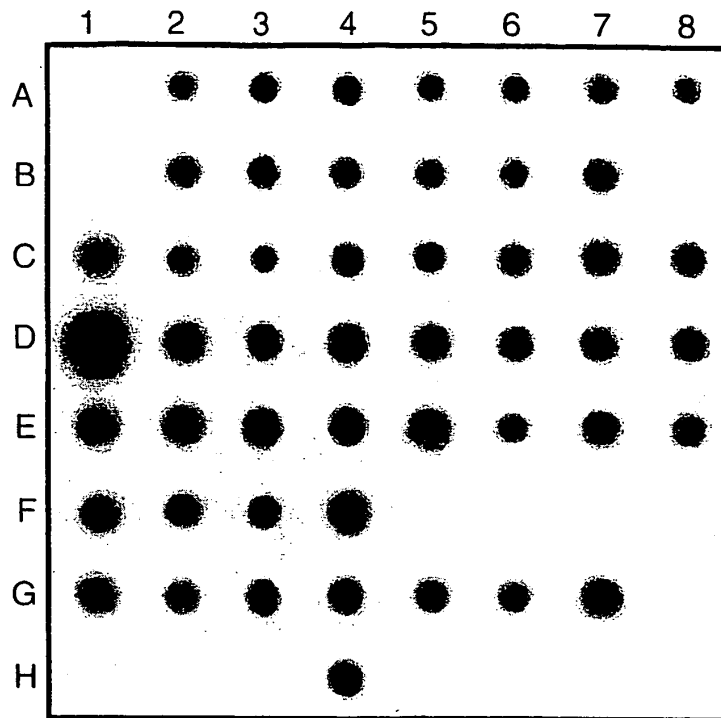


FIG. 35(E) (UBIQUITINA)

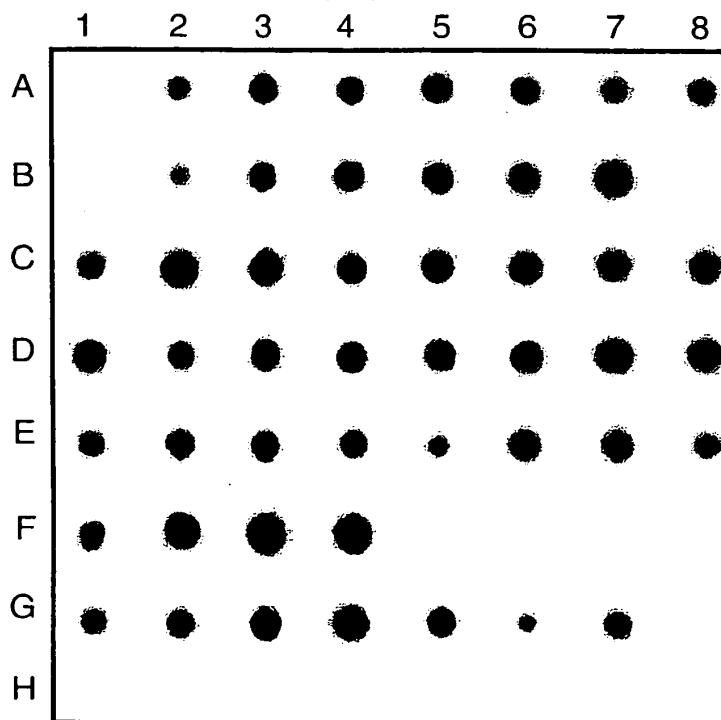


FIG. 36(a)

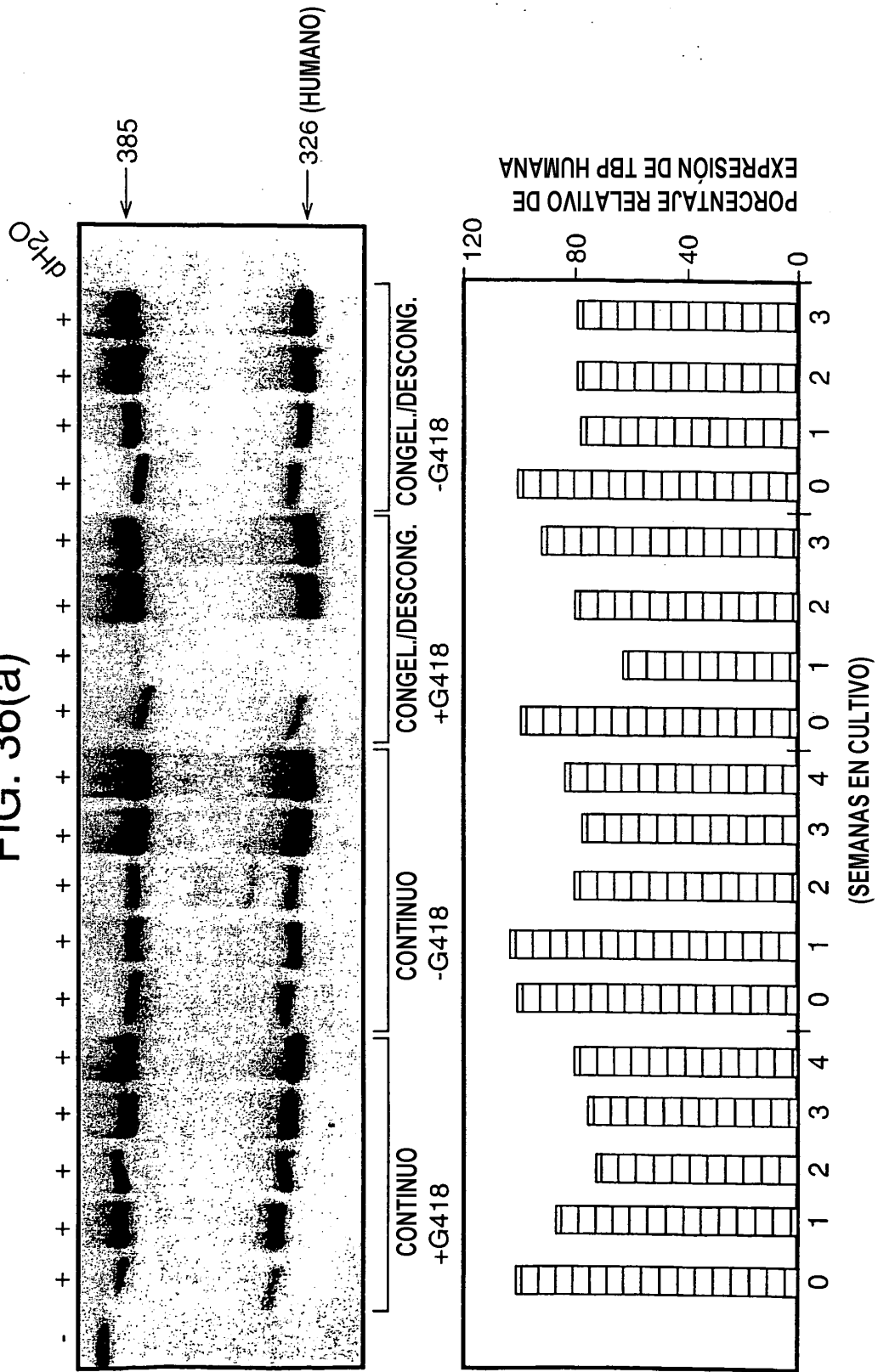


FIG. 36(b)

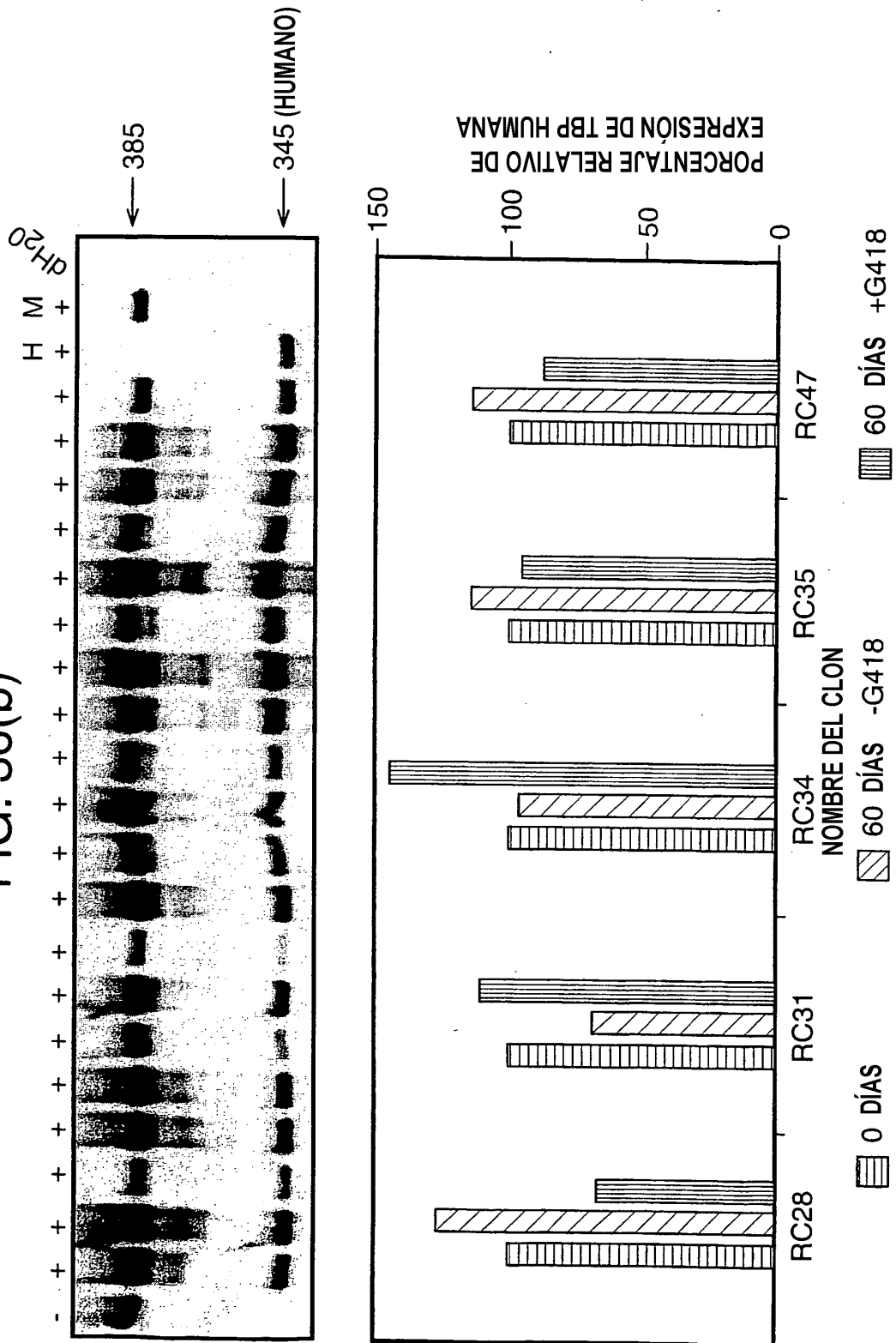


FIG. 38(A)

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	Cerebro completo 100	Amígdala 135	Núcleo caudado 161	Cerebelo 109	Corteza cerebral 99	Lóbulo frontal 89	Hipocampo 118	Médula oblonga 124
B	Lóbulo occipital 100	Putamen 202	Sustancia negra 132	Lóbulo temporal 117	Tálamo 125	Núcleo subtalámico 127	Médula espinal 169	
C	Corazón 410	Aorta 106	Músculo esquelético 210	Colon 177	Vejiga 100	Útero 114	Próstata 190	Estómago 293
D	Testículos 213	Ovario 205	Páncreas 514	Glándula pituitaria 331	Glándula adrenal 349	Glándula tiroides 169	Glándula salivar 393	Glándula mamaria 93
E	Riñón 213	Hígado 429	Intestino delgado 275	Bazo 175	Timo 209	Leucocitos periféricos 94	Nódulo linfático 164	Médula ósea 147
F	Apéndice 152	Pulmón 243	Tráquea 235	Placenta 361				
G	Cerebro fetal 137	Corazón fetal 135	Riñón fetal 210	Hígado fetal 243	Bazo fetal 149	Timo fetal 104	Pulmón fetal 245	
H	ARN total de levaduras 100 ng	ARNt de levaduras 100 ng	ARNr de E. coli 100 ng	ADN de E. coli 100 ng	poli r(A) 100 ng	ADN C ₀ t 1 humano 100 ng	ADN humano 100 ng	ADN humano 500 ng

FIG. 38(B)

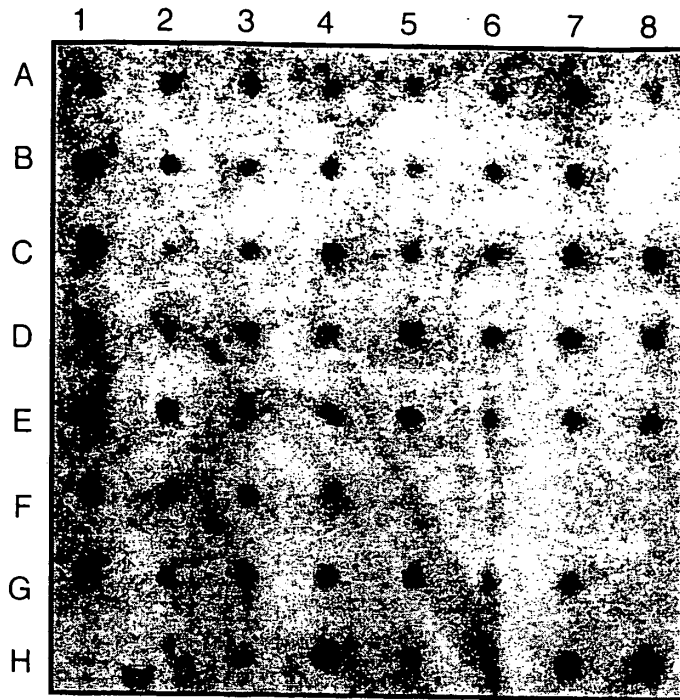


FIG. 38(C)

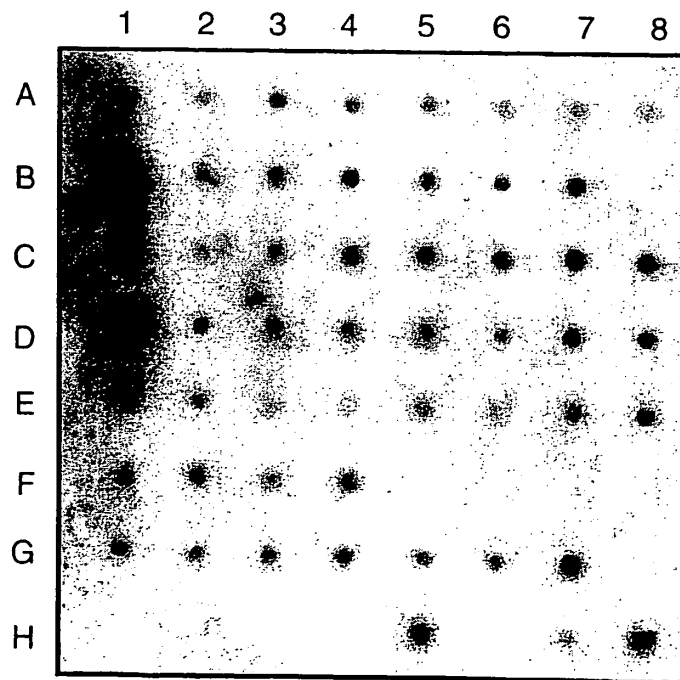


FIG. 39(A)

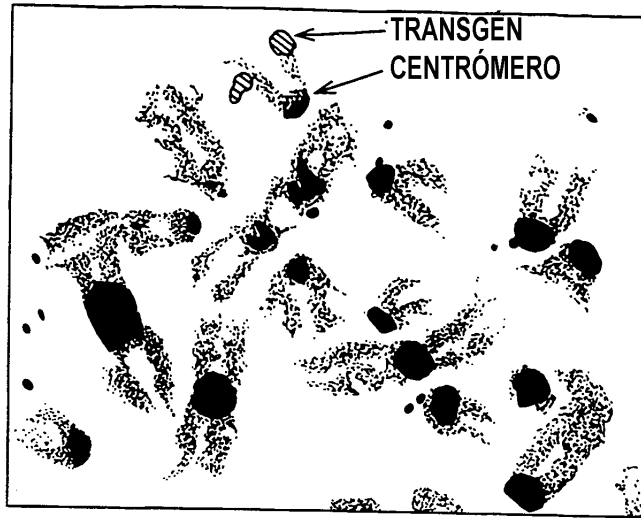


FIG. 39(B)

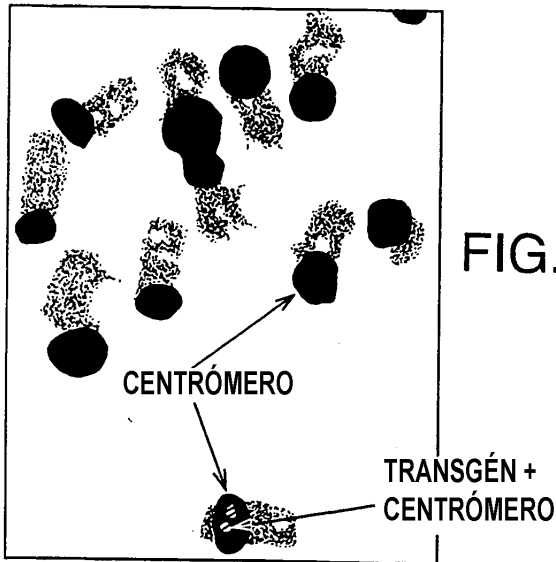


FIG. 39(C)

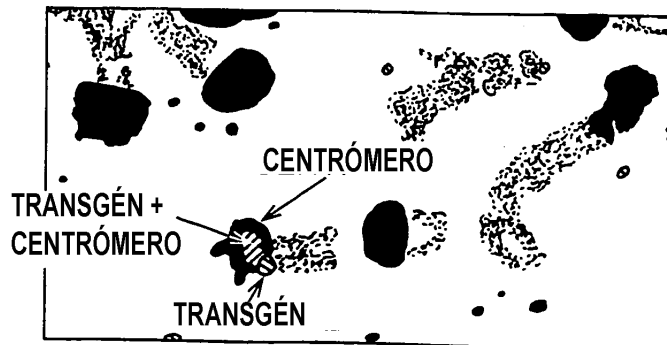


FIG. 40

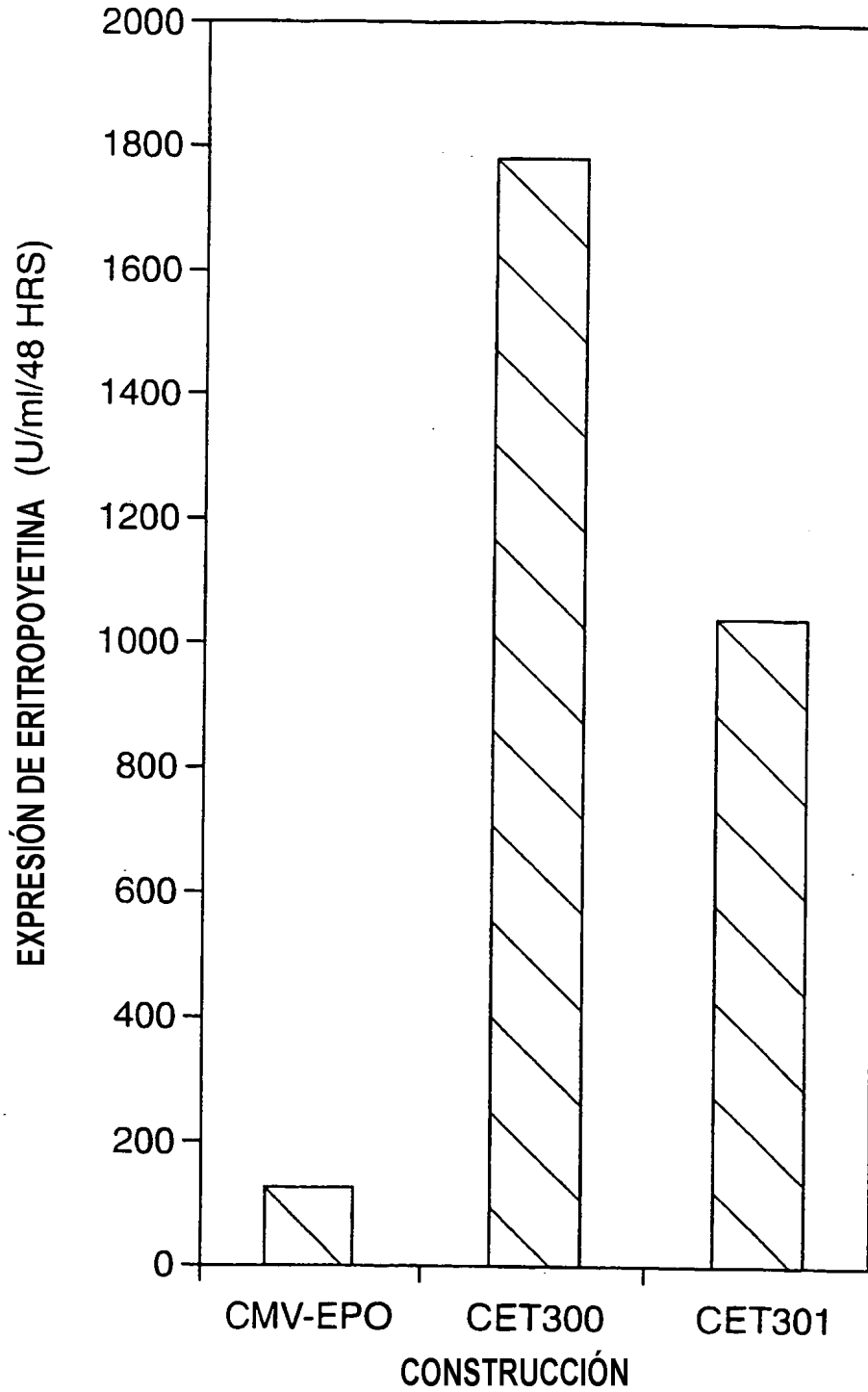


FIG. 41

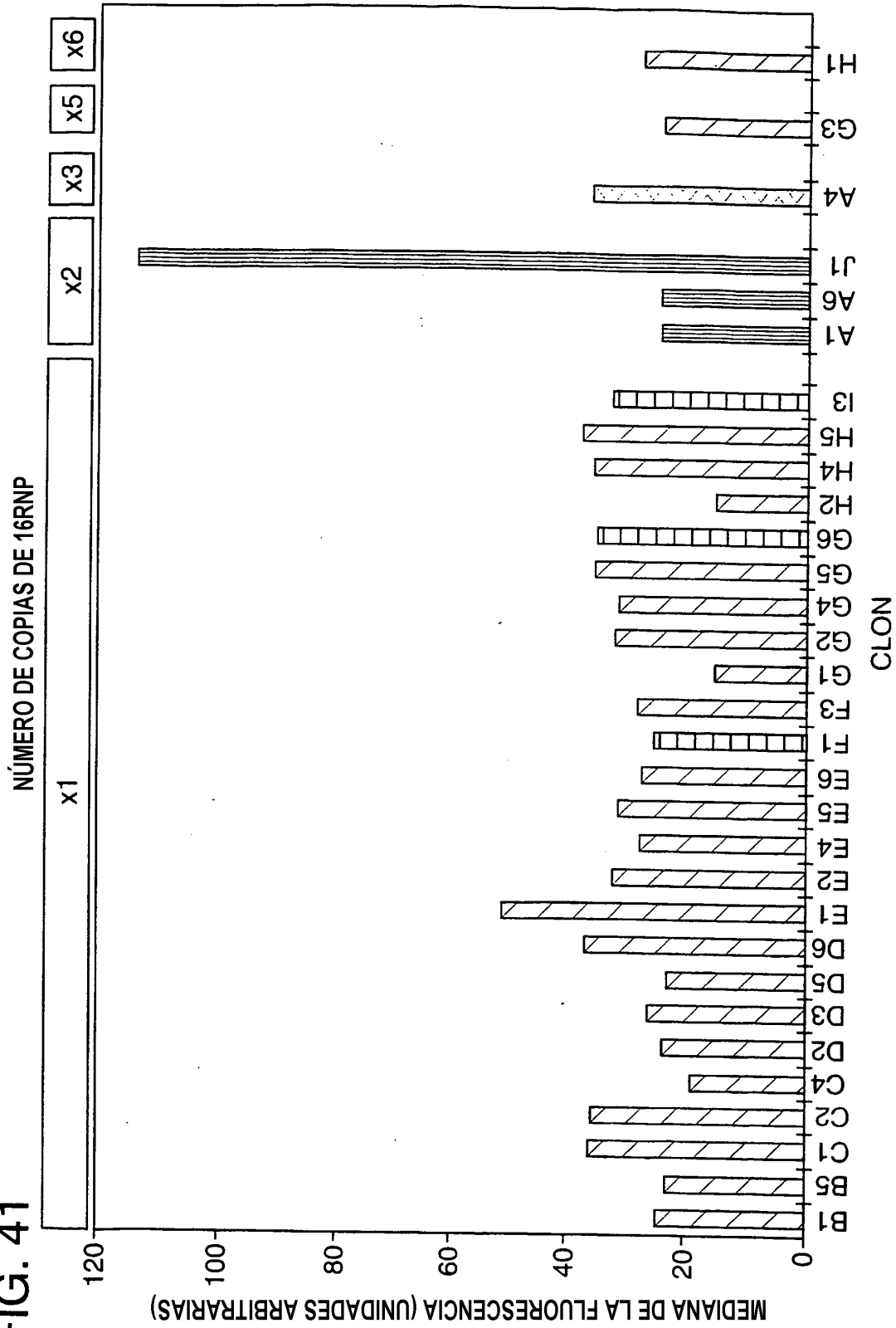


FIG. 42(B)

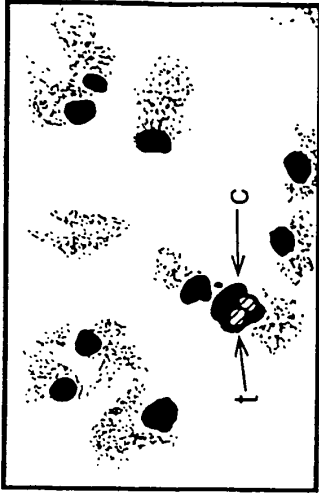


FIG. 42(D)

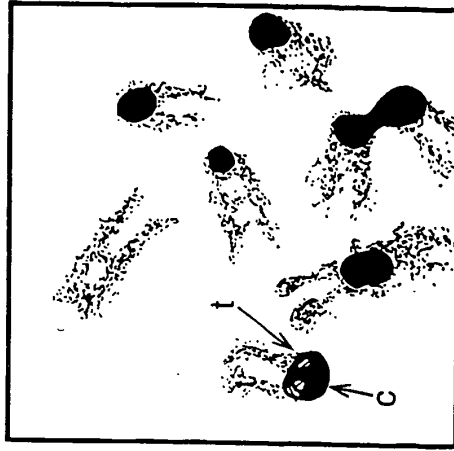


FIG. 42(A)

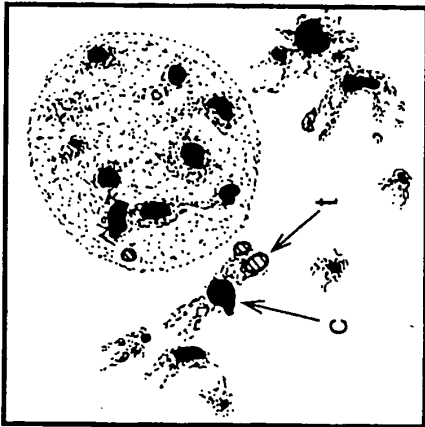


FIG. 42(C)

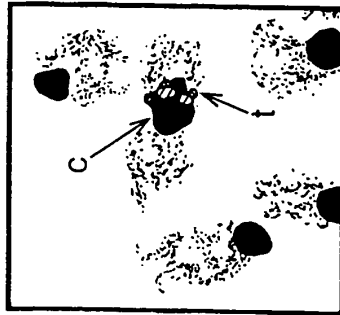


FIG. 43

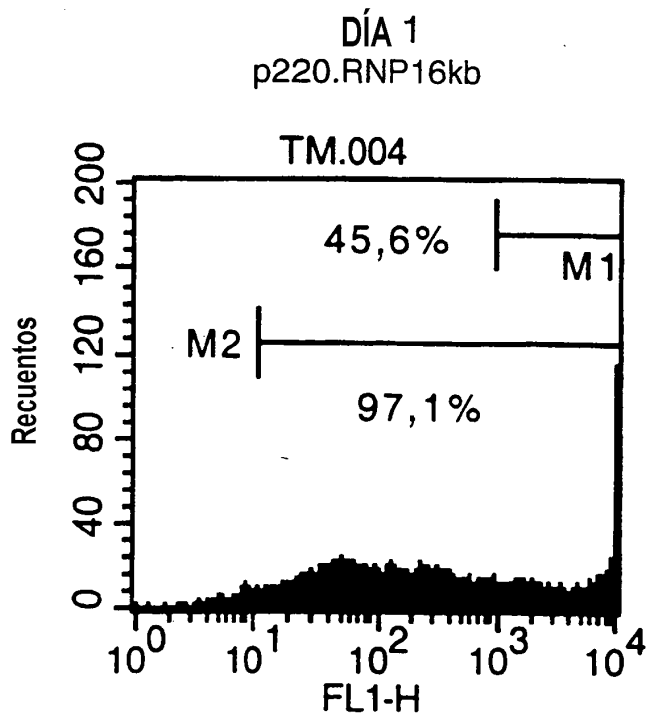
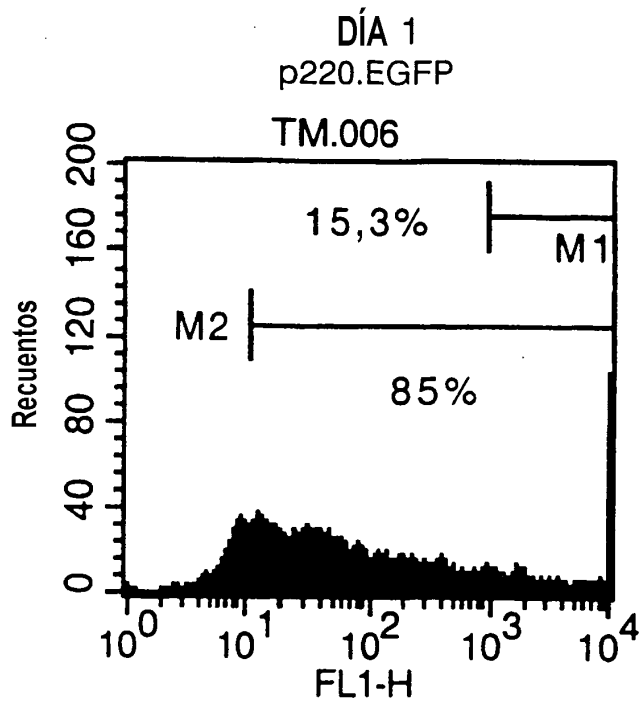


FIG. 43(I)

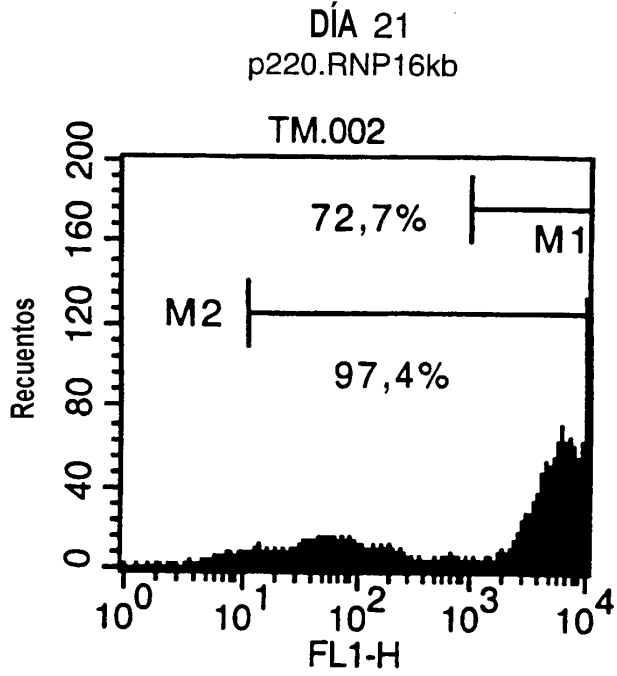
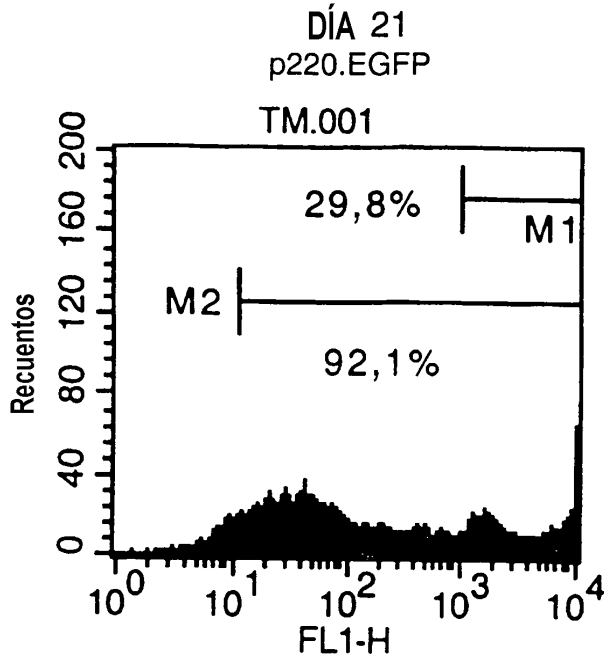


FIG. 43(II)

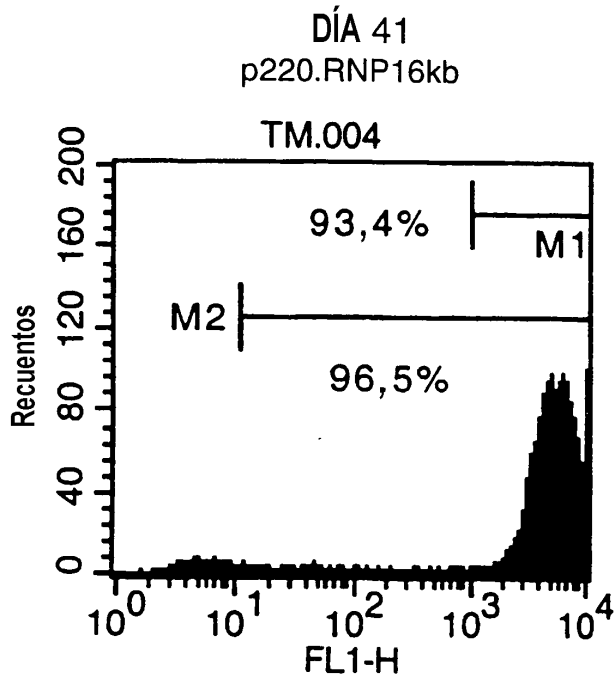
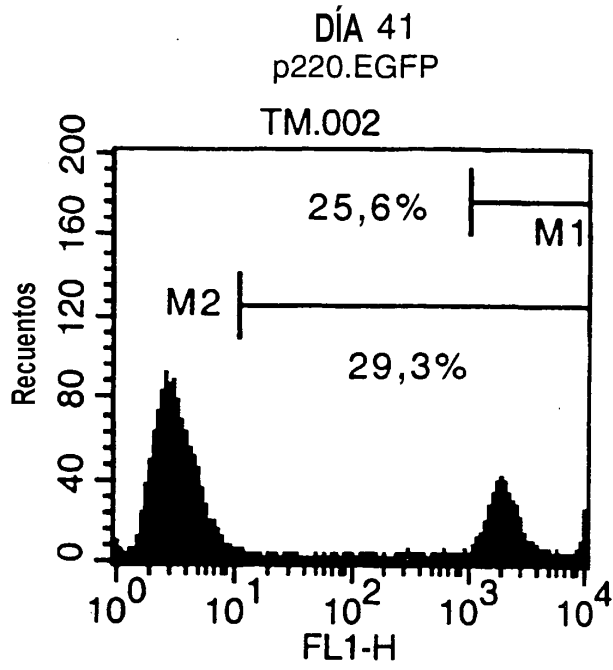


FIG. 44

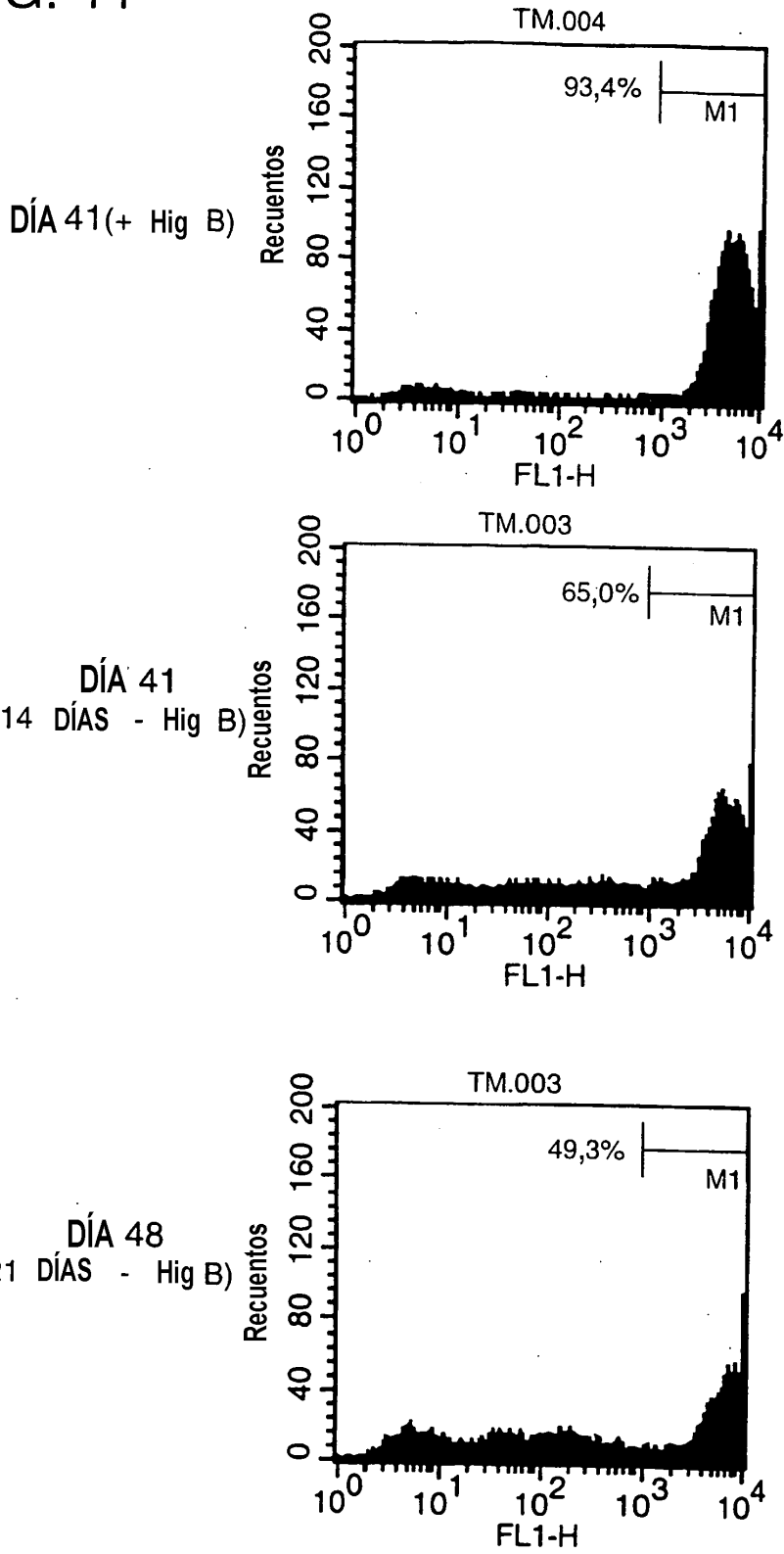


FIG. 45

PRODUCCIÓN DE EPO EN UNA TRANSFECCIÓN TRANSITORIA

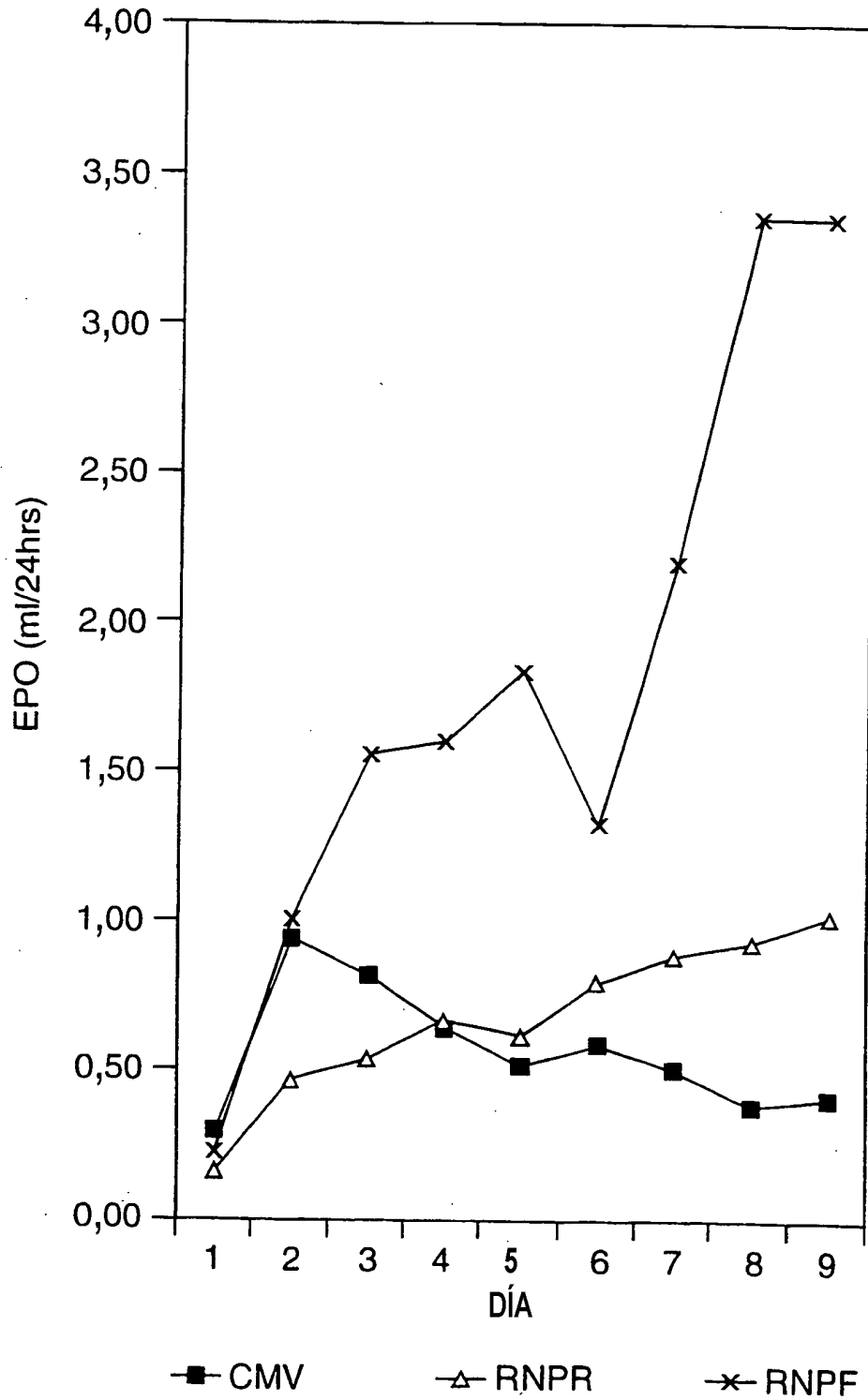


FIG. 46

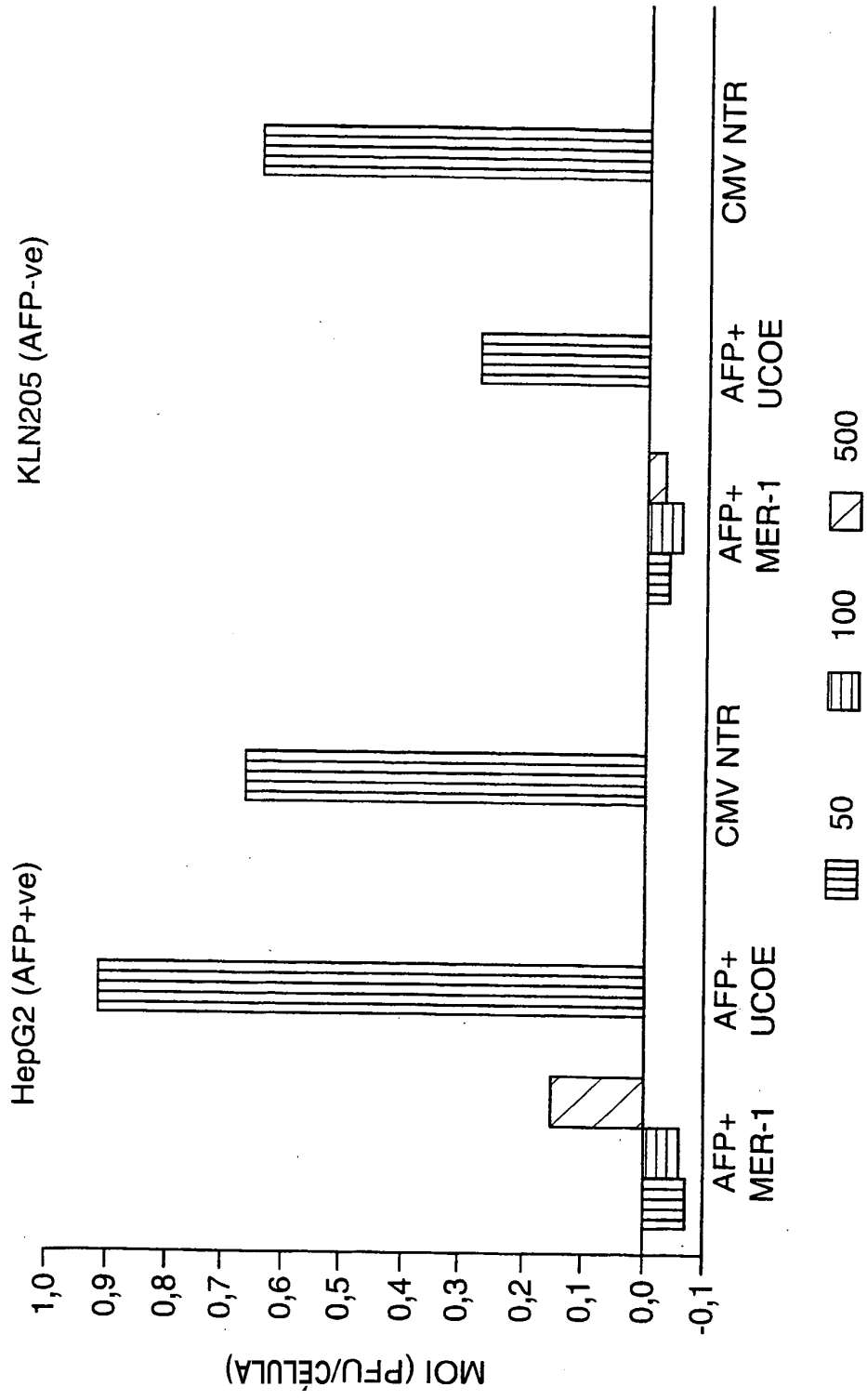


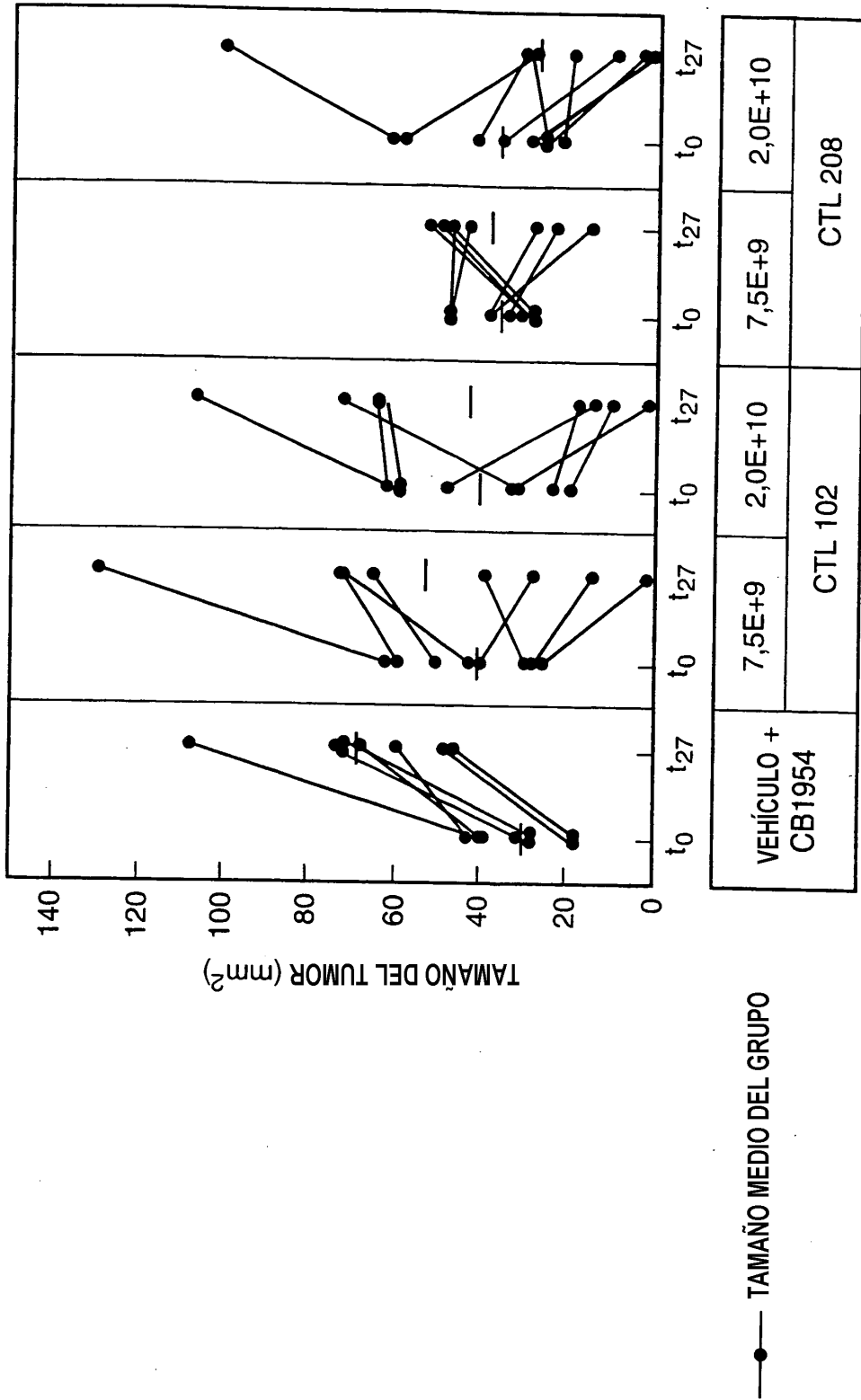
FIG. 47

	TUMOR (%)	HÍGADO (%)
<u>CTL102; 7.5E+9</u>		
RATÓN 1	+	1
RATÓN 2	5	+
RATÓN 3	15	0
RATÓN 4	20	+/-
RATÓN 5	25	+
RATÓN 6	60	+
<u>CTL208; 7.5E+9</u>		
RATÓN 7	0	0
RATÓN 8	10	0
RATÓN 9	30	0
RATÓN 10	40	0
RATÓN 11	80	0

+/- POCAS CÉLULAS (MEDIA DE 3/SECCIÓN)

+ MEDIA DE 30-50 CÉLULAS/SECCIÓN

FIG. 48



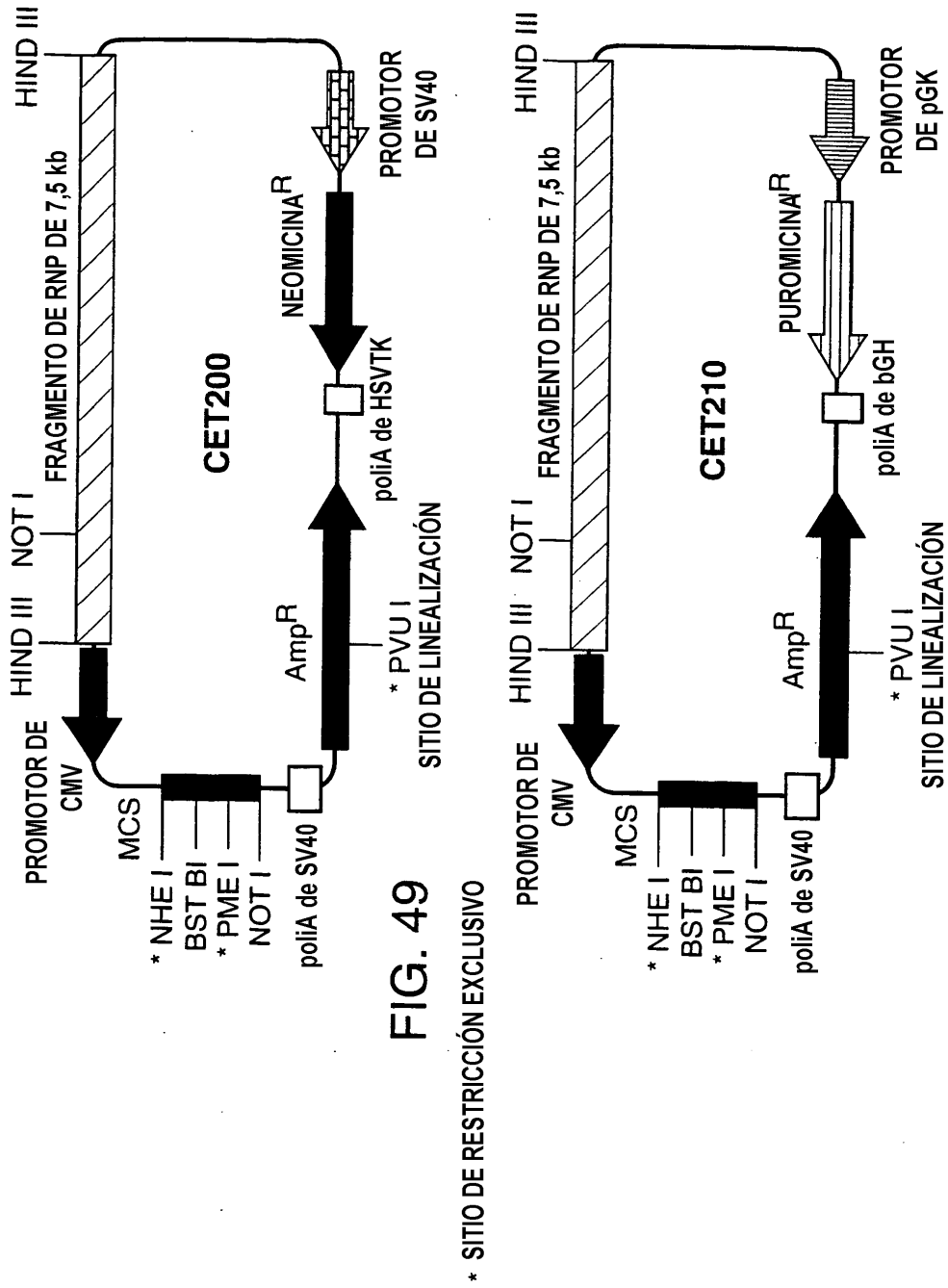


FIG. 50

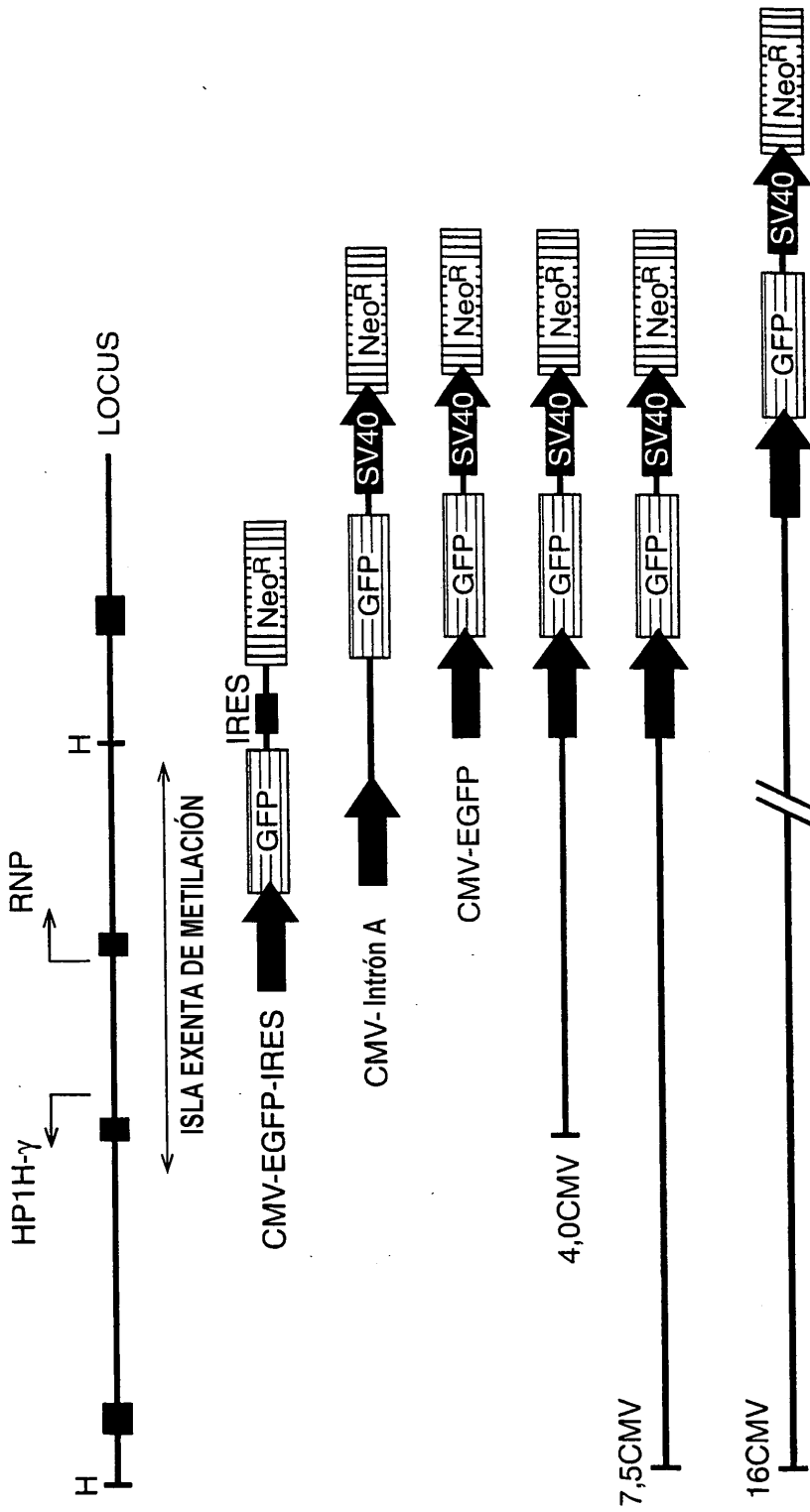


FIG. 51 MEDIANA DE LA FLUORESCENCIA DE CÉLULAS HeLa TRANSFECTADAS DE MODO TRANSITORIO

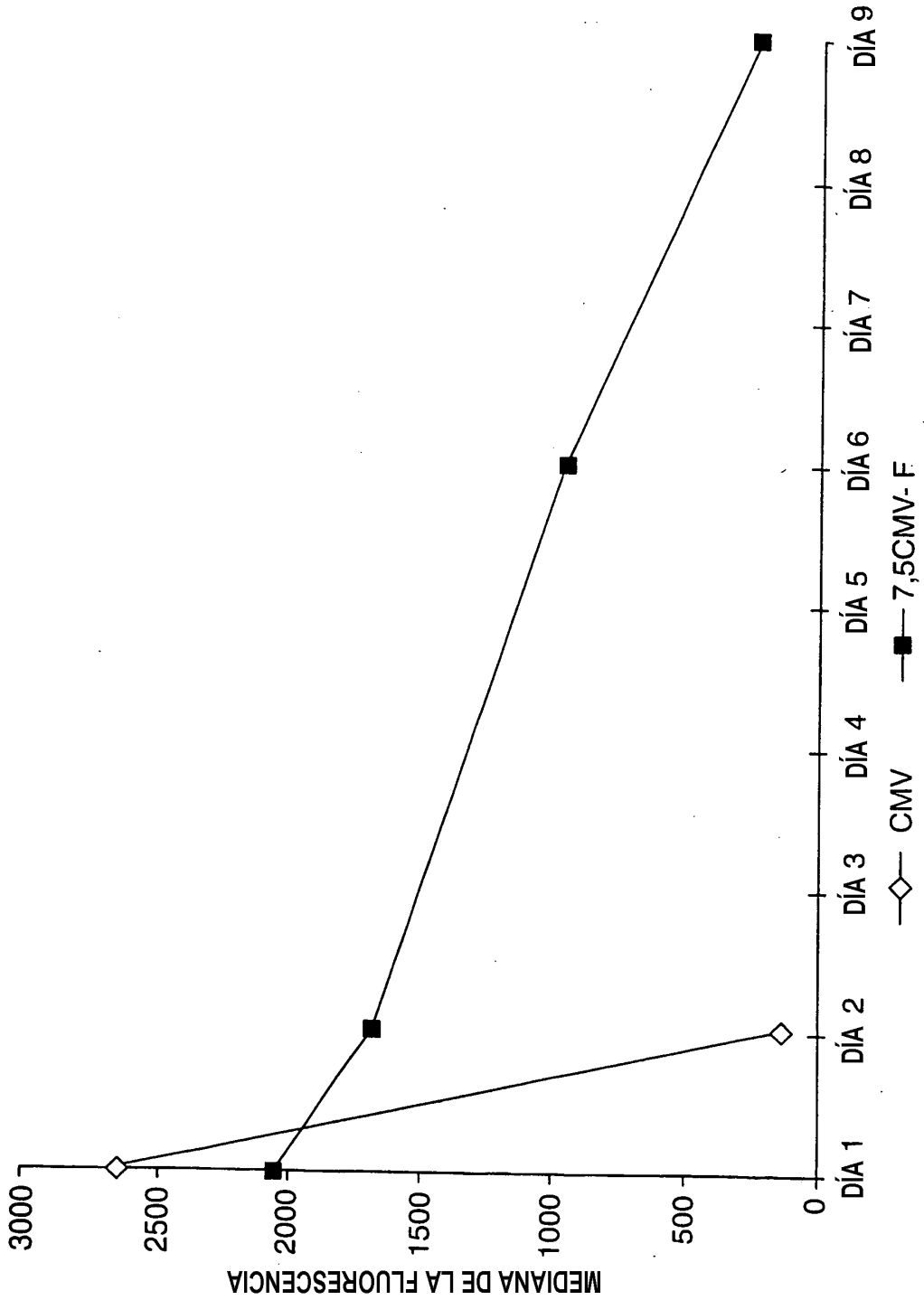
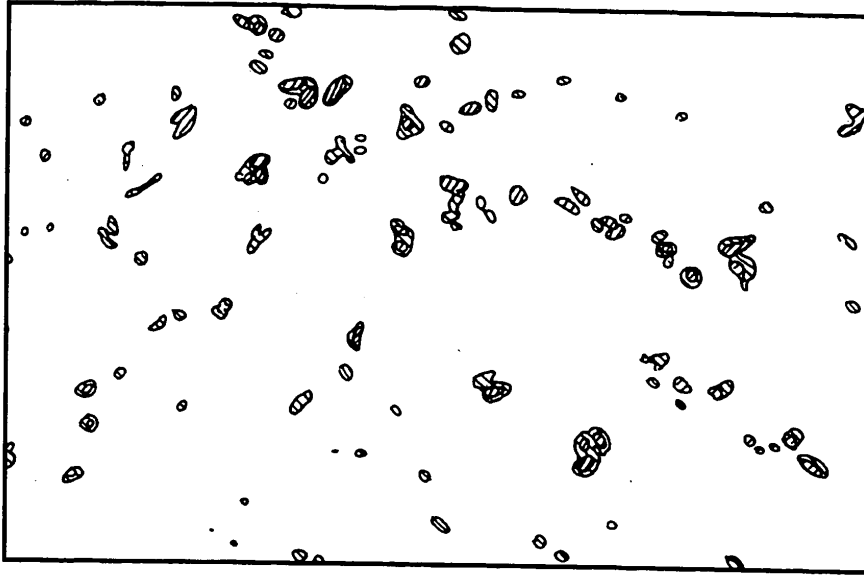
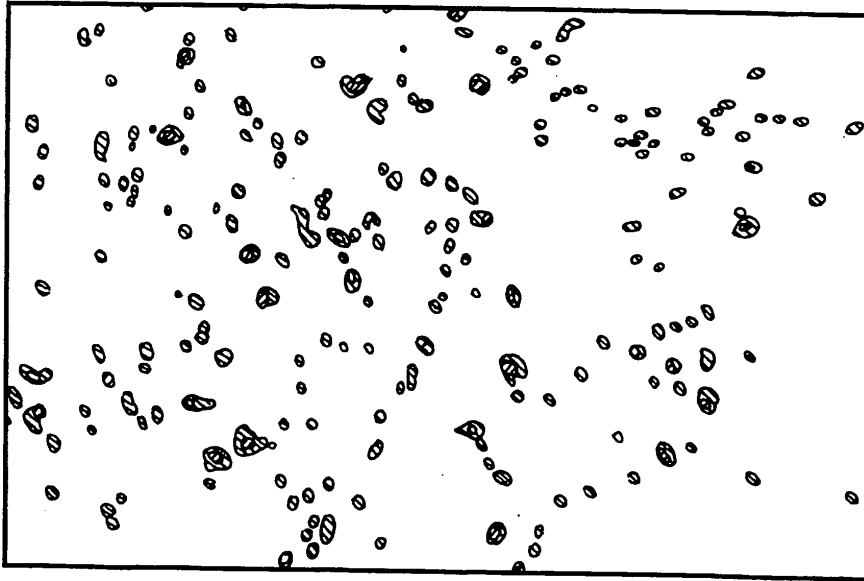


FIG. 52(B)



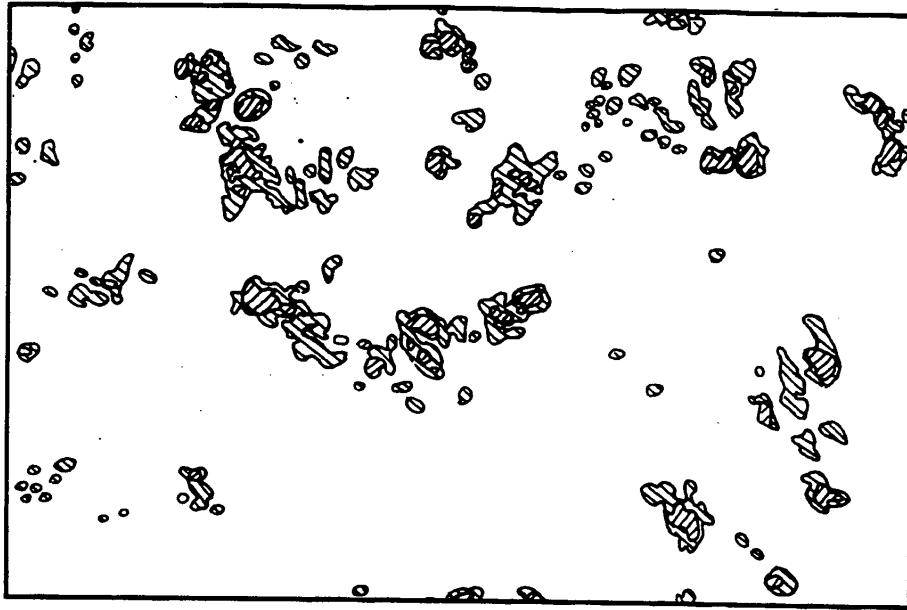
7,5 CMV 24 hrs p-t

FIG. 52(A)



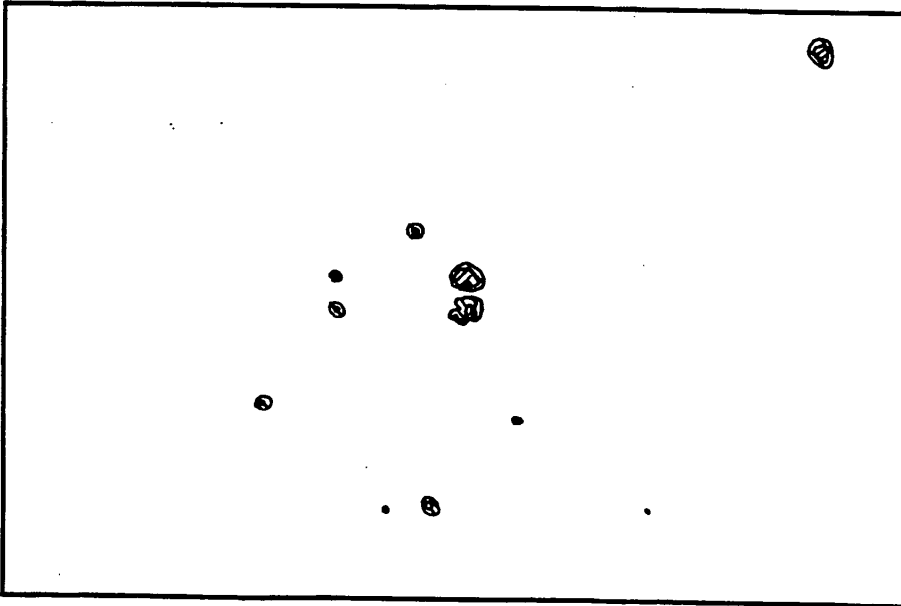
CMV-EGFP 24 hrs p-t

FIG. 52(D)



7,5 CMV 6 días p-t

FIG. 52(C)



CMV-EGFP 6 días p-t