

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 296**

51 Int. Cl.:
C12N 15/79 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09013246 .5**
96 Fecha de presentación: **04.05.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **2141238**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.01.2010**

54 Título: **Plásmidos vectores de clonación de ADN y procedimientos para su uso**

30 Prioridad:
09.10.2003 US 682764

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.07.2012

73 Titular/es:
**Intrexon Corporation
1872 Pratt Drive, Suite 1400
Blacksburg, VA 24060, US**

72 Inventor/es:
Reed, Thomas D.

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 384 296 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

Plásmidos vectores de clonación de ADN y procedimientos para su uso.

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de los plásmidos vectores de clonación y al uso de plásmidos vectores de clonación para construir constructos de ADN o transgenes.

Antecedentes de la invención

El fundamento de la biología molecular es la tecnología de ADN recombinante, que en el presente documento se puede resumir como la modificación y la propagación de ácidos nucleicos con el propósito de estudiar la estructura y la función de los ácidos nucleicos y sus productos proteicos.

10 Los genes individuales, las regiones reguladoras génicas, las subpoblaciones de genes y, de hecho, los cromosomas enteros dentro de los que están contenidos los anteriores, están todos ellos compuestos por secuencias de nucleótidos bicatenarias antiparalelas que convencionalmente se identifican por las iniciales A, T, G y C. Estas secuencias de ADN, así como las secuencias de ADNc derivadas de las moléculas de ARNm, pueden fragmentarse en fragmentos distintos, aislarse e insertarse en un vector, tal como un plásmido bacteriano, para estudiar los productos génicos. Un plásmido es una pieza de ADN extracromosómico derivado originalmente de bacterias y que se puede manipular y reintroducir en una bacteria huésped con el propósito de estudiar o producir un producto génico. El ADN de un plásmido es similar a todo el ADN cromosómico en cuanto a que está compuesto por los mismos nucleótidos A, T, G y C que codifican genes y regiones reguladoras de los genes, no obstante, es una molécula relativamente pequeña compuesta por menos de aproximadamente 30.000 pares de bases o 30 kilobases (kb). Además, los pares de bases nucleotídicos de un plásmido bicatenario forma una molécula circular, lo que también distingue al ADN del plásmido del ADN cromosómico.

25 Los plásmidos potencian el rápido intercambio de material genético entre organismos bacterianos y permiten la adaptación rápida a los cambios ambientales, tales como temperatura, suministro de alimentos u otros retos. Cualquier plásmido adquirido debe expresar un gen o genes que contribuyan a la supervivencia del huésped o, de lo contrario, el organismo lo destruirá o desechará, dado que el mantenimiento de plásmidos innecesarios sería un uso derrochador de los recursos. Una población clonal de células contiene material genético idéntico, incluidos todos los plásmidos que podría alojar. El uso de un plásmido vector de clonación con un inserto de ADN en tal población clonal de las células huésped amplificará la cantidad disponible del ADN de interés. El ADN clonado de este modo se puede aislar y recuperar para su posterior manipulación en las etapas requeridas para construir un constructo de ADN. Por tanto, se puede apreciar que los plásmidos vectores de clonación son herramientas útiles en el estudio de la función génica.

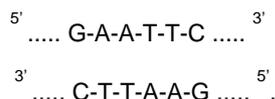
30 Mientras que algunos elementos encontrados en los plásmidos son naturales, otros se han producido mediante ingeniería para potenciar la utilidad de los plásmidos como vectores de ADN. Estos incluyen genes de resistencia a antibióticos o a sustancias químicas y un sitio de clonación múltiple (MCS) entre otros. Cada uno de estos elementos tiene un papel en la presente invención, así como en la técnica anterior. La descripción del papel que desempeña cada elemento destacará las limitaciones y demostrará la utilidad de la presente invención.

35 Un gen de transmisión plasmídica particularmente útil que puede adquirir un huésped es uno que conferiría resistencia a antibióticos. En la práctica diaria de la tecnología del ADN recombinante, los genes de resistencia a antibióticos se explotan como elementos de selección positiva o negativa que potencian preferentemente el cultivo y la amplificación del plásmido deseado sobre los de los otros plásmidos.

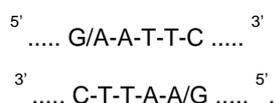
40 Con el fin de que pueda ser mantenido por un huésped bacteriano, un plásmido también debe contener un segmento de secuencias que dirigen al huésped a duplicar el plásmido. Las secuencias conocidas como el elemento origen de replicación (ORI) dirigen al huésped para usar sus enzimas celulares para hacer copias del plásmido. Cuando tal bacteria se divide, cada una de las células hijas conservará una copia o copias de cualquiera de dichos plásmidos. Ciertas cepas de la bacteria E. coli se han derivado para maximizar esta duplicación de modo que se producen más de 300 copias por bacteria. De este modo, se puede potenciar el cultivo de un plásmido deseado.

45 Otro elemento esencial en cualquier vector de clonación es una localización para la inserción de los materiales genéticos de interés. Este es un elemento sintético que se ha sometido a ingeniería dentro de plásmidos "salvajes", de modo que se confiere utilidad como vector de clonación. Todo plásmido vector de clonación típico disponible comercialmente contiene al menos una de estas regiones, conocida como sitio de clonación múltiple (MCS). Un MCS normalmente comprende secuencias nucleotídicas que pueden fragmentarse por la acción de una sola o de

una serie de enzimas endonucleasas de restricción (en lo sucesivo denominadas "enzimas de restricción"), cada una de ellas tiene una secuencia de reconocimiento y un patrón de escisión distintos. Las denominadas secuencias de reconocimiento (que se denominan "sitios" de la enzima de restricción) codificadas en la molécula de ADN comprenden una secuencia palindrómica bicatenaria. Para algunas enzimas de restricción, bastan con sólo 4-6 nucleótidos para proporcionar un sitio de restricción, mientras que algunas enzimas de restricción requieren una secuencia de 8 o más nucleótidos. Por ejemplo, la enzima EcoR1 reconoce la secuencia hexanucleotídica; ^{5'} G-A-A-T-T-C ^{3'}, en la que 5' indica el extremo de la molécula conocido por consenso como el extremo "anterior" y, asimismo, 3' indica el extremo "posterior". La hebra complementaria de la secuencia de reconocimiento sería su hebra antiparalela, ^{3'} G-A-A-T-T-C ^{5'}. Por tanto, el sitio de reconocimiento de doble cadena puede estar representado dentro de la molécula bicatenaria más grande en la que aparece como:



Como muchas otras enzimas de restricción, EcoR1 no fragmenta exactamente en el eje de la simetría de la díada, sino en posiciones alejadas cuatro nucleótidos en las dos hebras de ADN entre los nucleótidos indicados por una "/".



de modo que la molécula de ADN bicatenaria se fragmenta y tiene la configuración resultante de nucleótidos en los "extremos" recién formados:



Esta fragmentación escalonada proporciona fragmentos de ADN con términos 5' protruyentes. Dado que los pares A-T y G-C se forman de modo espontáneo cuando están cercanos, los extremos que protruyen como estos se denominan extremos cohesivos o adhesivos. Uno cualquiera de estos extremos puede formar puentes de hidrógeno con cualquier otro extremo complementario fragmentado con la misma enzima de restricción. Dado que cualquier ADN que contiene una secuencia de reconocimiento específico se cortará del mismo modo que cualquier otro ADN que contiene la misma secuencia, los extremos escindidos serán complementarios. Por tanto, los extremos de cualquier molécula de ADN cortada con la misma enzima de restricción "coinciden" entre sí del mismo modo que piezas adyacentes de un puzzle "coinciden", y pueden unirse enzimáticamente. Es esta propiedad la que permite la formación de moléculas de ADN recombinantes y permite la introducción de fragmentos de ADN extraño en los plásmidos bacterianos o en cualquier otra molécula de ADN.

Otro principio general que se debe considerar al construir moléculas de ADN recombinante es que todos los sitios de restricción que se encuentren dentro de una molécula se cortarán con una enzima de restricción concreta, no sólo el sitio de interés. Cuanto más grande es una molécula de ADN, mayor es la probabilidad de que vuelva a aparecer cualquier sitio de restricción. Suponiendo que todos los sitios de restricción se distribuyen de forma aleatoria a lo largo de una molécula de ADN aparecerá un sitio tetranucleotídico, de media, una vez cada 4^4 (es decir, 256) nucleótidos, mientras que un sitio hexanucleotídico aparecerá una vez dada 4^6 (es decir, 4096) nucleótidos, y los sitios octanucleotídicos aparecerán una vez dada 4^8 (es decir, 114.688) nucleótidos. Por tanto, se puede apreciar con facilidad que las secuencias de reconocimiento más cortas aparecerán con frecuencia, mientras que las más largas aparecerán rara vez. Al planificar la construcción de un transgen u otra molécula de ADN recombinante, éste es un tema vital, ya que tal proyecto con frecuencia requiere el ensamblaje de varias piezas de ADN de varios tamaños. Cuanto más grandes son estas piezas, mayor es la probabilidad de que los sitios que se desean usar aparezcan en varias piezas de los componentes de ADN, lo que dificulta la manipulación, como mucho.

En la presente memoria descriptiva, las enzimas de restricción frecuentes se denominan enzimas de restricción habituales y sus secuencias análogas se denominan sitios de restricción habituales. Las enzimas de restricción con secuencias análogas superiores a 6 nucleótidos se denominan enzimas de restricción raras y sus sitios análogos sitios de restricción raros. Por tanto, las designaciones "raros" y "habituales" no se refieren a la abundancia o disponibilidad relativa de una enzima de restricción concreta, sino a la frecuencia de aparición de la secuencia de nucleótidos que constituyen su sitio de reconocimiento análogo dentro de cualquier molécula de ADN o fragmento

aislado de una molécula de ADN o cualquier gen o su secuencia de ADN.

Recientemente se ha aislado una segunda clase de enzimas endonucleasas de restricción denominadas enzimas endonucleasas de anidación (HE). Las enzimas HE tienen grandes sitios de reconocimiento asimétricos (12-40 pares de bases). Los sitios de reconocimiento de las HE son extremadamente raros. Por ejemplo, el HE conocido como I-SceI tiene un sitio de reconocimiento de 18 pb (5'...TAGGGATAACAGGGTAAT ...3'), que se ha previsto que sólo aparezca una vez cada 7×10^{10} pares de bases de secuencia aleatoria. Este índice de aparición es equivalente a sólo un sitio en 20 genomas del tamaño del de los mamíferos. La rara naturaleza de los sitios HE incrementa considerablemente la probabilidad de que un ingeniero genético pueda cortar un producto transgénico final sin alterar la integridad del transgen si los sitios HE estuvieran incluidos en localizaciones adecuadas en un plásmido vector de clonación.

Dado que una molécula de ADN de cualquier organismo fuente se cortará de forma idéntica mediante su enzima de restricción análoga, las piezas de ADN extraño de cualquier especie se pueden cortar con una enzima de restricción, insertada en un plásmido vector bacteriano fragmentado con la misma enzima de restricción un amplificado en una célula huésped adecuada. Por ejemplo, un gen humano puede cortarse por 2 sitios con EcoR1, aislarse el fragmento con los extremos EcoR1 y mezclarse con un plásmido que también se cortó con EcoR1 en lo que se conoce habitualmente como reacción de ligación o mezcla de ligación. En las condiciones adecuadas en la mezcla de ligación, algunos de los fragmentos génicos humanos aislados coincidirán con los extremos de las moléculas de plásmido. Estos extremos recientemente unidos se pueden unir y recircularizar enzimáticamente el plásmido, que ahora contiene su nuevo inserto de ADN. Después, la mezcla de ligación se introduce en *E. coli* u otro huésped adecuado, y los plásmidos recién sometidos a ingeniería se amplificarán a medida que la bacteria se divide. De este modo se puede obtener un número relativamente grande de copias del gen humano y se puede recolectar de la bacteria. Estas copias de genes se pueden manipular adicionalmente con el propósito de investigación, análisis o producción de su producto génico proteico.

La tecnología de ADN recombinante con frecuencia se enmarca en la generación de los denominados "transgenes". Los transgenes con frecuencia comprenden una variedad de materiales genéticos que derivan de uno o más organismos donantes y se introducen en un organismo huésped. Normalmente, un transgen se construye usando un vector de clonación como el punto de partida o "estructura" del proyecto y se planifica una serie de complejas etapas de clonación para ensamblar el producto final dentro de dicho vector. Los elementos de un transgen, que comprende secuencias nucleotídicas, incluyen, entre otros 1) promotor regulador y/o elementos de potenciación, 2) un gen que se expresará como una molécula de ARNm, 3) elementos de ADN que proporcionan estabilización del mensaje del ARNm, 4) secuencias nucleotídicas que simulan regiones génicas intrónicas de mamífero, y 5) señales para el procesamiento del ARNm, tal como la cola de poli-A que se añade al extremo de los ARNm naturales. En algunos casos, un diseño experimental puede requerir la adición de señales de localización para proporcionar transporte al producto génico a una localización subcelular concreta. Cada uno de estos elementos es un fragmento de una molécula de ADN más grande que se ha cortado de un genoma donante o, en algunos casos, sintetizarse en un laboratorio. Cada pieza está ensamblada con las otras en un orden preciso y orientación 5'-3' en un plásmido vector de clonación.

El promotor de cualquier gen se puede aislar como un fragmento de ADN y colocarse dentro de una molécula sintética, tal como un plásmido, para dirigir la expresión de un gen deseado, suponiendo que se pueden proporcionar las condiciones necesarias para la estimulación del promotor de interés. Por ejemplo, las secuencias promotoras del gen de la insulina se pueden aislar, introducir en un plásmido vector de clonación junto con un gen indicador y usarse para estudiar las condiciones requeridas para la expresión del gen de la insulina en un tipo celular adecuado. Como alternativa, el promotor del gen de la insulina puede unirse con la secuencia codificadora de la proteína de cualquier gen de interés en un plásmido vector de clonación y usarse para dirigir la expresión del gen de interés en células que expresan insulina, suponiendo que todos los elementos necesarios están presentes dentro del transgen de ADN construido de este modo.

Un gen indicador es un componente particularmente útil de algunos tipos de transgenes. Un gen indicador comprende secuencias nucleotídicas que codifican una proteína que se expresará bajo la dirección de un promotor concreto de interés al que está unido en un transgen, lo que proporciona una respuesta bioquímica medible de la actividad promotora. Normalmente, un gen indicador es fácil de detectar o medir frente al fondo de proteínas celulares endógenas. Genes indicadores de uso habitual incluyen, entre otros, los de LacZ, proteína fluorescente verde y luciferasa, y otros genes indicadores, muchos de los cuales son bien conocidos para los expertos en la técnica.

En los genomas bacterianos no hay intrones, pero se requieren para la formación adecuada de moléculas de ARNm en las células de mamífero. Por tanto, cualquier constructo de ADN para usar en sistemas de mamíferos debe tener al menos un intrón. Los intrones pueden aislarse a partir de cualquier gen de mamífero e insertarse en un

constructo de ADN, junto con las señales de corte y empalme adecuadas que permiten que las células de mamífero escindan el intrón y realicen el corte y empalme de los extremos restantes del ARNm.

5 Un elemento de estabilización del ARNm es una secuencia de ADN que es reconocida por las proteínas de unión que protegen a algunos ARNm de la degradación. La inclusión de un elemento de estabilización de ARNm con frecuencia potenciará el nivel de expresión génica con respecto al ARNm en algunos tipos de células de mamífero y, por tanto, puede ser útil en algunos constructos de ADN o transgenes. Un elemento de estabilización de ARNm se puede aislar a partir de ADN o ARN natural o producirse de forma sintética para su inclusión en un constructo de ADN.

10 Una señal de localización es una secuencia de ADN que codifica una señal proteica para la ruta subcelular de una proteína de interés. Por ejemplo, una señal de localización nuclear dirigirá una proteína al núcleo; una señal de localización en la membrana plasmática la dirigirá a la membrana plasmática, etc. Por tanto, una señal de localización se puede incorporar en un constructo de ADN para estimular la translocación de su producto proteico a la localización subcelular deseada.

15 Una secuencia marcadora puede estar codificada en un constructo de ADN de modo que el producto proteico tenga una región única unida. Esta región única sirve como marcador proteico que puede distinguirla de su homóloga endógena. Como alternativa, puede servir como identificador que se puede detectar mediante una amplia variedad de técnicas bien conocidas en la técnica, incluidas, entre otras, RT-PCR, inmunohistoquímica o hibridación in situ.

20 Con un transgen complejo, o con uno que incluya regiones de ADN particularmente grandes, hay una mayor probabilidad de que haya múltiples sitios de reconocimiento en estas piezas de ADN. Recuérdese que las secuencias de reconocimiento que codifican un sitio hexanucleotídico cualquiera aparecen cada 4096 pb. Si una secuencia promotora tiene 3000 pb y un gen de interés de 1500 pb se debe ensamblar en un vector de clonación de 3000 pb, es estadísticamente muy probable que muchos sitios de 6 o menos nucleótidos no sean útiles, ya que todos los sitios que se pueden usar deben aparecer en sólo dos de las piezas. Además, los sitios deben aparecer en las áreas adecuadas de las moléculas adecuadas que se deben ensamblar. Además, la mayoría de los proyectos de clonación necesitarán la adición de elementos de ADN adicionales, de modo que se incrementa la complejidad de la molécula en crecimiento y la probabilidad de repetición inoportuna de cualquier sitio concreto. Dado que cualquier enzima de restricción cortará en todos sus sitios en una molécula, si reaparece un sitio de enzima de restricción se cortarán todos los sitios inoportunos junto con los sitios deseados, lo que altera la integridad de la molécula. Por tanto, cada etapa de clonación debe planearse cuidadosamente de modo que no rompa la molécula en crecimiento al cortarla con una enzima de restricción que ya se ha usado para incorporar un elemento precedente. Y, por último, cuando un investigador desea introducir un transgen completo en un organismo de mamífero, el constructo del transgen completamente ensamblado con frecuencia debe linealizarse en un sitio de restricción único en al menos un extremo del transgen, de modo que se requiere otro sitio único más que no se encuentra en ningún otro lugar en el constructo. Dado que la mayoría de los constructos de ADN están diseñados para un propósito sencillo, se ha prestado poca atención a cualquier modificación futura que podría necesitar hacerse, lo que incrementa aún más la dificultad para cambios experimentales futuros.

40 Por ejemplo, Goderis y col. (Plant Molecular Biology 50: 17-27, 2002) se refiere a un conjunto de vectores realizado para la construcción de vectores de transformación vegetales mediados por *Agrobacterium* que contienen múltiples casetes de expresión y/u otros elementos, tales como regiones de fijación a la matriz. Este conjunto de vectores comprende un vector binario que tiene un sitio de clonación múltiple constituido por 13 sitios de restricción hexanucleotídicos, 6 sitios de restricción octanucleotídicos y 5 sitios para endonucleasas de anidación, y un conjunto de vectores auxiliares que permiten el ensamblaje de los casetes de expresión flanqueados por los sitios para las endonucleasas de anidación. Los casetes de expresión unidos en los vectores auxiliares se pueden transferir al vector binario.

45 Tradicionalmente, el diseño y la construcción del transgen consumen cantidades significativas de tiempo y energía por varios motivos, incluidos los siguientes:

50 1. Hay una amplia variedad de enzimas de restricción y de HE disponibles que generarán una serie de extremos, no obstante, la mayoría de ellos no son compatibles entre sí. Muchas enzimas de restricción, como la EcoR1, generan fragmentos de ADN con extremos 5' cohesivos protruyentes o "colas"; otras (p. ej., Pst1) generan fragmentos con colas protruyentes en 3', mientras que otras más (p. ej., Ball) fragmentan por el eje de simetría para producir fragmentos con extremos romos. Algunas de éstos serán compatibles con los extremos formados mediante escisión con otras enzimas de restricción y HE, pero la mayoría de los útiles no lo serán. Los extremos que se pueden generar con el aislamiento de cada aislamiento de fragmento de ADN deben considerarse cuidadosamente en el diseño de un constructo de ADN.

55 2. Los fragmentos de ADN necesarios para ensamblar un constructo de ADN o transgen deben aislarse primero de

5 sus genomas fuente, introducirse en plásmidos vectores de clonación y amplificarse para obtener cantidades útiles. La etapa se puede realizar usando cualquier número de vectores de clonación disponibles comercialmente o alterados de forma individual. Cada uno de los plásmidos vectores de clonación diferentes disponibles comercialmente se desarrollaron, en su mayor parte, de forma independiente y, por tanto, contienen diferentes
 10 secuencias y sitios de restricción para los fragmentos de ADN de los genes o elementos génicos de interés. Por tanto, los genes deben ajustarse individualmente para adaptar cada uno de estos vectores según sea necesario para cualquier conjunto dado de experimentos. Con frecuencia se necesitará alterar adicionalmente los mismos fragmentos de ADN con frecuencia para los experimentos posteriores o su clonación en otras combinaciones para nuevos constructos de ADN o transgenes. Dado que cada constructo de ADN o transgen está fabricado a medida
 15 para una aplicación concreta sin pensar o conocer cómo se usará a continuación, con frecuencia se debe "retroajustar" para las aplicaciones siguientes.

3. Además, la secuencia de ADN de cualquier gen o elemento genético dado varía y puede contener sitios de restricción internos que la convierten en incompatible con los vectores disponibles en la actualidad, de modo que se complica la manipulación. Esto es especialmente cierto cuando se ensamblan varios fragmentos de ADN en un
 20 único constructo de ADN o transgen.

Por tanto, existe la necesidad de un sistema que permita al usuario ensamblar rápidamente una serie de fragmentos de ADN en una molécula, a pesar de la redundancia de los sitios de restricción encontrados en los extremos y dentro de los fragmentos de ADN. Dicho sistema podría también proporcionar un simple medio para alterar rápidamente los extremos de los fragmentos, de modo que a ellos se añaden otras secuencias de
 25 restricción. La inclusión de pares únicos u opuestos de sitios de restricción para HE potenciaría la probabilidad de tener sitios únicos para la clonación. Un sistema que también permitiría la fácil sustitución o eliminación de uno o más de los fragmentos, añadiría un nivel de versatilidad actualmente no disponible a los usuarios. Por tanto, un "sistema modular", que permita insertar o eliminar fragmentos de ADN dentro o fuera de las regiones "casete", flanqueadas por sitios de restricción raros dentro del vector de clonación, sería especialmente útil y bienvenido al campo de la tecnología de ADN recombinante.

Breve resumen de la invención

La presente invención se refiere a un plásmido vector de clonación, en el que los elementos secuencias que codifican una estructura molecular comprenden: Tres sitios de restricción habituales únicos y no variables, un sitio
 30 cebador oligonucleotídico en 5', un sitio de endonucleasas de anidación único en orientación directa, un par de sitios de restricción habituales, únicos y no variables flanqueando secuencias nucleotídicas aleatorias, una agrupación fija de sitios de restricción raros no variables, que definen una porción 5' de un módulo promotor, secuencias nucleotídicas aleatorias, una agrupación fija de sitios de restricción raros no variables que definen una
 35 unión compartida entre una posición en 3' relativa al módulo promotor/intrón, y una posición en 5' relativa a un módulo de expresión, secuencias nucleotídicas aleatorias, una agrupación fija de sitios de restricción raros no variables que definen una unión de una posición en 3' relativa al módulo de expresión, y una posición en 5' relativa a un módulo de regulación en 3', secuencias nucleotídicas aleatorias, una agrupación fija de sitios de restricción raros no variables que definen una posición en 3' relativa a un módulo de regulación en 3', un par de sitios de restricción habituales únicos y no variables que flanquean secuencias nucleotídicas aleatorias, un sitio de
 40 endonucleasas de anidación único de orientación opuesta, que es el mismo sitio de endonucleasas de anidación que el situado en 3' del sitio cebador oligonucleotídico en 5', un sitio cebador oligonucleotídico en 3' de orientación opuesta, y cuatro sitios de restricción habituales únicos y no variables que definen un sitio de inserción en 3'.

Breve descripción de las figuras

La FIGURA 1 es un mapa lineal del concepto modular de la invención.

La FIGURA 2 es un mapa del plásmido de acoplamiento.

45 La FIGURA 3 es un mapa de restricción lineal que ilustra un ejemplo de sitios de enzimas de restricción que se pueden incluir en el MCS del plásmido de acoplamiento.

La FIGURA 4 es un mapa del plásmido de acoplamiento primario no reivindicado.

La FIGURA 5 es un mapa de restricción lineal que ilustra un ejemplo de sitios de enzimas de restricción que se pueden incluir en el MCS del plásmido de acoplamiento primario no reivindicado.

50 La FIGURA 6 es un mapa del plásmido vector lanzadera P no reivindicado (SVP).

La FIGURA 7 es un mapa del sitio de restricción lineal que ilustra un ejemplo de sitios de enzimas de restricción que se pueden incluir en el MCS del SVP no reivindicado.

La FIGURA 8 es un mapa del plásmido vector lanzadera E no reivindicado (SVE).

La FIGURA 9 es un mapa del sitio de restricción lineal que ilustra un ejemplo de sitios de enzimas de restricción que se pueden incluir en el MCS del SVE no reivindicado.

La FIGURA 10 es un mapa del vector lanzadera 3' no reivindicado (SV3).

- 5 La FIGURA 11 es un mapa del sitio de restricción lineal que ilustra un ejemplo de sitios de enzimas de restricción que se pueden incluir en el MCS del SV3 no reivindicado.

Breve descripción de los listados de secuencia

La SEC ID 01 es un ejemplo de una secuencia nucleotídica para un MCS del plásmido de acoplamiento PE3 .

La SEC ID 02 es un ejemplo de una secuencia nucleotídica para un plásmido de acoplamiento PE3 .

- 10 La SEC ID 03 es un ejemplo de una secuencia nucleotídica para un MCS del plásmido de acoplamiento primario no reivindicado.

La SEC ID 04 es un ejemplo de una secuencia nucleotídica para un plásmido de acoplamiento primario no reivindicado.

La SEC ID 05 es un ejemplo de una secuencia nucleotídica para un MCS del plásmido SVP no reivindicado.

- 15 La SEC ID 06 es un ejemplo de una secuencia nucleotídica para un plásmido SVP no reivindicado.

La SEC ID 07 es un ejemplo de una secuencia nucleotídica para un MCS del plásmido SVE no reivindicado.

La SEC ID 08 es un ejemplo de una secuencia nucleotídica para un plásmido SVE no reivindicado.

La SEC ID 09 es un ejemplo de una secuencia nucleotídica para un MCS del plásmido SV3 no reivindicado.

La SEC ID 10 es un ejemplo de una secuencia nucleotídica para un plásmido SV3 no reivindicado.

- 20 **Definiciones de términos usados para describir la invención**

Como se usa en la presente memoria descriptiva, las expresiones “vector de clonación” y “plásmido vector de clonación” se usan de forma intercambiable para hacer referencia a una molécula de ADN circular que contiene, como mínimo, un origen de replicación, un medio para la selección positiva de las células huésped que alojan el plásmido, tal como un gen de resistencia a antibióticos; y un sitio de clonación múltiple.

- 25 Como se usa en la presente memoria descriptiva, la expresión “Origen de Replicación” (ORI) se refiere a secuencias nucleotídicas que dirigen la replicación o duplicación de un plásmido dentro de una célula huésped.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, la expresión “Sitio de clonación múltiple” hace referencia a secuencias nucleotídicas que comprenden sitios de restricción con el propósito de clonar fragmentos de ADN en un plásmido vector de clonación.

- 30 Como se usa en la presente memoria descriptiva, la expresión “clonación” se refiere al procedimiento de ligar una molécula de ADN en un plásmido y transferirla a una célula huésped adecuada para su duplicación durante la propagación del huésped.

- 35 Como se usa en la presente memoria descriptiva, la expresión “constructo de ADN” se refiere a una molécula de ADN sintetizada mediante etapas consecutivas de clonación dentro de un plásmido vector de clonación y normalmente se usa para dirigir la expresión génica en cualquier célula huésped adecuada, tal como células cultivadas *in vitro* o un ratón transgénico *in vivo*. También se puede hacer referencia a un transgen usado para fabricar dicho ratón como un constructo de ADN, especialmente durante el periodo de tiempo cuando se diseña y sintetiza el transgen.

- 40 Como se usa en la presente memoria descriptiva, la expresión “vector lanzadera” se refiere a un vector de clonación plasmídica especializado usado en la invención para fabricar una molécula intermedia que modifique los extremos de un fragmento de ADN.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, la expresión “plásmido de acoplamiento” se refiere a un plásmido vector de clonación especializado usado en la invención para ensamblar fragmentos de ADN en un constructo de ADN.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, las expresiones “endonucleasa de restricción” o “enzima de restricción” se refieren a un miembro o miembros de una clasificación de moléculas catalíticas que se unen a una secuencia análoga de ADN y escinden la molécula de ADN en una localización precisa dentro de dicha secuencia.

5 Como se usa en la presente memoria descriptiva, las expresiones “secuencia análoga” o “secuencias análogas” se refieren a la serie mínima de nucleótidos requerida para que una enzima de restricción se una a, y escinda, una molécula de ADN o gen.

10 Como se usa en la presente memoria descriptiva, la expresión “fragmento de ADN” se refiere a cualquier molécula de ADN aislada, incluidos, entre otros, una secuencia codificadora de proteínas, un gen indicador, un promotor, un potenciador, un intrón, un exón, una cola de poli-A, un sitio de clonación múltiple, una señal de localización nuclear o una señal de estabilización de ARNm, o cualquier otra molécula de ADN natural o sintética. Como alternativa, un fragmento de ADN puede tener un origen completamente sintético, producido *in vitro*. Además, un fragmento de ADN puede comprender cualquier combinación de fragmentos aislados naturales o sintéticos.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, las expresiones “promotor génico” o “promotor” (P) se refieren a una secuencia nucleotídica requerida para la expresión de un gen.

15 Como se usa en la presente memoria descriptiva, la expresión “región potenciadora” se refiere a una secuencia nucleotídica que no se requiere para la expresión de un gen diana pero que incrementará el nivel de expresión génica en las condiciones adecuadas.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, la expresión “gen indicador” se refiere a una secuencia nucleotídica que codifica una proteína útil para monitorizar la actividad de un promotor de interés concreto.

20 Como se usa en la presente memoria descriptiva, la expresión “dominio de modificación de cromatina” (CMD) se refiere a secuencias nucleotídicas que interactúan con una variedad de proteínas asociadas con mantener y/o alterar la estructura de la cromatina.

25 Como se usa en la presente memoria descriptiva, la expresión “cola de poliA” se refiere a una secuencia de nucleótidos de adenina (A) que normalmente se encuentran en el extremo de moléculas de AD” mensajero (ARNm). Una señal de cola de poliA se incorpora en los extremos 3' de los constructos de ADN o transgenes para facilitar la expresión del gen de interés.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, la expresión “intrón” se refiere a las secuencias nucleotídicas de una región no codificadora de proteínas de un gen que se encuentra entre dos regiones codificadoras de proteínas o exones.

30 Como se usa en la presente memoria descriptiva, la expresión “región no traducida” (UTR) se refiere a secuencias nucleotídicas que abarcan la región no codificadora de proteínas de una molécula de ARNm. Estas regiones no traducidas pueden residir en el extremo 5' (5' UTR) o el extremo 3' (3' UTR) de una molécula de ARNm.

35 Como se usa en la presente memoria descriptiva, la expresión “elemento de estabilización del ARNm” se refiere a una secuencia de ADN que es reconocida por las proteínas de unión que se piensa que protegen a algunos ARNm de la degradación.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, la expresión “señal de localización” (LOC) se refiere a secuencias nucleotídicas que codifican una señal para la ruta subcelular de una proteína de interés.

40 Como se usa en la presente memoria descriptiva, la expresión “secuencia marcadora” (TAG) se refiere a secuencias nucleotídicas que codifican una región proteica única que permite su detección o, en algunos casos, que se distinga de cualquier homóloga endógena.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, la expresión “sitio cebador” se refiere a secuencias nucleotídicas que sirven como moldes de ADN sobre los que los oligonucleótidos de ADN monocatenario se pueden hibridar con el fin de iniciar secuenciación de ADN, amplificación por PCR y/o transcripción de ARN.

45 Como se usa en la presente memoria descriptiva, la expresión “gen selector de la expresión génica en el huésped” (GEH-S) se refiere a un elemento genético que puede conferir resistencia o toxicidad a las células u organismos cuando se tratan con un antibiótico o sustancia química adecuado.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, la expresión “brazo de recombinación” se refiere a secuencias nucleotídicas que facilitan la recombinación homóloga entre ADN transgénico y ADN genómico. El éxito de la recombinación requiere la presencia de un brazo de recombinación izquierdo (LRA) y un brazo de recombinación

derecho (RRA) que flanquean una región de ADN transgénico que se va a incorporar en un genoma huésped mediante recombinación homóloga.

5 Como se usa en la presente memoria descriptiva, la expresión "pUC19" se refiere a un plásmido vector de clonación bien conocido para los expertos en la técnica y se puede encontrar en la base de datos NCBI Genbank con el número de registro L09137.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, la expresión "secuencias nucleotídicas aleatorias" se refiere a cualquier combinación de secuencias nucleotídicas que no duplican secuencias que codifican otros elementos especificados como componentes de la misma molécula.

10 Como se usa en la presente memoria descriptiva, la expresión "único" se refiere a cualquier sitio de endonucleasa de restricción o de endonucleasa de anidación que no se encuentran en ningún otro lugar dentro de una molécula de ADN.

Descripción detallada de la invención

15 La presente invención es un grupo de vectores de clonación optimizados para reducir la cantidad de manipulación necesaria con frecuencia para ensamblar una variedad de fragmentos de ADN en un constructo de ADN o transgen *de novo*. El vector primario, en la presente memoria descriptiva denominado plásmido de acoplamiento, contiene un sitio de clonación múltiple (MCS) con 3 grupos de sitios de restricción raros y/o de endonucleasas de anidación dispuestos en un patrón lineal. Esta disposición define una arquitectura molecular que permite al usuario ensamblar múltiples insertos en un único constructo de transgen sin alterar la integridad de los elementos de ADN ya incorporados en el plásmido de acoplamiento en etapas de clonación previas.

20 Dos sitios de reconocimiento para al menos tres endonucleasas de anidación están colocados en orientación opuesta para flanquear tres regiones modulares con el fin de crear un sitio aceptor de casete génico que no puede autohibridar. Dado que los sitios de endonucleasas de anidación son asimétricos y no palindrómicos, es posible generar colas cohesivas protruyentes en 3' no complementarias introduciendo dos sitios de reconocimiento para endonucleasas de anidación en orientación opuesta. Por tanto, la endonucleasa de anidación I-SceI corta su sitio de reconocimiento análogo indicado por "/".

5'...TAGGGATAA / CAGGGTAAAT...3',

3'...ATCCC / TATTGTCCCATTA...5'.

La colocación inversa de un segundo sitio dentro de un MCS generaría dos colas protruyentes cohesivas no complementarias:

30 5'...TAGGGATAA CCCTA...3'

3'...ATCCC AATAGGGAT...5'

35 Esto es particularmente útil cuando es necesario subclonar transgenes más grandes en un vector. Debido al tamaño del inserto, es termodinámicamente más favorable que un vector se autohibride en lugar de aceptar un inserto grande. La presencia de colas no complementarias generadas por esta colocación de sitios de restricción proporciona fuerzas químicas que contrarrestan la inclinación termodinámica para la autoligación.

40 La naturaleza asimétrica de la mayoría de las colas protruyentes de endonucleasas de anidación también crea una potente herramienta de clonación cuando se usa en combinación con el sitio de la enzima de restricción BstX I (5' CCANNNNN/NTGG 3'). El dominio de secuencia neutra de BstX I se puede usar para generar extremos cohesivos compatibles para dos colas protruyentes para endonucleasas de anidación inversas, mientras impide la autohibridación.

BstX I (I-Sce I Fwd.)	I-Sce I Directo	I-Sce I Inverso	BstX I (I-Sce I Inv.)
5'-CCAGATAA	CAGGGTAAT//ATTACCCTGTTAT		GTGG-3'
3'-GGTC	TATTGTCCCATTA//TAATGGGAC		AATACACC-5'

45 Los vectores lanzadera no reivindicados contienen sitios de clonación múltiple con sitios de restricción habituales flanqueados por sitios de restricción raros y/o de endonucleasas de anidación. Los vectores lanzadera están diseñados para clonar fragmentos de ADN en los sitios de restricción habituales entre los sitios raros. Los fragmentos clonados pueden liberarse posteriormente mediante escisión por el sitio o sitios de restricción raros o de endonucleasas de anidación e incorporarse en el plásmido de acoplamiento usando el mismo sitio o sitios de

restricción raros o de endonucleasas de anidación encontrados en los vectores lanzadera.

Por tanto, al contrario que los vectores de clonación convencionales, el diseño del MCS permite insertar "casetes" o módulos de fragmentos de ADN en las regiones modulares del plásmido de acoplamiento. Asimismo, cada uno se puede eliminar con facilidad usando las mismas enzimas de restricción raras y/o de endonucleasas de anidación y sustituirse con cualquier otro fragmento de ADN de interés. Esta característica permite que el usuario cambie la dirección de un proyecto experimentar rápida y fácilmente sin tener que reconstruir todo el constructo de ADN. Por tanto, los plásmidos vectores de clonación de la presente invención permiten que el usuario clone un fragmento de ADN en un vector intermedio, usando sitios de restricción habituales, creando un módulo aceptor de casetes y, después, transferir dicho fragmento al punto modular deseado en el constructo final mediante los sitios de restricción raros. Además, permite futuras alteraciones en la molécula para sustituir módulos individuales en el plásmido de acoplamiento con otros módulos casete. Las descripciones siguientes destacan las distinciones de la presente invención en comparación con la técnica anterior.

Los componentes individuales de un transgen (el potenciador del promotor P, la proteína expresada E y/o la región reguladora en 3' 3) se pueden ensamblar como módulos transferidos desde vectores lanzadera al plásmido estación de acoplamiento PE3. Si se necesitan mayores órdenes de complejidad, los transgenes ensamblados, u otras secuencias nucleotídicas, pueden transferirse a un plásmido de acoplamiento primario. Cada uno de los cinco tipos de plásmidos vectores de clonación se explicará con más detalle para proporcionar conocimientos de los componentes incorporados en cada uno, comenzando con el plásmido estación de acoplamiento PE3 más complejo y el plásmido de acoplamiento primario.

El plásmido de acoplamiento PE3 (FIGURA 2) comprende una estructura de pUC19 con las modificaciones siguientes, en las que las secuencias se numeran de acuerdo con el archivo de secuencias del pUC19 Genbank, número de registro L09137:

1. En el plásmido de acoplamiento sólo se usan las secuencias de 806 a 2617 (Afl3-Aat2),
2. El sitio BspH1 en 1729 en el pUC19 está mutado de TCATGA a GCATGA
3. El sitio Act1 en 1493 en el pUC19 está mutado de AACGTT a AACGCT
4. El sitio Acl1 en 1120 en el pUC19 está mutado de AACGTT a CACGCT,
5. El sitio Ahd1 en pUC19 está mutado de GACNNNNNGTC a CACNNNNNGTC,
6. Las secuencias que codifican BspH1/I-Ppo 1/BspH1 se insertan en el único sitio restante BspH1 en el pUC19 tras la etapa de mutación 2 en la lista anterior.

El sitio de clonación múltiple (MCS) en el plásmido de acoplamiento PE3 (FIGURA 3) comprende los siguientes elementos secuenciales, en el orden enumerado:

1. Tres sitios de restricción habituales únicos y no variables que definen un sitio de inserción en 5' para el vector pUC19 mutado descrito en lo que antecede (por ejemplo, Aat II, Bln I y EcoO109 I),
2. Un sitio cebador de T7.
3. Un sitio único para endonucleasas de anidación (por ejemplo, I-SceI (orientación directa)),
4. Un par de sitios de restricción habituales únicos y no variables que flanquean secuencias nucleotídicas aleatorias que pueden servir como un módulo aceptor del dominio de modificación de cromatina (RNAS-CMD-1) (por ejemplo, Kpn I y Avr II),
5. Una agrupación fija de sitios de restricción raros no variables que definen la porción 5' del módulo promotor (por ejemplo, AsiS I y SgrA I),
6. Secuencias nucleotídicas aleatorias que pueden servir como un módulo aceptor de promotor/intrón (RNAS-P),
7. Una agrupación fija de sitios de restricción raros no variables que definen la unión compartida entre la porción 3' del módulo promotor/intrón y la porción 5' del módulo de expresión (por ejemplo, PacI, AscI y MluI),
8. Secuencias nucleotídicas aleatorias que pueden servir como un módulo aceptor de expresión (RNAS-P),

ES 2 384 296 T3

9. Una agrupación fija de sitios de restricción raros no variables que definen la unión de la porción 3' del módulo de expresión y la porción 5' del módulo regulador en 3' (por ejemplo, SnaB I, Not I y Sal I),
10. Secuencias nucleotídicas aleatorias que pueden servir como un módulo aceptor del dominio regulador en 3' (RNAS-3),
- 5 11. Una agrupación fija de sitios de restricción raros no variables que definen la porción 3' del módulo regulador 3' (por ejemplo, Swa I, Rsr II y BsiW I),
12. Un par de sitios de restricción habituales únicos y no variables que flanquean una secuencia nucleotídica aleatoria de ADN que puede servir como un módulo aceptor del dominio de modificación de cromatina (RNAS-CMD-2) (por ejemplo, Xho I y Nhe I),
- 10 13. Un sitio único de endonucleasas de anidación en orientación inversa que es idéntico al del punto 3, en lo que antecede,
14. Un sitio cebador de T3 en orientación inversa, y
15. Cuatro sitios de restricción habituales únicos y no variables que definen un sitio de inserción en 3' para el vector pUC19 mutado descrito en lo que antecede (por ejemplo, BspE I, Pme I, Sap I y BspH I).
- 15 El plásmido de acoplamiento primario no reivindicado (FIGURA 4) se puede usar para ensamblar dos transgenes completados que se construyen primero en los plásmidos de estación de acoplamiento PE3 no reivindicados, o dos brazos de homología necesarios para construir un transgen dirigido al gen, o para introducir dos tipos de elementos de selección positiva o negativa. El sitio de clonación múltiple (MCS) en el plásmido de acoplamiento primario (FIGURA 5) comprende los siguientes elementos secuenciales, en el orden enumerado:
- 20 1. Dos sitios de restricción habituales únicos y no variables que definen un sitio de inserción en 5' para el vector pUC19 mutado descrito en lo que antecede (por ejemplo, Aat II, y Bln I),
2. Un sitio cebador de M13 Rev.,
3. Un par de sitios únicos de endonucleasas de anidación en orientación opuesta que flanquean una secuencia nucleotídica aleatoria de ADN que puede servir como módulo aceptor del gen selector en la expresión del
- 25 genoma del huésped (RNAS-GEH-S1) (por ejemplo, PstI (orientación directa) y PstI (orientación inversa)),
4. Un sitio de restricción habitual único y no variable que permite la clonación de un módulo del vector lanzadera posterior al par de endonucleasas de anidación (por ejemplo, Eco0109I),
5. Una agrupación fija de sitios de restricción raros no variables que definen la porción 5' de un módulo del
- 30 brazo de recombinación izquierdo (por ejemplo, SgrA I y AsiS I),
6. Secuencias nucleotídicas aleatorias que pueden servir como módulo aceptor del brazo de recombinación izquierdo (RNAS-LRA),
7. Una agrupación fija de sitios de restricción raros no variables que definen la porción 3' del módulo aceptor del brazo de recombinación izquierdo (por ejemplo, PacI, MluI, y AscI),
- 35 8. Un sitio único para endonucleasas de anidación (por ejemplo, I-Ceu I (orientación directa)),
9. Un par de sitios de restricción habituales únicos y no variables que flanquean una secuencia nucleotídica aleatoria de ADN que puede servir como un módulo aceptor del dominio de modificación de cromatina (RNAS-CMD-1) (por ejemplo, Kpn I y Avr II),
10. Un sitio cebador de T7,
- 40 11. Un par de sitios BstX I únicos en orientación opuesta (en los que la región nucleotídica variable en el sitio de reconocimiento de BstX I está definido por nucleótidos idénticos a las colas no complementarias generadas mediante la ordenación de dos sitios de reconocimiento de endonucleasas de anidación idénticos dispuestos en orientación complementaria-inversa; por ejemplo, PstI (orientación directa) y PstI (orientación inversa)) que flanquean una secuencia nucleotídica aleatoria de ADN que puede servir como un módulo aceptor del
- 45 transgen completo (RNAS-PE3-),

12. Un par de sitios únicos de endonucleasas de anidación en orientación opuesta que flanquean una secuencia nucleotídica aleatoria de ADN que puede servir como un módulo aceptor del transgen complejo (RNAS-PE3-2) (por ejemplo, I-SceI (orientación directa) y I-SceI (orientación inversa)),
13. Un sitio cebador de T3 en orientación inversa,
- 5 14. Un par de sitios de restricción habituales únicos y no variables que flanquean una secuencia nucleotídica aleatoria de ADN que puede servir como un módulo aceptor del dominio de modificación de cromatina (RNAS-CMD-2) (por ejemplo, Xho I y Nhe I),
15. Un sitio único de endonucleasas de anidación en orientación inversa que es idéntico al del punto 8, en lo que antecede,
- 10 16. Una agrupación fija de sitios de restricción raros no variables que definen la porción 5' de un módulo del brazo de recombinación derecho (por ejemplo SnaB I, Sal I y Not I),
17. Secuencias nucleotídicas aleatorias que pueden servir como un módulo aceptor del brazo de recombinación derecho (RNAS-RRA),
- 15 18. Una agrupación fija de sitios de restricción raros no variables que definen la porción 3' del módulo aceptor del brazo de recombinación derecho (por ejemplo, Rsr II, Swa I y BsiW I),
19. Un sitio de restricción habitual único y no variable que permite la clonación de un módulo del vector lanzadera antes del par de endonucleasas de anidación (por ejemplo, BspE I),
- 20 20. Un par de sitios únicos de endonucleasas de anidación en orientación opuesta que flanquean una secuencia nucleotídica aleatoria de ADN que puede servir como módulo aceptor del gen selector en la expresión del genoma del huésped (RNAS-GEH-S2) (por ejemplo, PI-Psp I (orientación directa) y PI-Psp I (orientación inversa)),
21. Un sitio cebador directo de M13 colocado en orientación inversa,
22. Tres sitios de restricción habituales únicos y no variables que definen un sitio de inserción en 3' para el vector pUC19 mutado descrito en lo que antecede (por ejemplo, Pme I, Sap I y BspH I).
- 25 Tres plásmidos vectores de clonación no reivindicados se conocen como vectores lanzadera. Los vectores lanzadera, como el PE3 y los plásmidos de acoplamiento primarios, también se construyen a partir de una estructura de pUC19. Como PE3 y los plásmidos de acoplamiento primarios, cada vector lanzadera tiene las mismas modificaciones en la estructura de pUC19 indicadas como de 1 a 6, en lo que antecede. Los vectores lanzadera (SV) individuales se identifican como promotor/intrón (P) del vector lanzadera, expresión (E) del vector lanzadera y regulador en 3' (3) del vector lanzadera: en lo sucesivo SVP, SVE y SV3, respectivamente. Cada uno se describe más a fondo a continuación.
- 30
- Vector lanzadera P (SVP):
- SVP es un plásmido vector de clonación que se puede usar para preparar secuencias promotoras e intrones para ensamblar dentro de un constructo de transgen (FIGURA 6). Un ejemplo de un plásmido SVP puede comprender los siguientes elementos secuenciales en el MCS (FIGURA 7) en el orden enumerado:
- 35
1. Dos sitios de restricción habituales únicos y no variables que definen un sitio de inserción en 5' para el vector pUC19 mutado descrito en lo que antecede (por ejemplo, AatII, y BlnI),
 2. Un sitio cebador de T7,
 - 40 3. Un sitio de restricción habitual único y no variable que permite la clonación eficiente de un módulo del vector lanzadera posterior al sitio cebador de T7 (por ejemplo, Eco0109I),
 4. Una agrupación fija de sitios de restricción raros no variables que definen la porción 5' del módulo promotor (por ejemplo, AsiSI y SgrAI),
 5. Un MCS variable que comprende cualquier agrupación de sitios de restricción habituales o raros que son únicos del vector lanzadera (por ejemplo, la serie de sitios de restricción ilustrada en la FIGURA 7),
 - 45 6. Una agrupación fija de sitios de restricción raros no variables que definen la porción 3' del módulo promotor (por ejemplo, PacI, AscI y MluI),

ES 2 384 296 T3

7. Un sitio de restricción habitual único y no variable que permite la clonación eficiente de un módulo del vector lanzadera anterior al sitio cebador de T3 (por ejemplo, BspEI),

8. Un sitio cebador de T3 en orientación inversa, y

5 9. Dos sitios de restricción habituales únicos y no variables que definen un sitio de inserción en 3' para el vector pUC19 mutado descrito en lo que antecede (por ejemplo, PmeI y SapI),

Vector lanzadera E (SVE):

Este es un plásmido vector de clonación que se puede usar para preparar secuencias que van a ser expresadas en el transgen para ensamblar dentro de un constructo de transgen (FIGURA 8). Un ejemplo de un plásmido SVE puede comprender los siguientes elementos secuenciales en el MCS (FIGURA 9), en el orden enumerado:

10 1. Dos sitios de restricción habituales únicos y no variables que definen un sitio de inserción en 5' para el vector pUC19 mutado descrito en lo que antecede (por ejemplo, AatII, y BlnI),

2. Un sitio cebador de T7,

3. Un sitio de restricción habitual único y no variable que permite la clonación eficiente de un módulo del vector lanzadera posterior al sitio cebador de T7 (por ejemplo, Eco0109I),

15 4. Una agrupación fija de sitios de restricción raros no variables que definen la porción 5' del módulo de expresión (por ejemplo, PaeI, AscI y MluI),

5. Un MCS variable constituido por cualquier agrupación de sitios de restricción habituales o raros que son únicos del vector lanzadera (por ejemplo, la serie de sitios de restricción ilustrada en la FIGURA 9),

20 6. Una agrupación fija de sitios de restricción raros no variables que definen la porción 3' del módulo de expresión (por ejemplo, SnaBI, NotI y Sall),

7. Un sitio de restricción habitual único y no variable que permite la clonación eficiente de un módulo del vector lanzadera anterior al sitio cebador de T3 (por ejemplo, BspEI),

8. Un sitio cebador de T3 en orientación inversa, y

25 9. Dos sitios de restricción habituales únicos y no variables que definen un sitio de inserción en 3' para el vector pUC19 mutado descrito en lo que antecede (por ejemplo, PmeI y SapI),

Vector lanzadera 3 (SV3):

Este es un plásmido vector de clonación que se puede usar para preparar secuencias reguladoras en 3' para ensamblar dentro de un constructo de transgen (FIGURA 10). Un ejemplo de un plásmido SV3 puede comprender los siguientes elementos en el MCS (FIGURA 11), en el orden enumerado:

30 1. Dos sitios de restricción habituales únicos y no variables que definen un sitio de inserción en 5' para el vector pUC19 mutado descrito en lo que antecede (por ejemplo, AatII, y BlnI),

2. Un sitio cebador de T7,

3. Un sitio de restricción habitual único y no variable que permite la clonación eficiente de un módulo del vector lanzadera posterior al cebador de T7 (por ejemplo, Eco0109I),

35 4. Una agrupación fija de sitios de restricción raros no variables que definen la porción 5' del módulo regulador 3' (por ejemplo, SnaBI, NotI y Sall),

5. Un MCS variable constituido por cualquier agrupación de sitios de restricción habituales o raros que son únicos del vector lanzadera (por ejemplo, la serie de sitios de restricción ilustrada en la FIGURA 11),

40 6. Una agrupación fija de sitios de restricción raros no variables que definen la porción 3' del módulo regulador (por ejemplo, SmaI, RsrII y BsiWI),

7. Un sitio de restricción no raro único y no variable que permite la clonación eficiente de un módulo del vector lanzadera anterior al sitio cebador de T3 (por ejemplo, BspEI),

8. Un sitio cebador de T3 en orientación inversa, y

9. Dos sitios de restricción no raros únicos y no variables que definen un sitio de inserción en 3' para el vector pUC19 mutado descrito en lo que antecede (por ejemplo, PmeI y SapI).

5 Aunque la presente invención da a conocer procedimientos para construir transgenes en plásmidos vectores de clonación, se pueden usar procedimientos similares para construir transgenes en moléculas más grandes de ADN extracromosómico, tales como cósmidos o cromosomas artificiales, incluidos cromosomas artificiales bacterianos (BAC). La amplia variedad de elementos transgénicos que se pueden incorporar en los plásmidos vectores de clonación también permiten transferir los productos finales del transgen a una amplia variedad de organismos huésped con poca o ninguna manipulación adicional.

10 Como ejemplo del procedimiento de practicar la presente invención se puede construir un transgen que contiene estos elementos:

1. Secuencias nucleotídicas del promotor humano para la proteína tensioactivo C (SP-C),
2. Secuencias que codifican el producto proteico del gen de ratón del receptor beta c del factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GMRβC)
3. Secuencias intrón de la betaglobina de conejo, y
- 15 4. Señal poli-A de SV40.

20 Las secuencias de SP-C contienen sitios BamH1 internos y se pueden liberar de su plásmido parental únicamente con Not1 y EcoR1. El GMRβc tiene un sitio Not1 interno y se puede cortar de su plásmido parental con BamH1 y Xho1. Las secuencias intrones de la betaglobina de conejo se pueden cortar de su plásmido parental con EcoR1. La cola poli-A de SV-40 se puede cortar de su plásmido parental con Xho1 y Sac1. Dada la redundancia de varios sitios de restricción, ninguno de los plásmidos parentales se puede usar para ensamblar todos los fragmentos necesarios.

Las etapas usadas para construir el transgen deseado en el plásmido de acoplamiento PE3 son las siguientes:

- 25 1. Dado que Not1 y PspOMI generan extremos cohesivos compatibles, las secuencias promotoras SP-C humanas se escinden con Not1 y EcoR1 y se clonan en los sitios de PspOM1 y EcoR1 del vector lanzadera P. El producto de esta reacción se denomina pSVP-SPC.
2. Tras las etapas de propagación y recuperación bien conocidas por los expertos en la técnica, las secuencias intrónicas de la betaglobina de conejo se clonan en el sitio EcoR1 de pSVP-SPC. La orientación del intrón en el constructo intermedio resultante se verifica mediante secuenciación del producto, denominado pSVP-SPC-rβG.
- 30 3. El promotor y el intrón se escinden y aíslan como un fragmento contiguo de pSVP-SPC-rβG usando AsiS1 y Asc1. Simultáneamente, el plásmido de acoplamiento PE3 se corta con AsiS1 y Asc1 en preparación de la ligación con el segmento promotor/intrón. El fragmento promotor/intrón se liga en el plásmido de acoplamiento, se propaga y se recupera.
- 35 4. Se introduce el sitio Xho1 del fragmento GMRβc para crear un extremo 3' como usando técnicas bien conocidas para los expertos en la técnica. Después se clona en el sitio BamH1 y el sitio Pvu2 con extremos romos de pSVP-SPC-rβG. El plásmido resultante (pDP-SPC-GMRβc-rβG) se propagó y recuperó.
- 40 5. La etapa de clonación final es la adición de la cola de poli-A de SV-40. El fragmento poli-A del SV40 se corta con Xho1 y Sac1, como también el vector receptor pDS1-SPC-GMRβc-rβG. Ambas piezas de ADN se purifican en gel y se recuperan. Se prepara una mezcla de ligación con una proporción molar de 10:1 entre poli-A de SV-40 y pDS1-SPC-GMRβc-rβG. Los productos de ligación se propagan y recolectan. El plásmido nuevo pDS1-SPC-GMRβc-rβG-pA contiene todos los elementos requeridos para el transgen, incluido un sitio de restricción único en el extremo 3' con el que todo el plásmido pDS1-SPC-GMRβc-rβG-pA se puede linealizar para la transfección en células eucarióticas o microinyección en el pronúcleo de un huevo fertilizado.

Listado de secuencias

<110> Intrexon Corporation

<120> Plásmidos vectores de clonación de ADN y procedimientos para su uso

5

<130> 28569-508-EP1

<140> EP 04751078.9

<141> 2004-05-04

10

<150> 60/417.282

<151> 2002-10-09

<160> 10

15

<170> Patente versión 3.3

<210> 1

<211> 3452

20

<212> ADN

<213> Molécula de ADN sintética

<220>

<221> misc_feature

25

<222> (98)..(347)

<223> n es a, c, g, o t

<220>

<221> misc_feature

30

<222> (411)..(430)

<223> n es a, c, g, o t

<220>

<221> misc_feature

35

<222> (530)..(779)

ES 2 384 296 T3

<223> n es a, c, g, o t

<220>

<221> misc_feature

5 <222> (810)..(1059)

<223> n es a, c, g, o t

<220>

<221> misc_feature

10 <222> (1163)..(1182)

<223> n es a, c, g, o t

<220>

<221> misc_feature

15 <222> (1240)..(1489)

<223> n es a, c, g, o t

<400> 1

```
tgagcagcgg ataacaattt cacacaggaa acagctatga ccatgattac tctgtagcat      60
ctatgtcggg tgcggagaaa gaggtaatga aatggcannn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn      120
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn      180
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn      240
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn      300
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnntgc catttcatta      360
cctctttctc cgcacccgac atagataggc cctgcgccgg cggcgatcgc nnnnnnnnnn      420
```

ES 2 384 296 T3

nnnnnnnnnn	ttaattaaac	gcgtggcgcg	cctaaactata	acggtcctaa	ggtagcgagg	480
taccgctggc	cctagggtaa	tacgactcac	tatagggcca	cataagtgg	nnnnnnnnnn	540
nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	600
nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	660
nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	720
nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnc	780
cacttatgtg	gtagggataa	cagggtaatn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	840
nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	900
nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	960
nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	1020
nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnna	ttaccctgtt	atccctatcc	1080
ctttagtgag	ggttaattct	cgaggcagga	gctagctcgc	taccttagga	ccgttatagt	1140
tatacgtagt	cgacgcggcc	gcnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nncgggccga	tttaaatacgt	1200
acgtccggat	ggcaaacagc	tattatgggt	attatgggt	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	1260
nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	1320
nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	1380
nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	1440
nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnna	cccataatac	1500
ccataatagc	tgtttgccag	ctacagagtt	tactggccgt	cgttttacaa	cgtcgtgact	1560
gggaaaacc	tggcggttta	aacgctcttc	cgcttccttc	atgtgagcaa	aaggccagca	1620
aaaggccagg	aaccgtaaaa	aggccgcggt	gctggcgttt	ttccataggc	tccgcccccc	1680
tgacgagcat	cacaaaaatc	gacgctcaag	tcagaggtgg	cgaaaccgca	caggactata	1740
aagataccag	gcgtttcccc	ctggaagctc	cctcgtgcgc	tctcctgttc	cgaccctgcc	1800
gcttaccgga	tacctgtccg	cctttctccc	ttcgggaagc	gtggcgcttt	ctcatagctc	1860
acgctgtagg	tatctcagtt	cggtgtaggt	cgttcgctcc	aagctgggct	gtgtgcacga	1920
acccccggt	cagcccagacc	gctgcgcctt	atccggtaac	tatcgtcttg	agtccaacc	1980
ggtaagacac	gacttatcgc	cactggcagc	agccactgg	aacaggatta	gcagagcgag	2040
gtatgtaggc	ggtgctacag	agttcttgaa	gtggtggcct	aactacggct	acactagaag	2100
gacagtattt	ggtatctgcg	ctctgctgaa	gccagttacc	ttcggaaaaa	gagttggtag	2160
ctcttgatcc	ggcaaacaaa	ccaccgctgg	tagcggtggt	ttttttgitt	gcaagcagca	2220
gattacgcgc	agaaaaaag	gatctcaaga	agatcctttg	atcttttcta	cggggtctga	2280
cgctcagtgg	aacgaaaact	cacgttaagg	gattttggct	atgataacta	tgactctctt	2340
aaggtagcca	aattcatgag	attatcaaaa	aggatcttca	cctagatcct	tttaaattaa	2400
aatgaagtt	ttaaataaat	ctaaagtata	tatgagtaaa	cttggctctga	cagttaccaa	2460

ES 2 384 296 T3

tgcttaatca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttcgttcatc catagttgcc 2520
 tgactccccg tgggtgtagat aactacgata cgggagggct taccatctgg ccccagtgct 2580
 gcaatgatac cgcgagaccc acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat aaaccagcca 2640
 gccggaaggg ccgagcgcag aagtggctct gcaactttat ccgcctccat ccagtctatt 2700
 aattgttgcc ggggaagctag agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg caacgtggtt 2760
 gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc attcagctcc 2820
 ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga tccccatgt tgtgcaaaaa agcgggttagc 2880
 tccttcgggtc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg cagtgttatc actcatggtt 2940
 atggcagcac tgcataattc tcttactgtc atgccatccg taagatgctt ttctgtgact 3000
 ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag ttgctcttgc 3060
 ccggcgtcaa tacgggataa taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt gctcatcatt 3120
 ggaaagcggt cttcggggcg aaaactctca aggatcttac cgctgttgag atccagttcg 3180
 atgtaaccca ctcgtgcacc caactgatct tcagcatctt ttactttcac cagcgtttct 3240
 gggtgagcaa aacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc gacacggaaa 3300
 tgttgaatac tcatactctt cctttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt 3360
 ctcatgcgcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg ggttccgcgc 3420
 acatttcccc gaaaagtgcc acctgacgtc gc 3452

<210> 2

<211> 792

<212> ADN

5 <213> molécula de ADN sintética

<220>

<221> misc_feature

<222> (86)..(185)

10 <223> n es a, c, g, o t

<220>

<221> misc_feature

<222> (208)..(307)

15 <223> n es a, c, g, o t

<220>

<221> misc_feature

<222> (330)..(429)

ES 2 384 296 T3

<223> n es a, c, g, o t

<220>

<221> misc_feature

5 <222> (451)..(550)

<223> n es a, c, g, o t

<220>

<221> misc_feature

10 <222> (593)..(692)

<223> n es a, c, g o t

<400> 2

gagagagaga	cgctcgctgag	caggccctgt	aatacgactc	actatagggg	gcgccggagc	60
ttagggataa	cagggtaatg	gtaccnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	120
nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	180
nnnnncctag	ggcgatcgcc	gccggcggnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	240
nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	300
nnnnnnntta	attaaggcgc	gccacgcgtn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	360
nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	420
nnnnnnnnnt	acgtagcggc	cgcgtcgacg	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	480
nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	540
nnnnnnnnnn	atttaaactg	gtccgcgtac	gcatatagct	aacagcctcg	agnnnnnnnn	600
nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	660
nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nngctagcat	taccctgtta	tccttagccg	720
ctggcgcttc	ccttttagtga	gggttaattt	ccggagttta	aacgctcttc	cgcttccttc	780
atgagagaga	ga					792

15 <210> 3

<211> 3452

<212> ADN

<213> molécula de ADN sintética

20 <220>

<221> misc_feature
<222> (98)..(347)
<223> n es a, c, g, o t

5 <220>
<221> misc_feature
<222> (411)..(430)
<223> n es a, c, g, o t

10 <220>
<221> misc_feature
<222> (530)..(779)
<223> n es a, c, g, o t

15 <220>
<221> misc_feature
<222> (810)..(1059)
<223> n es a, c, g, o t

20 <220>
<221> misc_feature
<222> (1163)..(1182)
<223> n es a, c, g, o t

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (1240)..(1489)
<223> n es a, c, g, o t

30 <400> 3

ES 2 384 296 T3

```
tgagcagcgg ataacaattt cacacaggaa acagctatga ccatgattac tctgtagcat    60
ctatgtcggg tgcggagaaa gaggtaatga aatggcannn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn    120
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn    180
```

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 240
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 300
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnntgc catttcatta 360
 cctctttctc cgcacccgac atagataggc cctgcgccgg cggcgatcgc nnnnnnnnnn 420
 nnnnnnnnnn ttaattaaac gcgtggcgcg cctaactata acggtcctaa ggtagcgagg 480
 taccgctggc cctagggtaa tacgactcac tatagggcca cataagtggc nnnnnnnnnn 540
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 600
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 660
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 720
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnnC 780
 cacttatgtg gtagggataa cagggtaatn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 840
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 900
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 960
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 1020
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnna ttaccctgtt atccctatcc 1080
 ctttagtgag ggtaattct cgaggcagga gctagctcgc taccttagga ccgttatagt 1140
 tatacgtagt cgacgcggcc gcnnnnnnnn nnnnnnnnnn nncggtccga tttaaatcgt 1200
 acgtccggat ggcaaacagc tattatgggt attatgggtn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 1260
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 1320
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 1380
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 1440
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnna cccataatac 1500
 ccataatagc tgtttgccag ctacagagtt tactggccgt cgttttaca cgtcgtgact 1560
 gggaaaacc tggcggttta aacgctcttc cgcttccttc atgtgagcaa aaggccagca 1620
 aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcggt gctggcggtt ttccataggc tccgcccccc 1680
 tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg cgaaaccga caggactata 1740
 aagataccag gcgtttccc ctggaagctc cctcgtcgc tctcctgttc cgaccctgcc 1800
 gcttaccgga tacctgtccg cttttctccc ttcgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc 1860
 acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt cgttcgtcc aagctgggct gtgtgcacga 1920
 acccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac tctcgtcttg agtccaacc 1980
 ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt aacaggatta gcagagcgag 2040
 gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtggtggcct aactacggct aactagaag 2100
 gacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa gagttggtag 2160
 ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg tagcgggtgt tttttgttt gcaagcagca 2220

gattacgCGC agaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cgggggtctga 2280
 cgctcagtgg aacgaaaact cacgttaagg gattttggtc atgataacta tgactctctt 2340
 aaggtagcca aattcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct tttaaattaa 2400
 aatgaagtt ttaaataaat ctaaagtata tatgagtaaa cttgggtctga cagttaccaa 2460
 tgcttaatca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttcgttcatc catagttgcc 2520
 tgactccccg tgggtgtagat aactacgata cgggagggtt taccatctgg ccccagtgct 2580
 gcaatgatac cgcgagaccc acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat aaaccagcca 2640
 gccggaaggg ccgagcgcag aagtggctct gcaactttat ccgcctccat ccagtctatt 2700
 aattggtgcc gggaagctag agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg caacgtggtt 2760
 gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc attcagctcc 2820
 ggttccaac gatcaaggcg agttacatga tccccatgt tgtgcaaaaa agcgggttagc 2880
 tccttcggtc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg cagtgttacc actcatggtt 2940
 atggcagcac tgcataattc tcttactgtc atgccatccg taagatgctt ttctgtgact 3000
 ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag ttgctcttgc 3060
 ccggcgtcaa tacgggataa taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt gctcatcatt 3120
 ggaaagcgtt cttcggggcg aaaactctca aggatcttac cgctgttgag atccagttcg 3180
 atgtaacca ctcgtgcacc caactgatct tcagcatctt ttactttcac cagcgtttct 3240
 ggggtgagcaa aaacaggaag gcaaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc gacacggaaa 3300
 tgttgaaatac tcatactctt cctttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt 3360
 ctcatgCGC gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg ggttccgCGC 3420
 acatttcccc gaaaagtGCC acctgacgTC gc 3452

<210> 4

<211> 1628

5 <212> ADN

<213> molécula de ADN sintética

<220>

<221> misc_feature

10 <222> (114)..(363)

<223> n es a, c, g, o t

<220>

<221> misc_feature

<222> (427)..(446)

<223> n es a, c, g, o t

<220>

5 <221> misc_feature

<222> (546)..(795)

<223> n es a, c, g, o t

<220>

10 <221> misc_feature

<222> (826)..(1075)

<223> n es a, c, g, o t

<220>

15 <221> misc_feature

<222> (1179)..(1198)

<223> n es a, c, g, o t

<220>

20 <221> misc_feature

<222> (1256)..(1505)

<223> n es a, c, g, o t

<400> 4

25

30

35

gagagagaga	cgtcgctgag	cagcggataa	caatttcaca	caggaaacag	ctatgaccat	60
gattactctg	tagcatctat	gtcgggtgcg	gagaaagagg	taatgaaatg	gcannnnnnn	120
nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	180
nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	240
nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	300
nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	360
nnntgccatt	tcattacctc	tttctccgca	cccgcacatag	ataggccctg	cgccggcggc	420
gatcgcnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnntaa	ttaaacgcgt	ggcgcgccta	actataacgg	480
tcctaaggta	gcgaggtacc	gctggcccta	gggtaatacg	actcactata	gggccacata	540
agtggnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	600
nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	660
nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	720
nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	780
nnnnnnnnnn	nnnnnccact	tatgtggtag	ggataacagg	gtaatnnnnn	nnnnnnnnnn	840
nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	900
nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	960
nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	1020
nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnattac	1080
cctgttatcc	ctatcccttt	agtgagggtt	aattctcgag	gcaggagcta	gctcgcctacc	1140
ttaggaccgt	tatagttata	cgtagtcgac	gcggccgcnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnncg	1200
gtccgattta	aatcgtacgt	ccggatggca	aacagctatt	atgggtatta	tgggtnnnnn	1260
nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	1320
nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	1380
nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	1440
nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	1500
nnnnnaccca	taatacccat	aatagctggt	tgccagctac	agagtttact	ggccgctggt	1560
ttacaacgtc	gtgactggga	aaaccctggc	ggtttaaacg	ctcttccgct	tccttcatga	1620
gagagaga						1628

<210> 5

<211> 2092

<212> ADN

5 <213> molécula de ADN sintética

<400> 5

tgagcgtaat	acgactcact	atagggaggc	cctgcatcg	ccgccggcgg	atatcggagc	60
tgctgggccc	agggagcttc	tagaggagct	ggatccgctg	gagaattcgg	agctggaaag	120
cttgagctg	ctctgcaggg	agctgcatgc	gctggcgcac	agctgttaat	taaggcgcgc	180
cacgcgttc	ggattccctt	tagtgagggt	taattgttta	aacgctcttc	cgcttccttc	240
atgtgagcaa	aaggccagca	aaaggccagg	aaccgtaaaa	aggccgcggt	gctggcgttt	300
ttccataggc	tccgcccccc	tgacgagcat	cacaaaaatc	gacgctcaag	tcagaggtgg	360
cgaaaccga	caggactata	aagataccag	gcgtttcccc	ctggaagctc	cctcgtgcgc	420
tctcctgttc	cgaccctgcc	gcttaccgga	tacctgtccg	cctttctccc	ttcgggaagc	480
gtggcgcttt	ctcatagctc	acgctgtagg	tatctcagtt	cggtgtaggt	cgttcgctcc	540
aagctgggct	gtgtgcacga	acccccggt	cagccccgacc	gctgcgcctt	atccggtaac	600
tatcgtcttg	agtccaacc	ggtaagacac	gacttatcgc	cactggcagc	agccactggt	660
aacaggatta	gcagagcgag	gtatgtaggc	gggtctacag	agttcttgaa	gtggtggcct	720
aactacggct	acactagaag	gacagtattt	ggtatctgcg	ctctgctgaa	gccagttacc	780
ttcggaaaaa	gagttggtag	ctcttgatcc	ggcaaaaaaa	ccaccgctgg	tagcggtggt	840
ttttttgttt	gcaagcagca	gattacgcgc	agaaaaaaag	gatctcaaga	agatcctttg	900
atcttttcta	cggggtctga	cgctcagtg	aacgaaaact	cacgttaagg	gattttggtc	960
atgataacta	tgactctctt	aaggtagcca	aattcatgag	attatcaaaa	aggatcttca	1020
cctagatcct	tttaaattaa	aaatgaagtt	ttaaataaat	ctaaagtata	tatgagtaaa	1080
cttggctctga	cagttaccaa	tgcttaatca	gtgaggcacc	tatctcagcg	atctgtctat	1140
ttcgttcac	catagttgcc	tgactccccg	tggtgtagat	aactacgata	cgggagggct	1200
taccatctgg	ccccagtgc	gcaatgatac	cgcgagaccc	acgctcaccg	gctccagatt	1260
tatcagcaat	aaaccagcca	gccggaaggg	ccgagcgcag	aagtggctct	gcaactttat	1320
ccgcctccat	ccagtctatt	aattggtgcc	gggaagctag	agtaagtagt	tcgccagtta	1380
atagtttgcg	caacgtgggt	gccattgcta	caggcatcgt	ggtgtcacgc	tcgtcgtttg	1440
gtatggcttc	attcagctcc	ggttccaac	gatcaaggcg	agttacatga	tccccatgt	1500
tgtgcaaaaa	agcggttagc	tccttcggtc	ctccgatcgt	tgtcagaagt	aagttggccg	1560
cagtgttatc	actcatgggt	atggcagcac	tgcataattc	tcttactgtc	atgccatccg	1620
taagatgctt	ttctgtgact	ggtgagtact	caaccaagtc	attctgagaa	tagtgtatgc	1680
ggcgaccgag	ttgctcttgc	ccggcgtcaa	tacgggataa	taccgcgcca	catagcagaa	1740
ctttaaaggt	gctcatcatt	ggaaagcgtt	cttcggggcg	aaaactctca	aggatcttac	1800
cgctgttgag	atccagttcg	atgtaaccca	ctcgtgcacc	caactgatct	tcagcatctt	1860
ttactttcac	cagcgtttct	gggtgagcaa	aaacaggaag	gcaaaatgcc	gcaaaaaagg	1920

gaataagggc gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt ctttttcaa tattattgaa 1980
gcatttatca gggttattgt ctcatgcgcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata 2040
aacaaatagg ggttccgcg acatttcccc gaaaagtgcc acctgacgtc gc 2092

<210> 6

<211> 234

5 <212> ADN

<213> molécula de ADN sintética

<400> 6

cgctgagcgt aatacgactc actatagggg ggcctgcga tcgccgccgg cggatatcgg 60
agctgctggg cccagggagc ttctagagga gctggatccg ctggagaatt cggagctgga 120
aagcttgag ctgctctgca gggagctgca tgcgctggcg cacagctggt aattaaggcg 180
cgccacgcgt tccggattcc ctttagtgag ggtaattgt ttaaacgctc ttcc 234

10 <210> 7

<211> 2097

<212> ADN

<213> molécula de ADN sintética

15 <400> 7

20

tgagcgtaat	acgactcact	atagggaggc	cctgttaatt	aaggcgcgcc	acgcgtgata	60
tcggagctgc	tgggcccagg	gagcttctag	aggagctgga	tccgctggag	aattcggagc	120
tggaaagctt	ggagctgctc	tgcagggagc	tgcattgcgt	ggcgcacagc	tgtacgtagc	180
ggccgcgtcg	actccggatt	cccttttagtg	agggttaatt	gtttaaacgc	tcttccgctt	240
ccttcatgtg	agcaaaaggc	cagcaaaagg	ccaggaaccg	taaaaaggcc	gcgttgctgg	300
cgttttcca	taggctccgc	ccccctgacg	agcatcacia	aaatcgacgc	tcaagtcaga	360
ggtggcgaaa	cccgacagga	ctataaagat	accaggcggt	tccccctgga	agctccctcg	420
tgcgctctcc	tgttccgacc	ctgccgctta	ccggatacct	gtccgccttt	ctcccttcgg	480
gaagcgtggc	gctttctcat	agctcacgct	gtaggtatct	cagttcggtg	taggtcgttc	540
gctccaagct	gggctgtgtg	cacgaacccc	ccgttcagcc	cgaccgctgc	gccttatccg	600
gtaactatcg	tcttgagtcc	aacccggtaa	gacacgactt	atcgccactg	gcagcagcca	660
ctggtaacag	gattagcaga	gcgaggtatg	taggcggtgc	tacagagttc	ttgaagtgg	720
ggcctaacta	cggctacact	agaaggacag	tatttggtat	ctgcgctctg	ctgaagccag	780
ttacccttcg	aaaaagagtt	ggtagctctt	gatccggcaa	acaaaccacc	gctggtagcg	840
gtggtttttt	tgtttgcaag	cagcagatta	cgcgcagaaa	aaaaggatct	caagaagatc	900
ctttgatctt	ttctacgggg	tctgacgctc	agtggaacga	aaactcacgt	taagggattt	960
tggatcatgat	aactatgact	ctcttaaggt	agccaaattc	atgagattat	caaaaaggat	1020
cttcacctag	atccttttaa	attaaaaatg	aagtttttaa	tcaatctaaa	gtatatatga	1080
gtaaacttgg	tctgacagtt	accaatgctt	aatcagtgag	gcacctatct	cagcgatctg	1140
tctatttcgt	tcatccatag	ttgcctgact	ccccgtggtg	tagataacta	cgatacggga	1200
gggcttacca	tctggcccca	gtgctgcaat	gataccgcga	gaccacgct	caccggctcc	1260

ES 2 384 296 T3

agatttatca gcaataaacc agccagccgg aagggccgag cgcagaagtg gtcctgcaac 1320
 tttatccgcc tccatccagt ctattaattg ttgccgggaa gctagagtaa gtatgtcgcc 1380
 agttaatagt ttgCGcaacg tggttgccat tgctacaggc atcgtggtgt cacgctcgtc 1440
 gtttggtatg gcttcattca gctccggttc ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc 1500
 catgttgtgc aaaaaagcgg ttagctcctt cggtcctccg atcgttgtca gaagtaagtt 1560
 ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc 1620
 atccgtaaga tgcttttctg tgactggtga gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg 1680
 tatgcggcga ccgagttgct cttgcccggc gtcaatacgg gataataccg cgccacatag 1740
 cagaacttta aaagtgtca tcattggaaa gcgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat 1800
 cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta acccactcgt gcaccaact gatcttcagc 1860
 atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaca ggaaggcaaa atgccgcaaa 1920
 aaaggaata agggcgacac ggaaatgtg aatactcata ctcttccttt ttcaatatta 1980
 ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat gcgcggatac atatttgaat gtatttagaa 2040
 aaataaaca ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaaa gtgccacctg acgtcgc 2097

<210> 8

<211> 239

<212> ADN

5 <213> molécula de ADN sintética

<400> 8

cgctgagcgt aatcagactc actatagggg gccctgtta attaaggcgc gccacgcgtg 60
 atatcgagc tgctgggccc agggagcttc tagaggagct ggatccgctg gagaattcgg 120
 agctggaaag cttggagctg ctctgcaggg agctgcatgc gctggcgac agctgtacgt 180
 agcggccgcg tcgactccgg attcccttta gtgagggtta attgtttaa cgctcttcc 239

10 <210> 9

<211> 2096

<212> ADN

<213> molécula de ADN sintética

15 <400> 9

ES 2 384 296 T3

tgagcgtaat acgactcact atagggaggc cctgtacgta gcggccgcgt cgacgatatc	60
ggagctgctg ggcccagggg gcttctagag gagctggatc cgctggagaa ttcggagctg	120
gaaagcttgg agctgctctg cagggagctg catgcgctgg cgcacagctg atttaaactg	180
gtccgcgtac gtccggattc cctttagtga gggttaattg tttaaacgct cttccgcttc	240
cttcatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc	300
gtttttccat aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtcagag	360
gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt ccccctggaa gctccctcgt	420
gcgctctcct gttccgacct tgccgcttac cggataacctg tccgcctttc tcccttcggg	480
aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg aggtcgttcg	540
ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg ccttatccgg	600

5

10

15

20

taactatcgt	cttgagtcca	acccggtaag	acacgactta	tcgccactgg	cagcagccac	660
tggtaacagg	attagcagag	cgaggtatgt	aggcgggtgct	acagagttct	tgaagtgggtg	720
gcctaactac	ggctacacta	gaaggacagt	atcttggtatc	tgcgctctgc	tgaagccagt	780
taccttcgga	aaaagagttg	gtagctcttg	atccggcaaa	caaaccaccg	ctggtagcgg	840
tggttttttt	gtttgcaagc	agcagattac	gcgagaaaa	aaaggatctc	aagaagatcc	900
tttgatcttt	tctacggggt	ctgacgctca	gtggaacgaa	aactcacggt	aagggatttt	960
ggatcatgata	actatgactc	tcttaaggta	gccaaattca	tgagattatc	aaaaaggatc	1020
ttcacctaga	tccttttaaa	ttaaaaatga	agttttaaat	caatctaaag	tatatatgag	1080
taaacttggt	ctgacagtta	ccaatgctta	atcagtgagg	cacctatctc	agcgatctgt	1140
ctatttcggt	catccatagt	tgcctgactc	cccgtgggtg	agataactac	gatacgggag	1200
ggcttaccat	ctggccccag	tgctgcaatg	ataccgagag	accacgctc	accggctcca	1260
gatttatcag	caataaacca	gccagccgga	agggccgagc	gcagaagtgg	tcctgcaact	1320
ttatccgcct	ccatccagtc	tattaattgt	tgccgggaag	ctagagtaag	tagttcgcca	1380
gttaatagtt	tgcgcaacgt	ggttgccatt	gctacaggca	tcgtgggtgc	acgctcgtcg	1440
tttggtatgg	cttcattcag	ctccggttcc	caacgatcaa	ggcgagttac	atgatcccc	1500
atgttggtgca	aaaaagcggg	tagctccttc	ggctctccga	tcgttgctcag	aagtaagttg	1560
gccgcagtgt	tatcactcat	ggttatggca	gcactgcata	attctcttac	tgatcatgcca	1620
tccgtaagat	gcttttctgt	gactgggtgag	tactcaacca	agtcattctg	agaatagtgt	1680
atgcggcgac	cgagttgctc	ttgcccggcg	tcaatacggg	ataataccgc	gccacatagc	1740
agaactttaa	aagtgctcat	cattggaaaag	cgttcttcgg	ggcgaaaact	ctcaaggatc	1800
ttaccgctgt	tgagatccag	ttcgatgtaa	cccactcgtg	cacccaactg	atcttcagca	1860
tcttttactt	tcaccagcgt	ttctgggtga	gcaaaaacag	gaaggcaaaa	tgccgcaaaa	1920
aagggataaa	ggcgacacg	gaaatggtga	atactcatac	tcttcctttt	tcaatattat	1980
tgaagcattt	atcaggggta	ttgtctcatg	cgcggatata	tatttgaatg	tatttagaaa	2040
aataaacaaa	taggggttcc	gcgcacattt	ccccgaaaag	tgccacctga	cgtcgc	2096

<210> 10

<211> 238

5 <212> ADN

<213> molécula de ADN sintética

<400> 10

ES 2 384 296 T3

cgctgagcgt	aatacgactc	actatagggg	ggccctgtac	gtagcggccg	cgtcgacgat	60
atcggagctg	ctgggccag	ggagcttcta	gaggagctgg	atccgctgga	gaattcggag	120
ctggaaagct	tggagctgct	ctgcagggag	ctgcatgcgc	tggcgcacag	ctgatttaa	180
tcggtccg	tacgtccgga	tccctttag	tgagggttaa	ttgtttaa	gctcttcc	238

REIVINDICACIONES

1. Un plásmido vector de clonación, en el que los elementos secuenciales que codifican una estructura modular comprenden
- a) tres sitios de restricción habituales únicos y no variables,
 - 5 b) un sitio cebador oligonucleotídico en 5',
 - c) un sitio de endonucleasas de anidación único en orientación directa,
 - d) un par de sitios de restricción habituales únicos y no-variables que flanquean secuencias nucleotídicas aleatorias,
 - 10 e) una agrupación fija de sitios de restricción raros no variables, que definen una porción 5' de un módulo promotor,
 - f) secuencias nucleotídicas aleatorias,
 - g) una agrupación fija de sitios de restricción raros no variables, que definen una unión compartida entre una posición en 3' relativa al módulo promotor/intrón, y una posición en 5' relativa a un módulo de expresión,
 - h) secuencias nucleotídicas aleatorias,
 - 15 i) una agrupación fija de sitios de restricción raros no variables que definen una unión de una posición en 3' relativa al módulo de expresión, y una posición en 5' relativa a un módulo de regulación en 3'
 - j) secuencias nucleotídicas aleatorias,
 - k) una agrupación fija de sitios de restricción raros no variables que definen una posición en 3' relativa a un módulo de regulación en 3',
 - 20 l) un par de sitios de restricción habituales únicos y no variables que flanquean secuencias nucleotídicas aleatorias,
 - m) un sitio de endonucleasas de anidación único de orientación opuesta, que es el mismo sitio de endonucleasas de anidación que el situado en 3' del sitio cebador oligonucleotídico en 5',
 - n) un sitio cebador oligonucleotídico en 3' de orientación opuesta, y
 - 25 o) cuatro sitios de restricción habituales únicos y no variables que definen un sitio de inserción en 3'.
2. El plásmido vector de clonación de la reivindicación 1, en el que la estructura modular de los elementos secuenciales está ordenada para permitir la introducción de tres regiones discretas de secuencias nucleotídicas, de modo que las secuencias nucleotídicas introducidas de este modo sustituyen las secuencias nucleotídicas aleatorias en los módulos promotor, de expresión, y regulador en 3'.

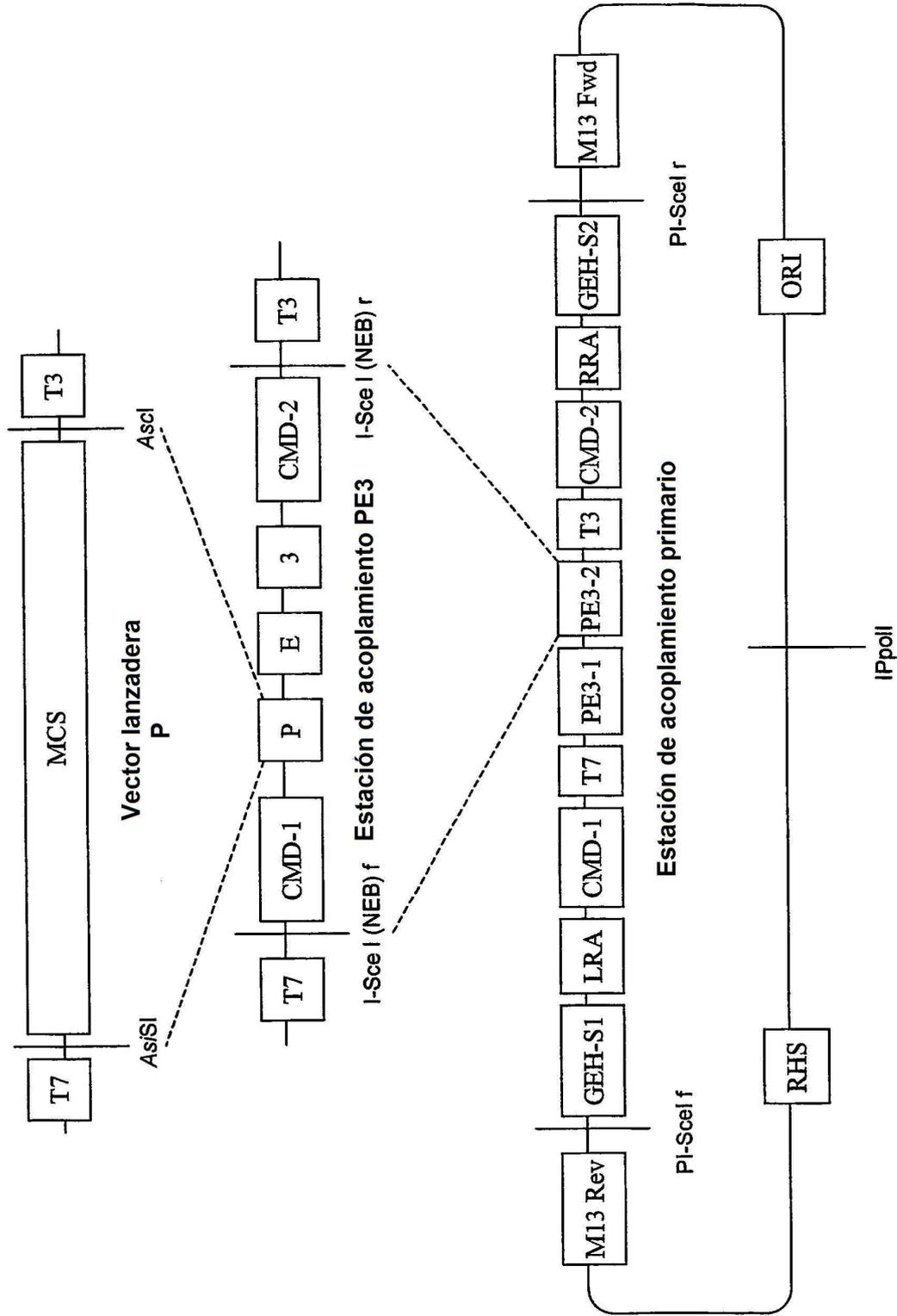


Figura 1

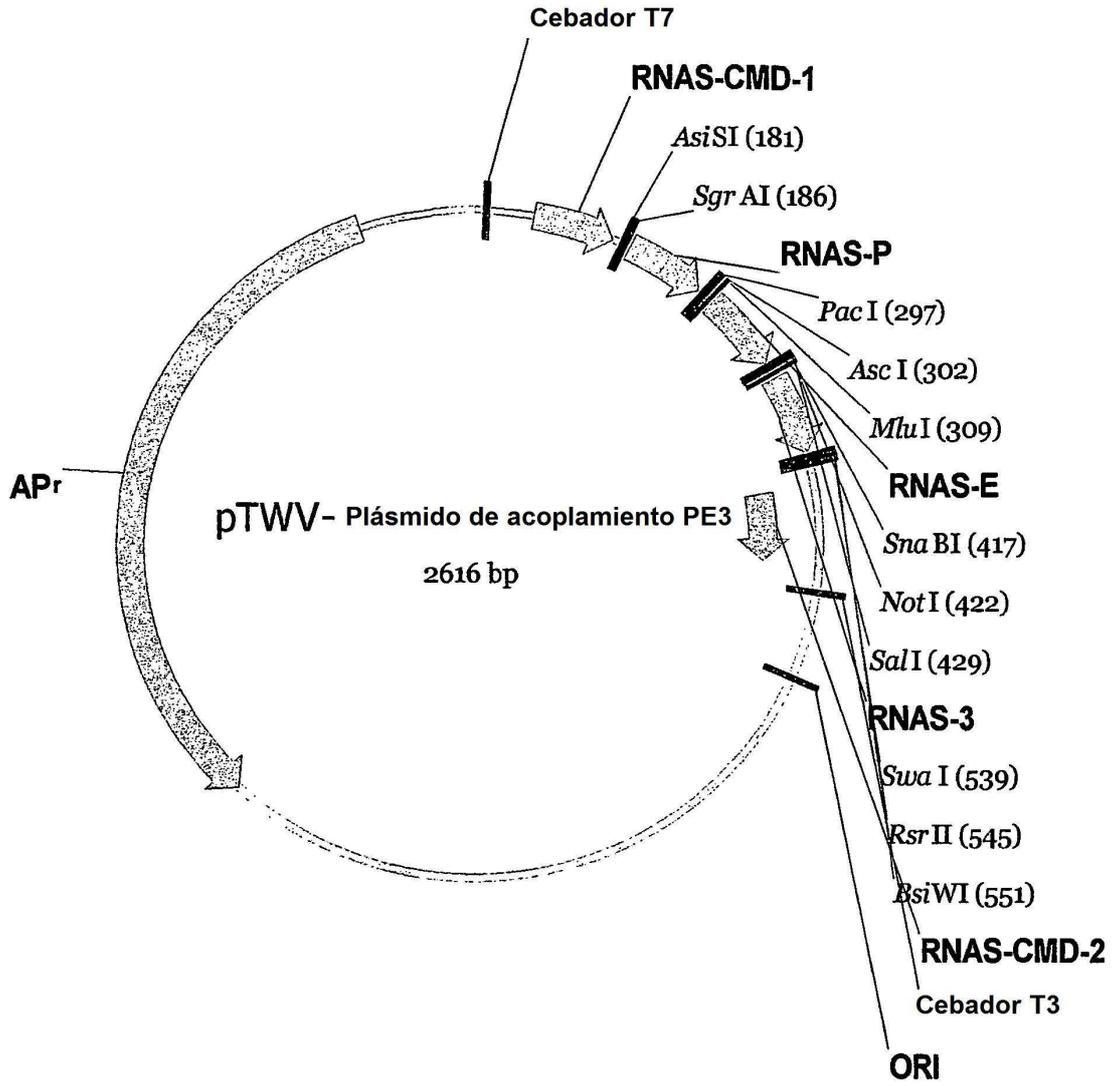


Figura 2

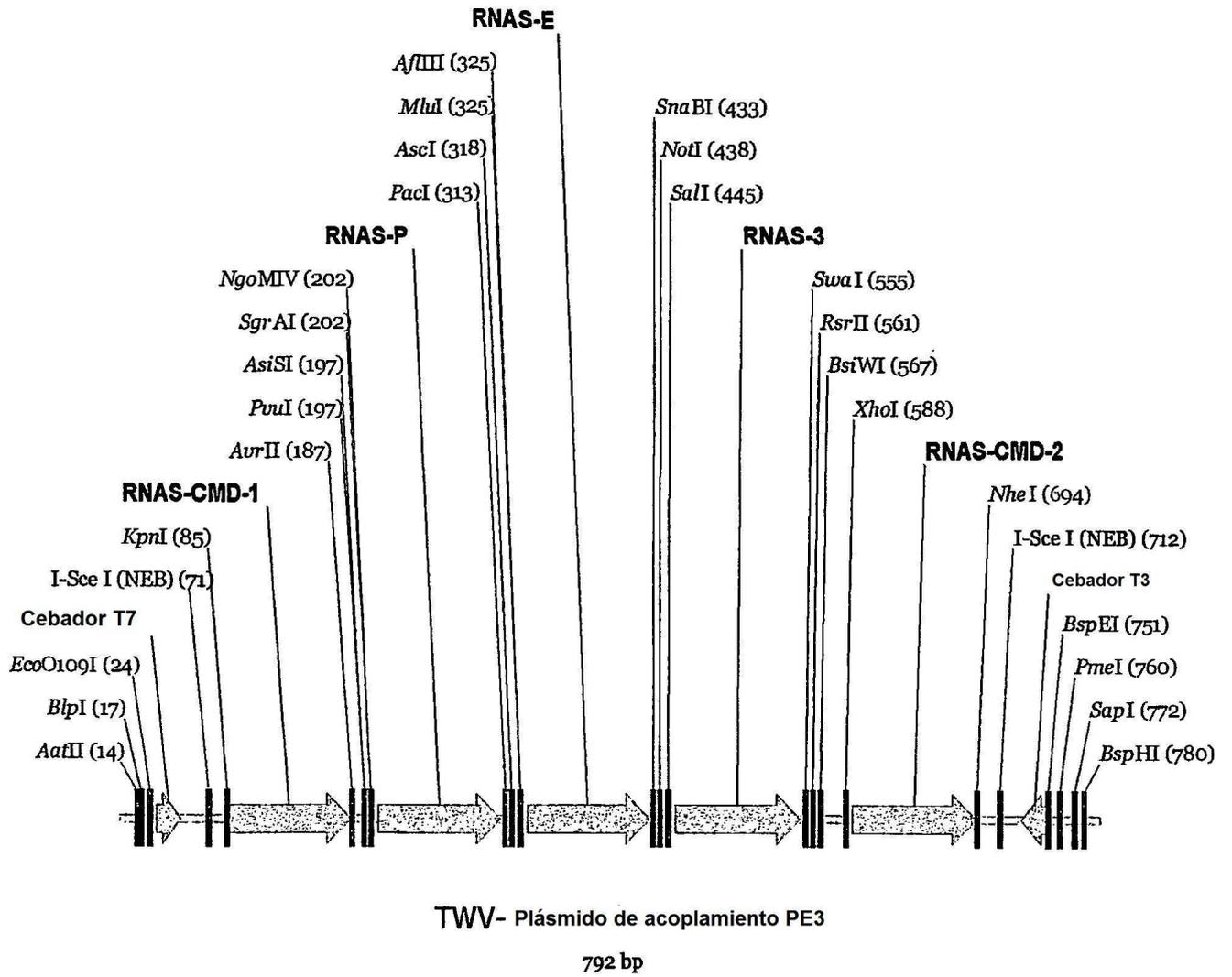


Figura 3

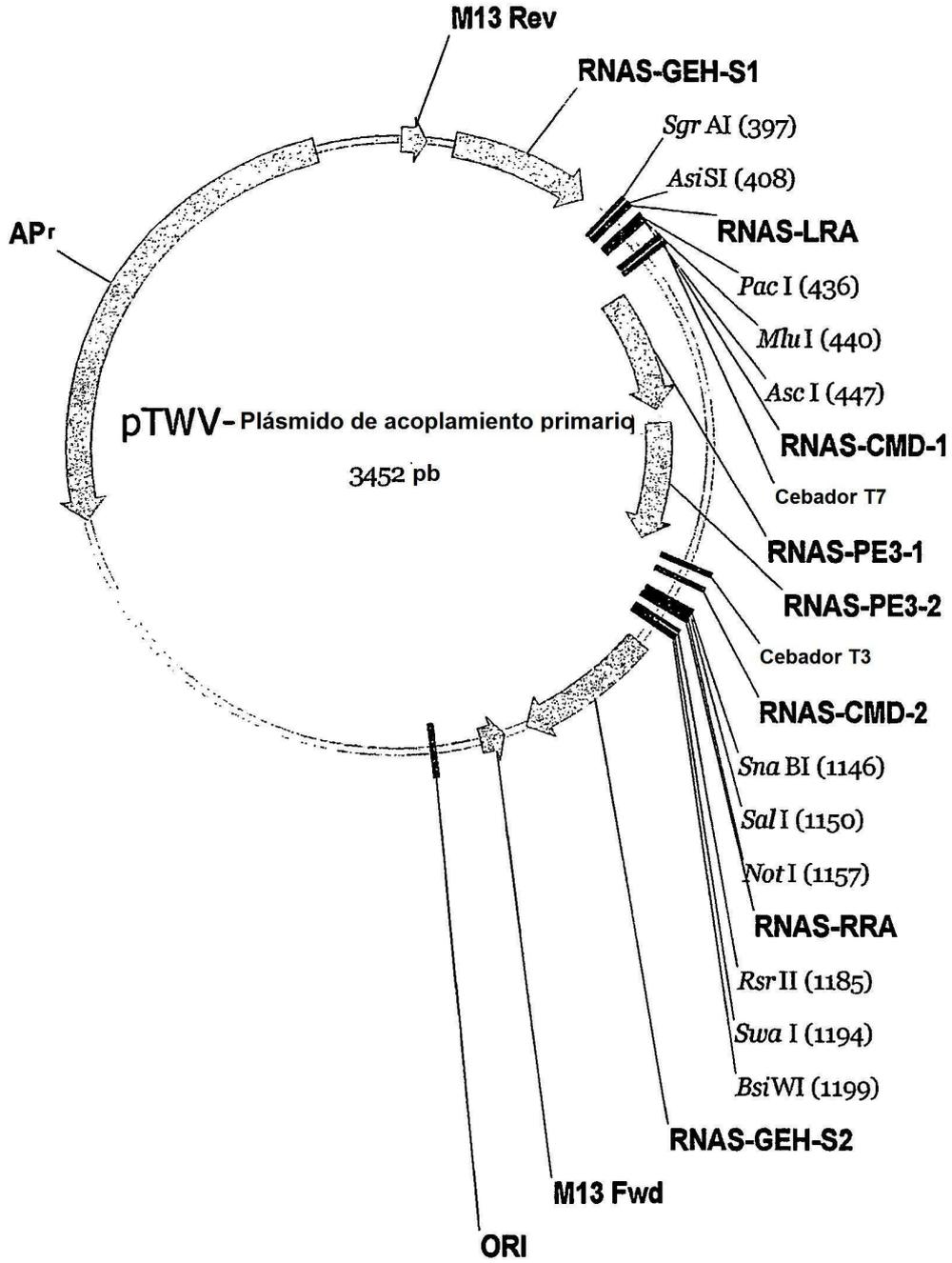
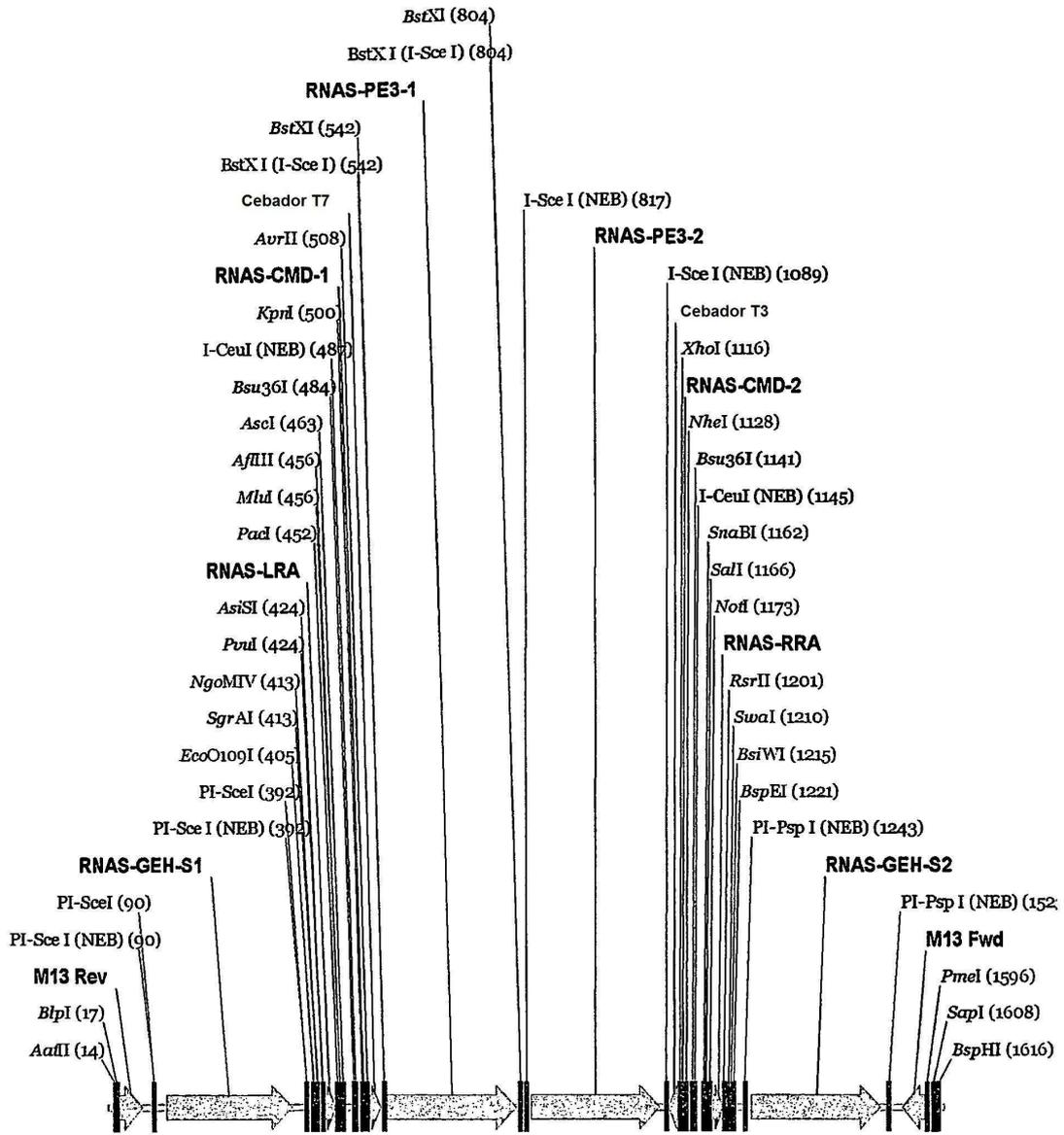


Figura 4



TWV-Plásmido de acoplamiento primario

1628 pb

Figura 5

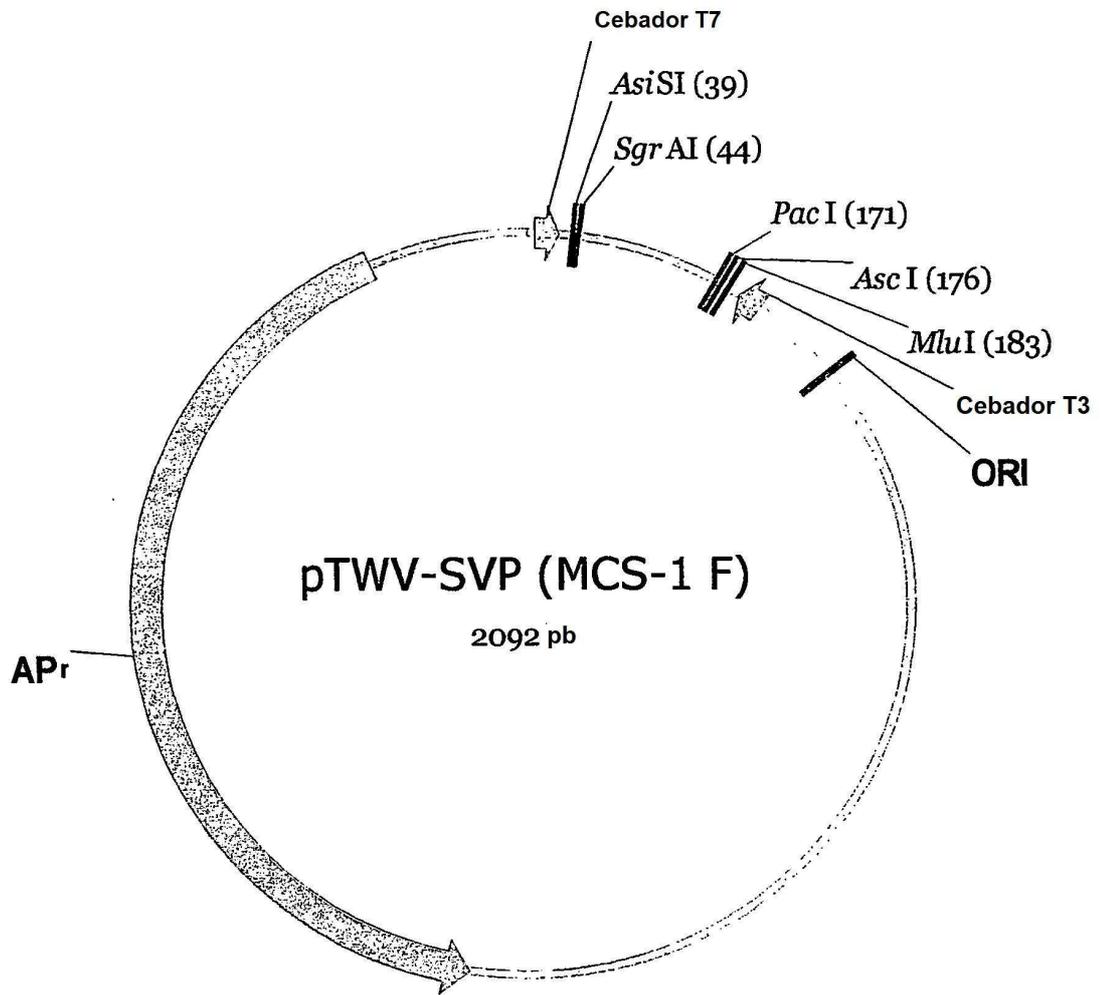


Figura 6

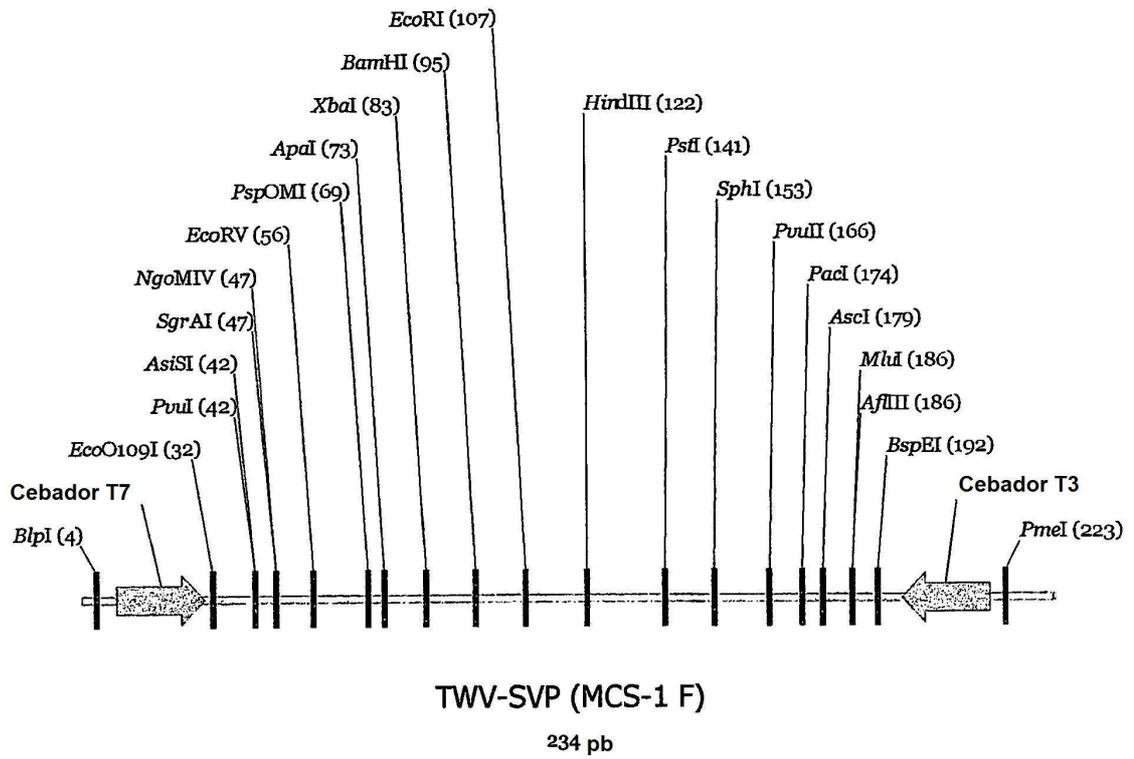


Figura 7

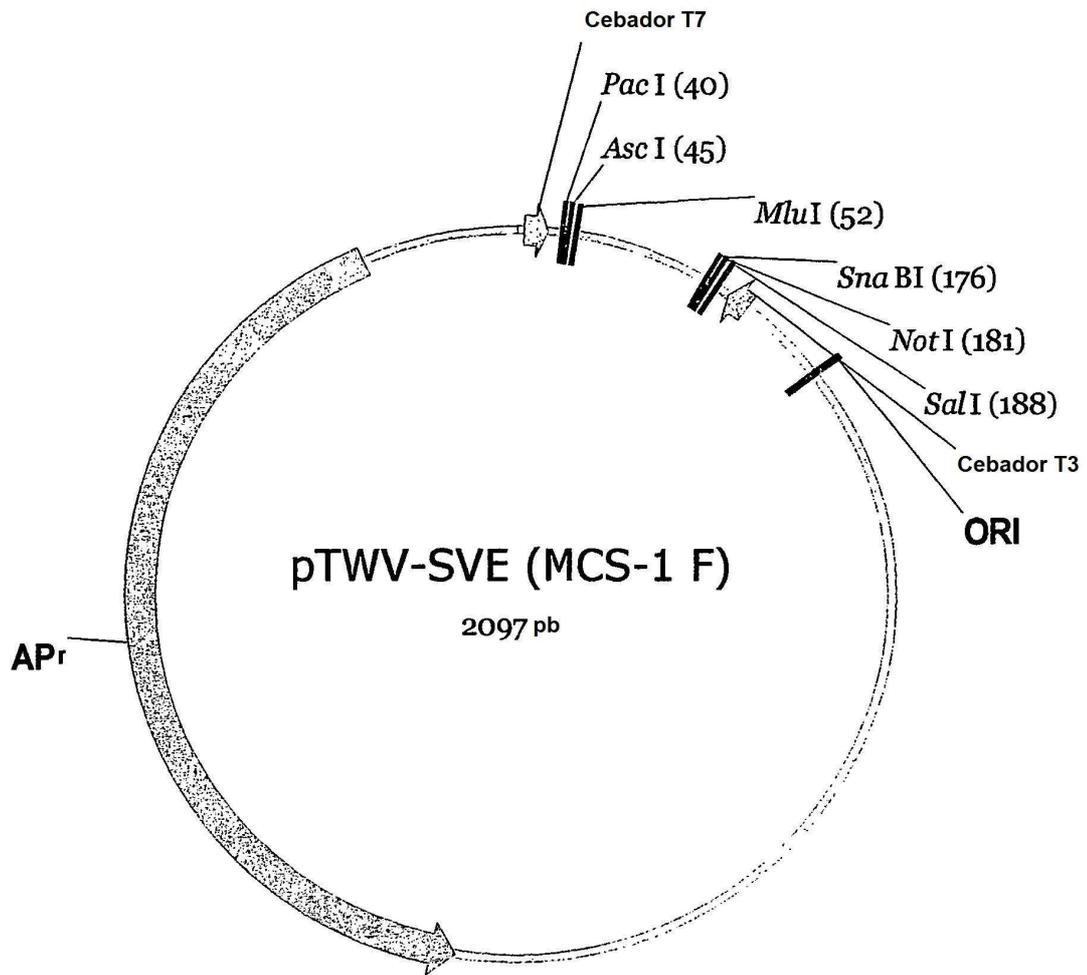


Figura 8

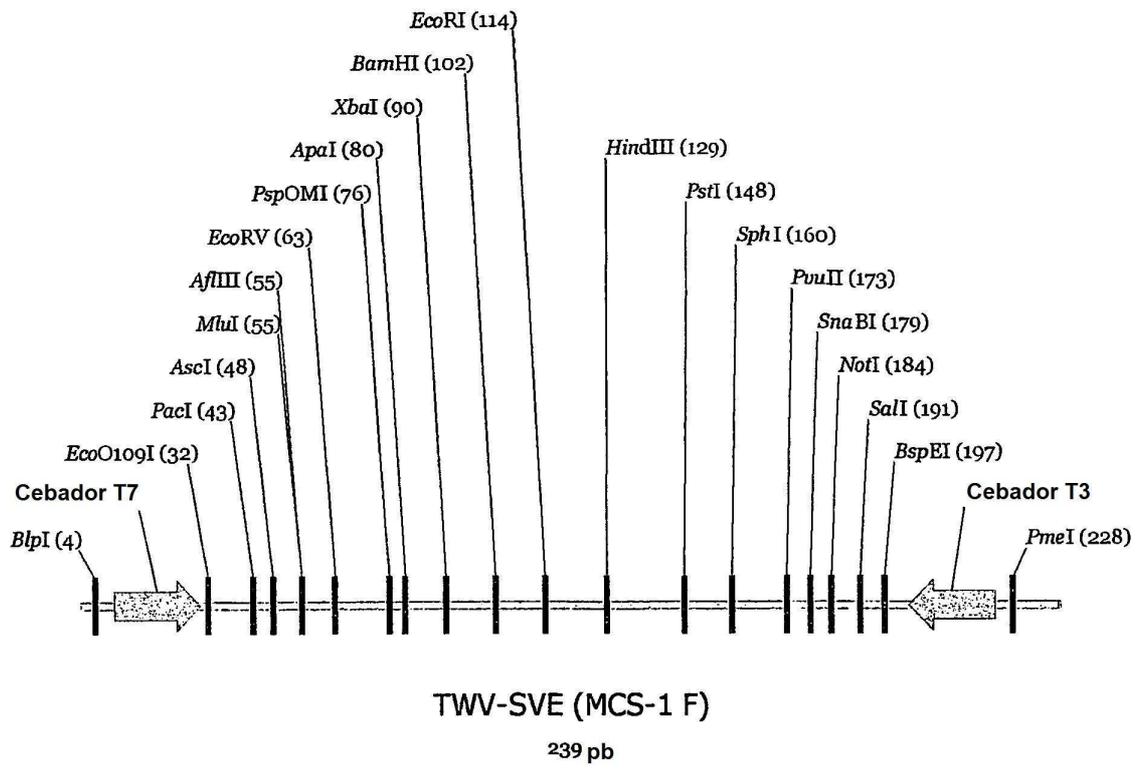


Figura 9

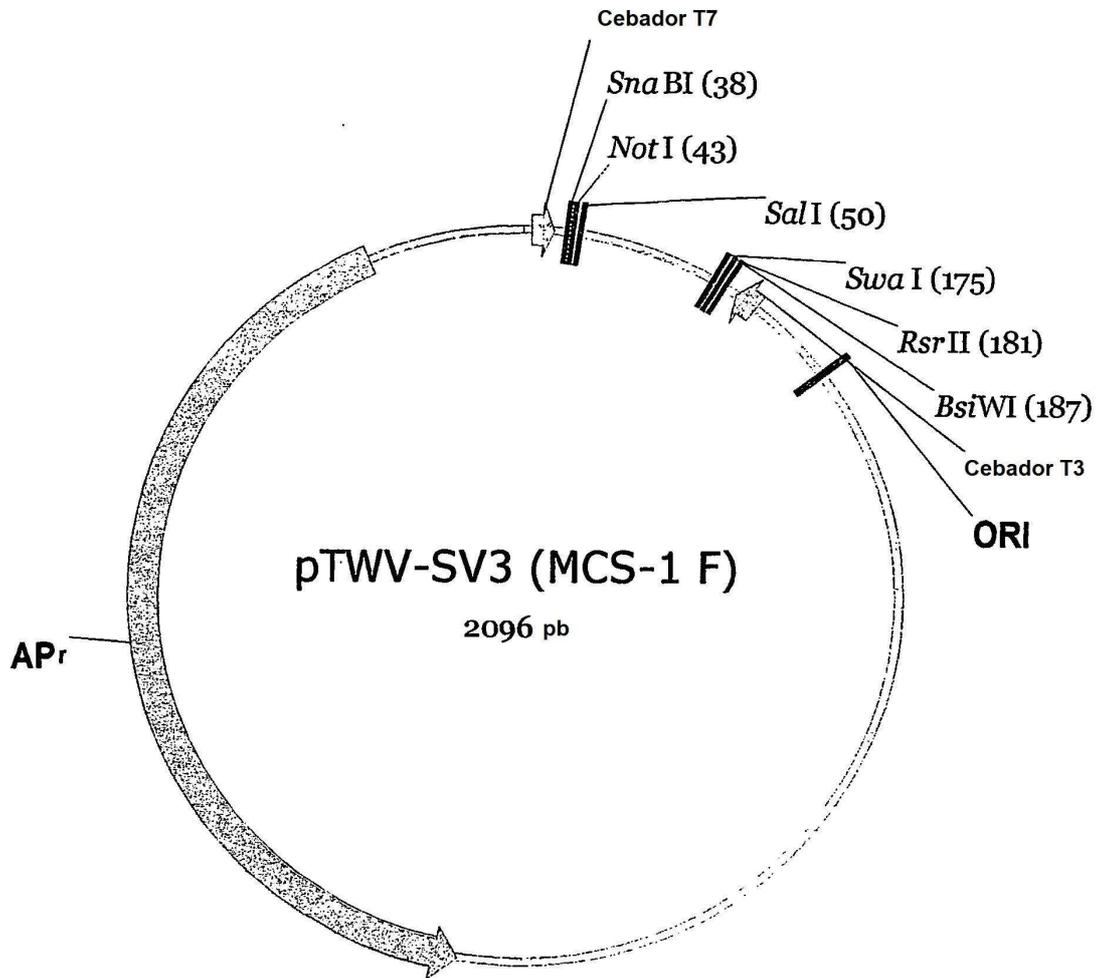


Figura 10

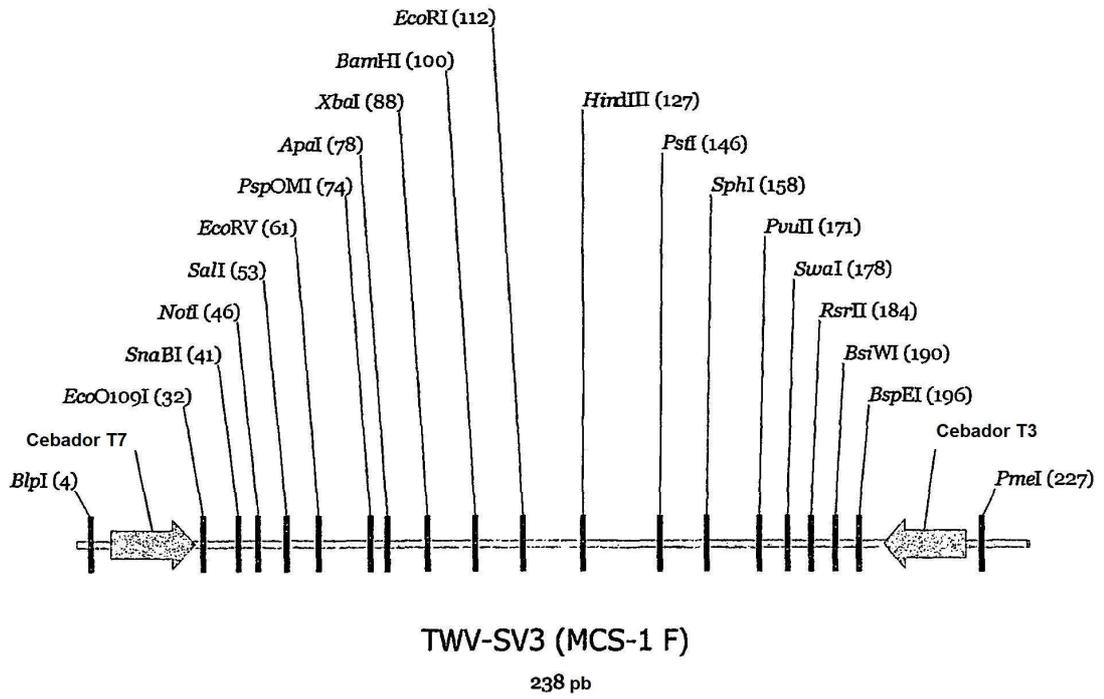


Figura 11