(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 377 765**

(51) Int. CI.:
C12N 15/85 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **08773642 .7**
(96) Fecha de presentación: **25.06.2008**
(97) Número de publicación de la solicitud: **2164972**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **24.03.2010**

(54) Título: **Promotor**

(30) Prioridad:
29.06.2007 EP 07012772

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.03.2012

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.03.2012

(73) Titular/es:
F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
124 GRENZACHERSTRASSE
4070 BASEL, CH

(72) Inventor/es:
KLEIN, Christian y
KOPETZKI, Erhard

(74) Agente/Representante:
Isern Jara, Jorge

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

DESCRIPCIÓN

Promotor

La presente invención se refiere al sector de la expresión de proteínas y la selección de células. Se da a conocer un promotor con baja potencia promotora y, por lo tanto, con una expresión limitada de un ácido nucleico que codifica, enlazado operativamente.

Antecedentes de la Invención

La expresión de proteínas es un proceso fundamental en las células vivas. Toda la información requerida para la expresión de proteínas es facilitada por un único ácido nucleico. Este ácido nucleico no sólo contiene la información de la secuencia de aminoácidos de la proteína, sino que también proporciona la información de regulación requerida (por ejemplo, el sitio de unión ribosómico, las señales de inicio y final para la transcripción, señales de corte y empalme, elementos amplificadores, etc.), incluyendo un promotor / secuencia de promotor.

Un promotor es un ácido nucleico que regula la magnitud de la transcripción de un ácido nucleico, por ejemplo, codificando un polipéptido, al que está enlazado operativamente, en un pre-mARN. Es un elemento de control de la transcripción, que está situado alrededor del sitio de inicio de ARN polimerasa en el extremo 5' de una secuencia que codifica enlazada operativamente. Del análisis del promotor temprano SV40 se conoce que lugares de conocimiento / unión para activadores de transcripción están contenidos en promotores en segmentos que consisten en 7-20 pares de bases. Un segmento es el sitio de inicio para la síntesis de ARN, por ejemplo, la bien conocida secuencia TATA. Otros segmentos, situados aproximadamente a 30-110 pares de bases de 5', es decir, más arriba con respecto al sitio de inicio para la síntesis de ARN, definen la frecuencia de inicio de transcripción. Un promotor requiere, como mínimo, un segmento que inicia la síntesis de ARN en un sitio específico y en una dirección definida, es decir, en dirección 5 'a 3'.

Los promotores más conocidos son lac-lpp, ara-, lac-, tac-, trc-, trp-, phoA-, P_{BAD}-, λ_{PL}-, lpp y el promotor T7. El promotor SV40 es una secuencia de ácido nucleico derivada del genoma de Simio (vacuolante) Virus 40. Para la producción recombinante de un polipéptido heterólogo en una célula eucariota o procariota se introducen normalmente uno o más plásmidos de expresión en la célula. El plásmido o plásmidos de expresión comprende un casete de expresión para la expresión de un polipéptido heterólogo y asimismo un casete de expresión para la expresión de un marcador seleccionable, que es necesario para la selección de células transfectadas que expresan el polipéptido heterólogo. La síntesis del polipéptido heterólogo y del marcador seleccionable requiere una fracción de la maquinaria de expresión de la célula.

Dado que el objetivo es producir predominantemente el polipéptido heterólogo, la mayor parte de la capacidad disponible de la maquinaria de expresión de la célula debe ser asignada a la expresión del ácido nucleico que codifica el polipéptido heterólogo. Sólo una cantidad reducida debe ser utilizada para la expresión del marcador seleccionable. Esta asignación de capacidad de expresión es llevada a cabo con intermedio de la potencia de los promotores correspondientes. Cuanto más potente es un promotor, mayor es la cantidad del ácido nucleico enlazado operativamente que se transcribe y, por lo tanto, se traduce. Por lo tanto, existe la necesidad de promotores con potencia de promotor ajustable o reducible.

Taylor, W.E., y otros (Endocrinol. 137 (1996) 5407-5414) han dado a conocer variantes de deleción de promotor de factor de célula madre humana. En la solicitud de patente US 2007/0092968 se dan a conocer un nuevo promotor hTMC y vectores para la expresión selectiva de tumores y de alta eficacia de expresión de genes terapéuticos del cáncer. Fromm y otros (J. Mol. Appl. Gen. 1 (1982) 457-481 y ibid 2 (1983) 127-135) han dado a conocer mapeado de deleción y mutantes de deleción de promotor SV-40 de la región inicial. Se han dado a conocer fragmentos de quitinasa de unión a quitina en el documento US 6.399.571. El documento WO 99/62927 da a conocer factor 4 de crecimiento de tejidos conectivos.

Resumen de la Invención

El primer aspecto de la presente invención es un promotor que tiene, es decir, consiste en una secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 04.

Otro aspecto de la presente invención es un método para la selección de una célula que comprende las etapas siguientes en este orden:

a) transfectar una célula eucariota con un ácido nucleico que comprende
   i) un primer casete de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido heterólogo,
   ii) un segundo casete de expresión que comprende el promotor que consiste en SEQ ID NO: 04 y un segundo ácido nucleico que codifica el marcador seleccionable, de manera que el primer ácido nucleico está enlazado operativamente al segundo ácido nucleico,

b) cultivar dicha célula transfectada en condiciones adecuadas de crecimiento de la célula eucariota no transfectada,

c) seleccionar una célula que se propaga en la etapa b) y asimismo
i) propagar en condiciones selectivas de cultivo, o
ii) expresar el marcador seleccionable.

En una realización de este aspecto de la invención, la célula eucariota es una célula de mamífero. En una realización preferente, la célula de mamífero es una célula CHO, célula BHK o célula PER.C6®, o célula HEK, o célula Sp2/0. En otra realización, el polipéptido heterólogo es una inmunoglobulina, o un fragmento de inmunoglobulina, o un conjugado de inmunoglobulina. En una realización, el marcador seleccionable es una neomicin-aminoglucósido fosfotransferasa, o una higromicin-fosfotransferasa, o dLNGFR, o GFP.

Un aspecto de la presente invención es un método para la expresión de un polipéptido heterólogo que comprende las siguientes etapas siguiendo este orden:

a) transfectar una célula de mamífero con un ácido nucleico comprendiendo un casete de expresión que comprende promotor que consiste en SEQ ID NO: 04 enlazado operativamente a un segundo ácido nucleico que codifica un polipéptido heterólogo,

b) seleccionar una célula transfectada en la etapa a),

c) cultivar la célula seleccionada en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido heterólogo,

d) recuperar el polipéptido heterólogo de la célula o del medio de cultivo.

En una realización de este aspecto de la presente invención, la célula de mamífero es una célula CHO, una célula BHK, o una célula PER.C6®, o célula HEK, o célula Sp2/0. En otra realización, el segundo ácido nucleico codifica una inmunoglobulina, o un fragmento de una inmunoglobulina, o un conjugado de inmunoglobulina. En otra realización adicional, el ácido nucleico comprende un casete de expresión que codifica un marcador seleccionable.

Descripción detallada de la invención

La presente invención da a conocer un nuevo ácido nucleico promotor con una secuencia de nucleótido SEC ID NO: 04.

Se conocen, por los técnicos en la materia, métodos y técnicas útiles para llevar a cabo la presente invención y se describen, por ejemplo, en Ausubel, F.M., ed., Current Protocols in Molecular Biology, Volúmenes I a III (1997), y Sambrook, y otros., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989). Tal como es conocido por los técnicos en la materia, posibilita la utilización de tecnología de ADN recombinante la producción de numerosos derivados de un ácido nucleico y/o polipéptido. Dichos derivados pueden ser modificados, por ejemplo, en una o varias posiciones por sustitución, alteración, intercambio, deleción o inserción. La modificación o derivatización pueden ser llevadas a cabo, por ejemplo, por medio de mutagénesis dirigida al sitio. Estas modificaciones pueden ser fácilmente llevadas a cabo por un técnico en la materia (ver, por ejemplo Sambrook, J., y otros, Molecular Cloning: A laboratory manual (1999) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA). La utilización de tecnología recombinante posibilita a un técnico en la materia para transformar varias células huésped con ácido o ácidos nucleicos heterólogos.

Un "promotor" se refiere a un ácido nucleico, es decir, una secuencia de polinucleótidos, que controla la transcripción de un ácido nucleico al que está enlazado operativamente. Un promotor puede incluir señales para unión de ARN polimerasa e iniciación de transcripción. El promotor o promotores utilizados podrán funcionar en el tipo de célula de la célula huésped en la que se prevé la expresión del ácido nucleico enlazado operativamente. Un gran número de promotores incluyendo promotores constitutivos, inducibles y represibles procedentes de una serie de fuentes diferentes son bien conocidos en la técnica (e identificados en bases de datos tales como GenBank). Se encuentran a disposición polinucleótidos clonados o dentro de los mismos (por ejemplo, a partir de depósitos tales como ATCC, y otras fuentes comerciales o individuales). Un "promotor" comprende una secuencia de nucleótidos que dirige la transcripción de, por ejemplo, un gen estructural enlazado operativamente. De manera típica, un promotor está situado en la región 5' no codificante o 5' no traducida (5'UTR) de un gen, en posición proximal al sitio de inicio transcripcional de un gen estructural. Los elementos de la secuencia dentro de los promotores que funcionan en la iniciación de transcripción se caracterizan frecuentemente por secuencias de nucleótidos de consenso. Estos elementos de secuencia incluyen lugares de unión polimerasa ARN, secuencias TATA, secuencias CAAT, elementos específicos de diferenciación (DSE; McGehee, R.E., y otros, Mol Endocrinol. 7 (1993) 551), elementos de respuesta AMP cíclica (CRE), elementos de respuesta de suero (SRE; Treisman, R., Seminars in Cancer Biol. 1 (1990) 47), elementos de respuesta glucocorticoide (GRE) y sitios de unión para otros factores de transcripción, tales como CRE/ATF (O'Reilly, M.A., y otros, J. Biol. Chem. 267 (1992) 19938), AP2 (Ye, J., y otros, J. Biol. Chem. 269 (1994) 25728), SP1, proteína de unión a elemento de respuesta cAMP (CREB; Loeken, M.R., Gene Expr. 3 (1993) 253-264) y factores de octámeros (ver, en general, Watson y otros, eds., Molecular Biology of the Gene, 4ª

edición, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 1987, y Lemaigre, F.P. y Rousseau, G.G., Biochem. J. 303 (1994). Si un promotor es un promotor inducible, entonces la tasa de transcripción incrementa como respuesta a un agente inductor. En contraste, la tasa de transcripción no está regulada por un agente inductor si el promotor es un promotor constitutivo. También se conocen promotores represibles. Por ejemplo, el promotor de c-fos se activa específicamente cuando tiene lugar la unión de la hormona del crecimiento a su receptor en la superficie de la célula. Se puede conseguir expresión regulada por tetraciclina (tet) por promotores artificiales híbridos que consisten, por ejemplo, en un promotor de CMV seguido por dos sitios Tet-operador. El Tet-represor se une a los dos sitios Tet-operador y bloquea la transcripción. Cuando tiene lugar la adición de la tetraciclina inductora, el Tet-represor se libera de los sitios Tet-operador y tiene lugar la transcripción (Gossen, M. y Bujard, H., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 5547-5551). Para otros promotores inducibles incluyendo metalotioneína y promotores de choque térmico, ver, por ejemplo, Sambrook, y otros (más arriba), y Gossen, M., y otros, Curr. Opin. Biotech. 5 (1994) 516-520. Entre los promotores eucarióticos que han sido identificados como promotores potentes para expresión de alto nivel se encuentra el promotor temprano SV40, promotor posterior principal de adenovirus, promotor de metalotioneína I de ratón, repetición del terminal largo del virus de sarcoma de Rous, factor 1 alfa de (CHEF-1, ver, por ejemplo, US 5.888.809) elongación de hámster chino, EF-1 alfa humano, ubiquitina y promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano (CMV IE). Un potenciador (es decir, un elemento ADN con acción cis que actúa sobre un promotor para incrementar la transcripción) puede ser necesario para accionar conjuntamente con el promotor para incrementar el nivel de expresión obtenido con un promotor solo, y puede ser incluido como un elemento regulador transcripcional. Frecuentemente, el segmento de polinucleótido que contiene el promotor incluirá también secuencias de potenciador (por ejemplo, CMV ó SV40).

El término "ácido nucleico" utilizado en esta descripción es un polímero que consiste en nucleótidos individuales, es decir, un polinucleótido. Se refiere a un ácido nucleico natural o parcial o totalmente no natural, que, por ejemplo, está codificando un polipéptido que puede ser producida de forma recombinante. El ácido nucleico puede ser constituido a base de fragmentos de ADN que son o bien aislados o sintetizados por medios químicos. El ácido nucleico puede ser integrado en otro ácido nucleico, por ejemplo, en un plásmido de expresión o el genoma/cromosoma de una célula huésped. El plásmido comprende vectores de transferencia (“shuttle”) y de expresión. De manera típica, el plásmido comprenderá también una unidad de propagación procariótica que comprende un origen de replicación (por ejemplo, el origen de replicación CoIE1) y un marcador seleccionable (por ejemplo, gen de resistencia a ampicilina o tetraciclina) para la replicación y selección, respectivamente, del vector en bacterias.

El término "potencia del promotor" (“promoter strength”) y equivalentes gramaticales del mismo utilizados en la presente invención indica la eficacia de un promotor en la transcripción de un ácido nucleico enlazado operativamente. La potencia de promotor de un promotor determinado puede ser elevada, es decir, de un 90% a más de 100%, o media, es decir, puede ser de 40% a menos del 90%, o baja, es decir, puede ser de hasta menos de 40%, si se compara con la potencia del promotor del promotor SV40 de tipo natural de la SEC ID NO: 05. Este valor puede ser determinado por comparación de la magnitud de expresión de un polipéptido heterólogo enlazado operativamente al promotor en cuestión con la magnitud de expresión del polipéptido heterólogo enlazado operativamente al promotor SV40 de tipo natural en el mismo tipo de célula. Esto puede ser realizado, por ejemplo, determinando la magnitud de expresión del polipéptido heterólogo en una célula CHO ó HEK transfectada con un casete de expresión que consiste en el promotor en cuestión enlazado operativamente a un ácido nucleico que codifica el polipéptido heterólogo por un ensayo ELISA. Por comparación de esta magnitud a la magnitud de expresión del mismo polipéptido heterólogo en la misma línea celular transfectada con un casete de expresión que consiste en el promotor SV40 de tipo natural enlazado operativamente a un ácido nucleico que codifica el polipéptido heterólogo determinado con el mismo ensayo ELISA, es decir, comparando la magnitud de polipéptido heterólogo en la misma célula con el mismo plásmido de expresión en el que sólo se ha cambiado el promotor, la potencia relativa del promotor puede ser determinada. El término "promotor SV40 de tipo natural" que se utiliza en esta solicitud de patente indica un ácido nucleico de SEC ID NO: 05.

"Enlazado operativamente" se refiere a una yuxtaposición de dos o más componentes, en la que los componentes descritos se encuentran en una relación que les permite funcionar en su forma prevista. Por ejemplo, un promotor y/o potenciador están enlazados operativamente a una secuencia de codificación, si actúa en cis para controlar o modular la transcripción de la secuencia de codificación enlazada. De modo general, aunque no necesariamente, las secuencias de ADN que están "enlazadas operativamente" son contiguas y, en caso que sea necesario unir dos regiones de codificación de proteínas, tales como una secuencia de secreción conductora/señal y un polipéptido, contiguas y en marco de lectura. Sin embargo, si bien un promotor enlazado operativamente está situado en general en la línea de entrada de la secuencia de codificación, no se encuentra necesariamente contigua a la misma. Los potenciadores no tienen porque ser contiguos. Un potenciador está enlazado operativamente a una secuencia de codificación si el potenciador aumenta la transcripción de la secuencia de codificación. Los potenciadores enlazados operativamente puede estar situados en la línea de entrada, dentro, o en la línea de salida de secuencias de codificación, y a una cierta distancia del promotor. Un sitio de poliadenilación está enlazado operativamente a una secuencia de codificación si está situado en el extremo de la línea de salida de la secuencia de codificación de manera tal que la transcripción tiene lugar a través de la secuencia de codificación hacia dentro de la secuencia de poliadenilación. El enlace se consigue por métodos recombinantes conocidos en la técnica, por ejemplo, utilizando la metodología PCR y/o por ligación en los sitios de restricción convenientes. Si no existen sitios de restricción

convenientes, entonces se utilizan adaptadores oligonucleótidos sintéticos o enlazadores de acuerdo con la práctica convencional.

Dentro del ámbito de la presente invención, se pueden obtener células transfectadas sustancialmente con cualquier tipo de método de transfección conocido en la técnica. Por ejemplo, el ácido nucleico puede ser introducido en células por medio de electroporación o microinyección. De manera alternativa, se pueden utilizar reactivos de lipofeción tales como FuGENE 6 (Roche Diagnostics GmbH, Alemania), X-tremeGENE (Roche Diagnostics GmbH, Alemania) y LipofectAmine (Invitrogen Corp., USA). También de forma alternativa, el ácido nucleico puede ser introducido en la célula por sistemas de vector vírico adecuados basados en retrovirus, lentivirus, adenovirus o virus adeno-asociados (Singer, O., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 (2004) 5313-5314).

El término "célula" o "célula huésped" se refiere a una célula en la que un ácido nucleico, por ejemplo, que codifica un polipéptido heterólogo o que constituye un shARN, puede ser o es introducido/transfectado. Las células huésped incluyen tanto células procarióticas, que son utilizadas para propagación de vectores/plásmidos, como células eucariotas, que son utilizadas para la expresión del ácido nucleico. En una realización, las células eucariotas son células de mamífero. En otra realización, la célula huésped de mamífero se selecciona de entre células de mamífero que comprenden células CHO (por ejemplo, CHO K1 ó CHO DG44), células BHK, células NSO, células SP2/0, células HEK 293, células HEK 293 EBNA, células PER.C6 y células COS. En otra realización, la célula de mamífero se selecciona de entre el grupo que comprende hibridoma, mieloma y células de roedores. Las células de mieloma comprenden células de mieloma de rata (por ejemplo, YB2) y células de mieloma de ratón (por ejemplo, NSO, SP2/0). Los polipéptidos para utilización en aplicaciones farmacéuticas son producidos en una realización en células de mamíferos tales como células CHO, células NSO, células SP2/0, células COS, células HEK, células BHK, células PER.C6®, o similares. Para la fermentación de la célula huésped y, por lo tanto, para la expresión del polipéptido de interés se utiliza un medio de cultivo. En la actualidad, las células CHO son utilizadas ampliamente para la expresión de polipéptidos farmacéuticos, ya sea a pequeña escala en el laboratorio o a gran escala en procesos de producción. Debido a su amplia distribución y utilización, las propiedades características y los antecedentes genéticos de las células CHO son bien conocidos. Por lo tanto, las células CHO están aprobadas por las autoridades reguladoras para la producción de proteínas terapéuticas para aplicación a seres humanos. En una realización, la célula de mamífero es una célula CHO.

Un "casete de expresión" se refiere a un ácido nucleico que contiene los elementos necesarios para la expresión y secreción de, como mínimo, el gen estructural contenido en una célula huésped. Un ácido nucleico se caracteriza igualmente por su secuencia que consiste en nucleótidos individuales o por la secuencia de aminoácidos codificada por la molécula de ácido nucleico.

Un "gen" indica un ácido nucleico que es un segmento, por ejemplo, en un cromosoma o en un plásmido que puede efectuar la expresión de un péptido, polipéptido o proteína. Además de la región de codificación, es decir, el gen estructural, un gen comprende otros elementos funcionales, por ejemplo, secuencia de señal, promotor o promotores, intrones y/o terminadores.

Un "gen estructural" indica la región de un gen sin una secuencia de señal, es decir, la región de codificación.

El término "expresión" utilizado en esta descripción se refiere a la transcripción y/o traducción que tiene lugar dentro de una célula. El nivel de transcripción de un producto deseado en una célula huésped se puede determinar en base a la cantidad de mARN correspondiente en la célula. Por ejemplo, el mARN transcrito de un ácido nucleico seleccionado se puede cuantificar por PCR o por hibridación Northern (ver Sambrook, y otros, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)). La proteína codificada por un ácido nucleico seleccionado se puede cuantificar por diferentes métodos, por ejemplo, mediante ELISA, ensayando la actividad biológica de la proteína, o mediante el empleo de ensayos que son independientes de dicha actividad, tales como transferencia Western o radioinmunoensayo, utilizando anticuerpos que reconocen la proteína y se unen a la misma (ver cita anterior Sambrook, y otros 1989).

"Elementos reguladores" tal como se indica en esta descripción, se refieren a secuencias de nucleótidos presentes en cis, necesarias para la transcripción y/o traducción de la secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés. Los elementos reguladores transcripcionales normalmente comprenden un promotor en la línea de entrada de la secuencia de ácido nucleico a expresar, iniciación transcripcional y sitios de terminación, así como una secuencia de señal de poliadenilación. El término "sitio de iniciación transcripcional" se refiere al nucleótido del ácido nucleico correspondiente al primer nucleótido incorporado en el transcrito primario, es decir, el precursor de mARN; el sitio de iniciación transcripcional puede solaparse con la secuencia del promotor. El término "sitio de terminación transcripcional" se refiere a una secuencia de nucleótido representada normalmente en el extremo 3' de un gen de interés a transcribir, que provoca que la ARN polimerasa termine la transcripción. La secuencia de señal de poliadenilación, o señal de adición poli-A proporciona la señal para el fraccionamiento en un sitio específico en el extremo 3' del mARN eucariótico y la adición post-transcripcional en el núcleo de una secuencia de aproximadamente 100-200 nucleótidos de adenina (cola poli-A) hasta el extremo fraccionado 3'. La secuencia de señal de poliadenilación puede incluir la secuencia de consenso AATAAA situada en aproximadamente 10-30 nucleótidos más arriba del sitio de fraccionamiento.

Un "polipéptido" es un polímero de residuos de aminoácidos unidos por enlaces de peptídicos, producidos de forma natural o sintética. Los polipéptidos de menos de aproximadamente 20 residuos de aminoácidos puede ser designados como "péptidos". Los polipéptidos que comprenden dos o más cadenas de aminoácidos o que comprende una cadena de aminoácidos de una longitud de 100 aminoácidos o más se pueden indicar como "proteínas". Un polipéptido o proteína puede también comprender componentes no peptídicos, tales como grupos carbohidratos o iones de metales. Se pueden añadir carbohidratos y otros sustituyentes no peptídicos a una proteína por la célula en la que ha producido la proteína, y puede variar con el tipo de célula. Las proteínas y polipéptidos se definen en esta descripción en términos de su estructura de esqueleto de aminoácidos; no se especifican en general adiciones tales como grupos carbohidratos, pero, no obstante, pueden encontrarse presentes.

Los términos "ADN heterólogo" o “polipéptido heterólogo" se refiere a una molécula de ADN o un polipéptido, o una población de moléculas de ADN o una población de polipéptidos, que no existen de forma natural dentro de una célula huésped determinada. Las moléculas de ADN heterólogas para una célula huésped particular pueden contener ADN derivado de especies de células huésped (es decir, ADN endógeno), siempre que dicho ADN derivado de la célula huésped se combina con ADN derivado de células no huésped (es decir, ADN exógeno). Por ejemplo, una molécula de ADN que contiene un segmento de ADN no huésped que codifica un polipéptido enlazado operativamente a un segmento de ADN huésped comprende un gen estructural endógeno enlazado operativamente con un promotor exógeno. Un péptido o polipéptido codificado por una molécula de ADN no huésped es un péptido o polipéptido "heterólogo".

El término "marcador seleccionable" indica un ácido nucleico que permite que las células que llevan este ácido nucleico sean seleccionadas específicamente para la presencia de un correspondiente "agente de selección", o contra el mismo. Un marcador seleccionable positivo útil es, por ejemplo, un gen de resistencia a antibióticos. El marcador seleccionable permite que una célula que se debe transforma con el mismo sea seleccionada en presencia del agente de selección correspondiente; una célula no transformada no es capaz de crecer o sobrevivir en condiciones de cultivo selectivas, es decir, en presencia del agente de selección. Los marcadores seleccionables pueden ser positivos, negativos o bifuncionales. Los marcadores seleccionables positivos permiten la selección de células que llevan el marcador, mientras que los marcadores seleccionables negativos permiten que las células que llevan el marcador sean selectivamente eliminadas. De manera típica, un marcador seleccionable conferirá resistencia a un medicamento o compensará un defecto metabólico o catabólico en la célula. Se incluyen entre los marcadores seleccionables útiles con células eucariotas, por ejemplo, los genes para aminoglucósido fosfotransferasa (APH), tales como la higromicina-fosfotransferasa (HYG), neomicina y G418 APH, dihidrofolato reductasa (DHFR), timidina quinasa (TK), glutamina sintetasa (GS), asparagina sintetasa, triptofano sintetasa (agente de selección indol), histidinol dehidrogenasa (agente de selección histidinol D) y genes que proporcionan resistencia a puromicina, bleomicina, fleomicina, cloranfenicol, Zeocin y ácido micofenólico. Otros marcadores seleccionables se indican en los documentos WO 92/08796 y WO 94/28143.

El término "maquinaria de expresión" utilizado en la presente invención indica la suma de las enzimas, cofactores, etc. de una célula que están involucradas en el proceso que empieza con la transcripción de un ácido nucleico o un gen (es decir, llamada también "maquinaria de expresión de gen") a la modificación post-traslacional del polipéptido codificado por el ácido nucleico. La "maquinaria de expresión" comprende, por ejemplo, las etapas de transcripción de ADN en pre-mARN, corte y pegado de pre-mARN para madurar mARN, traducción del mARN en un polipéptido, y modificación post-traslacional del polipéptido.

El término "bajo condiciones apropiadas para la expresión de un polipéptido heterólogo" indica condiciones que son utilizadas para el cultivo de una célula de mamífero que expresa un polipéptido heterólogo y que son conocidas o se pueden determinar fácilmente por un técnico en la materia. También es conocido por los técnicos en la materia que estas condiciones pueden variar dependiendo del tipo de célula de mamífero cultivada y el tipo de proteína expresada. En general, la célula de mamífero se cultiva a una temperatura, por ejemplo, entre 20ºC y 40ºC, y durante un período de tiempo es suficiente para permitir la producción de proteínas efectiva, por ejemplo, de 4 a 28 días, en un volumen de desde 0,1 litros a 10^7 litros.

El término "bajo condiciones apropiadas para el crecimiento de la célula no transfectada" indica condiciones que son utilizadas generalmente para el cultivo de una célula no transfectada de la misma línea celular. Estas condiciones son conocidas o se pueden determinar fácilmente por los técnicos en la materia.

El término "recuperación del polipéptido heterólogo" que se utiliza en la presente solicitud, indica precipitación, separación por formación de sales, ultrafiltración, diafiltración, liofilización, reducción del volumen de disolvente para obtener una solución concentrada o cromatografía. En general, se utilizan procesos cromatográficos para la separación y purificación de polipéptidos. Diferentes métodos están bien establecidos y son ampliamente utilizados para la recuperación y purificación de proteínas, tales como cromatografía de afinidad con las proteínas microbianas (por ejemplo, cromatografía de afinidad proteína A o proteína G), cromatografía de intercambio iónico (es decir, intercambio catiónico (resinas de carboximetilo), intercambio aniónico (resinas de aminoetilo) e intercambio en modalidad mixta, adsorción tiofílica (por ejemplo, con beta-mercaptoetanol y otros ligandos SH), interacción hidrofóbica o cromatografía de adsorción aromática (por ejemplo, con fenil-sefarosa, resinas aza-arenofílicas o ácido

m-aminofenilborónico), cromatografía de afinidad con quelato metálico (por ejemplo, con material con afinidad para Ni(II) y Cu(II)), cromatografía de exclusión dimensional y métodos electroforéticos (tales como electroforesis de gel, electroforesis capilar) (Vijayalakshmi, M.A., Appl. Biochem. Biotech. 75 (1998) 93-102).

El término “inmunoglobulina” se refiere a una proteína que consiste en uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por genes de inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los diferentes genes de región constante y también los múltiples genes de región variable de inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas pueden existir en una serie de formatos, incluyendo, por ejemplo Fv, Fab, y F(ab)2, así como cadenas únicas (scFv) o diacuerpos (por ejemplo, Huston, J.S., y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988) 5879-5883; Bird, R.E., y otros, Science 242 (1988) 423-426; en general, Hood, y otros, Immunology, Benjamin N.Y., 2nda edición (1984); y Hunkapiller, T. y Hood, L., Nature 323 (1986) 15-16).

Una inmunoglobulina comprende, en general, dos llamados polipéptidos de cadena ligera (cadena corta) y dos polipéptidos llamados, de cadena pesada (cadena larga). Cada uno de los polipéptidos de cadena pesada y de cadena ligera contiene una región constante (en general, la parte terminal carboxilo). La región constante de la cadena pesada intermedia la unión del anticuerpo i) a células que llevan un receptor gamma Fc (FcγR), tal como células fagocíticas, o ii) a células que llevan el receptor neonatal Fc (FcRn), conocido también como receptor de Brambell. También intermedia la unión a algunos factores que incluyen factores del sistema de complemento clásico, tal como el componente (C1q). El dominio variable de una cadena ligera o pesada de una inmunoglobulina comprende, a su vez, diferentes segmentos, es decir, cuatro regiones de armazón (FR) y tres regiones hipervariables (CDR).

Un “fragmento de inmunoglobulina” indica un polipéptido que comprende, como mínimo, un dominio del grupo de dominios que comprende el dominio variable, el dominio C_H1, la región charnela, el dominio C_H2, el dominio C_H3, el dominio C_H4 de una cadena pesada de una inmunoglobulina, o el dominio variable o el dominio C_L, de una cadena ligera de una inmunoglobulina. También están comprendidos derivados y variantes de los mismos. De manera adicional se puede encontrar presente un dominio variable en el que se ha delecionado uno o más aminoácidos o regiones de aminoácidos.

Un “conjugado de inmunoglobulina” indica un polipéptido que comprende, por lo menos, un dominio de una inmunoglobulina pesada o ligera, conjugada con intermedio de un enlace péptido a otro polipéptido. Los otros polipéptidos son un péptido no inmunoglobulina, tal como una hormona, receptor de crecimiento, péptido antifusogénico, o similar.

La presente invención da a conocer un promotor con una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4.

Un método para la identificación de un clon de célula potencial altamente productor es el enlace de la expresión de un gen marcador seleccionable y un gen estructural que dosifica un polipéptido heterólogo, con intermedio de un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES). Con este diseño, la expresión del polipéptido heterólogo se puede correlacionar con la expresión del marcador seleccionable. Otro método es la amplificación del gen. En él, células deficientes de la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR) son transfectadas con un vector/plásmido que contiene un primer casete de expresión para la expresión de la proteína DHFR y un segundo casete de expresión para la expresión de un polipéptido heterólogo. Utilizando el medio de cultivo con agotamiento de glicina, hipoxantina y timidina se establecen condiciones de cultivo selectivas. Para la amplificación, se añade un inhibidor DHFR, metotrexato (MTX) (Kaufman, R.J., y otros, J Mol. Biol. 159 (1982) 601-621; US 4.656.134). De manera general, se puede utilizar cualquier tipo de gen, cuyo producto de expresión está localizado/puede ser detectado en la superficie de la célula como marcador para el enriquecimiento y selección de transfectantes. dLNGFR, una forma truncada del receptor de factor de crecimiento nervioso, de baja afinidad y, por lo tanto, inactivo para la transducción de señal, que es expresado en la superficie de la célula y que ha demostrado ser un marcador muy útil para análisis biológico de células (Philipps, K., y otros, Nat. Med. 2 (1996) 1154-1156 y Machl, A.W., y otros, Cytometry 29 (1997) 371-374).

A efectos de no reducir innecesariamente la producción de un polipéptido heterólogo de interés, la expresión del marcador seleccionable, que es requerido para la selección de células produciendo el polipéptido heterólogo, es decir, de la transfección satisfactoria de células, debe ser lo más baja posible, pero no obstante, todavía detectable.

Actualmente, se ha descubierto de manera sorprendente que esta necesidad puede ser satisfecha con un promotor, de acuerdo con la invención. Al utilizar un promotor, de acuerdo con la presente invención, se pueden seleccionar células que expresan un polipéptido heterólogo a un nivel más elevado, en comparación con células seleccionadas en las mismas condiciones y que no utilizan un promotor de acuerdo con la presente invención. Se ha descubierto de manera sorprendente que con un promotor, según la presente invención, se puede aislar una célula que expresa un polipéptido heterólogo, con un dispendio reducido. Adicionalmente, se ha descubierto que utilizando un promotor, de acuerdo con la presente invención, se pueden seleccionar células que expresan un polipéptido heterólogo a un nivel superior, en comparación con células seleccionadas utilizando un promotor SV40 de longitud completa en las mismas condiciones y concentraciones que los agentes de selección.

El término “promotor SV40 acortado en 5’ ” que se utiliza en la presente solicitud de patente, indica un promotor SV40 de tipo natural, en el que se ha delecionado un número definido de nucleótidos consecutivos en el extremo 5’ de la secuencia de ácido nucleico.

SEQ ID NO: 02 comprende nucleótidos 61 a 348 del promotor SV40 de tipo natural de SEQ ID NO: 05, es decir, los nucleótidos 1 a 60 han sido delecionados. La preparación del promotor con SEQ ID NO: 02 se muestra en el ejemplo 1.

SEQ ID NO: 03 corresponde a los nucleótidos 130 a 348 del promotor SV 40 de tipo natural de SEQ ID NO: 05, es decir, se han delecionado los nucleótidos 1 a 129. La preparación del promotor con SEQ ID NO: 03 se muestra en el ejemplo 2.

La presente invención da a conocer finalmente un promotor que consiste o que comprende la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 04. SEQ ID NO: 04 consiste en los nucleótidos 177 a 348 del promotor SV40 de tipo natural de SEQ ID NO: 05, es decir, los nucleótidos 1 a 176 han sido delecionados. La preparación del promotor con SEQ ID NO: 04 se muestra en el ejemplo 3.

SEQ ID NO: 06 comprende los nucleótidos 203 a 348 del promotor SV40 de tipo natural de SEQ ID NO: 05, es decir, los nucleótidos 1 a 202 han sido delecionados.

Para determinar la potencia del promotor de los promotores con una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 02 a 04 y 06, se han generado plásmidos de expresión en los que cada uno de los diferentes promotores está enlazado operativamente a un ácido nucleico que codifica GFP (proteína fluorescente verde, SEQ ID NO: 07). Tal como se puede apreciar de la figura 7 a) a c), la deleción en 5’ de nucleótidos en el ácido nucleico del promotor SV40 de tipo natural reduce la potencia del promotor. El promotor de SEQ ID NO: 02 tiene aproximadamente la misma potencia que el promotor SV40 de tipo natural de longitud completa. Los promotores de SEQ ID NO: 03 y 04 tienen potencia de promotor de aproximadamente 56% y aproximadamente 19%, respectivamente. Por lo tanto, con el promotor, según la presente invención, la expresión de un ácido nucleico enlazado operativamente al mismo se puede reducir o limitar, en comparación con el promotor SV40 de tipo natural.

En virus de simio 40, el promotor SV40 está precedido por dos repeticiones de 72 bp. Esto es útil para la expresión de un polipéptido heterólogo. Con la reducida potencia de promotor de este promotor, la expresión del marcador seleccionable es reducida, mientras que la expresión del polipéptido heterólogo se mantiene utilizando, por ejemplo, el promotor SV40 de tipo natural de SEQ ID NO: 05. De este modo, se ha descubierto que la combinación de un promotor, según la invención, enlazado operativamente a un ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable y un promotor de tipo natural, por ejemplo SV40 ó CMV, enlazados operativamente a un ácido nucleico que codifica un polipéptido heterólogo de interés tiene como resultado una expresión mejorada del polipéptido heterólogo, en comparación con constructos en los que el ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable, así como el ácido nucleico que codifica el polipéptido heterólogo de interés, están ambos enlazados operativamente a un promotor de tipo natural.

En clones de células estables, el ácido nucleico que codifica el marcador seleccionable y el ácido nucleico que codifica el polipéptido heterólogo, así como sus promotores correspondientes, están integrados conjuntamente en el genoma de dicha células. Dado que la localización de la integración en el genoma es un proceso al azar, se lleva a cabo, normalmente, una etapa de selección. En esta etapa de selección, se seleccionan solamente células en las que los ácidos nucleicos conjuntos están incorporados en el genoma, en íntima proximidad de un lugar transcripcionalmente muy activo. Las células que, o bien han incorporado el ácido nucleico lejos de dicho lugar, o bien han incorporado ambos ácidos nucleicos en diferentes lugares, son eliminadas por la etapa de selección.

Dado que el ácido nucleico y el promotor, respectivamente, según la invención, tienen ambos una reducida potencia de promotor, es decir, un ácido nucleico enlazado operativamente con el mismo, se transcriben con una cantidad reducida o con una tasa reducida en comparación con el promotor SV40 de tipo natural, son útiles en múltiples aplicaciones.

Por ejemplo, se pueden utilizar para la promoción de la expresión de un marcador de selección enlazado operativamente, permitiendo la selección de una célula que lleva a cabo este marcador de selección sin requerir una gran fracción de la capacidad de la maquinaria de expresión de la proteína de la célula. Por lo tanto, la expresión de, por ejemplo, un polipéptido heterólogo co-expresado no queda afectada negativamente.

Otro aspecto de la presente invención es un método para la selección de una célula que expresa un polipéptido heterólogo que comprende las siguientes etapas:

a) transfectar una célula eucariota con un ácido nucleico que comprende
   i) un primer casete de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido heterólogo,

ii) un segundo casete de expresión que comprende un promotor de SEQ ID NO: 04 y un segundo ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable, de manera que el promotor está enlazado operativamente al segundo ácido nucleico,

b) cultivar dicha célula transfectada en condiciones adecuadas para crecimiento de la célula eucariota no transfectada,

c) seleccionar una célula que se propaga en la etapa b) y asimismo,
i) propagar en condiciones de selección, o bien
ii) expresar el marcador seleccionable.

Las células apropiadas en este método son, por ejemplo, células CHO, células BHK, células PER.C6®, células HEK, células HeLa, células SP2/0, células NS0, células de mieloma o células de hibridoma. En una realización, la célula es una célula de un mamífero, en una realización preferente, la célula es seleccionada entre una célula CHO, célula BHK, célula HEK, célula SP2/0 o célula PER.C6®.

El polipéptido heterólogo puede ser cualquier polipéptido heterólogo de interés, tal como por ejemplo, pro-medicamentos, enzimas, fragmentos de enzima, inhibidores de enzima, activadores de enzima, polipéptidos biológicamente activos, proteínas hedgehog, proteínas morfogenéticas de hueso, factores de crecimiento, eritropoyetina, trombopoyetina, G-CSF, interleucinas, interferones, inmunoglobulinas o péptidos antifusogénicos, o fragmentos de los mismos, o conjugados de los mismos. En una realización, el polipéptido heterólogo es una inmunoglobulina, o un fragmento de inmunoglobulina, o un conjugado de inmunoglobulina.

En una realización, la etapa c) del método es la selección de una célula que se propaga en la etapa b) en condiciones de cultivo selectivas, es decir, en presencia de un agente de selección. En otra etapa c) de la realización del método se selecciona una célula que se propaga en la etapa b) y expresa el marcador seleccionable codificado por dicho segundo ácido nucleico. En la primera realización, es la célula transfectada cultivada en presencia de un agente de selección la que inhibe la propagación de células no transfectadas o que no expresan suficientemente el segundo ácido nucleico que codifica el marcador seleccionable. En la segunda realización, es la célula transfectada cultivada en ausencia de un agente de selección y la selección tiene lugar por la detección de la expresión del marcador seleccionable como, por ejemplo, FACS o inspección visual.

La selección de las células puede ser llevada a cabo en una única etapa o en múltiples etapas. En una etapa única/múltiple del procedimiento, la primera selección puede ser llevada a cabo basándose, por ejemplo, en un nivel de umbral de un marcador seleccionable, tal como por ejemplo dLNGFR ó GFP. Por ejemplo, para la selección por citometría de flujo (por ejemplo, por FACS - Fluorescence Activated Cell Sorting) (Clasificación de células activada por fluorescencia) se dispone un nivel de umbral de fluorescencia y las células con una fluorescencia por encima de este nivel de umbral son seleccionadas. De manera alternativa, células dentro de la parte superior 1-15% (es decir, el 15% de las células con el marcador detectable de modo más intenso) o la parte superior 1-10%, o la parte superior 1-15% o la parte superior 5-10% de intensidad de fluorescencia en la población de la muestra pueden ser recogidas. Un método alternativo para la selección de una célula es la unión inmunológica, por ejemplo, a perlas magnéticas recubiertas con proteína A o inmunoglobulinas específicas. El panel de selección de células puede ser tomado como población básica para otra etapa de selección adicional, por ejemplo por sembrado de células individuales, cultivo y análisis ELISA (enzyme-linked Immunosorbent Assay) o por clonado por dilución limitada o por ampliación por cultivo durante varios días y selección FACS adicional, o por una selección FACS adicional con un nivel umbral más elevado, que puede ser basado, por ejemplo, en las intensidades de fluorescencia detectadas en una selección FACS preferente, o por un método de inmunoprecipitación (ver, por ejemplo, WO 2005/020924). La selección de una célula, de acuerdo con la invención, puede ser llevada a cabo en una realización por un método seleccionado entre citometría de flujo, ELISA, inmunoprecipitación, cromatografía de columna de inmunoafinidad, selección de inmunoafinidad por perlas magnéticas, métodos de aislamiento basados en microscopio o unión inmunológica. En otra realización, la selección de una célula, de acuerdo con la invención, puede ser llevada a cabo por un método seleccionado entre citometría de flujo, ELISA, inmunoprecipitación, cromatografía de columna de inmunoafinidad, selección por inmunoafinidad de perlas magnéticas, métodos de aislamiento basados en microscopio o unión inmunológica, seguido del método seleccionado entre sembrado de células individuales y cultivo, dilución limitada o ampliación por cultivo, seguido de un método seleccionado entre FACS, inmunoprecipitación, cromatografía de columna de inmunoafinidad, clasificación por inmunoafinidad de perlas magnéticas, métodos de aislamiento basados en microscopio o ELISA.

El aspecto final de la presente invención es un método para la expresión de un polipéptido heterólogo en una célula al enlazar operativamente un promotor, de acuerdo con la invención, a un ácido nucleico que codifica dicho polipéptido heterólogo. Este método es adecuado para la expresión, por ejemplo, de proteínas grandes con bajas solubilidades o cinéticas de replegado lentas. La reducción de la cantidad o tasa de expresión de un polipéptido heterólogo o de la transcripción de un ácido nucleico es aconsejable si el polipéptido heterólogo o el ácido nucleico afectan adversamente a la célula huésped o reducen el rendimiento de producción general del polipéptido heterólogo susceptible de funcionar, es decir, replegado correctamente. Por lo tanto, un aspecto de la presente invención consiste en la expresión o producción de un polipéptido heterólogo con una fracción reducida de

polipéptido no funcional, es decir, no correctamente replegado. Si el polipéptido heterólogo expresado en la célula huésped supera una cierta dimensión con respecto al peso o número de aminoácidos, o número de subunidades, o número de modificaciones secundarias, será obtenido probablemente después del cultivo de la célula huésped en una forma no funcional, es decir, no activa o no correctamente replegada. Una posibilidad de superar este problema es reducir la cantidad, es decir la tasa, de la expresión de la proteína. Dado que la expresión de la proteína está regulada por la potencia del promotor enlazado operativamente, el promotor, según la invención, es apropiado para ello.

Por lo tanto, la presente invención comprende un método para la expresión o producción de un polipéptido heterólogo con una fracción reducida de polipéptido no funcional en el que el método comprende las siguientes etapas, en este orden:

a) transfectar una célula de mamífero con un ácido nucleico que comprende un casete de expresión que comprende un promotor de SEQ ID NO:04 enlazado operativamente a un ácido nucleico que codifica un polipéptido heterólogo,
b) seleccionar una célula transfectada en la etapa a),
c) cultivar la célula seleccionada en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido heterólogo,
d) recuperar el polipéptido heterólogo de la célula o del medio de cultivo.

En una realización de este aspecto de la presente invención, la célula de mamífero es una célula CHO, célula BHK, célula HEK, célula Sp2/0 o una célula PER.C6®. En otra realización, es el ácido nucleico el que codifica un polipéptido heterólogo que codifica una inmunoglobulina o un fragmento de inmunoglobulina o un conjugado de una inmunoglobulina. En otra realización, comprende el ácido nucleico un segundo casete de expresión que codifica un marcador seleccionable.

Los siguientes ejemplos, listados de secuencias y figuras se facilitan para ayudar a la comprensión de la presente invención, cuyo verdadero ámbito está determinado por las reivindicaciones adjuntas.

Descripción de las figuras

Figura 1 Mapa de plásmidos de plásmido 5500.
Figura 2 Mapa de plásmidos de plásmido 5501.
Figura 3 Mapa de plásmidos de plásmido 4703.
Figura 4 Mapa de plásmidos de plásmido 4712.
Figura 5 Mapa de plásmidos de plásmido 4713.
Figura 6 Análisis FACS de la expresión de dLNGFR de células HEK293EBNA transfectadas con
a) un casete de expresión de SEQ ID NO: 05 enlazado operativamente a SEQ ID NO: 07,
b) un casete de expresión de SEQ ID NO: 04 enlazado operativamente a SEQ ID NO: 07,
c) un casete de expresión de SEQ ID NO: 06 enlazado operativamente a SEQ ID NO: 07.

Figura 7 Análisis FACS de la expresión de GFP de células HEK293EBNA transfectadas con
a) un casete de expresión de SEQ ID NO: 05 enlazado operativamente a SEQ ID NO: 07,
b) un casete de expresión de SEQ ID NO: 03 enlazado operativamente a SEQ ID NO: 07,
c) un casete de expresión de SEQ ID NO: 06 enlazado operativamente a SEQ ID NO: 07.

Ejemplo 1

Construcción de ácido nucleico de SEQ ID NO: 02

El promotor de SEQ ID NO: 02 SV40 acortado en 5' fue obtenido por intermedio de una reacción PCR con el promotor SV40 de longitud completa como plantilla enlazado operativamente a un ácido nucleico que codifica un dLNGFR (plásmido 4788). La mezcla PCR era: 1x tampón PWO (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania) suplementado con 2 mM de $MgSO_4$, 200 µM dNTPs PCR mezcla de nucleótidos (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania), 1 µm de cebador directo de SEQ ID NO: 08, 1 µM de cebador inverso de SEQ ID NO: 13, 50 ng de ADN plantilla de plásmido 4788, 2,5 U PWO-ADN polimerasa (PWO = Pyrococcus woesei; Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania), añadiendo 100 µL de agua doble destilada ultra pura. Las condiciones de PCR fueron: 1 min a 94 ℃, 1 ciclo; 0,5 min a 94 ℃, 25 ciclos; 0,5 min a 55 ° C, 25 ciclos; 1 min a 72 ℃, 25 ciclos; 5 min a 72 ℃, 1 ciclo.

Ejemplo 2

Construcción de ácido nucleico de SEQ ID NO: 03

La variante de promotor SV40 acortado en 5' de SEQ ID NO: 03 fue obtenida con intermedio de reacción PCR con el promotor SV40 de longitud completa como plantilla, enlazado operativamente a un ácido nucleico que codifica

dLNGFR del plásmido 4788. La mezcla de PCR era: 1 x PWO tampón suplementado con 2 mM de $MgSO_4$, 200 µM dNTPs PCR mezcla de nucleótidos, 1 µM de cebador directo de SEQ ID NO: 09, 1 µM de cebador inverso de SEQ ID NO: 13, 50 ng de ADN plantilla de plásmido 4788, 2,5 U PWO-ADN polimerasa, añadiendo 100 µL con agua doble destilada ultra pura. Las condiciones de PCR fueron: 1 min a 94 ℃, 1 ciclo; 0,5 min a 94 ℃, 25 ciclos; 0,5 min a 55 ℃, 25 ciclos; 1 min a 72 ℃, 25 ciclos; 5 min a 72 ℃, 1 ciclo.

Ejemplo 3

Construcción del ácido nucleico de SEQ ID NO: 04

La variante de promotor SV40 acortado en 5' de SEQ ID NO: 04 fue obtenida con intermedio de reacción PCR con el promotor SV40 de longitud completa como plantilla, enlazado operativamente a un ácido nucleico que codifica dLNGFR (plásmido 4788). La mezcla de PCR era: 1 x PWO tampón suplementado con 2 mM $MgSO_4$, 200 µM dNTPs PCR mezcla de nucleótidos, 1 µM de cebador directo de SEQ ID NO: 10, 1 µM de cebador inverso de SEQ ID NO: 13, 50 ng de ADN plantilla de plásmido 4788, 2,5 U PWO-ADN polimerasa, añadiendo 100 µL con agua doble destilada ultra pura. Las condiciones de PCR fueron: 1 min a 94 ℃, 1 ciclo; 0,5 min a 94 ℃, 25 ciclos; 0,5 min a 55 ℃, 25 ciclos; 1 min a 72 ℃, 25 ciclos; 5 min a 72 ℃, 1 ciclo.

Ejemplo 4

Construcción de otros promotores

Se produjeron otras variantes de promotor SV40 acortado en 5' fue obtenida con intermedio de reacción PCR con el promotor SV40 de longitud completa como plantilla, enlazado operativamente a un ácido nucleico que codifica dLNGFR (plásmido 4788). La mezcla de PCR era: 1 x PWO tampón suplementado con 2 mM de $MgSO_4$, 200 µM dNTPs PCR mezcla de nucleótidos, 1 µM de cebador directo de SEQ ID NO: 11 (proporcionando SEQ ID NO: 06) o SEQ ID NO: 12, 1 µM de cebador inverso de SEQ ID NO: 13, 50 ng de ADN plantilla de plásmido 4788, 2,5 U PWO-ADN polimerasa, añadiendo 100 µL con agua doble destilada ultra pura. Las condiciones de PCR fueron: 1 min a 94 ℃, 1 ciclo; 0,5 min a 94 ℃, 25 ciclos; 0 ,5 min a 55 ℃, 25 ciclos; 1 min a 72 ℃, 25 ciclos ; 5 min a 72 ℃, 1 ciclo.

Ejemplo 5

Expresión de dLNGFR enlazado operativamente a SEQ ID NO: 02, 03, 04 y 06

El cebador con el que se obtuvieron los ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 02, 03, 04, y 06 contenían sitios de restricción de las endonucleasas de restricción SalI y EcoRI. Utilizando estos lugares de restricción/endonucleasas de restricción, estos ácidos nucleicos enlazados operativamente a un ácido nucleico que codifica dLNGFR (por LNGFR (low affinity nerve growth factor) ver, por ejemplo, Philipps, K., y otros, Nat. Med. 2 (1996) 1154-1156; o Machl, A.W., y otros, Cytometry 29 (1997) 371-374) han sido ligados en el plásmido 4736-pUC-DHFR, que ha sido linealizado utilizando los sitios de restricción SalI y PvuII. Los plásmidos resultantes son:

5500-pUC-DHFR_dLNGFR_tiponatural SV40 (mapa de plásmidos en la figura 1),
5501-pUC-DHFR_dLNGFR_Acortamiento_2 (mapa de plásmidos en la figura 2),
5502-pUC-DHFR_dLNGFR_Acortamiento _3,
5503-pUC-DHFR_dLNGFR_Acortamiento _4,
5504-pUC-DHFR_dLNGFR_Acortamiento_6.

Se han transfectado células HEK 293 EBNA con estos plásmidos, y el polipéptido codificado fue expresado transitoriamente. Después de 48 horas, se ha verificado la expresión de dLNGFR con intermedio de FACS. Para la determinación de la potencia del promotor (potencia de expresión) de los diferentes promotores se marcó por fluorescencia el marcador de superficie expresado dLNGFR con intermedio de un anticuerpo anti-dLNGFR.

Para cada determinación, se han extraído aproximadamente 0,5 x 10^6 a 1,0 x 10^6 células por la adición de 1 ml de Accutase® para 6 pocillos (GIBCO Invitrogen, Karlsruhe, Alemania). Las células extraídas fueron transferidas en un dial y lavadas una vez con medio RPMI 1640 suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino. Posteriormente, las células fueron precipitadas por centrifugación (1.500 rpm, 5 min.) y se eliminó el sobrenadante. Todas las etapas siguientes fueron llevadas a cabo a una temperatura de 0 a 2 ℃ o en un baño de hielo. La pastilla de células fue resuspendida en 100 µl de una solución que contenía el anticuerpo anti-dLNGFR a 30 µg/ml. Después de un periodo de incubación de 30 minutos, las muestras fueron diluidas por la adición de 2 ml de medio RPMI 1640 enfriado con hielo con una precipitación subsiguiente por centrifugación. La pastilla fue resuspendida en 100 µL de una solución secundaria de anticuerpo, un anticuerpo IgG de cabra anti-ratón, conjugado a Phycoerythrin (Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA), a una concentración de 20 µg/ml. La muestra fue incubada en la oscuridad durante 30 minutos sobre hielo. Después de una etapa de lavado y centrifugación, la muestra fue resuspendida en 500 µl de medio y almacenada en la oscuridad sobre hielo, hasta su medición. El

análisis FACS fue evaluado utilizando un software FACSCalibur (Cell Quest Pro). Los resultados se muestran en la figura 6.

Resultados del análisis FACS:

5500-pUC-DHFR_dLNGFR_tiponaturalSV40 (Figura 6a)):

Marcador	izquierda, derecha	eventos	%controlado	%total	Media	Mediana
Todo	1,9910	8067	100,00	80,67	567,61	128,64
M1	1, 40	2134	26.45	21.34	21.84	21.29
M2	40,9910	5956	73,83	59,56	761,11	345,99

5501-pUC-DHFR_dLNGFR_Acortamiento_2:

Marcador	izquierda, derecha	eventos	%controlado	%total	Media	Mediana
Todos	1, 9910	7377	100,00	73,77	564,33	168,49
M1	1,40	1365	18,50	13,65	24,69	25,48
M2	40,9910	6027	81,70	60,27	685,24	291,64

5502-pUC-DHFR_dLNGFR_Acortamiento_3:

Marcador	izquierda, derecha	eventos	%controlado	%total	Media	Mediana
Todo	1,9910	7643	100,00	76,43	582,85	129,80
M1	1,40	1959	25,63	19,59	22,68	22,88
M2	40,9910	5708	74,68	57,08	772,82	339,82

5503-pUC-DHFR_dLNGFR_Acortamiento_4 (Figura 6b)):

Marcador	izquierda, derecha	eventos	%controlado	%total	Media	Mediana
Todo	1,9910	7440	100,00	74,40	436,61	69,78
M1	1,10	2603	34,99	26,03	20,87	19,99
M2	40,99,10	4852	65,22	48,52	658,42	250,29

5504-pUC DHFR_dLNGFR_Acortamiento_6 (Figura 6c)):

Marcador	izquierda, derecha	eventos	%controlado	%total	Media	Mediana
Todo	1,9910	8404	100,00	84,04	31,67	11,65
M1	1,40	6685	79,55	66,85	12,05	9,14
M2	40,9910	1732	20,61	17,32	107,45	74,32

Se puede observar que la intensidad de fluorescencia media del dLNGFR marcado expresado del plásmido 5504 muestra una reducción significativa de la expresión con reducción aproximada del 85%.

Ejemplo 6

Expresión de GFP enlazado operativamente a la SEQ ID NO: 02, 03, 04 y 06

El cebador con el que se obtuvieron los ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 02, 03, 04 y 06 contenía sitios de restricción de las endonucleasas de restricción SalI y EcoRI. Utilizando sitios de restricción/endonucleasas de restricción se han ligado estos ácidos nucleicos enlazados operativamente a un ácido nucleico que codifica GFP (SEQ ID NO: 07) en el plásmido 4703-pUC-OriP (figura 3), que ha sido linealizado utilizando los sitios de restricción SalI y PvuII. Los plásmidos resultantes fueron:

4712-pUC-Hyg_GFP_tiponaturalSV40 (mapa del plásmido en la figura 4),
4713-pUC-Hyg_GFP_Acortamiento_2 (mapa del plásmido en la figura 5),
4714-pUC-Hyg_GFP_Acortamiento_3,
4715-pUC-Hyg_GFP_Acortamiento_4,
4716-pUC-Hyg_GFP_Acortamiento_6.

Para cada determinación se han separado aproximadamente $5x10^5$ a $1x10^6$ células por la adición de 1 ml Accutase® por 6 pocillos (GIBCO Invitrogen, Karlsruhe, Alemania). Las células separadas se transfirieron en un vial y se resuspendieron en 3 ml de medio RPMI 1640 suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino. Posteriormente, las células fueron precipitadas por centrifugación (1.500 rpm, 5 min.) y se eliminó el sobrenadante. La pastilla de células fue resuspendida en 500 µl de medio. Para la diferenciación de las células vivas y muertas se añadió 1 µl de yoduro de propidio. Las células fueron resuspendidas poco antes de la medición de FACS. El análisis FACS fue evaluado utilizando software FACSCalibur (Cell Quest Pro). Los resultados se muestran en la figura 7.

Resultados del análisis FACS:

4712-pUC-Hyg_GFP_tiponaturalSV40 (figura 7a)):

Marcador	izquierda, derecha	eventos	%controlado	%total	Media	Mediana
Todo	1,9910	8390	100,00	33,90	385,26	17,15
M1	1,16	4162	49,61	41,62	592	4,91
M2	16,9910	4240	50,54	42,40	756,58	302,32

4713-pUC-Hyg_GFP_Acortamiento_2:

Marcador	izquierda, derecha	eventos	%controlado	%total	Media	Mediana
Todo	1,9910	8576	100,00	85,76	514,24	45,73
M1	1,16	3635	42,39	36,35	5,72	4,61
M2	16,9910	4948	57,70	49,48	887,12	392,42

4714-pUC-Hyg_GFP_Acortamiento_3 (Figura 7b)):

Marcador	izquierda, derecha	eventos	%controlado	%total	Media	Mediana
Todos	1,9910	8538	100,00	85,38	215,22	15,96
M1	1,16	4289	50,23	42,89	5,44	4,26
M2	16,9910	4258	49,87	42,58	426,11	203,51

4715-pUC-Hyg_GFP_Acortamiento_4:

Marcador	izquierda, derecha	eventos	%controlado	%total	Media	Mediana
Todos	1,9910	8601	100,00	86,01	53,76	7,37
M1	1,16	5606	65,18	56,06	5,59	4,41
M2	16,9910	3012	35,02	30,12	143,20	73,65

4716-pUC-Hyg_GFP_Acortamiento_6 (Figura 7c)):

Marcador	izquierda, derecha	eventos	%controlado	%total	Media	Mediana
Todos	1,9910	7622	100,00	76,22	4,09	3,52
M1	1,16	7614	99,90	76,14	4,07	3,52
M2	16,9910	8	0,10	0,08	22,46	18,85

Se puede apreciar que la intensidad media de fluorescencia del GFP expresado a partir del plásmido 4714 o plásmido 4715 muestra una reducción significativa de expresión con una reducción aproximadamente del 50% y 75%, respectivamente. Con el plásmido 4716 no se encontró ninguna expresión detectable de GFP.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Promotor

<130> 24351 WO

<150> EP07012772.5

<151> 2007-06-29

<160> 14

<170> Patent In version 3.2

<210> 1
<211> 5243
<212> ADN
<213> virus de simio 40

<400> 1

gcctcggcct ctgcataaat aaaaaaaatt agtcagccat ggggcggaga atgggcggaa 60

ctgggcggag ttaggggcgg gatgggcgga gttaggggcg ggactatggt tgctgactaa 120

ttgagatgca tgctttgcat acttctgcct gctggggagc ctggggactt tccacacctg 180

gttgctgact aattgagatg catgctttgc atacttctgc ctgctgggga gcctggggac 240

tttccacacc ctaactgaca cacattccac agctggttct ttccgcctca gaaggtacct 300

aaccaagttc ctctttcaga ggttatttca ggccatggtg ctgcgccggc tgtcacgcca 360

ggcctccgtt aaggttcgta ggtcatggac tgaaagtaaa aaaacagctc aacgcctttt 420

tgtgtttgtt ttagagcttt tgctgcaatt ttgtgaaggg gaagatactg ttgacgggaa 480

acgcaaaaaa ccagaaaggt taactgaaaa accagaaagt taactggtaa gtttagtctt 540

tttgtctttt atttcaggtc catgggtgct gctttaacac tgttggggga cctaattgct 600

actgtgtctg aagctgctgc tgctactgga ttttcagtag ctgaaattgc tgctggagag 660

gccgctgctg caattgaagt gcaacttgca tctgttgcta ctgttgaagg cctaacaacc 720

tctgaggcaa ttgctgctat aggcctcact ccacaggcct atgctgtgat atctggggct 780

cctgctgcta tagctggatt tgcagcttta ctgcaaactg tgactggtgt gagcgctgtt 840

gctcaagtgg ggtatagatt ttttagtgac tgggatcaca aagtttctac tgttggttta 900

tatcaacaac caggaatggc tgtagatttg tataggccag atgattacta tgatatttta 960

tttcctggag tacaaacctt tgttcacagt gttcagtatc ttgaccccag acattggggt 1020

ccaacacttt ttaatgccat ttctcaagct ttttggcgtg taatacaaaa tgacattcct 1080

aggctcacct cacaggagct tgaaagaaga acccaaagat atttaaggga cagtttggca 1140

aggtttttag aggaaactac ttggacagta attaatgctc ctgttaattg gtataactct 1200

ttacaagatt actactctac tttgtctccc attaggccta caatggtgag acaagtagcc 1260

aacagggaag ggttgcaaat atcatttggg cacacctatg ataatattga tgaagcagac 1320

agtattcagc aagtaactga gaggtgggaa gctcaaagcc aaagtcctaa tgtgcagtca 1380

ggtgaattta ttgaaaaatt tgaggctcct ggtggtgcaa atcaaagaac tgctcctcag 1440

tggatgttgc ctttacttct aggcctgtac ggaagtgtta cttctgctct aaaagcttat 1500

gaagatggcc ccaacaaaaa gaaaaggaag ttgtccaggg gcagctccca aaaaaccaaa 1560

ggaaccagtg caagtgccaa agctcgtcat aaaaggagga atagaagttc taggagttaa 1620

aactggagta gacagcttca ctgaggtgga gtgcttttta aatcctcaaa tgggcaatcc 1680

tgatgaacat caaaaaggct taagtaaaag cttagcagct gaaaaacagt ttacagatga 1740

ctctccagac aaagaacaac tgccttgcta cagtgtggct agaattcctt tgcctaattt 1800

aaatgaggac ttaacctgtg gaaatatttt gatgtgggaa gctgttactg ttaaaactga 1860

ggttattggg gtaactgcta tgttaaactt gcattcaggg acacaaaaaa ctcatgaaaa 1920

tggtgctgga aaacccattc aagggtcaaa ttttcatttt tttgctgttg gtggggaacc 1980

tttggagctg cagggtgtgt tagcaaacta caggaccaaa tatcctgctc aaactgtaac 2040

cccaaaaaat gctacagttg acagtcagca gatgaacact gaccacaagg ctgttttgga 2100

taaggataat gcttatccag tggagtgctg ggttcctgat ccaagtaaaa atgaaaacac 2160

tagatatttt ggaacctaca caggtgggga aaatgtgcct cctgttttgc acattactaa 2220

cacagcaacc acagtgcttc ttgatgagca gggtgttggg cccttgtgca aagctgacag 2280

cttgtatgtt tctgctgttg acatttgtgg gctgtttacc aacacttctg gaacacagca 2340

gtggaaggga cttcccagat attttaaaat tacccttaga aagcggtctg tgaaaaaccc 2400

ctacccaatt tccttttttgt taagtgacct aattaacagg aggacacaga gggtggatgg 2460

gcagcctatg attggaatgt cctctcaagt agaggaggtt agggtttatg aggacacaga 2520

ggagcttcct ggggatccag acatgataag atacattgat gagtttggac aaaccacaac 2580

tagaatgcag tgaaaaaaat gctttatttg tgaaatttgt gatgctattg ctttatttgt 2640

aaccattata agctgcaata aacaagttaa caacaacaat tgcattcatt ttatgtttca 2700

ggttcagggg gaggtgtggg aggtttttta aagcaagtaa aacctctaca aatgtggtat 2760

ggctgattat gatcatgaac agactgtgag gactgagggg cctgaaatga gccttgggac 2820

tgtgaatcaa tgcctgtttc atgccctgag tcttccatgt tcttctcccc accatcttca 2880

tttttatcag cattttcctg gctgtcttca tcatcatcat cactgtttct tagccaatct 2940

aaaactccaa ttcccatagc cacattaaac ttcatttttt gatacactga caaactaaac 3000

tctttgtcca atctctcttt ccactccaca attctgctct gaatactttg agcaaactca 3060

gccacaggtc tgtaccaaat taacataaga agcaaagcaa tgccactttg aattattctc 3120

ttttctaaca aaaactcact gcgttccagg caatgcttta aataatcttt gggcctaaaa 3180

tctatttgtt ttacaaatct ggcctgcagt gttttaggca cactgtactc attcatggtg 3240

actattccag ggggaaatat ttgagttctt ttatttaggt gtttcttttc taagtttacc 3300

ttaacactgc catccaaata atcccttaaa ttgtccaggt tattaattcc ctgacctgaa 3360

ggcaaatctc tggactcccc tccagtgccc tttacatcct caaaaactac taaaaactgg 3420

tcaatagcta ctcctagctc aaagttcagc ctgtccaagg gcaaattaac atttaaagct 3480

ttccccccac ataattcaag caaagcagct gctaatgtag ttttaccact atcaattggt 3540

cctttaaaca gccagtatct ttttttagga atgttgtaca ccatgcattt taaaaagtca 3600

tacaccactg aatccatttt gggcaacaaa cagtgtagcc aagcaactcc agccatccat 3660

tcttctatgt cagcagagcc tgtagaacca aacattatat ccatcctatc caaaagatca 3720

ttaaatctgt ttgttaacat ttgttctcta gttaattgta ggctatcaac ccgcttttta 3780

gctaaaacag tatcaacagc ctgttggcat atggtttttt ggtttttgct gtcagcaaat 3840

atagcagcat ttgcataatg cttttcatgg tacttatagt ggctgggctg ttctttttta 3900

atacatttta aacacatttc aaaactgtac tgaaattcca agtacatccc aagcaataac 3960

aacacatcat cacattttgt ttccattgca tactctgtta caagcttcca ggacacttgt 4020

ttagtttcct ctgcttcttc tggattaaaa tcatgctcct ttaacccacc tggcaaactt 4080

tcctcaataa cagaaaatgg atctctagtc aaggcactat acatcaaata ttccttatta 4140

acccctttac aaattaaaaa gctaaaggta cacaattttt gagcatagtt attaatagca 4200

gacactctat gcctgtgtgg agtaagaaaa aacagtatgt tatgattata actgttatgc 4260

ctacttataa aggttacaga atatttttcc ataattttct tgtatagcag tgcagctttt 4320

tcctttgtgg tgtaaatagc aaagcaagca agagttctat tactaaacac agcatgactc 4380

aaaaaactta gcaattctga aggaaagtcc ttggggtctt ctacctttct cttctttttt 4440

ggaggagtag aatgttgaga gtcagcagta gcctcatcat cactagatgg catttcttct 4500

gagcaaaaca ggttttcctc attaaaggca ttccaccact gctcccattc atcagttcca 4560

taggttggaa tctaaaatac acaaacaatt agaatcagta gtttaacaca ttatacactt 4620

aaaaatttta tatttacctt agagctttaa atctctgtag gtagtttgtc caattatgtc 4680

acaccacaga agtaaggttc cttcacaaag atcaagtcca aaccacattc taaagcaatc 4740

gaagcagtag caatcaaccc acacaagtgg atctttcctg tataattttc tattttcatg 4800

cttcatcctc agtaagcaca gcaagcatat gcagttagca gacattttct ttgcacactc 4860

aggccattgt ttgcagtaca ttgcatcaac accaggattt aaggaagaag caaatacctc 4920

agttgcatcc cagaagcctc caaagtcagg ttgatgagca tattttactc catcttccat 4980

tttcttgtac agagtattca ttttcttcat tttttcttca tctcctcctt tatcaggatg 5040

aaactccttg catttttta aatatgcctt tctcatcaga ggaatattcc cccaggcact 5100

cctttcaaga cctagaaggt ccattagctg caaagattcc tctctgttta aaactttatc 5160

catctttgca aagctttttg caaaagccta ggcctccaaa aaagcctcct cactacttct 5220

ggaatagctc agaggccgag gcg 5243

<210> 2
<211> 288
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> promotor 1

<400> 2

agtcagcaac caggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt atgcaaagca 60

tgcatctcaa ttagtcagca accatagtcc cgcccctaac tccgcccatc ccgcccctaa 120

ctccgcccag ttccgcccat tctccgcccc atggctgact aatttttttt atttatgcag 180

aggccgaggc cgcctctgcc tctgagctat tccagaagta gtgaggaggc ttttttggag 240

gcctaggctt ttgcaaaaag ctcccgggag cttgtatatc cattttcg 288

<210> 3
<211> 219
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> promotor 2

<400> 3

attagtcagc aaccatagtc ccgcccctaa ctccgcccat cccgccccta actccgccca 60

gttccgccca ttctccgccc catggctgac taatttttt tatttatgca gaggccgagg 120

ccgcctctgc ctctgagcta ttccagaagt agtgaggagg ctttttttgga ggcctaggct 180

tttgcaaaaa gctcccggga gcttgtatat ccattttcg 219

<210> 4
<211> 172
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> promotor 3

<400> 4

ctaactccgc ccagttccgc ccattctccg ccccatggct gactaatttt ttttatttat 60

gcagaggccg aggccgcctc tgcctctgag ctattccaga agtagtgagg aggcttttt 120

ggaggcctag gcttttgcaa aaagctcccg ggagcttgta tatccatttt cg 172

<210> 5
<211> 348
<212> ADN
<213> virus de simio 40

<400> 5

ggtgtggaaa gtccccaggc tccccagcag gcagaagtat gcaaagcatg catctcaatt 60

agtcagcaac caggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt atgcaaagca 120

tgcatctcaa ttagtcagca accatagtcc cgcccctaac tccgcccatc ccgcccctaa 180

ctccgcccag ttccgcccat tctccgcccc atggctgact aatttttttt atttatgcag 240

aggccgaggc cgcctctgcc tctgagctat tccagaagta gtgaggaggc ttttttggag 300

gcctaggctt ttgcaaaaag ctcccgggag cttgtatatc cattttcg 348

<210> 6
<211> 146
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> promotor 4

<400> 6

tccgccccat ggctgactaa ttttttttat ttatgcagag gccgaggccg cctctgcctc 60

tgagctattc cagaagtagt gaggaggctt ttttggaggc ctaggctttt gcaaaaagct 120

cccgggagct tgtatatcca ttttcg 146

<210> 7
<211> 717
<212> ADN
<213> Aequorea victoria

<400> 7

atgagtaaag gagaagaact tttcactgga gttgtcccaa ttcttgttga attagatggt 60

gatgttaatg ggcacaaatt ctctgtcagt ggagagggtg aaggtgatgc aacatacgga 120

aaacttaccc ttaaatttat ttgcactact ggaaagctac ctgttccatg gccaacactt 180

gtcactactt tctcttatgg tgttcaatgc ttttcaagat acccagatca tatgaaacag 240

catgactttt tcaagagtgc catgcccgaa ggttatgtac aggaaagaac tatattttac 300

aaagatgacg ggaactacaa atcacgtgct gaagtcaagt ttgaaggtga taccctcgtt 360

aatagaattg agttaaaagg tattgatttt aaagaagatg gaaacattct tggacacaaa 420

atggaataca actataactc acacaatgta tacatcatgg cagacaaaca aaagaatgga 480

atcaaagtta acttcaaaat tagacacaac attgaagatg gaagcgttca actagcagac 540

cattatcaac aaaatactcc aattggcgat ggccctgtcc ttttaccaga caaccattac 600

ctgtccacac aatctgccct ttccaaagat cccaacgaaa agagagatca catgatcctt 660

cttgagtttg taacagctgc tgggattaca catggcatgg atgaactata caaataa 717

<210> 8
<211> 25
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador directo 1

<400> 8
ttagggtgtg gaaagtcccc aggct 25

<210> 9
<211> 29
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador directo 2

<400> 9
aattagtcag caaccaggtg tggaaagtc 29

<210> 10

<211> 25
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador directo 3

<400> 10
attagtcagc aaccatagtc ccgcc 25

<210> 11
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador directo 4

<400> 11
ctaactccgc ccagttccgc cca 23

<210> 12
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador directo 5

<400> 12
ccgccccatg gctgactaat tttt 24

<210> 13
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador inverso

<400> 13
ggagcttgta tatccatttt cg 22

<210> 14
<211> 72
<212> ADN
<213> virus de simio 40

<400> 14
tggttgctga ctaattgaga tgcatgcttt gcatacttct gcctgctggg gagcctgggg 60

actttccaca cc 72

REIVINDICACIONES

1. Promotor, caracterizado porque dicho promotor consiste en la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 04.

2. Método para la selección de una célula que expresa un polipéptido heterólogo, caracterizado por comprende las siguientes etapas:

a) transfectar una célula de mamífero con un ácido nucleico comprendiendo

i) un primer casete de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido heterólogo,

ii) un segundo casete de expresión que comprende el promotor, según la reivindicación 1, y un segundo ácido nucleico que codifica una aminoglicósido fosfotransferasa seleccionada entre higromicina fosfotransferasa, neomicina y G418 aminoglicósido fosfotransferasa, de manera que dicho promotor, según la reivindicación 1, y segundo ácido nucleico están enlazados operativamente,

b) cultivar dicha célula transfectada en condiciones adecuadas para el crecimiento de dicha célula no transfectada,

c) seleccionar una célula que se propaga en la etapa b) en condiciones de cultivo selectivas por citometría de flujo.

3. Método para la selección de una célula que expresa un polipéptido heterólogo, caracterizado por comprende las siguientes etapas:

a) transfectar una célula de mamífero con un ácido nucleico comprendiendo

i) un primer casete de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido heterólogo,

ii) un segundo casete de expresión que comprende el promotor, según la reivindicación 1, y un segundo ácido nucleico que codifica dLINGFR ó GFP, de manera que dicho promotor, según la reivindicación 1, y segundo ácido nucleico están enlazados operativamente,

b) cultivar dicha célula transfectada en condiciones adecuadas para el crecimiento de dicha célula no transfectada,

c) seleccionar una célula que se propaga en la etapa b) en condiciones de cultivo selectivas por citometría de flujo.

4. Método para la expresión de un polipéptido heterólogo, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

a) transfectar una célula de mamífero con un ácido nucleico que comprende un casete de expresión que comprende un promotor, según la reivindicación 1, enlazado operativamente a un segundo ácido nucleico que codifica un polipéptido heterólogo,

b) seleccionar una célula transfectada en la etapa a) por citometría de flujo,

c) cultivar la célula seleccionada de la etapa b) en condiciones adecuadas para la expresión de dicho polipéptido heterólogo,

d) recuperar el polipéptido heterólogo de la célula o el medio de cultivo.

5. Método de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado porque el ácido nucleico comprende un segundo casete de expresión que codifica una aminoglicósido fosfotransferasa seleccionada entre higromicina fosfotransferasa, neomicina y G418 aminoglicósido fosfotransferasa.

6. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, caracterizado porque dicho polipéptido heterólogo es una inmunoglobulina o un fragmento de una inmunoglobulina o un conjugado de inmunoglobulina.

7. Método para la expresión de un polipéptido heterólogo, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

a) transfectar una célula CHO con un ácido nucleico que comprende un promotor, según la reivindicación 1, enlazado operativamente a un ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable y un ácido nucleico que comprende un promotor adicional seleccionado de SV40 ó CMV enlazado operativamente a un ácido nucleico que codifica un polipéptido heterólogo,

b) seleccionar una célula CHO transfectada en la etapa a) por citometría de flujo,

c) cultivar la célula CHO seleccionada de la etapa b) en condiciones adecuadas para la expresión de dicho polipéptido heterólogo,

d) recuperar el polipéptido heterólogo de la célula o el medio de cultivo.

8. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, caracterizado porque la citometría de flujo es clasificación de células activada por fluorescencia.

Fig. 1

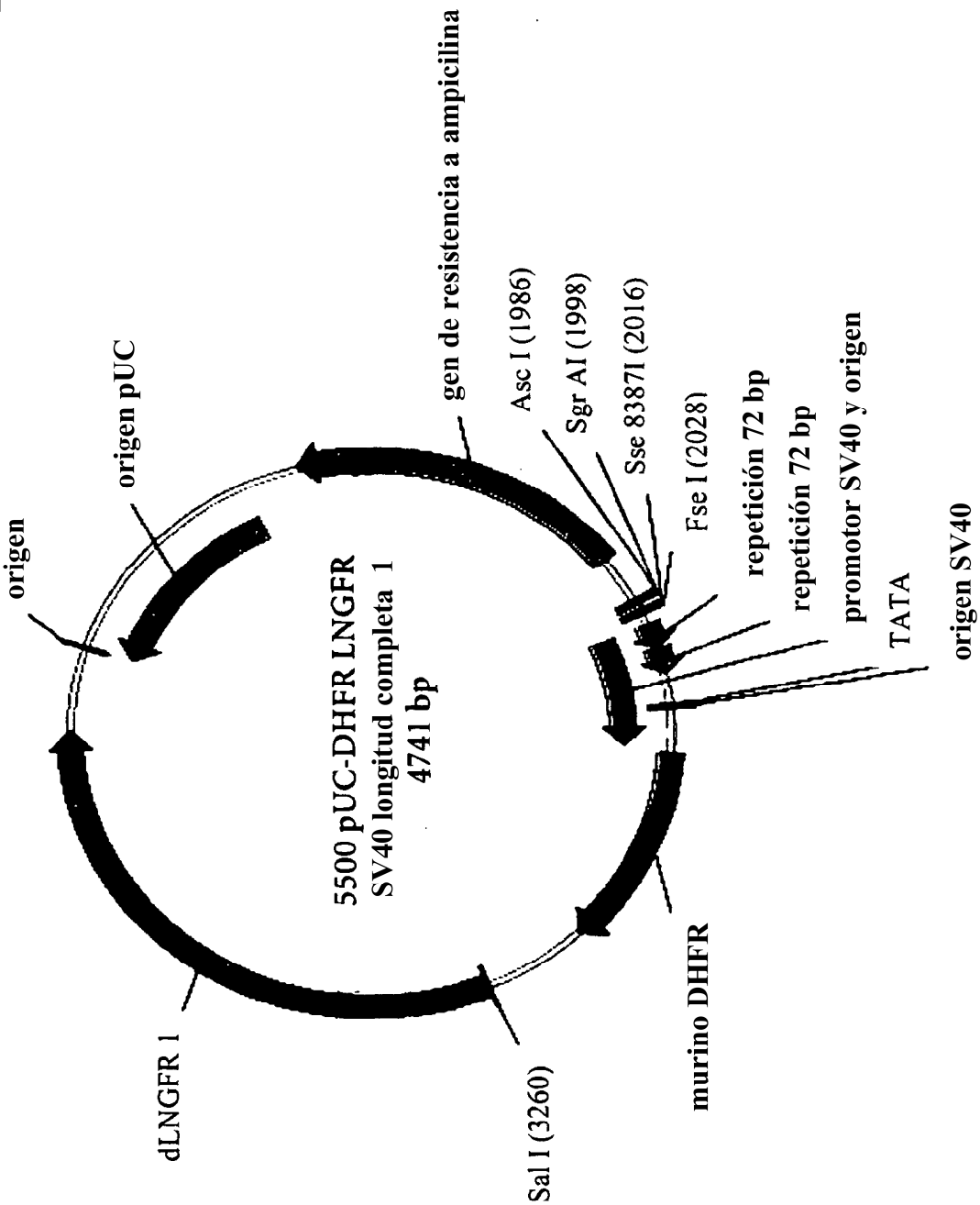

5500 pUC-DHFR LNGFR
SV40 longitud completa 1
4741 bp
origen
origen pUC
gen de resistencia a ampicilina
Asc I (1986)
Sgr AI (1998)
Sse 8387I (2016)
Fse I (2028)
repetición 72 bp
repetición 72 bp
promotor SV40 y origen
TATA
origen SV40
murino DHFR
Sal I (3260)
dLNGFR 1

Fig. 2

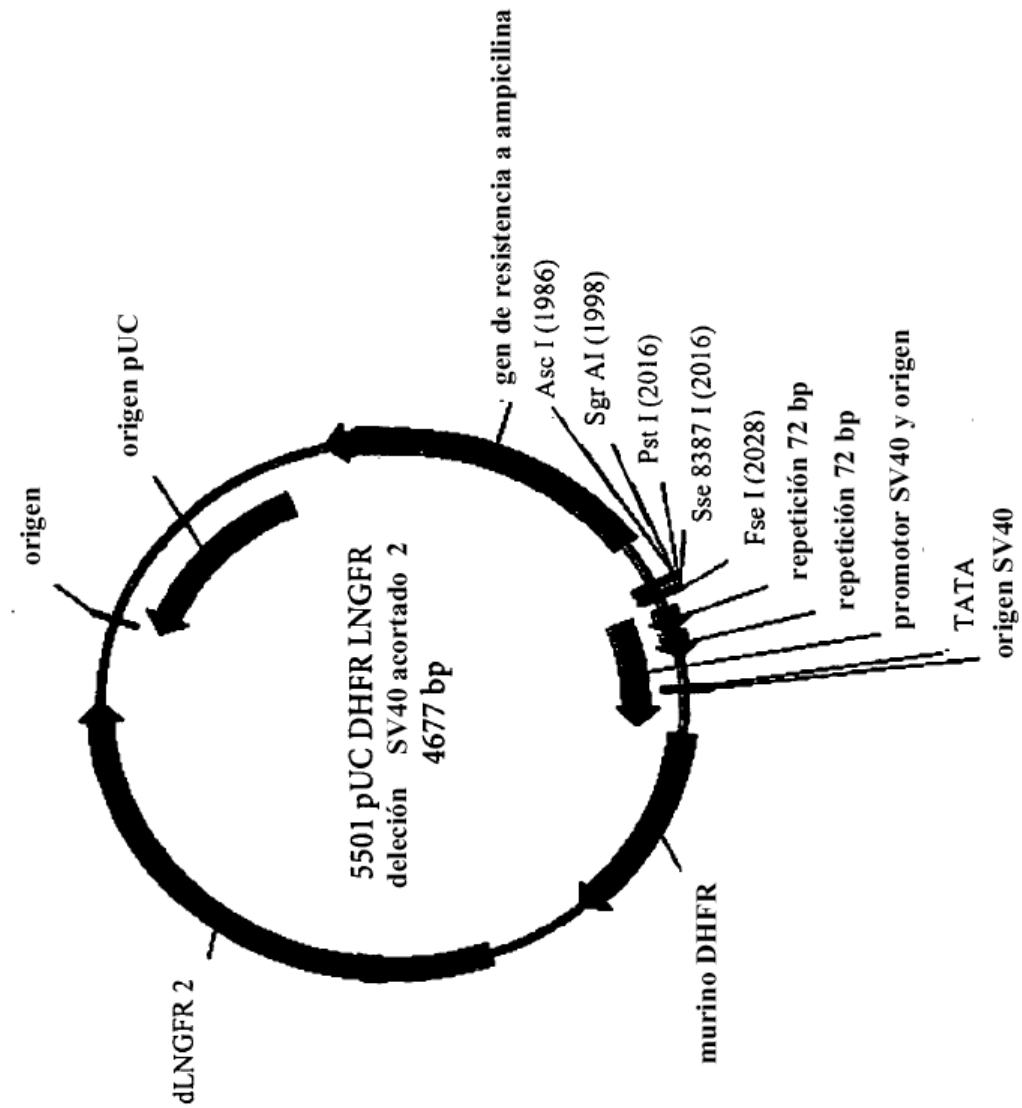

origen
origen pUC
gen de resistencia a ampicilina
Asc I (1986)
Sgr AI (1998)
Pst I (2016)
Sse 8387 I (2016)
Fse I (2028)
repetición 72 bp
repetición 72 bp
promotor SV40 y origen
TATA
origen SV40
5501 pUC DHFR LNGFR
deleción SV40 acortado 2
4677 bp
dLNGFR 2
murino DHFR

Fig. 3

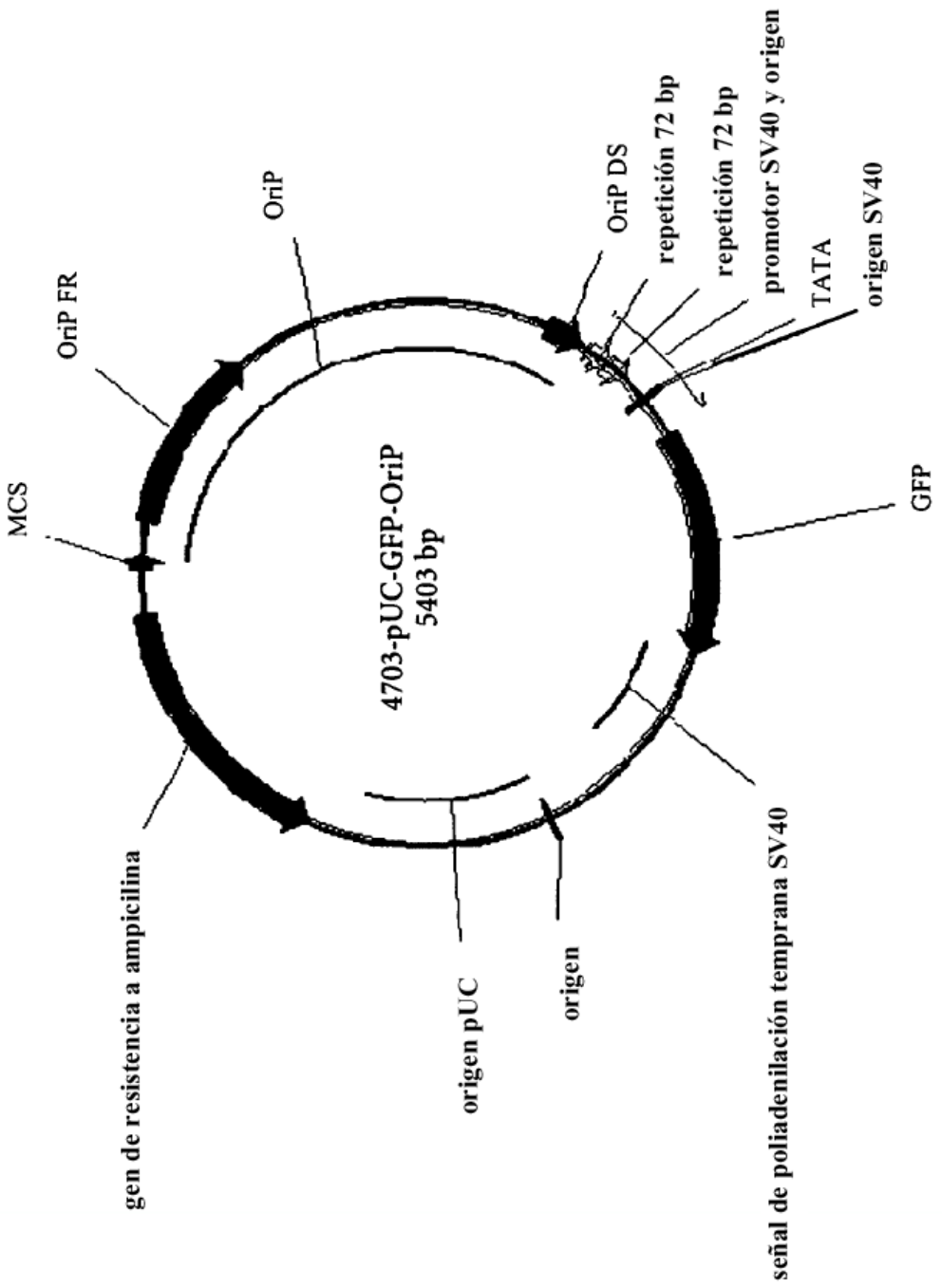

4703-pUC-GFP-OriP
5403 bp
MCS
OriP FR
OriP
OriP DS
repetición 72 bp
repetición 72 bp
promotor SV40 y origen
TATA
origen SV40
GFP
gen de resistencia a ampicilina
origen pUC
origen
señal de poliadenilación temprana SV40

Fig. 4

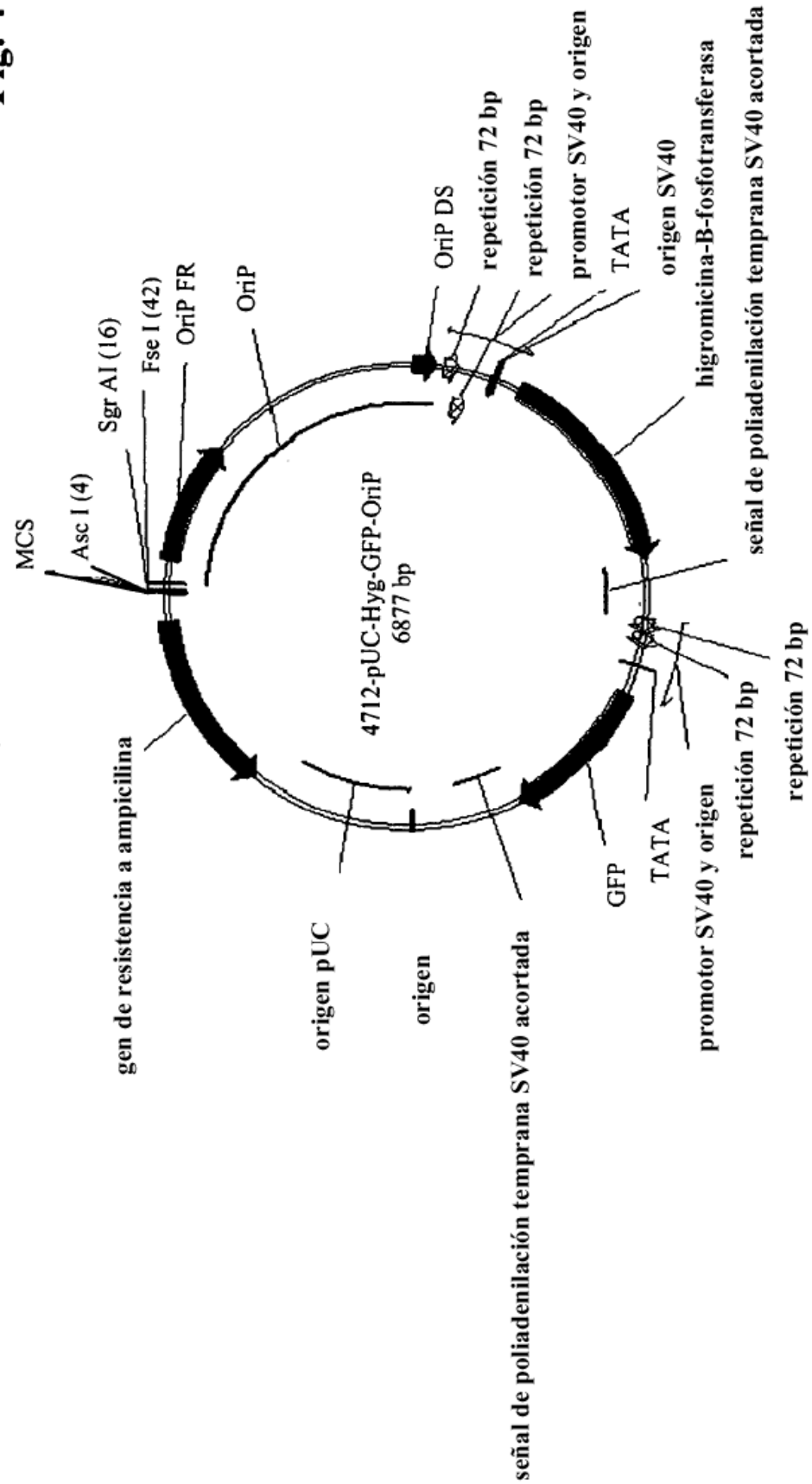

4712-pUC-Hyg-GFP-OriP
6877 bp
MCS
Asc I (4)
Sgr AI (16)
Fse I (42)
OriP FR
OriP
OriP DS
repetición 72 bp
repetición 72 bp
promotor SV40 y origen
TATA
origen SV40
higromicina-B-fosfotransferasa
señal de poliadenilación temprana SV40 acortada
repetición 72 bp
TATA
promotor SV40 y origen
GFP
señal de poliadenilación temprana SV40 acortada
origen
origen pUC
gen de resistencia a ampicilina

Fig. 5

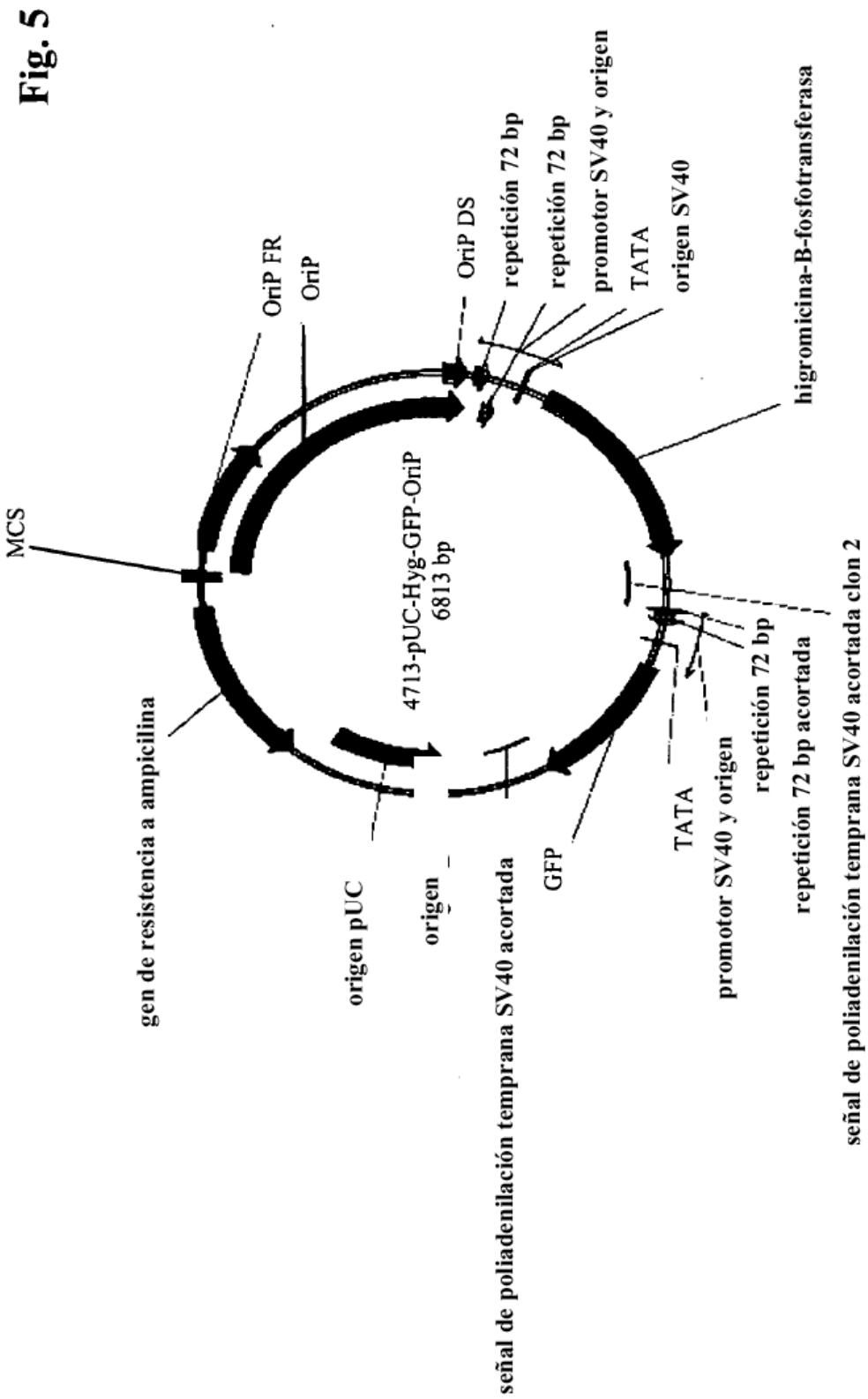

MCS
gen de resistencia a ampicilina
origen pUC
origen
señal de poliadenilación temprana SV40 acortada
GFP
TATA
promotor SV40 y origen
repetición 72 bp
repetición 72 bp acortada
señal de poliadenilación temprana SV40 acortada clon 2
higromicina-B-fosfotransferasa
origen SV40
TATA
promotor SV40 y origen
repetición 72 bp
repetición 72 bp
OriP DS
OriP
OriP FR
4713-pUC-Hyg-GFP-OriP
6813 bp

Fig. 6

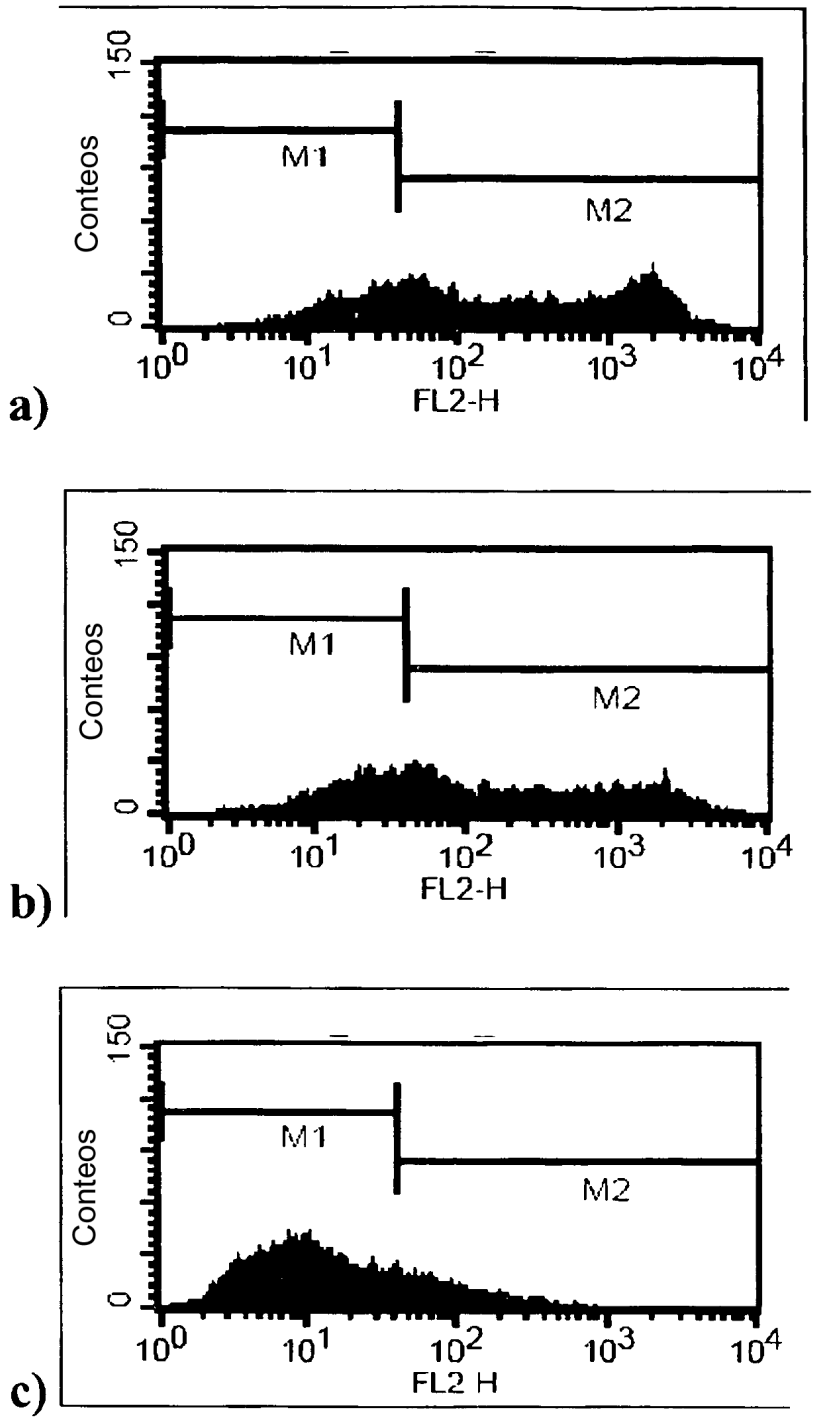
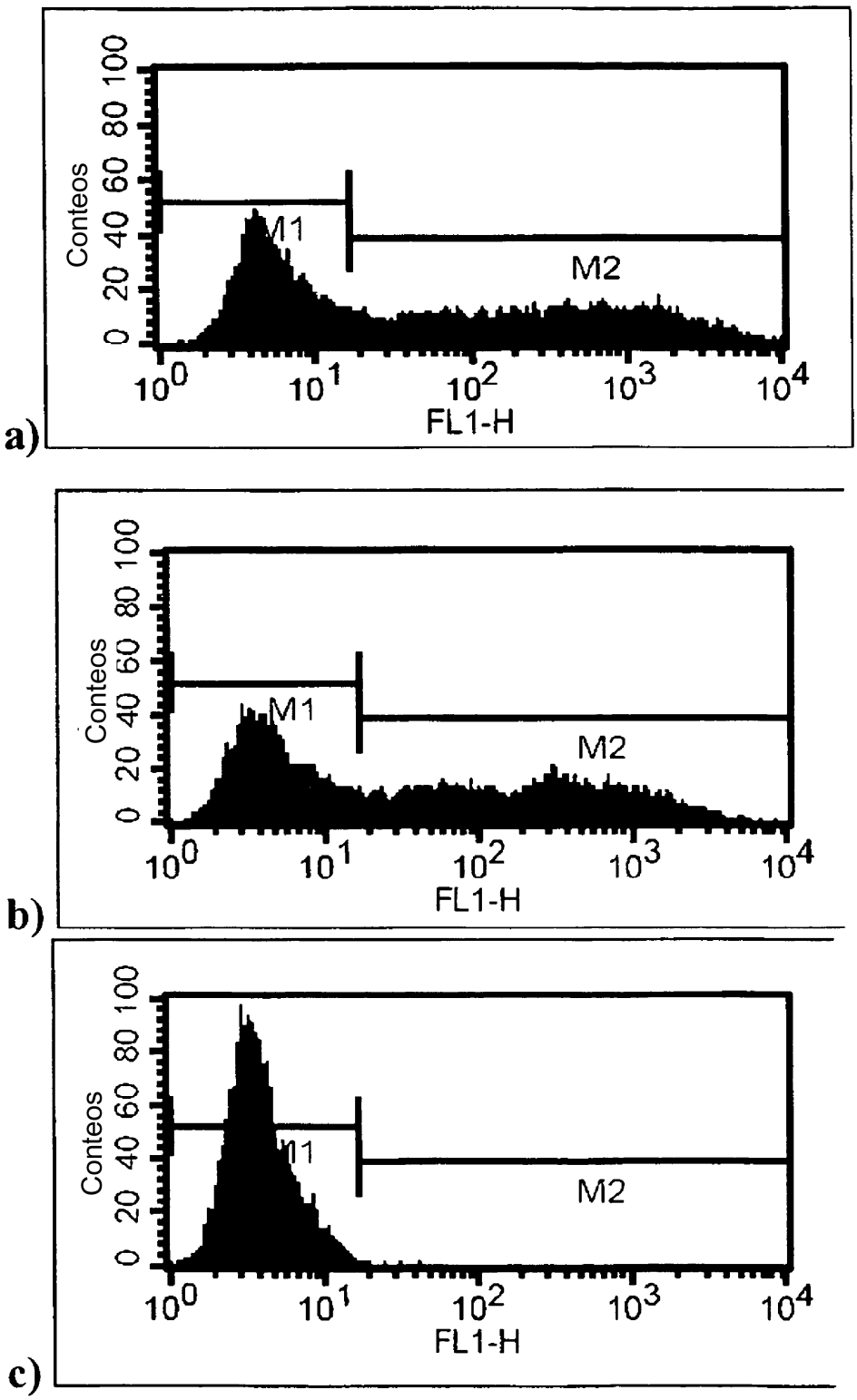

a)
150
Conteos
0
M1
M2
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
FL2-H
b)
150
Conteos
0
M1
M2
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
FL2-H
c)
150
Conteos
0
M1
M2
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
FL2 H

Fig. 7


a)
Conteos
0 20 40 60 80 100
M1
M2
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4
FL1-H
b)
Conteos
0 20 40 60 80 100
M1
M2
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4
FL1-H
c)
Conteos
0 20 40 60 80 100
M1
M2
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4
FL1-H