

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 654**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 15/67 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2007 E 07730192 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2012 EP 2049671**

54 Título: **Elementos reguladores de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

26.07.2006 EP 06117862

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

23.04.2013

73 Titular/es:

**BOEHRINGER INGELHEIM PHARMA GMBH & CO.
KG (100.0%)
BINGER STRASSE 173
55216 INGELHEIM AM RHEIN, DE**

72 Inventor/es:

**ENENKEL, BARBARA y
SAUTTER, KERSTIN**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 401 654 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

Elementos reguladores de ácidos nucleicos

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

SECTOR TÉCNICO

La invención se refiere a secuencias de ácidos nucleicos *cis*-activas, los llamados elementos TE. Los elementos TE provienen preferentemente del genoma CHO. Su empleo en, por ejemplo, vectores de expresión permite en poblaciones celulares estables una expresión de un gen de interés por lo menos dos veces más elevada en comparación con los vectores utilizados hasta ahora en cualquier locus cromosómico.

ANTECEDENTES

Las células de mamíferos son las células huésped preferidas para la producción de proteínas biofarmacéuticas complejas, ya que las modificaciones realizadas después de la traducción son compatibles con humanos desde un punto de vista funcional como también farmacocinético. Los tipos celulares preferentemente relevantes son hibridomas, mielomas, células de CHO (*Chinese Hamster Ovary*) y células de BHK (*Baby Hamster Kidney*). El cultivo de las células huésped se realiza de modo creciente en condiciones de producción libres de suero y de proteínas. Los motivos para ello son la reducción de costos asociada a ello, la menor interferencia en la purificación de la proteína recombinante, así como la reducción del potencial para la introducción de patógenos (por ejemplo, priones, virus). La aplicación de células CHO como células huésped tiene cada vez más difusión, ya que estas células se pueden adaptar al crecimiento en suspensión en un medio libre de suero y de proteína y, al mismo tiempo, son consideradas y aceptadas como células productivas seguras según las autoridades de regulación.

Para generar una línea celular de mamífero estable que expresa un gen heterólogo de interés, se incorpora el gen heterólogo por lo general junto con un gen marcador seleccionable tal como, por ejemplo, neomicina-fosfotransferasa (NPT), por transfección en la línea celular deseada. El gen heterólogo y el gen marcador seleccionable se pueden expresar en una célula huésped, a partir de un único vector o de vectores cotransfectados, separados. Dos a tres días después de la transfección, las células transfectadas se convierten en medio que contiene un agente selectivo, por ejemplo, G418 al usar el gen de neomicina-fosfotransferasa (gen NPT), y se cultivan durante algunas semanas en estas condiciones selectivas. Las células resistentes de alto crecimiento que tienen integrado el ADN exógeno se pueden aislar e investigar en cuanto a la expresión del producto génico deseado (gen de interés).

Para la producción biofarmacéutica son necesarias líneas celulares con productividad alta y estable. Los vectores de expresión para las células de producción son provistos de promotores y potenciadores ("enhancer") fuertes, que expresan principalmente en forma constitutiva tales como, por ejemplo, el potenciador y el promotor de CMV, para posibilitar una alta expresión del producto. Como esta expresión del producto tiene que ser garantizada durante un período de tiempo en lo posible prolongado, se seleccionan células que han integrado el gen del producto en forma estable en su genoma. Esto se realiza con marcadores de selección tales como, por ej., la neomicinafosfotransferasa (NPT) y la dihidrofolato-reductasa (DHFR).

Por la integración casual de los vectores de expresión en el genoma de la célula huésped se obtienen células con una expresión de distinta magnitud del producto de gen deseado, ya que su expresión no está condicionada solamente por la intensidad del promotor precedente o de la combinación promotor/potenciador. La estructura de cromatina que se encuentra en el lugar de integración puede influir sobre la magnitud de la expresión tanto en forma negativa como también positiva. En forma creciente se integran en los vectores de expresión por lo tanto también elementos *cis*-activos, los cuales influyen de manera positiva sobre la expresión a nivel de la cromatina.

Estos comprenden las regiones de control de locus ("Locus Control Regions") (LCR), las que se encuentran, por ej., en la región 5' del gen de la β -globina (Li y col., 2002) y en la región 3' del gen TCR α . Estas provocan una alta expresión específica del tejido de un transgén acoplado en la cromatina, la cual se caracteriza por la independencia de la posición y la dependencia del número de copias. Estas propiedades indican que las LCRs son capaces de abrir la cromatina en su tejido nativo (Ortiz et al., 1997). Existen diversas formas de β -talasemia en las cuales el locus de la β -globina se encuentra intacto, pero no se expresa. El motivo de la falta de expresión es una gran deleción en dirección 5' del gen de la β -globina. La deleción de esta LCR de β -globina conduce a una conformación de cromatina cerrada, la cual se extiende a través de todo el locus y lleva a una supresión de la expresión del gen (Li et al., 2002). Las LCRs se colocan con sitios hipersensibles (HS) a la ADNasa I en las células que expresan cromatina. La presencia de HA indica igualmente una cromatina abierta. Los HS contienen una serie de diferentes sitios de ligadura generales y específicos del tejido para los factores de transcripción. Mediante la interacción de los factores de transcripción con el ADN se forma la estructura abierta de la cromatina de los HS (Li et al., 2002). De algunas LCRs se conoce que están compuestas por varios HS, cuyas funciones pueden ser delimitadas más o menos una de otra. El gen de TCR α , por ejemplo, es expresado bajo el control endógeno sólo en el tejido de las células T. El locus existe, según el tejido y el estado de expresión, en diversos modos de cromatina. Posee en la zona 3' una región de control de locus, que presenta ocho HS. El HS 2 - 6, un fragmento parcial de 6 kb de la LCR

actúa abriendo la cromatina y no es específico del tejido. La especificidad con respecto al tejido le es otorgada a la expresión específica de las células T en el timo por el HS 7, 8 y 1 (3 kb). Sólo en la combinación completa de todos los HS se encuentra funcionalmente completa la TCR α LCR (Ortiz et al., 1997). Una subdivisión y especificación más exacta de las funciones HS individuales de la TCR α LCR se puede leer en (Ortiz et al., 1999). Este ejemplo muestra que las LCRs son funcionalmente muy complejas y que pueden estar compuestas por diversos elementos de control como potenciadores, silenciadores y aisladores. Otros ejemplos para una división de las funciones de las LCR en diversos dominios son el locus de TCR γ y el locus de β -globina. El primero está compuesto por el sitio hipersensible a la ADNasa I HsA y el potenciador 3'E_{CY1}. A la TCR γ -LCR se le adjudican además de las tareas usuales, un rol en la recombinación del gen TCR γ (Baker et al., 1999). El locus de β -globina presenta cinco HS con diversas funciones, las que para su funcionamiento completo necesitan además el promotor específico del tejido. Las LCRs podrían jugar otro rol importante en la desmetilación del ADN específica del tejido, ya que la mutilación de ADN provoca una estructura de cromatina cerrada y la inactivación de genes. También sería posible un mecanismo de acción que activa la expresión del gen por medio de una acetilación aumentada de histona (Li et al., 2002).

Las regiones de andamio/unión a la matriz ("Scaffold/Matrix Attachment Regions") (S/MARs) son secuencias de ADN que se ligan con alta afinidad *in vitro* a componentes de la matriz o de la estructura del núcleo celular. Ellas forman los límites estructurales y posiblemente también funcionales de los dominios de cromatina (Zahn-Zabal et al., 2001). Las S/MARs son capaces de interactuar con los potenciadores así como también de aumentar la accesibilidad del ADN en la cromatina localmente y de este modo pueden aumentar la expresión de genes heterólogos, integrados en forma estable, en líneas celulares, plantas y animales transgénicos (Klehr et al., 1991; Stief et al., 1989; Jenuwein et al., 1997; Zahn-Zabal et al., 2001). Pero no pueden proteger a un locus cromosómico completamente de sus elementos circundantes para posibilitar una expresión independiente de la posición (Poljak et al., 1994). El efecto de las MARs se puede usar para aumentar la parte de clones celulares que expresan (fuertemente) y/o animales transgénicos en un experimento de transfección (McKnight et al., 1992; Zahn-Zabal et al., 2001). Sin embargo, también se informó de MARs que no producen una fuerte expresión, pero que tienen un rol importante en la regulación correcta de genes específicos para el desarrollo (McKnight et al., 1992).

Los aisladores se definen como límite neutro entre regiones vecinas que se influyen mutuamente, por ej., entre cromatina activa e inactiva (elementos límite). Pueden limitar la acción de los potenciadores y/o aislar contra ellos dominios completos de ADN y proteger a genes informadores transfectados en forma estable contra efectos de posición (Bell y Felsenfeld, 1999; Udvardy, 1999). Estos elementos proveen así una independencia de la expresión de la posición genómica. Además pueden evitar el silenciamiento de transgenes en ausencia de presión de selección (Pikaart et al., 1998). Otra supuesta función de los aisladores es la delimitación de territorios de replicación (Bell y Felsenfeld, 1999). Los primeros aisladores que se describieron son scs y scs' de *Drosophila*. Representan el límite para el gen del shock de calor hsp70 y suprimen efectos de posición (Udvardy et al., 1985).

Como otro elemento con función aislante se halló un fragmento rico en GC del gen dhfr (hámster chino), que contienen islas de CpG (Poljak et al., 1994). El fragmento sólo no mostró influencia sobre la expresión del gen informador. Situado entre una SAR que promueve la expresión y el gen informador, el fragmento pudo, sin embargo, evitar en gran parte la acción aumentadora de la expresión del elemento SAR. Este fragmento rico en GC bloquea posiblemente el mecanismo de apertura de cromatina del elemento SAR y actúa por lo tanto como aislante. Los elementos con islas de CpG extendidas son muy probablemente metiladas, ya que son reconocidas por una ADN-metiltransferasa, la que transforma citosina en 5-metilcitosina. Como consecuencia se forma cromatina inactiva (Poljak et al., 1994).

Aronow y colaboradores definieron en el primer intrón del gen ADA humano (adenosina desaminasa) un nuevo elemento regulador que aporta sustancialmente a la expresión dependiente del número de copias de gen e independiente de la posición (Aronow et al., 1995). El elemento es de hasta 1 kb y sólo funcional, cuando flanquea un potenciador específicos de las células T de 200 pb. Si sólo se encuentra presente uno de los dos segmentos o si los segmentos están mal ordenados con respecto al orden y la orientación, el elemento no tiene función, ya que de este modo se evita la formación de los sitios hipersensibles a la ADNasa I en el potenciador.

La empresa Cobra Therapeutics describe en la patente WO 02/081677 otro elemento que influye sobre la cromatina. Los elementos de apertura de cromatina ubicuos ("Ubiquitous Chromatin Opening Elements") (UCOEs) son responsables de una estructura de cromatina abierta en regiones cromosómicas con genes domésticos expresados en forma ubicua (gen hnRNP A2 humano, gen β -actina humano, gen PDCD2 humano). Todos estos genes poseen islas ricas en CpG en las zonas no traducidas, las que están relativamente poco metiladas. La falta de mutilación de las islas CpG indica que en este sitio se trata de cromatina activa. Los UCOEs ayudan a una intensidad de expresión que es independiente del ambiente circundante genómico y del tipo de célula o tejido.

La empresa Immunex describe igualmente secuencias de ADN cis-activas, que provocan un aumento de la expresión (documento US 6.027.915, documento US 6.309.851). El elemento denominado elemento de secuencia que aumenta la expresión ("Expression Augmenting Sequence Element") (EASE) promueve una alta expresión de proteínas recombinantes en células de mamíferos, no es activo en sistemas de expresión transitorios y no posee las propiedades de secuencias típicas como se encuentran en LCRs y S/MARs. Tampoco se trata de una secuencia

que codifica para una proteína trans-activante, ya que no contiene un marco de lectura abierto. El fragmento tiene un tamaño de 14,5 kb, proviene del ADN gnómico de células CHO y puede aumentar ocho veces la expresión de un gen informador integrado en forma estable. Más de 50% de la actividad del elemento está limitada a un segmento de 1,8 kb de tamaño, en donde los primeros 600 pares de bases de este segmento son indispensables para la función correcta. Una propiedad adicional de los sectores de secuencias con alta actividad EASE es la presencia de varios sitios de unión HMG-I(Y). Las proteínas HMG-I(Y) pertenecen a la familia de las proteínas de cromatina no histona del grupo de alta movilidad. También son denominadas “factores de transcripción arquitectónicos” y forman una nueva categoría de los trans-reguladores de genes de mamíferos. Las proteínas HMG-I(Y) reconocen secuencias ricas en AT y se ligan con sus así llamados ganchos AT (dominios que ligan ADN) en el surco pequeño del ADN. Esto puede llevar a modificaciones locales de la topología de ADN y en consecuencia a una expresión génica modificada. Los autores de la patente US 6.309.841 suponen que los efectos de los EASE están relacionados con la amplificación inducida por MTX del plásmido integrado. En la amplificación del gen inducida por MTX se producen los así llamados ciclos de rotura-fusión-puente (“Breakage-Fusion-Bridge”). Se puede imaginar un rol de las proteínas HMG-I(Y) en la modificación estructural del ADN que lleva a la formación y reparación de las roturas de ADN.

Otros elementos para aumentar la expresión génica en células de mamíferos se describieron en Kwaks et al., 2003. Estos así llamados elementos STAR (“Stimulatory and Anti-Repressor Elements”), elementos estimuladores y anti-represores, provienen del rastreo de una biblioteca de genes humanos con fragmentos de ADN de 500 a 2100 pb. El rastreo se realizó con un plásmido informador construido especialmente. La expresión del gen informador sólo era posible cuando estaba unido funcionalmente con un elemento anti-represor del banco de genes humano. Con los elementos STAR así obtenidos, los autores pudieron proteger a transgenes de los efectos de posición en el genoma de células de mamíferos. En comparación con el genoma del ratón se mostró que la mayoría de estos elementos STAR se encuentran tanto en el genoma humano como en el del ratón y están altamente conservados en estas dos especies.

Un gran problema en la determinación de líneas celulares con alta expresión de la proteína deseada resulta de la integración arbitraria y no dirigida del vector recombinante en los loci de transcripción activa o inactiva del genoma de la célula huésped. De este modo se obtiene una población de células que presentan tasas de expresión completamente diferentes del gen heterólogo, en donde la productividad de las células sigue en general una distribución normal. Para la identificación de clones de células, que presentan una muy alta expresión del gen heterólogo de interés, tienen que examinarse y probarse una multiplicidad de clones, dando por resultado un alto costo en cuanto a tiempo, trabajo y gastos. Las optimizaciones del sistema de vectores usado para la transfección están dirigidas por lo tanto primero a posibilitar la transcripción de un transgén integrado en forma estable por medio del uso de elementos cis-activos adecuados, o también a aumentarla. Los elementos cis-activos que tiene efecto sobre el nivel de cromatina comprenden, por ej., las ya descritas regiones de control de locus, las regiones de andamio/unión a la matriz, aisladores, entre otros. Algunos de estos elementos protegen a determinados genes contra la influencia de la cromatina circundante. Otros muestran un efecto similar a los intensificadores, estando ésta, sin embargo, limitada a constructos integrados en forma estable. Otros elementos reúnen varias de estas funciones en ellos. Frecuentemente no es posible una adjudicación exacta a un grupo determinado.

En líneas celulares estables la expresión del gen del producto transgénico está sujeta considerablemente a efectos de posición cromosómicos. Este fenómeno se basa en la influencia de la estructura de la cromatina y/o a la presencia de elementos reguladores intrínsecos en el lugar de integración del ADN extraño. Esto lleva a niveles de expresión muy variables. En la selección de células se forman por lo tanto frecuentemente clones con expresión del producto muy reducida o que falta totalmente. Estos efectos de posición cromosómicos también son la causa de que la generación de líneas celulares de producción, que expresan un alto nivel de una proteína terapéutica, constituya en general un procedimiento muy costoso en cuanto a tiempo, capacidad y gastos. Las líneas celulares estables con alta productividad son generadas comúnmente por selección con marcadores de selección positivos, combinados frecuentemente con amplificación génica inducida por agentes (por ej., dihidrofolato-reductasa/metotrexato o glutaminasintetasa/metioninasulfoximina). Los pools y clones que se forman con esta estrategia de selección son examinados en un procedimiento de rastreo muy trabajoso con respecto a una expresión alta y estable. La mayoría de los clones no produce o sólo produce cantidades promedio de producto, sólo muy pocos son altos productores. La proporción de altos productos en una población mixta puede ser aumentada, por ejemplo, por una mutación en el marcador de selección (Sautter y Enenkel, 2005, documento WO 2004/050884). Un aumento adicional de la productividad específica de cada clon individual, así como también de la proporción de altos productores dentro de una población celular transfectada es, sin embargo, deseable.

La productividad específica de células transfectadas en forma estable, especialmente células CHO u otras células relevantes para la producción, y la proporción de altos productores de una mezcla de transfección tienen que ser aumentados. Esto tiene que llevar en última instancia a un desarrollo más eficiente de las líneas celulares. De este modo se pueden establecer en menos tiempo más líneas celulares y con mayor producción, y de este modo se ahorra en tiempo, trabajo y costos.

SÍNTESIS DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a ácidos nucleicos reguladores (denominados “elementos TE”), especialmente a un ácido nucleico que contiene TE-13 (SEQ ID N° 15) o a un fragmento de TE-13 (SEQ ID N° 15) o a sus secuencias de nucleótidos complementarias o a un derivado de TE-13 (SEQ ID N° 15) o a sus secuencias de nucleótidos complementarias, en donde el ácido nucleico, el fragmento, el derivado o sus secuencias de nucleótidos complementarias lleva a un aumento de la transcripción y/o expresión de un gen de interés en un sistema de expresión, y en donde el derivado presenta al menos una identidad de la secuencia del 85%. La presente invención se refiere, en particular, a un ácido nucleico con la SEQ ID N° 1. Se pudo demostrar, sorprendentemente, que el uso de un elemento TE de este tipo soluciona, protege de o elimina los efectos de posición cromosómicos en un vector de expresión en unión con un promotor, un gen de producto, un marcador de selección y opcionalmente un potenciador con una integración estable en un genoma huésped como, por ejemplo, el genoma CHO-DG44. De este modo se aumenta tanto la proporción de altos productos de una mezcla de transfección como también el nivel de expresión absoluto.

La invención se refiere además a vectores de expresión eucarióticos que contienen un ácido nucleico de acuerdo con la invención, preferentemente los elementos TE TE-01 (SEQ ID N° 3), TE-02 (SEQ ID N° 4), TE-07 (SEQ ID N° 9), TE-08 (SEQ ID N° 10), TE-10 (SEQ ID N° 12), TE-11 (SEQ ID N° 13), TE-12 (SEQ ID N° 14), TE-13 (SEQ ID N° 15), TE-15 (SEQ ID N° 17), TE-17 (SEQ ID N° 19), TE-18 (SEQ ID N° 20). En base a su tamaño reducido se prefieren especialmente TE-07, TE-08, así como TE-13 (SEQ ID N° 15).

La SEQ ID N° 1 proviene de una zona de secuencias que se encuentra corriente arriba de la región codificadora del gen ubiquitina/S27a, que fue aislada de células CHO, en donde el gen codifica para una proteína esencial en el metabolismo de ribosomas de la célula.

En comparación con los vectores de expresión usados hasta ahora, la introducción adicional de los elementos TE *cis*-activos en vectores de expresión posibilita una productividad específica sorprendentemente mayor hasta en un factor de 7, del pool de células transfectadas en forma estable, especialmente del pool de células CHO-DG44. En transfecciones transitorias de pools de células CHO-DG44 no se puede obtener en cambio con la introducción de los elementos TE ningún aumento de la productividad. Así, el aumento de productividad observado en el pool de células estable no se basa en un potenciador presente en los elementos TE. Para el aumento de la productividad causado por los elementos SE TE requiere obligatoriamente una integración cromosómica. Esto indica que los elementos TE pueden suprimir, proteger de, o eliminar, efectos de posición cromosómicos negativos. De este modo se pudieron generar e identificar elementos *cis*-activos que se caracterizan por su especial adecuación para la selección y el enriquecimiento de células de alta producción y de este modo pueden reducir tiempo, costos y capacidad en el aislamiento y la identificación de clones de alta producción.

Las posibilidades de utilización de la invención se encuentran, por ej., en el desarrollo de líneas celulares de alta producción, que son requeridas, por ejemplo, para la preparación de productos biofarmacéuticos, en ensayos analíticos basadas en células, en “High Throughput Screenings” de sustancias o para la obtención de productos de proteínas recombinantes para espectroscopia RMN, otros ensayos, etc. Por la mayor productividad específica y la reducción de células, que no expresan o expresan poco producto, se pueden establecer más líneas celulares y de mayor producción en menor tiempo y de este modo se puede ahorrar en trabajo y costos. Otras posibilidades de utilización se encuentran en la obtención de líneas de células huésped robustas, mejoradas (por ej., introducción de genes anti-apoptosis o de glucosilación), de plantas o animales transgénicos así como también en la terapia génica.

La invención no resulta del estado de la técnica.

El ácido nucleico con la SEQ ID N° 1 es una secuencia de ácidos nucleicos que se aisló del genoma de hámster chinos (*Cricetulus griseus*). Proviene de una zona de secuencias que se encuentra corriente arriba de la región codificadora del gen de ubiquitina/S27a.

El ácido nucleico con la SEQ ID N° 1 presenta un contenido promedio de GC de 44% y no contiene pasajes más largos de repeticiones de GC. Este contenido de GC es comparable con el contenido de GC promedio descrito para ADN genómico de mamíferos de aprox. 40% (Delgado et al., 1998). La búsqueda con newcpgseek (paquete de análisis de la secuencia EMBOSS) de regiones ricas en CpG dio como resultado únicamente cinco regiones de secuencia, muy cortas, que presentan una frecuencia, absolutamente incrementada, de dímeros CpG y/o una proporción incrementada de CpG en relación con GpC: nucleótidos 2242 – 2259 (18 pb), 3129 – 3146 (18 pb), 3215 – 3240 (26 pb), 3417 – 3461 (44 pb) y 3658 – 3788 (131 pb) de la SEQ ID N° 1. Los resultados de la búsqueda demuestran que la secuencia de ácidos nucleicos no contiene islas de CpG extendidas.

Además, la SEQ ID N° 1 contiene dos repeticiones tandem (nucleótidos 2179 – 2244 y nucleótidos 1027 – 1080) y dos repeticiones invertidas (nucleótidos 8 – 47 y nucleótidos 1726 – 1766), las cuales fueron identificadas con los programas EMBOSS *etandem* y *einverted*. TE-08 contiene, por consiguiente, una repetición invertida. En el intervalo de la secuencia entre 1 pb y 1578 pb se encuentran, por consiguiente, una repetición tandem y una repetición invertida.

Partes de los ácidos nucleicos con la SEQ ID N° 1 ya fueron descritas en el documento WO 97/15664: los nucleótidos 1579 a 3788 de la SEQ ID N° 1 corresponden a los nucleótidos 1 a 2201 de la SEQ ID N° 5 de la WO

97/15664, pero con una diferencia. En la preparación de la SEQ ID N° 1 de acuerdo con la invención se introdujeron 4 nucleótidos adicionales condicionados por la clonación, los que se generaron por una reacción de relleno de un sitio de corte de EcoRI existente. Esta inserción de los 4 nucleótidos adicionales se realizó entre los nucleótidos 357 y 358 de la SEQ ID N° 5 del documento WO 97/15664. Los nucleótidos 1 a 1578 de la secuencia de ácidos nucleicos con la SEQ ID N° 1 de la presente invención presentan sin embargo, zonas de secuencias hasta ahora desconocidas, que fueron aisladas en el marco de esta invención. En el documento WO 97/15664 tampoco se reveló que la SEQ ID N° 1 de la presente invención, u otros ácidos nucleicos de acuerdo con la invención que aumentan la transcripción y/o la expresión de un gen de interés, independientemente del lugar de integración cromosómico, cuando se unen funcionalmente con una combinación de promotor/potenciador, la que posibilita la transcripción del gen de interés unido funcionalmente. En el documento WO 97/15664 se divulga en cambio el uso de las secuencias 5'UTR del gen de ubiquitina/S27a como promotor, en donde la zona de secuencias de la posición -161 hasta la -45, de acuerdo con la Figura 5 en el documento WO 97/15664, es esencial para una actividad del promotor. Esta zona de secuencias se encuentra en el ácido nucleico de la SEQ ID N° 1, de acuerdo con la invención, y un fragmento derivado de la misma con la SEQ ID N° 2 mantenido sólo parcialmente (posición -161 a -89 de acuerdo con la Figura 5 en el documento WO 97/15664). Otros ácidos nucleicos de acuerdo con la invención ya no contienen esta zona de secuencias.

Además, el ácido nucleico de la SEQ ID N° 1 de acuerdo con la invención, usando los algoritmos de alineamiento estándar, como por ejemplo BLAST, no presentan homologías de secuencias con las secuencias de ácidos nucleicos descritos en las siguientes solicitudes de patente, las que también pueden influir en *cis* sobre la expresión a nivel de la cromatina:

- a) secuencias de ácido nucleico UCOE del documento WO 00/05393
- b) secuencias de ácido nucleico EASE del documento US 6.309.841
- c) secuencias de ácido nucleico STAR del documento WO 03/004704

Tampoco con estrategias de alineación más complejas se encuentran homologías de las secuencias extendidas con respecto a estas secuencias de ácidos nucleicos a) a c).

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIGURA 1: REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS VECTORES BASE

Los vectores representados bajo A se usaron para la expresión de un anticuerpo IgG1 monoclonal, recombinante en células CHO-DG44. "E/P", en este caso, es una combinación del potenciador CMV y el promotor de ubiquitina/S27a de hámster, "P" es sólo un elemento del promotor y "T" es una señal de terminación para la transcripción, que se requiere para la poliadenilación del mRNA transcrito. La posición y la dirección de la iniciación de la transcripción en cada unidad de transcripción se indica mediante una flecha. Para la clonación de los elementos TE antes de la combinación promotor/potenciador se encuentra un sitio de corte Spel ("Spel"). El marcador de selección amplificable dihidrofolato-reductasa está abreviado con "dhfr". El marcador de selección neomicina-fosfotransferasa contiene la mutación puntual D227G y está abreviado en la Figura correspondientemente con "D227G". El elemento "IRES" proveniente del virus de la encefalomiocarditis sirve como sitio de ligadura de ribosomas interno dentro de la unidad de transcripción bicistrónica posibilita la traducción de la siguiente proteína fluorescente verde "GFP". "HC" y "LC" codifican para la cadena pesada y/o liviana de un anticuerpo IgG1 monoclonal humanizado.

El vector representado bajo B se usó para la expresión de la proteína recombinante MCP-1 en células CHO-DG44. "E/P" es una combinación de potenciador de CMV y promotor de CMV, "P" es sólo un elemento de promotor y "T" es una señal de terminación para la transcripción que se requiere para la poliadenilación del mRNA transcrito. La posición y la dirección de la iniciación de la transcripción en cada unidad de transcripción se indica mediante una flecha. Para la clonación del elemento TE fue introducida una zona de secuencias "A" antes del promotor con sitios de corte para las endonucleasa de restricción (adaptador). El marcador de selección neomicina-fosfotransferasa contiene la mutación puntual F240I y está abreviada en la Figura correspondientemente con "F240I". El elemento "IRES" proveniente del virus de la encefalomiocarditis sirve como sitio de ligadura de ribosomas interno dentro de la unidad de transcripción bicistrónica posibilita la traducción de la siguiente proteína fluorescente roja "dsRed". "MCP-1" codifica para la proteína quimioattractiva de monocitos humana-1.

FIGURA 2: REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE UN VECTOR BASE MCP-1

El vector representado aquí se usó para la expresión de la proteína recombinante MCP-1 en células CHO-DG44. "E/P" es una combinación de potenciador de CMV y promotor de CMV, "P" es sólo un elemento de promotor y "T" es una señal de terminación para la transcripción que se requiere para la poliadenilación del mRNA transcrito. La posición y la dirección de la iniciación de la transcripción en cada unidad de transcripción se indica mediante una flecha. Para la clonación del elemento TE fue introducida una zona de secuencias "A" antes del promotor con sitios de corte para las endonucleasa de restricción (adaptador). El marcador de selección dihidrofolato-reductasa está abreviado como "dhfr". El elemento "IRES" proveniente del virus de la encefalomiocarditis sirve como sitio de ligadura de ribosomas interno dentro de la unidad de transcripción bicistrónica posibilita la traducción de la siguiente proteína fluorescente roja "dsRed". "MCP-1" codifica para la proteína quimioattractiva de monocitos humana-1.

FIGURA 3: SECUENCIA 5' DEL GEN DE UBIQUITINA/S27A DE CHO

La zona de secuencias que comprende 2788 pb (SEQ ID N° 1) fue aislada del genoma de células de CHO (ovario de hámster chino) y se encuentra corriente arriba de la región codificadora del gen Ub/S27a, en el que se trata de una

fusión entre una unidad de ubiquitina (Ub) y una proteína ribosómica de la pequeña subunidad de ribosomas (S27a).

FIGURA 4: REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LOS ELEMENTOS TE 00 A 12

Esta Figura muestra esquemáticamente la zona de secuencias genómica que se encuentra corriente arriba de la región codificadora del gen de ubiquitina/S27a de CHO de 2788 pb, que se encontraba subclonado en un plásmido. De esta secuencia genómica (SEQ ID N° 1) denominada también elemento TE A se prepararon fragmentos parciales de diferente longitud, denominados a continuación elementos TE. El elemento TE 00 (SEQ ID N° 2) fue aislado de un subclón de esta secuencia como fragmento de restricción SacII y clonado en el sitio de corte SpeI de los vectores objetivo pBID-HC y pBING-LC. Estos contenían o bien el gen para la cadena pesada (HC) o la cadena liviana de un IgG1 (ver Figura 1a). De esta manera se obtuvieron los vectores de expresión, en los cuales el elemento TE 00 está posicionado en orientación directa e inversa corriente arriba del promotor. Los elementos TE 01 a 12 fueron preparados por PCR con diversos pares de cebadores (ver Figuras 5 y 6) y clonados mediante BamHI/BsrGI en los plásmidos de base pTE4/MCP-1 (Fig. 1B) y pTE5/MCP-1 (Fig. 2).

FIGURA 5: ELEMENTOS TE 00 A 12

En esta Tabla se representan tanto el tamaño como la posición inicial y final de los elementos TE 00 a 21, que fueron generados de la secuencia TE-A (SEQ ID N° 1). Para los fragmentos que fueron generados a través de PCR se indican además los cebadores utilizados. Los escalonamientos de tamaño de los elementos son de aprox. 500 pb y presentan en comparación con la secuencia de partida TE-A (SEQ ID N° 1) delecciones en el extremo 5' o 3'.

FIGURA 6: CEBADOR PARA LA SÍNTESIS DE LOS ELEMENTOS TE 01 A 12

Los cebadores están representados en dirección 5'-3'. Los cebadores con "for" en la denominación identifican a los cebadores en orientación directa de la SEQ ID N° 1, los cebadores con "rev", indican la orientación inversa. Cada cebador está compuesto en el extremo 5' por seis nucleótidos cualesquiera, seguidos por un sitio de corte BamHI o BsrGI y una secuencia de aprox. 20 a 30 nucleótidos, la que es 100% homóloga con respecto a un tramo de secuencia en la SEQ ID N° 1. La zona de los cebadores homóloga a la SEQ ID N° 1 se resaltó. Se usaron un cebador "for" y un cebador "rev" para la amplificación de una zona de secuencias de la SEQ ID N° 1. El producto de PCR resultante en cada caso se clonó mediante BamHI y BsrGI en el plásmido de base pTE4/MCP-1 (Figura 1B) o pTE5/MCP-1 (Figura 2).

FIGURA 7: MEDICIÓN FACS DE LA SERIE DE TRANSFECCIÓN B

La Figura muestra el aumento relativo de la expresión GFP en células con el elemento TE 00 en comparación con células sin el elemento TE 00. Además se transfectaron células CHO-DG4 con las combinaciones de plásmidos pBING-LC y pBID-HC, que se diferenciaban una de otra solamente por la presencia y la orientación del elemento TE 00. Después de una selección de dos a tres semanas de los pools de células transfectados en medio libre de HT con adición de G418 se midió la fluorescencia GFP por análisis FACS. Cada gráfico, con excepción de las células CHO-DG44 ("DG44") no transfectadas, que servían como control negativo, representa el valor promedio de la fluorescencia GFP de diez pools de la serie de transfección B. Por pool se consideraron 20000 células. "Control" significa los plásmidos de base pBING-LC y pBID-HC. "Inversa" significa una orientación inversa del elemento TE 00 en los vectores base, "directa" significa una orientación directa del elemento TE 00 en los vectores base.

FIGURA 8: MEDICIÓN FACS DE LA SERIE DE TRANSFECCIÓN C

La Figura muestra la parte de las células que expresan dsRed2 en poblaciones de células estables, que contenían los elementos TE 01, 02, 05, 06, 08 ó 09, en comparación con las células en poblaciones celulares que no contenían elementos TE. Para ello se transfectaron células CHO-DG44 con el plásmido pTE4/MCP-1 o sus derivados, que contenían uno de los elementos TE arriba mencionados. Después de una selección de aprox. Tres semanas de los pools de células transfectadas en medio con adición de G418 se midió la fluorescencia dsRed2 por análisis FACS. Por pool se midieron en cada caso 10000 células y se restó la fluorescencia propia de las células CHO-DG44 no transfectada. Cada valor representa el valor promedio de la parte porcentual de células que expresan dsRed2 de 6 pools de la serie de transfección C.

FIGURA 9: INFLUENCIA DE LOS ELEMENTOS TE SOBRE LA PRODUCTIVIDAD ESPECÍFICA

En esta figura se representan en forma de gráfico (A) o tabla (B) las modificaciones del nivel de expresión de IgG1 y/o MCP-1, las que resultan de la presencia de los elementos TE en comparación con el pool de control sin elemento TE. Los pools celulares se obtuvieron por transfección estable de células CHO-DG44 con los plásmidos base pBING-LC y pBID-HC y/o pTE4/MCP-1 ("control") y los derivados obtenidos de allí, los que contenían en cada caso un elemento TE ("00" en orientación directa ("00 directa") y en orientación inversa ("00 inversa"), "01" a "12"). Después de una selección de dos a tres semanas de los pools de células transfectados en medio libre de HT con adición de G418 (Serie A y B) y/o en medio que contenía HT con adición de G418 (Serie C y D) se midió la expresión de proteínas por ELISA en el sobrenadante del cultivo celular y se calculó la productividad específica por célula y día. El cultivo de las células CHO-DG44 transfectadas en forma estable se realizó mediante varios pasajes en recipientes T de 75 cm² con un ritmo de pasaje de 2-2-3 días. En la Serie A, de las combinaciones de plásmidos "00 inversa" y "00 directa" se encontraban en cultivo 4 pools y del control 3 pools a través de 8 pasajes, en la Serie B de cada combinación de plásmido 10 pools a través de 6 pasajes y en las Series C y D de cada tipo de plásmido 6 pools a través de 6 pasajes. Las productividades específicas de los pools en una combinación de plásmidos y una

serie se calculó un valor medio y el valor medio de los controles en cada serie se igualó a 1. Las productividades específicas promediadas de los pools con elemento TE, se ajustaron en relación.

FIGURA 10: INFLUENCIA DE LOS ELEMENTOS TE SOBRE LA PRODUCTIVIDAD ESPECÍFICA EN POOLS DE CÉLULAS SELECCIONADAS DHFR

En esta figura se representan en forma de gráfico (A) o tabla (B) las modificaciones del nivel de expresión de MCP-1, las que resultan de la presencia de los elementos TE en comparación con el pool de control sin elemento TE. Los pools celulares se obtuvieron por transfección estable de células CHO-DG44 con el plásmido base pTE4/MCP-1 ("control") o los derivados obtenidos de allí, los que contenían además en cada caso un elemento TE ("01" a "12") (Serie E). Después de una selección de dos a tres semanas de los pools de células transfectados en medio libre de HT se midió la expresión de proteínas por ELISA en el sobrenadante del cultivo celular y se calculó la productividad específica por célula y día. El cultivo de las células CHO-DG44 transfectadas en forma estable se realizó mediante varios pasajes en recipientes T de 75 cm² con un ritmo de pasaje de 2-2-3 días. De cada variante de plásmido se encontraban en cultivo 6 pools a través de 6 pasajes. Las productividades específicas de los pools en una variante de plásmido se promediaron y el valor medio de los controles se igualó a 1. Las productividades específicas promediadas de los pools con elemento TE, se ajustaron en relación.

FIGURA 11: PRUEBA DE LOS ELEMENTOS TE CON RESPECTO A LA ACTIVIDAD POTENCIADORA

La transfección transitoria de las células CHO-DG44 no mostró con el uso de los vectores de expresión con elementos TE ningún aumento significativo del título de MCP-1 con respecto a los vectores control sin elemento TE. Los elementos TE 01 a 12 no actúan por lo tanto como potenciador y sólo pueden provocar un aumento significativo de la expresión con integración cromosómica. Se transfectaron en cada caso 6 pools con el vector base pTE4/MCP-1 ("control") y los derivados que provenían de allí, los que contenían además un elemento TE ("01" a "12"). Al mismo tiempo se cotransfectó un plásmido de expresión SEAP, para determinar la eficiencia de transfección (SEAP = fosfatasa alcalina segregada). Después de 48 hs de cultivo en un volumen total de 3 ml se retiró el sobrenadante del cultivo celular y se determinó el título de MCP-1 por medio de ELISA así como también la actividad SEAP. El título de MCP-1 se corrigió con respecto a la eficiencia de transfección, calculada por medio de la expresión de SEAP. La figura muestra el valor medio de 6 pools paralelos con desviación estándar.

FIGURA 12: OTROS ELEMENTOS TE

Los resultados hasta ahora indican que la selección mostrada en esta figura de partes de la secuencia ID N° 1 también pueden provocar un aumento de la expresión génica. Por clonación y transfección estable de estos elementos TE adicionales se puede caracterizar más aún la secuencia ID N° 1, para localizar las zonas de secuencia importantes para la función en forma más exacta.

FIGURA 13: PRUEBA DE DIFERENTES POSICIONES Y COMBINACIONES DE LOS ELEMENTOS TE

Esta figura representa una selección de posibles vectores de expresión en los cuales se usan diferentes posiciones, orientación y combinaciones de elementos TE, para investigar, si de este modo se puede lograr un aumento adicional de la expresión. Aparte del flanqueo del gen del producto por elementos TE, se introducen también varios elementos TE cortos idénticos o diferentes uno después de otro, como por ej., los elementos TE 06 y 08 o los nuevos elementos TE 13 y 14.

FIGURA 14: INFLUENCIA DE LOS ELEMENTOS TE TE-13 A TE-18 SOBRE LA EXPRESIÓN DE MCP-1 ESPECÍFICA

En esta figura se representan gráficamente las modificaciones del nivel de expresión de MCP-1, las que resultan de la presencia de los elementos TE en comparación con los pools control sin elemento TE. Los pools celulares se obtuvieron por medio de transfección estable de células CHO-DG44 con el plásmido base pTE4/MCP-1 ("control") o derivados provenientes de allí, los que contenían adicionalmente un elemento TE ("13" a "18") (Serie F). Después de una selección de dos a tres semanas de los pools celulares transfectados en medio suplementado con HT +G418 (400 µ/ml) se midió la expresión de proteínas por ELISA en el sobrenadante de cultivo celular y se calculó la productividad específica por célula y día. El cultivo de las células CHO-DG44 transfectadas en forma estable se realizó mediante varios pasajes en recipientes T de 75 cm² con un ritmo de pasaje de 2-2-3 días. De cada variante de plásmido se encontraban en cultivo 4 pools a través de 5 a 6 pasajes. Las productividades específicas de los pools en una variante de plásmido se promediaron y el valor medio de los controles se igualó a 1. Las productividades específicas promediadas de los pools con elemento TE, se ajustaron en relación.

FIGURA 15: INFLUENCIA DE LOS ELEMENTOS TE EN DIVERSAS POSICIONES Y EN DIVERSAS COMBINACIONES SOBRE LA EXPRESIÓN DE MCP-1

En esta figura se representan gráficamente las modificaciones del nivel de MCP-1, las que resultan de la presencia y combinación de diversos elementos TE en comparación con los pools control sin elemento TE. Los pools celulares se obtuvieron por medio de transfección estable de células CHO-DG44 con el plásmido base pTE4/MCP-1 ("control") o derivados provenientes de allí, los que contenían adicionalmente uno o dos elementos TE ("06 y 08, 08rev, 09rev, A") (Serie G). Después de una selección de dos a tres semanas de los pools celulares transfectados en medio

suplementado con HT +G418 (300 µ/ml) se midió la expresión de proteínas por ELISA en el sobrenadante de cultivo celular y se calculó la productividad específica por célula y día. El cultivo de las células CHO-DG44 transfectadas en forma estable se realizó a través de varios pasajes en placas de 6 cavidades (MAT6) con un ritmo de pasaje de 2-2-3 días. De cada variante de plásmido se encontraban en cultivo 6 pools a través de 6 pasajes. Las productividades específicas de los pools en una variante de plásmido se promediaron y el valor medio de los controles se igualó a 1. Las productividades específicas promediadas de los pools con elemento TE, se ajustaron en relación.

FIGURA 16: PRUEBA DEL ELEMENTO TE CON ANTICUERPOS IGG-4

Los vectores aquí representados se usaron para la expresión de anticuerpos IgG4 monoclonales, recombinantes, en células CHO-DG44. "E/P", en este caso, es una combinación del potenciador y promotor CMV, "P" es sólo un elemento del promotor y "T" es una señal de terminación para la transcripción, que se requiere para la poliadenilación del mRNA transcripto. La posición y la dirección de la iniciación de la transcripción en cada unidad de transcripción se indica mediante una flecha. Los genes para la cadena liviana (LC2 o LC3) y la pesada (HC2 o HC3) fueron clonados por intercambio con el casete MCP-1 – IRES – dsRed2 (Figs. 1B y 2). Codifican para la cadena pesada y/o liviana de anticuerpos IgG4 monoclonales humanizados. El marcador de selección amplificable dihidrofolato-reductasa está abreviado con "dhfr". El marcador de selección neomicina-fosfotransferasa contiene la mutación puntual F240I y está abreviada en la Figura correspondientemente con "F240I".

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los conceptos y denominaciones utilizados en el marco de esta descripción de la invención tienen los siguientes significados definidos a continuación. Las formas de expresión generales "que contiene" o "contiene" comprenden la forma de expresión más especial "compuesto por". El "singular" y el "plural" no se utilizan en forma limitativa.

El concepto "elemento TE" denota ácidos nucleicos reguladores.

Los conceptos "elemento TE" o "elemento que aumenta la expresión" o "elemento que aumenta la transcripción" o "elemento de ácidos nucleicos que aumenta la expresión y/o la transcripción" se usan en el texto como sinónimos. Estos conceptos denotan todas las secuencias de ácidos nucleicos reguladoras.

Por "elemento TE" o "elemento que aumenta la expresión" o "elemento que aumenta la transcripción" o "elemento de ácidos nucleicos que aumenta la expresión y/o la transcripción" se entiende aquí especialmente la secuencia ID N° 1, inclusive su secuencia complementaria, la que fue aislada del genoma del hámster chino (*Cricetulus griseus*), o una parte, fragmento o zona cualquiera de la misma, que conduce a un aumento de la transcripción y/o expresión de un gen de interés, en una integración cromosómica, comprendiendo el fragmento o bien derivado al menos un intervalo de secuencias de la zona de ácidos nucleicos entre 1 pb y 1578 pb, y presentando el derivado una identidad de la secuencia de al menos el 85%. También se entienden cualesquiera combinaciones de ácidos nucleicos de acuerdo con la invención, los cuales se componen de varios ácidos nucleicos de acuerdo con la invención, idénticos o diferentes, los cuales a su vez pueden estar en cualquier orientación y distancia unos de otros o también pueden ser combinados con secuencias reguladores y que llevan a un aumento de la transcripción y/o expresión de un gen de interés. El concepto elemento TE puede ser la SEQ ID N° 1 propiamente dicha como también otros ácidos nucleicos de acuerdo con la invención.

El concepto "elemento TE", "elemento de ácidos nucleicos que aumenta la transcripción y/o la expresión" y/o fragmentos, partes, zonas o derivados del mismo, comprende además aparte de zonas de secuencias de hámster chino (*Cricetulus griseus*) también secuencias de nucleótidos homólogas funcionales correspondientes de otros organismos. Tales otros organismos son por ejemplo, el ser humano, ratón, rata, mono, así como también otros mamíferos y roedores, reptiles, pájaros, peces y plantas.

Por un "fragmento" o "parte" o "zona" (estos conceptos se usan como sinónimos) se entiende una molécula de ácidos nucleicos (de hebra simple o doble) que presenta identidad de secuencia de 100% con una parte de la SEQ ID N° 1 o su secuencia complementaria. Es conocido que la clonación de fragmentos que son obtenidos o bien a través de digestión con enzimas de restricción o a través de PCR, puede llevar a modificaciones en las zonas de los extremos del fragmento, es decir, por ejemplo, nucleótidos adicionales o faltantes que resultan de reacciones de adición o supresión, o nucleótidos introducidos adicionalmente por medio de cebadores. Estas variaciones en las zonas de los extremos de los fragmentos están incluidas en la definición de un fragmento, aún cuando estas zonas de secuencias presenten una identidad de secuencia de menos de 100% con la SEQ ID N° 1. "Partes" y/o "fragmentos" y/o "zonas" de la secuencia ID N° 1 son, por ej., TE-00 (Secuencia ID N° 2), TE-01 (Secuencia ID N° 3), TE-02 (Secuencia ID N° 4), TE-03 (Secuencia ID N° 5), TE-04 (Secuencia ID N° 6), TE-05 (Secuencia ID N° 7), TE-06 (Secuencia ID N° 8), TE-07 (Secuencia N° 9), TE-08 (Secuencia ID N° 10), TE-09 (Secuencia N° 11), TE-10 (Secuencia ID N° 12), TE-11 (Secuencia N° 13), TE-12 (Secuencia ID N° 14), TE-13 (Secuencia ID N° 15), TE-14 (Secuencia ID N° 16), TE-15 (Secuencia ID N° 17), TE-16 (Secuencia ID N° 18), TE-17 (Secuencia ID N° 19), TE-18 (Secuencia ID N° 20), TE-21 (Secuencia ID N° 21). Preferentemente, el fragmento, en una integración cromosómica estable, lleva a un aumento de la transcripción y/o expresión de un gen de interés unido funcionalmente. "Partes" y/o "fragmentos" y/o "zonas" de la Secuencia ID N° 1 preferidos, que llevan a un aumento de la transcripción y/o expresión de un gen de interés, son, por ej., TE-01 (Secuencia ID N° 3), TE-02 (Secuencia ID N° 4), TE-07

(Secuencia N° 9), TE-08 (Secuencia ID N° 10), TE-10 (Secuencia ID N° 12), TE-11 (Secuencia N° 13), TE-12 (Secuencia ID N° 14), TE-13 (Secuencia ID N° 15), TE-15 (Secuencia ID N° 17), TE-17 (Secuencia ID N° 19), TE-18 (Secuencia ID N° 20). Pero por "fragmento" también se entienden también todas las otras partes posibles de la SEQ ID N° 1 en cualquier orientación, las que llevan a un aumento de la transcripción y/o expresión de un gen de interés, especialmente aquellas que se encuentran total o por lo menos parcialmente en la zona 5' de TE-00 (SEQ ID N° 2). Esto corresponde a la zona parcial de SEQ ID N° 1 entre 1 pb y 1578 pb. Se prefiere también el fragmento TE-08 (SEQ ID N° 10).

Por un "derivado" se entiende en la siguiente invención una molécula de ácidos nucleicos (de hebra simple y doble), que presenta con la SEQ ID N° 1 o su secuencia complementaria o con una parte y/o fragmento y/o zona de la SEQ ID N° 1 y/o su secuencia complementaria, una identidad de secuencia de por lo menos aprox. 90% y de manera particularmente preferida una identidad de secuencia de por lo menos aprox. 95% y que en la integración cromosómica lleva a un aumento de la transcripción y/o expresión de un gen de interés. Las diferencias de secuencia con respecto a la SEQ ID N° 1, por un lado, pueden basarse en diferencias en secuencias de nucleótidos endógenas, homólogas, de otros organismos. Por otro lado, pueden basarse también en modificaciones de la secuencia de ácidos nucleótidos, por ej., la sustitución, la inserción o la delección de por lo menos uno o más nucleótidos. Los mutantes de delección, inserción y sustitución se pueden obtener por medio de "mutagénesis específica de un sitio" y/o "técnicas de mutagénesis basadas en PCR". Métodos correspondientes fueron descritos por Lottspeich y Zorbas (1998; Capítulo 36,1) con más referencias. Se puede establecer la concordancia de la identidad de secuencia por medio de los así llamados algoritmos de "alineamiento" estándar, como por ejemplo "BLAST" (Altschul, S. F., Gish, W., Millar, W., Myers, E. W. y Lipman, D. J. (1990) "Basic local alignment search tool", J. Mol. Biol. 215:403-410; Madden, T.L., Tatusov, R.L. & Zhang, J. (1996) "Applications of network BLAST server" Met. Enzymol. 266:131-141; Zhang, J. & Madden, T.L. (1997) "PowerBLAST: A new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation." con una secuencia de referencia, que se encuentra en la SEQ ID N° 1. La concordancia de las secuencias se establece cuando coinciden en su orden de secuencia y se pueden identificar con ayuda de los algoritmos de "alineamiento" estándar.

La expresión "variante" se refiere a los vectores de expresión usados en la mezcla de transfección en cada caso. Entre ellos se encuentran tanto los vectores base (pTE4/MCP-1 y/o pTE5/MCP-1) y/o la combinación de vectores base (pBING-LC + pBID-HC) como también los vectores base que contienen en cada caso uno o más elementos TE en diferente posición, combinación y orientación.

En los cebadores, la expresión "orientación" se refiere al ordenamiento del cebador con relación a la SEQ ID N° 1. Todos los cebadores, cuyo orden de secuencias se corresponde con la secuencia denominada SEQ ID N° 1 en el orden 5'-3' ("forward primer"), se encuentran en la misma orientación que esta secuencia, lo que también se denomina "orientación directa". Los cebadores cuyo orden de secuencias es complementario a la secuencia denominada SEQ ID N° 1 ("reverse primer") se encuentran en orientación opuesta a esta secuencia, lo que también se denomina "orientación inversa".

Con relación a los elementos TE, en la presente invención se entiende bajo "orientación" el ordenamiento con respecto al gen de interés. La secuencia denominada SEQ ID N° 1 representa una secuencia del genoma que está posicionada 5' con respecto a la región codificadora para el gen de ubiquitina/S27a, lo que también se denomina "corriente arriba". La continuación de esta secuencia indicada en la SEQ ID N° 1 en dirección a la región de codificación del gen de ubiquitina/S27a siguiente llevaría al codón de inicio de este gen. Este ordenamiento se denomina por eso "orientación directa". Análogamente, el elemento SE TE encuentra en la presente invención en orientación directa, cuando la secuencia indicada bajo SEQ ID N° 1, o una parte cualquiera, fragmento, zona o derivado de la misma, se encuentra en el vector de expresión en la misma hebra de ADN que el codón de inicio del gen de interés. Si por el contrario, la secuencia complementaria a la SEQ ID N° 1, o una parte cualquiera, fragmento, zona o derivado de la misma, se encuentra en el vector de expresión en la misma hebra de ADN que el codón de inicio del gen de interés, entonces se tiene una "orientación inversa" del elemento TE correspondiente. Si no se indica de otro modo, cuando se menciona un elemento TE siempre están comprendidas/se entienden ambas orientaciones, es decir, directa e inversa.

Bajo "integración cromosómica" se entiende la integración de una secuencia de ácidos cualquiera en el genoma, es decir en los cromosomas, de una célula, pudiendo realizarse la integración en uno o más cromosomas en cualquier número, posición y orientación. Bajo "integración cromosómica" se entiende además la integración de una secuencia de ácidos nucleicos cualquiera en cromosomas sintetizados, artificiales o mini-cromosomas.

Gen de interés:

El "gen de interés" contenido en el vector de expresión de acuerdo con la invención comprende una secuencia de nucleótidos de cualquier longitud, que codifica para un producto de interés. El producto de gen o también el "producto de interés" es en general una proteína, polipéptido, péptido y/o fragmento o derivado del mismo. Pero también puede ser un ARN o ARN antisentido. El gen de interés puede encontrarse en longitud completa, en forma acortada, como gen de fusión o gen marcado. Se puede tratar de ADN genómico o preferentemente de cADN y/o fragmentos correspondientes o fusiones. El gen de interés puede representar la secuencia de gen nativa, mutada o

puede estar modificada de otra manera. Tales modificaciones comprenden optimizaciones del codón para adaptarlo a una determinada célula huésped y una humanización. El gen de interés puede codificar, por ej., para un polipéptido segregado, citoplasmático, localizado en el núcleo, ligado a la membrana o ligado a la superficie de la célula.

La expresión “ácido nucleico”, “secuencia de nucleótidos” o “secuencia de ácidos nucleicos” indica un oligonucleótido, nucleótido, polinucleótido y sus fragmentos así como también ADN o ARN de origen genómico o sintético, que se encuentran como hebra simple o doble y puede representar la hebra codificadora o no codificadora de un gen. Para la modificación de secuencias de ácidos nucleicos se pueden usar técnicas estándar, como por ej., mutagénesis específica de un sitio o mutagénesis mediada por PCR (por ej., como se describió en Sambrook et al., 1989 o Ausubel et al., 1994).

Bajo “codificar” se entiende la propiedad o capacidad de una secuencia específica de nucleótidos en un ácido nucleico, por ejemplo, un gen en un cromosoma o un mRNA, de servir como matriz para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas, como por ej., rARN, tARN, mRNA, otras moléculas de ARN, cADN o polipéptidos en un procedimiento biológico. Por lo tanto, un gen codifica para una proteína, cuando por transcripción y traducción subsiguiente del mRNA, se produce la proteína deseada en una célula o en otro sistema biológico. Tanto la hebra codificadora, cuya secuencia de nucleótidos es idéntica a la secuencia de mRNA y que se indica normalmente también en bancos de datos de secuencias, por ej., EMBL o GenBank, como también la hebra no codificadora de un gen o cADN que sirve como matriz para la transcripción, puede ser denotada entonces como codificadora para un producto o proteína. Un ácido nucleico que codifica para una proteína comprende también ácidos nucleicos que debido al código genético degenerado presentan otro orden de secuencias de nucleótidos, pero que dan por resultado la misma secuencia de aminoácidos de la proteína. Las secuencias de ácidos nucleicos, que codifican para proteínas, pueden contener también intrones.

Con la expresión “cADN” se denotan ácidos desoxirribonucleicos, los que se obtienen por transcripción inversa y síntesis de la segunda hebra de ADN de un mRNA producido por un gen o de otro ARN. Si el cADN se encuentra como molécula de ADN de doble hebra, entonces el mismo contiene tanto una hebra codificadora como también una hebra no codificadora.

Con la expresión “intrón” se denotan secuencias de nucleótidos no codificadoras de cualquier longitud. Se encuentran naturalmente en muchos genes eucarióticos y se retiran de un precursor de mRNA transcrito anteriormente por medio de un procedimiento denominado corte y empalme. Para ello es necesario un corte exacto del intrón en el extremo 5'-3' y una unión correcta de los extremos mRNA obtenidos, para que se pueda obtener un mRNA procesado maduro con el marco de lectura correcto para una síntesis de proteínas exitosa. Muchos de los sitios dadores de corte y empalme y de los sitios aceptores de corte y empalme que participan en este procedimiento de corte y empalme, estas son las secuencias que se encuentran directamente en los límites del exón-intrón y/o intrón-exón, han sido caracterizados mientras tanto. Para una visión de conjunto, ver Ohshima et al., 1987.

Proteína/producto de interés:

Proteínas/polipéptidos importantes para la industria biofarmacéutica comprenden, por ej., anticuerpos, enzimas, citoquinas, linfoquinas, moléculas de adhesión, receptores así como también sus derivados y/o fragmentos, pero no se limitan a ellos. En general, son importantes todos los polipéptidos que actúan como agonistas o antagonistas y/o pueden tener una aplicación en diagnóstico. Otras proteínas de interés son, por ejemplo, proteínas/polipéptidos que se usan para la modificación de las propiedades de células huésped en el marco de la así llamada “Cell Engineering”, como por ej., proteínas anti-apoptóticas, chaperones, enzimas del metabolismo, enzimas de glucosilación así como también sus derivados y/o fragmentos, pero no se limitan a estos.

La expresión “polipéptidos” se usa para secuencias de aminoácidos o proteínas y denota polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. Esta expresión incluye también proteínas que son modificadas después de la traducción por reacciones como, por ejemplo, glucosilación, fosforilación, acetilación o procesamiento de proteínas. La estructura del polipéptido puede ser modificada, por ej., por sustituciones, deleciones o inserción de aminoácidos, fusión con otras proteínas, manteniendo su actividad biológica. Además, los polipéptidos se pueden multimerizar y formar homo- y heterómeros.

Ejemplos de proteínas terapéuticas son insulina, factor de crecimiento parecido a la insulina, hormona de crecimiento humana (hGH) y otros factores de crecimiento, receptores, activador del plasminógeno del tejido (tPA), eritropoyetina (EPO), citoquina, por ejemplo, interleuquina (IL) como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, interferón (IFN)-alfa, beta, gamma, omega o tau, factor de necrosis tumoral (TNF) como, por ej., TNF-alfa, beta o gamma, TRAIL, G-CSF, GM-CSF, M-CSF, MCP-1 y VEGF. Otros ejemplos son anticuerpos monoclonales, policlonales, multiespecíficos y de una sola cadena (*single chain*) y fragmentos de los mismos, como por ej., Fab, Fab', F(ab')₂, Fc y Fc', cadenas de inmunoglobulina ligeras (L) y pesadas (H) y sus regiones constantes, variables o hipervariables así como también fragmentos Fv y Fd (Chamov et al., 1999). Los anticuerpos pueden ser de origen humano o no humano. También entran en consideración

anticuerpos humanizados y quiméricos.

Los fragmentos Fab ("Fragment antigen-binding = Fab) están compuestos por las regiones variables de ambas cadenas, las que se mantienen unidas por las regiones constantes limitrofes. Pueden ser obtenidos, por ej., por tratamiento con una proteasa, como por ejemplo, papaína, a partir de anticuerpos convencionales o también por clonación de ADN. Otros fragmentos de anticuerpos son los fragmentos F(ab')₂, los que pueden ser preparados por medio de la digestión proteolítica con pepsina.

Por clonación de genes también se pueden preparar fragmentos de anticuerpos acortados, los que están compuestos solamente por las regiones variables de la cadena pesada (VH) y la cadena liviana (VL). Estos son denominados fragmentos Fv (Fragment variable = Fragmento de la parte variable). Como en estos fragmentos Fv no es posible la unión covalente a través de los restos de cisterna de las cadenas constantes, estos fragmentos Fv son estabilizados frecuentemente en otro lado. Además, las regiones variables de la cadena pesada y liviana son unidas entre sí frecuentemente por medio de un fragmento de péptido corto de aprox. 10-30 aminoácidos, más preferentemente 15 aminoácidos. De esta manera se forma una cadena de polipéptidos individual, en la cual VH y VL se unen entre sí por medio de un ligador de péptidos. Tales fragmentos de anticuerpos son denominados también fragmento Fv de cadena simple (scFv) ("single Chain Fv"). Ejemplos de anticuerpos scFv son conocidos y se describieron, ver por ej., Huston et al. (1988).

En los últimos años se desarrollaron diversas estrategias para preparar derivados de scFv multímeros. La intención es generar anticuerpos recombinantes con propiedades farmacocinéticas mejoradas y mayor actividad de ligadura. Para obtener la multimerización de los fragmentos scFv se preparan estos como proteínas de fusión con dominios de multimerización. Como dominios de multimerización pueden actuar para ello, por ej., la región CH3 de un IgG o estructuras helicoidales ("coiled coil structure") como los dominios de cremallera de leucina. En otras estrategias se usa la interacción entre las regiones VH y VL del fragmento scFv para una multimerización (por ej., dia-, tri- y pentacuerpos).

Como "diacuerpo" un experto denota un derivado de scFv homodímero bivalente. El acortamiento del ligador peptídico en la molécula de scFv a 5-10 aminoácidos da por resultado la formación de homodímeros por superposición de cadenas VH/VL. Los diacuerpos pueden ser estabilizados además por puentes disulfuro introducidos. Ejemplos de diacuerpos se encuentran en la literatura, por ej., en Perisic et al. (1994).

Como "minicuerpo" el experto designa un derivado de scFv homodímero, bivalente. Está compuesto por una proteína de fusión que contiene la región CH3 de una inmunoglobulina, preferentemente IgG, más preferentemente IgG1, como región de dimerización. Ésta une los fragmentos scFv a través de una región bisagra, igualmente de IgG, y una región del ligador. Ejemplos de tales minicuerpos se describen en Hu et al. (1996).

Con "triacuerpo" el experto denota un derivado de scFv homotrímero, trivalente (Kortt et al., 1997). La fusión directa de VH-VL sin usar una secuencia de ligador lleva a la formación de trímeros.

Los fragmentos denominados por el experto como mini-anticuerpos, que tienen una estructura bi-, tri- o tetravalente, son igualmente derivados de fragmentos de scFv. La multimerización se logra a través de estructuras de "coiled coil" di-, tri- o tetraméricas (Pack et al., 1993 y 1995; Lovejoy et al., 1993).

Gen que codifica una proteína fluorescente:

En otra forma de realización, el vector de expresión de acuerdo con la invención contiene un gen que codifica una proteína fluorescente en unión funcional con el gen de interés. Preferentemente, la transcripción de ambos genes se realiza bajo el control de un solo promotor heterólogo, de modo que la proteína/el producto de interés y la proteína fluorescente son codificados por un m-ARN bicistrónico. Esto posibilita una identificación de células que producen la proteína/el producto de interés en gran cantidad, a través de la tasa de expresión de la proteína fluorescente. Alternativamente, la transcripción del gen que codifica la proteína fluorescente puede realizarse bajo el control de un promotor propio.

La proteína fluorescente puede ser, por ej., una proteína fluorescente verde, azul-verdoso, azul, amarilla o de otro color. Un ejemplo especial es la proteína fluorescente verde (GFP) de *Aequorea victoria* o *Renilla reniformes* y los mutantes desarrollados a partir de allí; ver, por ejemplo, Bennet et al. (1998); Chalfie et al. (1994); documento WO 01/04306 y la literatura allí mencionada.

Otras proteínas fluorescentes y los genes que las codifican se describen en los documentos WO 00/34318, WO 00/34326, WO 00/34526 y WO 01/27150, los cuales se incorporan a la presente por referencia. Estas proteínas fluorescentes son fluoróforos de organismos no bioluminiscentes de la especie Anthozoa, por ejemplo de *Anemonia majano*, *Clavularia sp.*, *Zoanthus sp. I*, *Zoanthus sp. II*, *Discosoma striata*, *Discosoma sp.* "roja", *Discosoma sp.* "verde", *Discosoma sp.* "magenta", *Anemonia sulfata*, *Aequorea coerulescens*.

Las proteínas de fluorescencia usadas de acuerdo con la invención comprenden, aparte de las proteínas de tipo salvaje, también mutantes y variantes naturales o preparados por tecnología génica, sus fragmentos, derivados o, por ej., variantes fusionadas con otras proteínas u otros péptidos. Las mutaciones introducidas pueden modificar, por ej., el espectro de excitación o emisión, la formación de cromóforos, el coeficiente de extinción o la estabilidad de la proteína. Mediante la optimización del codón se puede mejorar además la expresión en células de mamíferos o de otras especies. De acuerdo con la invención, la proteína fluorescente también puede ser usada en fusión con un marcador de selección, preferentemente con un marcador de selección amplificable como, por ejemplo, la dihidrofolato-reductasa (DHFR).

La fluorescencia emitida por las proteínas fluorescentes posibilita la detección de las proteínas, por ej., por citometría de flujo con un separador de células activado por fluorescencia (FACS) o por microscopia de fluorescencia.

Otros elementos reguladores:

El vector de expresión contiene por lo menos un promotor heterólogo que posibilita la expresión del gen de interés y preferentemente también la de la proteína fluorescente.

Como "promotor" se designa una secuencia de polinucleótidos que posibilita y controla la transcripción de los genes o secuencias unidos con la misma funcionalmente. Un promotor contiene secuencias de reconocimiento para la ligadura de la ARN-polimerasa y el sitio de iniciación de la transcripción (sitio de iniciación de la transcripción). Para la expresión de una secuencia deseada en un tipo celular determinado o una célula huésped tiene que elegirse en cada caso un promotor funcional, adecuado. El experto conoce una multiplicidad de promotores de diversas fuentes, inclusive promotores constitutivos, inducibles y reprimibles. Se encuentran depositados en bancos de datos, por ej. GenBank, y se pueden adquirir de fuentes comerciales o individuales como elementos individuales o clonados dentro de secuencias de polinucleótidos. En promotores inducibles la actividad del promotor en reacción a una señal puede ser reducida o reforzada. Un ejemplo de un promotor inducible es el promotor de la tetraciclina (tet). Éste contiene secuencias operadoras de tetraciclina (tetO), las cuales pueden ser inducidas por medio de una proteína transactivadora regulada (tTA). En presencia de tetraciclina se inhibe la ligadura de tTA a tetO. Ejemplos de otros promotores inducibles son el promotor jun, fos, metalotionina y del choque térmico (ver también Sambrook et al., 1989; Gossen et al., 1994).

Entre los promotores que son adecuados para una alta expresión en eucariotas se encuentran, por ejemplo, el promotor de ubiquitina/S27a del hámster (documento WO 97/15664), el promotor temprano SV40, el promotor tardío mayor de Adenovirus, el promotor de metalotionina-I del ratón, la región de repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous, el promotor temprano del virus de citomegalia humano. Ejemplos de otros promotores de mamíferos heterólogos son el(los) promotor(es) de actina, inmunoglobulina o del choque térmico.

Un promotor heterólogo correspondiente puede ser relacionado funcionalmente con otras secuencias reguladoras para el aumento/regulación de la actividad de transcripción en una casete de expresión.

Por ejemplo, el promotor puede ser unido funcionalmente con secuencias de potenciadores para aumentar la actividad de transcripción. Para ello se pueden usar uno o más potenciadores y/o varias copias de una secuencia de potenciador, por ejemplo un potenciador de CMV o SV40. Correspondientemente, un vector de expresión de acuerdo con la invención contiene, en otra forma de realización, uno o más potenciadores/secuencias de potenciadores, preferentemente un potenciador de CMV o SV40.

Con el término "potenciador" se designa una secuencia de polinucleótidos que actúa en localización *cis* sobre la actividad de un promotor y de este modo estimula la transcripción de un gen unido funcionalmente con este promotor. A diferencia de los promotores, la acción de los potenciadores es independiente de la posición y la orientación y, por lo tanto, pueden ser posicionados delante o detrás de una unidad de transcripción, dentro de un intrón o incluso dentro de la región de codificación. El potenciador puede estar localizado tanto en la cercanía inmediata de la unidad de transcripción como también a una distancia considerable del promotor. También es posible una superposición física y funcional con el promotor. El experto conoce una multiplicidad de potenciadores de diversos orígenes (y depositados en bancos de datos como GenBank, por ej., el potenciador SV40, el potenciador CMV, el potenciador polioma, el potenciador adenovirus) y están disponibles en forma individual o como elementos clonados dentro de secuencias de polinucleótidos (por ej., depositados en ATCC o de fuentes comerciales e individuales). Una multiplicidad de secuencias de promotores contiene también secuencias de potenciadores como, por ej., el promotor CMV usado frecuentemente. El potenciador CMV humano pertenece a los potenciadores más fuertes identificados hasta el momento. Un ejemplo de un potenciador inducible es el potenciador de metalotionina, que puede ser estimulado por glucocorticoides o metales pesados.

Otra posible modificación es, por ej., la introducción de múltiples sitios de ligadura Sp1. Las secuencias de los promotores pueden ser combinadas además con secuencias reguladoras que permiten un control/regulación de la actividad de transcripción. Así se puede hacer al promotor reprimible/inducible. Esto se puede realizar, por ejemplo, por medio de la unión con secuencias que representan los sitios de unión para factores de transcripción que regulan positiva o negativamente. El factor de transcripción SP-1 arriba mencionado, por ejemplo, tiene una influencia positiva sobre la actividad de transcripción. Otro ejemplo es el sitio de unión para la proteína activadora AP-1, que

puede actuar tanto en forma positiva como negativa sobre la transcripción. La actividad de la AP-1 también puede ser controlada por los más diversos factores como, por ej., factores de crecimiento, citoquinas y suero (Faisst y col., 1992 y sus referencias). La eficiencia de transcripción también puede ser aumentada de tal modo que la secuencia del promotor es modificada por mutación (sustitución, inserción o delección) de una, dos, tres o más bases y luego se determina en un ensayo de gen informador si de este modo se aumenta la actividad del promotor.

Fundamentalmente, los elementos reguladores adicionales comprenden promotores heterólogos, potenciadores, señales de terminación y poliadenilación y otros elementos de control. Para los diversos tipos celulares se conocen tanto secuencias reguladoras inducibles como también constitutivas.

“Elementos reguladores de la transcripción” comprenden usualmente por lo menos un promotor aguas arriba de la secuencia de gen a expresar, sitios de iniciación y terminación de la transcripción así como también una señal de poliadenilación.

La expresión “sitio de iniciación de la transcripción” se refiere a un ácido nucleico en la construcción, que corresponde al primer ácido nucleico, el cual es incorporado en el transcrito primario, es decir, el precursor de mRNA. El sitio de iniciación de la transcripción puede superponerse con las secuencias de los promotores.

La expresión “sitio de terminación de la transcripción” se refiere a una secuencia de nucleótidos que se encuentra normalmente en el extremo 3’ del gen de interés o del tramo de gen a transcribir y que provoca la interrupción de la transcripción por la ARN-polimerasa.

La “señal de poliadenilación” es una secuencia de señales que provoca la escisión en un sitio específico en el extremo 3’ del mRNA eucariótico y la incorporación post-transcripcional de una secuencia de aprox. 100-200 nucleótidos de adenina (cola poliA) en el extremo 3’ escindido. La señal de poliadenilación comprende la secuencia AATAAA aproximadamente 10-30 nucleótidos aguas arriba del sitio de escisión, así como también una secuencia que se encuentra aguas abajo. Se conocen varios elementos de poliadenilación, por ej., tk polyA, SV40 tardío y polyA temprano o BGH polyA (descritos, por ej., en el documento US 5.122.458).

“Elementos reguladores de la traducción” comprenden un sitio de iniciación de la traducción (AUG), un codón de detención y una señal polyA para cada polipéptido a expresar. Para una expresión óptima puede ser favorable retirar, agregar o modificar zonas 5’ y/o 3’ no traducidas de la secuencia de ácidos nucleicos a expresar, para eliminar potenciales codones de iniciación de la traducción inadecuados adicionales u otras secuencias que puedan influir sobre la expresión a nivel de la transcripción o expresión. Para promover la expresión se pueden insertar alternativamente sitios de unión de consenso ribosómicos inmediatamente aguas arriba del codón de inicio. Para producir un polipéptido segregado, el gen de interés contiene comúnmente una señal de secuencia que codifica para un péptido precursor señal, que transporta al polipéptido hacia y a través de la membrana del RE. La secuencia de señales se encuentra frecuentemente, pero no siempre, en el extremo amino de la proteína segregada y es escindida por peptidasas señal, después que la proteína fue hecha pasar a través de la membrana del RE. La secuencia de genes contendrá comúnmente, pero no necesariamente, una secuencia de señales propia. Cuando la secuencia de señales nativa no está presente, se puede introducir de manera conocida una secuencia de señales heteróloga. El experto conoce numerosas de estas secuencias de señales y están depositadas en bancos de datos de secuencias como GenBank y EMBL.

Otro elemento regulador es el sitio interno de entrada al ribosoma (IRES). El “elemento IRES” comprende una secuencia que realiza funcionalmente la iniciación de la traducción independientemente de un casquete de metilguanosa 5’ terminal (estructura CAP) así como también del gen que se encuentra aguas arriba, y posibilita en una célula animal la traducción de dos cistrones (marco de lectura abierto) de un solo transcrito. El elemento IRES pone a disposición un sitio de ligadura de ribosomas independiente para la traducción del marco de lectura abierto que se encuentra inmediatamente aguas abajo. Al contrario del mRNA bacteriano, que puede ser multicistónico, es decir, que puede codificar varios polipéptidos o productos diferentes, los cuales son traducidos uno detrás de otro del mRNA, la mayoría de los mRNAs de células animales son monocistónicos y codifican solo una única proteína o producto. En un transcrito multicistónico en una célula eucariótica se iniciaría la traducción por el sitio de iniciación de la traducción que se encuentra más cercano aguas arriba y sería terminado por el primer codón de detención, después de lo cual se liberaría el transcrito del ribosoma. En la traducción se formaría por lo tanto sólo el primero del polipéptido o producto codificado por el mRNA. Por el contrario, un transcrito multicistónico con un elemento IRES, que está unido funcionalmente con el segundo o con otros marcos de lectura abiertos en el transcrito, posibilita la traducción subsiguiente del marco de lectura abierto que se encuentra aguas abajo, de modo que en la célula eucariótica se producen dos o más polipéptidos o productos codificados por el mismo transcrito.

El elemento IRES puede tener distinta longitud y origen diferente y provenir, por ej., del virus de la encefalomiocarditis (EMCV) o de otros picornavirus. En la literatura se han descrito diversas secuencias IRES y su aplicación en la construcción de vectores; ver, por ejemplo, Pelletier et al., 1988; Jang et al., 1989; Davies et al., 1992; Adam et al., 1991; Morgan et al., 1992; Sugimoto et al., 1994; Ramesh et al., 1996; Mosser et al., 1997.

La secuencia de genes que se encuentra aguas abajo está unida funcionalmente con el extremo 3' del elemento IRES, es decir, la distancia es elegida de tal modo que la expresión del gen no es influida o sólo lo es marginalmente y/o presenta una expresión suficiente para el objetivo. La distancia óptima y admisible entre el elemento IRES y el codón de inicio del gen que se encuentra aguas abajo para una expresión aún suficiente se puede calcular en ensayos sencillos mediante la variación de la distancia y la determinación de la tasa de expresión como función de la distancia con ayuda de ensayos de gen informador.

Por medio de las medidas indicadas se puede obtener una casete de expresión optimizada, la cual es de gran utilidad para la expresión de productos de genes heterólogos. Una casete de expresión obtenida mediante una o más de tales medidas también es objeto de la invención.

Promotor de ubiquitina/S27a del hámster:

En otra forma de realización, el vector de expresión de acuerdo con la invención contiene el promotor de ubiquitina/S27a del hámster, preferentemente en unión funcional con el gen de interés y aún más preferentemente en unión funcional con el gen de interés y el gen que codifica una proteína fluorescente o un marcador de selección.

El promotor de ubiquitina/S27a del hámster es un promotor homólogo fuerte que se describe en el documento WO 97/15664. Un promotor de este tipo presenta preferentemente por lo menos una de las siguientes características: zona de secuencia rica en GC, sitio de ligadura Sp1, elemento de polipirimidina, presencia de una caja TATA. Se prefiere especialmente un promotor que presenta un sitio de ligadura Sp1 en ausencia de una caja TATA. Además, se prefiere un promotor de este tipo que esté activado constitutivamente y que sea activo especialmente bajo condiciones de cultivo de células con suero, con poco suero y sin suero. En otra forma de realización se trata de un promotor inducible, especialmente un promotor que es activado por extracción del suero.

Una forma de realización especialmente ventajosa es un promotor con una secuencia de nucleótidos que está contenida en la Fig. 5 del documento WO 97/15664. Se prefieren especialmente las secuencias de promotores en las cuales está contenida la secuencia de la posición -161 a la -45 de la Fig. 5.

Los promotores usados en los ejemplos de la presente descripción de patente comprenden en cada caso una molécula de ADN con una secuencia que corresponde al fragmento -372 a +111 de la Fig. 5 del documento WO 97/15664 y representa el promotor preferido, es decir, un promotor preferido debería comprender esta zona de secuencias.

Preparación de vectores de expresión según la invención:

La preparación del vector de expresión de acuerdo con la invención puede realizarse básicamente según métodos usuales, conocidos por el experto como, por ej., se describen en Sambrook et al. (1989). Allí se encuentra también una descripción de los componentes funcionales de un vector, por ej., promotores adecuados (adicionalmente al promotor de ubiquitina/S27a del hámster), potenciadores, señales de terminación y poliadenilación, genes de resistencia a los antibióticos, marcadores de selección, puntos de partida de replicación y señales de corte y empalme. Para la preparación se pueden usar vectores de clonación usuales, por ej. plásmidos, bacteriófagos, fagémidos, cósmidos o vectores virales como baculovirus, retrovirus, adenovirus, virus adeno-asociados y virus Herpes simplex, pero también cromosomas sintéticos o artificiales o minicromosomas. Los vectores de expresión eucarióticos contienen típicamente también secuencias procarióticas como, por ej., origen de la replicación y genes de resistencia a los antibióticos, los cuales posibilitan la multiplicación y selección del vector en bacterias. Una multiplicidad de vectores de expresión eucarióticos, que contienen los sitios de clonación múltiples para la introducción de una secuencia de polinucleótidos, son conocidos y algunos se pueden obtener comercialmente de diversas empresas como Stratagene, La Jolla, CA, EE.UU.; Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.; Promega, Madison, WI, EE.UU. o BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA, EE.UU.

De una manera usual para el experto se introducen en el vector de expresión el promotor heterólogo, el gen (o genes) de interés, el marcador de selección así como también eventualmente el gen codificador de la proteína fluorescente, elementos reguladores adicionales como, por ejemplo, el sitio interno de entrada al ribosoma (IRES), potenciadores, señales de poliadenilación y otros elementos *cis*-activos como, por ejemplo, elementos TE. Un vector de expresión de acuerdo con la invención contiene como mínimo un promotor heterólogo, el gen de interés y un elemento TE. Preferentemente, el vector de expresión contiene además un gen codificador de una proteína fluorescente. De acuerdo con la invención, se prefiere especialmente el uso de un promotor de ubiquitina/S27a como promotor heterólogo. Se prefiere más aún un vector de expresión en el cual están unidos funcionalmente entre sí el promotor heterólogo, preferentemente un promotor de ubiquitina/S27a, el gen de interés y un elemento TE o que se encuentran en unión funcional.

En el marco de la presente descripción, la expresión "unión funcional" o "unido funcionalmente" se refiere a dos o más secuencias de ácidos nucleicos o secuencias parciales de ácidos nucleicos que están posicionadas de tal modo que pueden realizar la función prevista. Por ejemplo, un promotor/potenciador, un promotor/elemento TE o un promotor/potenciador/elemento TE están unidos funcionalmente con una secuencia de genes codificadora cuando pueden controlar o modular en posición *cis* la transcripción de la secuencia de genes unida. En general, pero no

necesariamente, las secuencias de ADN unidas funcionalmente se encuentran muy cerca una de otra, y si se unen dos secuencias de genes codificadoras o en el caso de una secuencia de señal de secreción, en el mismo marco de lectura. Si bien un promotor unido funcionalmente se encuentra en general aguas arriba de la secuencia de genes codificadora, no tiene que estar necesariamente muy cercano. Los potenciadores o elementos TE tampoco tienen que estar muy próximos, en tanto favorezcan la transcripción y/o la expresión de la secuencia de genes. Para este fin pueden estar tanto aguas arriba como también aguas abajo de la secuencia de genes, eventualmente a una cierta distancia. Un sitio de poliadenilación está unido funcionalmente con una secuencia de genes, cuando la misma está posicionada en el extremo 3' de la secuencia de genes de tal modo que la transcripción se realiza a través de la secuencia codificadora hasta la señal de poliadenilación. La unión se puede realizar según métodos recombinantes usuales, por ej. por medio de la técnica de PCR, por ligadura a sitios de corte de restricción adecuados o por medio de corte y empalme. Cuando no se encuentran sitios de corte de restricción, se pueden usar de manera conocida ligadores de oligonucleótidos sintéticos o adaptadores.

En una de las formas de realización descritas están unidos entre sí funcionalmente el promotor heterólogo, preferentemente un promotor de ubiquitina/S27a o promotor de CMV, el gen de interés y el gen codificador de una proteína fluorescente. Esto significa, por ej., que tanto el gen de interés como también el gen codificador de una proteína fluorescente son expresados por el mismo promotor heterólogo. En una forma de realización especialmente preferida, la unión funcional se realiza a través de un elemento IRES, de modo que de ambos genes se sintetiza un mRNA bicistrónico. El vector de expresión de acuerdo con la invención puede contener además elementos potenciadores y/o elementos TE, que actúan funcionalmente sobre uno o más promotores. Se prefiere especialmente un vector de expresión en el cual están unidos el promotor heterólogo, preferentemente el promotor de ubiquitina/S27a y/o una forma modificada del mismo o el promotor de CMV, con un elemento potenciador, por ej. un potenciador de SV40 o un elemento potenciador de CMV así como también un elemento TE.

Básicamente se puede realizar la expresión de los genes dentro de un vector de expresión a partir de una o más unidades de transcripción. Como "unidad de transcripción" se define una región, que contiene uno o más genes a transcribir. Para ello los genes dentro de una unidad de transcripción están unidos funcionalmente de tal modo entre sí que todos los genes dentro de una unidad de este tipo se encuentran bajo el control transcripcional del mismo promotor, promotor/potenciador o promotor/ potenciador/elemento TE. Como resultado de esta unión transcripcional de genes se puede transcribir y por lo tanto expresar más de una proteína o producto de una unidad de transcripción. Cada unidad de transcripción contiene elementos reguladores que son necesarios para la transcripción y la traducción de las secuencias de genes contenidas en los mismos. Cada unidad de transcripción puede contener los mismos o diferentes elementos reguladores. Para la unión funcional de los genes dentro de una unidad de transcripción se pueden usar elementos IRES o intrones.

El vector de expresión puede contener una sola unidad de transcripción para la expresión del gen (o también genes) de interés, del marcador de selección y eventualmente del gen que codifica la proteína de fluorescencia. Alternativamente, estos genes pueden estar ordenados también en dos o más unidades de transcripción. Para ello son posibles diversas combinaciones de genes dentro de una unidad de transcripción. En otra forma de realización de la presente invención se puede introducir más de un vector de expresión compuesto por una, dos o más unidades de transcripción, en una célula huésped por medio de cotransfección o en transfección subsiguiente en cualquier orden. Se puede elegir cualquier combinación de elementos reguladores y genes en cada vector, en tanto esté garantizada una expresión suficiente de las unidades de transcripción. Si fuera necesario se pueden posicionar en los vectores de expresión otros elementos reguladores, como por ejemplo, elementos TE y genes como, por ej., genes adicionales de interés o marcadores de selección.

También son de acuerdo con la invención aquellos vectores de expresión que contienen uno o más elementos TE, y que presentan en lugar del gen de interés solamente un sitio de clonación múltiple, que posibilita la clonación del gen de interés a través de secuencias de reconocimiento para endonucleasas de restricción. En el estado de la técnica se conocen numerosas secuencias de reconocimiento para las diversas endonucleasas de restricción, así como también las endonucleasas de restricción correspondientes. Preferentemente se usan secuencias que están compuestas por al menos 6 nucleótidos como secuencia de reconocimiento. Una lista de secuencias de reconocimiento adecuadas se encuentra por ejemplo, en Sambrook et al., (1989).

También son de acuerdo con la invención aquellos vectores de expresión que en lugar del gen de interés presentan solamente un sitio de clonación múltiple que posibilita la clonación del gen de interés a través de secuencias de reconocimiento para las endonucleasas de restricción y que además presentan uno o más, preferentemente múltiples sitios de clonación en diversas posiciones del vector de expresión, que posibilitan además la clonación de elementos TE a través de secuencias de reconocimiento para endonucleasas de restricción. En el estado de la técnica se conocen numerosas secuencias de reconocimiento para las diversas endonucleasas de restricción, así como también las endonucleasas de restricción correspondientes. Preferentemente se usan secuencias que están compuestas por al menos 6 nucleótidos como secuencia de reconocimiento. Una lista de secuencias de reconocimiento adecuadas se encuentra por ejemplo, en Sambrook et al., (1989).

Células huésped:

Para la transfección con el vector de expresión de acuerdo con la invención se usan células huésped eucarióticas, preferentemente células de mamíferos y especialmente células de roedores como, por ej., líneas celulares de ratones, ratas y hámsteres. La transfección exitosa de las células correspondientes con un vector de expresión de acuerdo con la invención da por resultado células transformadas, modificadas genéticamente, recombinantes o transgénicas, las cuales son también objeto de la presente invención.

Células huésped preferidas en el marco de la invención son células de hámster como, por ej., células BHK21, BHK TK, CHO, CHO-K1, CHO-DUKX, CHO-DUKX B1 y CHO-DG44 o derivados/descendientes de estas líneas celulares. Se prefieren especialmente las células CHO-DG44, CHO-DUKX, CHO-K1 y BHK21, especialmente las células CHO-DG44 y CHO-DUKX. También son adecuadas las células de mieloma del ratón, preferentemente células NS0 y Sp2/0, así como también derivados/descendientes de estas líneas celulares.

Ejemplos de células de hámster y ratón, que se pueden usar de acuerdo con la invención se indican en la siguiente Tabla 1. Sin embargo, también se pueden usar para la producción de proteínas para productos biofarmacéuticos derivados y descendientes de estas células, otras células de mamíferos, inclusive, pero no limitado a, líneas celulares de ser humano, ratón, rata, monos, roedores, o células eucarióticas, inclusive, pero no limitado a, células de levaduras, insectos, aves y plantas.

Tabla 1: Líneas celulares de producción de hámsteres y ratones

Línea celular	Número de depósito
NS0	ECACC N° 85110503
Sp2/0-Ag14	ATCC CRL-1581
BHK21	ATCC CCL-10
BHK TK	ECACC N° 85011423
HaK	ATCC CCL-15
2254-62.2 (derivado BHK-21)	ATCC CRL-8544
CHO	ECACC N° 8505302
CHO-K1	ATCC CCL-61
CHO-DUKX (= CHO duk, CHO/dhfr)	ATCC CRL-9096
CHO-DUKX B1	ATCC CRL-9010
CHO-DG44	Urlaub et al., Cell 33[2], 405-412, 1983
CHO Pro-5	ATCC CRL-1781
V79	ATCC CCC-93
B14AF28-G3	ATCC CCL-14
CHL	ECACC N° 87111906

La transfección de las células huésped eucarióticas con un polinucleótido o un vector de expresión de acuerdo con la invención se realiza según métodos usuales (Sambrook et al., 1989; Ausubel et al., 1994). Métodos de transfección adecuados son, por ej., la transfección mediada por liposomas, co-precipitación de fosfato de calcio, electroporación, transfección mediada por plicaciones (por ej., DEAE-dextrano), fusión de protoplastos, microinyección e infecciones virales. De acuerdo con la invención se realiza preferentemente una transfección estable, en donde las construcciones son integradas en el genoma de la célula huésped o un cromosoma artificial/minicromosoma o están contenidos de manera estable episomal en la célula huésped. Se prefiere el método de transfección que posibilita la frecuencia de transfección óptima y la expresión del gen heterólogo en la célula huésped correspondiente. Por definición, cada secuencia o cada gen que es introducido en la célula huésped, es denominado con respecto a la célula huésped "secuencia heteróloga" o "gen heterólogo". Aun cuando la secuencia a introducir o el gen a introducir sea idéntico a una secuencia endógena o a un gen endógeno de la célula huésped. Por ejemplo, un gen de actina de hámster, que es introducido en una célula huésped de hámster es, por definición, un gen heterólogo.

Son de acuerdo con la invención especialmente las células recombinantes de mamíferos, preferentemente células de roedores, más preferentemente células de hámster como, por ej., células CHO o BHK, que fueron transfectadas con uno de los vectores de expresión de acuerdo con la invención aquí descritos.

En la preparación recombinante de proteínas heterómeras como, por ej., anticuerpos monoclonales (mAk), la transfección de células huésped adecuadas se puede realizar, en principio, de tres maneras diferentes. Tales mAk están formados por varias subunidades, las cadenas pesadas y ligeras. Los genes codificadores de estas subunidades pueden ser introducidos en unidades de transcripción independientes o multicistrónicas en un solo plásmido, con el cual luego se transfecta la célula huésped. Esto tiene por objeto asegurar la representación estequiométrica de los genes después de la integración en el genoma de la célula huésped. Por supuesto, se debe garantizar aquí en caso de unidades de transcripción independientes, que los mARNs, que codifican las diversas proteínas, presenten la misma estabilidad, eficiencia de transcripción y de traducción. En el segundo caso, la

expresión de los genes se realiza dentro de una unidad de transcripción multicistónica por medio de un único promotor y se obtiene sólo un transcrito. Usando elementos IRES se posibilita una iniciación de la traducción interna muy eficiente de los genes en el segundo y en los siguientes cistrones. Sin embargo, las tasas de expresión para estos cistrones son más reducidas que las del primer cistron, cuya iniciación de traducción a través de un así
 5 llamado complejo de pre-iniciación dependiente de "cap" es sustancialmente más eficiente que la iniciación de traducción dependiente de IRES. Para obtener una expresión realmente equimolar del cistron se pueden introducir por ejemplo todavía elementos cistronicos adicionales, los cuales actuando junto con los elementos IRES logran tasas de expresión uniformes (documento WO 94/05785).

10 Otra posibilidad de acuerdo con la invención de la preparación de varias proteínas heterólogas es la transfección secuencial en la que los genes son transfectados, separados en el tiempo, de forma integrada en diferentes vectores de expresión. Por ejemplo, la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo se pueden incorporar en una célula en dos etapas de transfección.

15 Otra posibilidad, y preferida de acuerdo con la invención, de la preparación simultánea de varias proteínas heterólogas es la cotransfección, en la cual los genes son integrados en diversos vectores de expresión separadamente. Esto tiene la ventaja de que determinadas relaciones de los genes y productos de genes pueden ser ajustados entre sí, por medio de los cual se pueden equilibrar diferencias en la estabilidad del mRNA así como también en la eficiencia de transcripción y traducción. Además, los vectores de expresión son más estables por su
 20 tamaño reducido y se pueden manipular más fácilmente tanto en la clonación como también en la transfección.

En una forma de realización especial de la invención, las células huésped son por lo tanto transfectadas, preferentemente cotransfectadas, con uno o más vectores con genes que codifican una o más de otras proteínas de interés. El o los otros vectores usados para la cotransfección codifican, por ej., la o las otras proteínas de interés
 25 bajo el control del mismo promotor, preferentemente bajo el control de la misma combinación promotor/potenciador o más preferentemente bajo el control de la misma combinación de promotor/potenciador/elemento TE o también bajo el control de la misma combinación de promotor/potenciador con diferentes elementos TE así como también para por lo menos un marcador de selección, por ej., la dihidrofolato-reductasa.

30 En otra forma de realización de la invención, los vectores usados para la transfección pueden contener uno o más elementos TE en cualquier combinación, posición y orientación.

En otra forma de realización preferida de la invención se cotransfectan las células huésped con por lo menos dos vectores de expresión eucarióticos, en donde por lo menos uno de los dos vectores contiene por lo menos un gen que codifica por lo menos una proteína de interés, y el otro vector contiene uno o más ácidos nucleicos de acuerdo con la invención en cualquier combinación, posición y orientación, y opcionalmente también codifica por lo menos un gen de interés, y estos ácidos nucleicos de acuerdo con la invención transmiten su acción de aumento de la transcripción y/o expresión a los genes de interés que están localizados en el otro vector cotransfectado, a través de la cointegración con el otro vector.

40 De acuerdo con la invención, las células huésped son establecidas, adaptadas y cultivadas bajo condiciones libres de suero, eventualmente en medios que están libres de proteínas/péptidos animales. Ejemplos de los medios que se obtienen en el comercio son Ham's F12 (Sigma, Deisenhofen, DE), RPMI-1640 (Sigma), medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Sigma), medio esencial mínimo (MEM; Sigma), medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM; Sigma), CD-CHO (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.), CHO-S-SFMII (Invitrogen), medio CHO libre de suero
 45 (Sigma) y medio CHO libre de proteínas (Sigma). Cada uno de estos medios puede ser completado eventualmente con diversos compuestos, por ej., hormonas y/u otros factores de crecimiento (por ej., insulina, transferina, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento parecido a la insulina), sales (por ej., cloruro de sodio, calcio, magnesio, fosfato), tampones (por ej., HEPES), nucleósidos (por ej., adenosina, timidina), glutamina, glucosa u otras sustancias nutritivas equivalentes, antibióticos y/u oligoelementos. Si bien se prefieren de acuerdo con la invención medios libres de suero, se pueden usar también medios para el cultivo de las células huésped que fueron mezclados con una cantidad adecuada de suero. Para la selección de células modificadas genéticamente, que expresan uno o más genes marcadores de selección, se agregan al medio uno o más medios de selección adecuados.

55 Como "medio de selección" se designa una sustancia que influye sobre el crecimiento o la supervivencia de células huésped con una deficiencia para el gen marcador de selección. En el marco de la presente invención se usa preferentemente geneticina (G418) como agregado de medio para la selección de células huésped heterólogas, que llevan un gen de tipo salvaje o preferentemente un gen de neomicina-fosfotransferasa modificado. Preferentemente, se usan concentraciones de G418 entre 100 y 800 µg/ml de medio, más preferentemente son 200 a 400 µg de G418/ml de medio. Si las células huésped tuvieran que ser transfectadas con varios vectores de expresión, por ej.
 60 cuando separadamente varios genes de interés tienen que ser introducidos en la célula huésped, éstas disponen generalmente de varios genes marcadores de selección.

Un "gen marcador de selección" es un gen que posibilita la selección específica de células que contienen este gen por medio de la adición de un medio de selección correspondiente en el medio de cultivo. Como aclaración, un gen de resistencia a los antibióticos puede ser usado como marcador de selección positivo. Sólo células que fueron
 65

transformadas con este gen pueden crecer en presencia del antibiótico correspondiente y por lo tanto ser seleccionadas. Las células no transformadas en cambio no pueden crecer o sobrevivir bajo estas condiciones de selección. Hay marcadores de selección positivos, negativos y bifuncionales. Los marcadores de selección positivos posibilitan la selección y con ello el enriquecimiento de células transformadas por medio de la transmisión de una resistencia con respecto al medio de selección o por compensación de un defecto metabólico o catabólico de la célula huésped. Por el contrario, mediante marcadores de selección negativos se pueden eliminar selectivamente células que obtuvieron el gen para el marcador de selección. Un ejemplo de ello es el gen de la timidinaquinasa del virus Herpes simplex, cuya expresión en células con la administración simultánea de Acyclovir o Gancyclovir conduce a su eliminación. Los marcadores de selección usados en esta invención, inclusive el marcador de selección amplificable, incluye mutantes y variantes modificados biotecnológicamente, fragmentos, equivalentes funcionales, derivados, homólogos y fusiones con otras proteínas o péptidos, en tanto el marcador de selección mantenga sus propiedades selectivas. Tales derivados presentan una notable homología en la secuencia de aminoácidos en las zonas o dominios, a los cuales se les adjudica la propiedad selectiva. En la literatura se describen una multiplicidad de genes marcadores de selección, inclusive marcadores bifuncionales (positivos/negativos) (véanse, por ej., los documentos WO 92/08796 y WO 94/28143). Ejemplos de marcadores de selección, que son usados comúnmente en células eucarióticas, contienen el gen para aminoglicósido-fosfotransferasa (APH), higromicina-fosfotransferasa (HYG), dihidrofolato-reductasa (DHFR), timidinaquinasa (TK), glutamina-sintetasa, asparagina-sintetasa y genes que transmiten resistencia con respecto a neomicina (G418), puromicina, histidinol D, bleomicina, fleomicina y zeocina.

Bajo "neomicina-fosfotransferasa modificada (NPT)" están comprendidos todos los mutantes descritos en el documento WO 2004/050884, especialmente el mutante D227G (Asp227Gly), que se caracteriza por el intercambio ácido aspártico (Asp, D) por glicina (Gly, G) en la posición de aminoácido 227 y más preferentemente el mutante F240I (Phe240Ile) que se caracteriza por el intercambio de fenilalanina (Phe, f) por isoleucina (Ile I) en la posición de aminoácido 240.

La presente invención incluye, por lo tanto, un método para la preparación y selección de células recombinantes de mamíferos, que contiene los siguientes pasos: (i) transfección de las células huésped con genes que codifican por lo menos una proteína/un producto de interés y una neomicina-fosfotransferasa, preferentemente modificada, en donde por lo menos el gen (o genes) de interés está unido funcionalmente con por lo menos un elemento TE para aumentar la transcripción y/o expresión; (ii) cultivo de las células bajo condiciones que posibilitan una expresión de los diversos genes; y (iii) la selección de estos genes co-integrados por medio del cultivo de células en presencia de un agente de selección como, por ej., G418. Preferentemente se cultivan las células transfectadas aquí en un medio en ausencia de suero. Preferentemente la concentración de G418 es de por lo menos 200 µg/ml. La concentración puede ser también de por lo menos 400 µg/ml.

Gen marcador de selección amplificable:

Además las células de acuerdo con la invención pueden opcionalmente ser sometidas también a pasos de amplificación de genes, cultivándolas en presencia de un medio de selección que lleva a una amplificación de un gen marcador de selección amplificable.

La condición es que las células huésped sean transfectadas adicionalmente con un gen que codifica para un marcador de selección amplificable. Es posible que el gen, que codifica un marcador de selección amplificable, esté presente en uno de los vectores de expresión de acuerdo con la invención o sea introducido en la célula huésped con ayuda de otro vector.

El gen marcador de selección amplificable codifica comúnmente una enzima que se requiere para el crecimiento de células eucarióticas bajo determinadas condiciones de cultivo. Por ejemplo, el gen marcador de selección amplificable puede codificar la dihidrofolato-reductasa (DHFR). En este caso se amplifica el gen cuando se cultiva una célula huésped transfectada con el mismo en presencia del agente de selección metotrexato (MTX).

En la siguiente Tabla 2 se indican ejemplos de otros genes marcadores de selección amplificables que se pueden usar de acuerdo con la invención y los medios de selección correspondientes, que se describen en una vista general en Kaufman, *Methods in Enzymology*, 185, 537-566 (1990).

Tabla 2: Genes marcadores de selección amplificables

Gen marcador de selección amplificable	Número de depósito	Agente de selección
DHFR (dihidrofolato-reductasa)	M19869 (hámster) E00236 (ratón)	Metotrexato (MTX)
Metalotioneína	D10551 (hámster) M13003 (humano) M11794 (rata)	Cadmio
CAD (carbamoilfosfato-sintetasa: aspartato-transcarbamilasa: dihidroorotasa)	M23652 (hámster) D78586 (humano)	N-fosfoacetil-L-aspartato
Adenosina-desaminasa	K02567 (humano) M10319 (ratón)	Xyl-A- o adenosina, 2' desoxicoformicina
AMP (adenilato)-desaminasa	D12775 (humano) J02811 (rata)	Adenina, azaserina, coformicina
UMP-sintetasa	J03626 (humano)	6-Azaauridina, pirazofurano
IMP 5'-deshidrogenasa	J04209 (hámster) J04208 (humano) M33934 (ratón)	Ácido micofenólico
Xantina-guanina-fosforribosil-transferasa	X00221 (E. coli)	Ácido micofenólico con xantina limitante
HGPRTasa mutante o timidina-quinasa mutante	J00060 (hámster) M13542, K02581 (humano) J00423, M68489 (ratón) M63983 (rata) M36160 (Herpes virus)	Hipoantina, aminopterina y timidina (HAT)
timidilato-sintetasa	D00596 (humano) M13019 (ratón) L12138 (rata)	5-Fluordesoxiuridina
P-glicoproteína 170 (MDR1)	AF016535 (humano) J03398 (ratón)	Varios productos medicinales, por ej., adriamicina, vincristina, colchicina
Ribonucleótido-reductasa	M124223, K02927 (ratón)	Afidicolina
Glutamina-sintetasa	AF150961 (hámster) U09114, M60803 (ratón) M29579 (rata)	Metioninsulfoximina (MSX)
Asparagina-sintetasa	M27838 (hámster) M27396 (humano) U38940 (ratón) U07202 (rata)	β -Aspartilhidroxamato, albizziina, 5' azacitidina
Argininosuccinato-sintetasa	X01630 (humano) M31690 (ratón) M26198 (vaca)	Canavanina
Ornitina-descarboxilasa	M34158 (humano) J03733 (ratón) M16982 (rata)	A-Difluormetil-ornitina
HMG-CoA-reductasa	L00183, M12705 (hámster) M11058 (humano)	Compactina
N-acetilglucosaminil-transferasa	M55621 (humano)	Tunicamicina
Treonil-tARN-sintetasa	M63180 (humano)	Borrelidina
Na ⁺ K ⁺ -ATPasa	J05096 (humano) M14511 (rata)	Ouabaína

- 5 Como gen marcador de selección amplificable se prefiere de acuerdo con la invención un gen que codifica un polipéptido con la función de DHFR, por ej. DHFR o una proteína de fusión de la proteína fluorescente y DHFR. La DHFR es necesaria para la biosíntesis de purinas. Las células en las cuales no está el gen de la DHFR no pueden crecer en medio deficiente en purina. El gen de DHFR es por lo tanto un marcador de selección útil para la selección y amplificación de genes en células que son cultivadas en medio libre de purina. El agente de selección, que se usa
10 junto con el gen de DHFR es metotrexato (MTX).

Las células de mamíferos, preferentemente células de mieloma de ratón y de hámster, son células huésped preferidas para el uso de DHFR como marcador de selección amplificable. Se prefieren especialmente las líneas

celulares CHO-DUKX (ATCC CRL-9096) y CHO-DG44 (Urlaub y col., 1983), ya que debido a la mutación no presentan actividad DHFR propia. Para poder aplicar la amplificación condicionada por DHFR también en otros tipos de células que disponen de una actividad DHFR endógena propia, se puede usar en la transfección un gen de DHFR mutado, que codifica una proteína con una sensibilidad reducida con respecto a metotrexato (Simonson et al., 1983; Wigler et al., 1980; Haber et al., 1982).

El marcador DHFR cuando se usan células base DHFR-negativas como CHO-DG44 o CHO-DUKX, es especialmente adecuado para la selección y la amplificación subsiguiente, ya que estas células no expresan una DHFR endógena y por lo tanto no crecen en medio libre de purina. Por lo tanto se puede usar aquí el gen de DHFR como marcador de selección dominante y las células transformadas son seleccionadas en medio libre de hipoxantina/timidina.

La presente invención incluye, por lo tanto, un método para la preparación y selección de células recombinantes de mamíferos, que contiene los siguientes pasos: (a) transfección de las células huésped con genes que codifican por lo menos una proteína/un producto de interés, una neomicina-fosfotransferasa, preferentemente modificada, y el marcador de selección amplificable DHFR, en donde por lo menos el gen (o genes) de interés está(n) unido(s) funcionalmente con por lo menos un elemento TE de acuerdo con la invención para aumentar la transcripción y/o expresión; (b) cultivo de las células bajo condiciones que posibilitan una expresión de los diversos genes; (c) la selección de estos genes co-integrados por medio del cultivo de las células en presencia de un agente de selección, como por ej., G418, en medio libre de hipoxantina/timidina; y (d) la amplificación de estos genes co-integrados por medio del cultivo de las células en presencia de un agente de selección que permite la amplificación de por lo menos el gen marcador de selección amplificable como, por ej., metotrexato. Preferentemente se cultivan las células transfectadas aquí en medio libre de hipoxantina/timidina, suplementado con por lo menos 200 µg/mL de G418, preferentemente 400 µg/mL o también más G418, en ausencia de suero y con la adición de concentraciones crecientes de MTX. Preferentemente la concentración de MTX en el primer paso de amplificación es de por lo menos 100 nM. La concentración de MTX también puede ser de por lo menos 250 nM y puede ser aumentada escalonadamente hasta 1 µM. En el caso individual también se puede usar una concentración de más de 1 µM, por ej. 2 µM.

Una selección de células transfectadas también es posible por medio de separación de células activada por fluorescencia (FACS). Para ello se usan, por ejemplo, β-galactosidasa bacteriana, marcadores de la superficie de las células o proteínas fluorescentes (por ej., proteína fluorescente verde (GFP) y sus variantes de *Aequorea victoria* y *Renilla reniformes* u otras especies; proteína fluorescente roja y proteínas fluorescentes en otros colores y sus variantes de organismos no bioluminiscentes, como por ej., *Discosoma sp.*, *Anemonia sp.*, *Clavularia sp.*, *Zoanthus sp.*, *Aequorea coerulescens* para la selección de células transformadas.

Expresión génica y selección de células huésped de alta producción:

La expresión "expresión génica" se refiere a la transcripción y/o traducción de una secuencia de genes heteróloga en una célula huésped. La tasa de expresión se puede determinar en general aquí o bien en base a la cantidad del mRNA correspondiente que se encuentra presente en la célula huésped o en base a la cantidad producida de producto de gen, que es codificada por el gen de interés. La cantidad de mRNA producida mediante la transcripción de una secuencia de nucleótidos elegida puede ser determinada, por ejemplo, por hibridación de transferencia Northern, protección de ribonucleasa-ARN, hibridación in situ de ARN celular o por métodos de PCR (por ej., PCR cuantitativa) (Sambrook et al., 1989; Ausubel et al., 1994). Las proteínas que son codificadas por una secuencia de nucleótidos seleccionada también pueden ser determinadas por diversos métodos como, por ej., por ELISA, HPLC de proteínas A, transferencia Western, radioinmunoensayo, inmunoprecipitación, determinación de la actividad biológica de la proteína, inmunocoloración de la proteína con análisis FACS subsiguiente o microscopia de fluorescencia, detección directa de una proteína fluorescente por medio de análisis FACS o por microscopia de fluorescencia (Sambrook et al., 1989; Ausubel et al., 1994). Estos métodos posibilitan, por ejemplo, la investigación con respecto a si el elemento TE de acuerdo a la invención de la SEQ ID N° 1 o una parte cualquiera, fragmento o zona de la misma o sus derivados o combinaciones de estos llevan a un aumento de la transcripción y/o expresión de un gen de interés.

Con "aumento de la expresión, transcripción o productividad" se designa el aumento de la expresión o síntesis de una secuencia heteróloga introducida en una célula huésped, por ejemplo de un gen que codifica una proteína terapéutica, en comparación con un control. Hay un aumento de expresión, transcripción o productividad cuando una célula de acuerdo con la invención es cultivada de acuerdo con un procedimiento de acuerdo con la invención aquí descrito y cuando esta célula presenta por lo menos un aumento de la productividad específica de 1,3 veces o de 1,5 veces o, preferentemente, una duplicación de la productividad específica. También hay un aumento de expresión, transcripción o productividad cuando la célula de acuerdo con la invención presenta una triplicación de la productividad específica. También hay especialmente un aumento de la expresión, transcripción o productividad cuando la célula de acuerdo con la invención presenta por lo menos una cuadruplicación de la productividad específica. Hay un aumento de la expresión, transcripción o productividad especialmente cuando la célula de acuerdo con la invención presenta por lo menos una quintuplicación de la productividad específica. Un aumento de la expresión, transcripción o productividad existe también especialmente cuando la célula de acuerdo con la

invención presenta por lo menos una sextuplicación de la productividad específica. Hay un aumento especial de la expresión, transcripción o productividad cuando la célula de acuerdo con la invención presenta por lo menos una septuplicación de la productividad específica.

- 5 Un aumento de la expresión, transcripción o productividad puede obtenerse tanto usando uno de los vectores de expresión de acuerdo con la invención como también mediante la aplicación de un procedimiento de acuerdo con la invención.

10 Los procedimientos correspondientes pueden ser combinados con una selección basada en FACS de células huésped recombinantes que contienen como marcador de selección adicional, por ejemplo, una o más proteínas de fluorescencia (por ej., GFP) o un marcador de superficie celular. Otros métodos para obtener una expresión aumentada, en donde también es posible una combinación de diversos métodos, se basan, por ejemplo, en el uso de elementos *cis*-activos para la manipulación de la estructura de cromatina (por ej., LCR, UCOE, EASE, aisladores, S/MARs, elementos STAR), uso de factores de transcripción (artificial), tratamiento de las células con agentes naturales o sintéticos para la regulación hacia arriba de la expresión endógena o heteróloga de genes, mejora de la estabilidad (tiempo de vida media) del mRNA o de la proteína, mejora de la iniciación de la traducción del mRNA, aumento de la dosis de gen mediante el uso de plásmidos episomales (que se basa en el uso de secuencias virales como origen de replicación, por ej., de SV40, poliovirus, adenovirus, EBV o PBV), uso de secuencias que promueven la amplificación (Hemann et al., 1994) o en sistemas de amplificación *in vitro* que se basan en concatémeros de ADN (Monaco et al., 1996).

25 En otra forma de realización, la presente invención se refiere por lo tanto también a procedimientos para la obtención y la selección de células recombinantes de mamíferos, que expresan por lo menos un gen heterólogo de interés y que están caracterizados porque (i) se transfectan células recombinantes de mamíferos con un vector de expresión de acuerdo con la invención así como también el gen para un gen marcador de selección amplificable; (ii) se cultivan las células de mamíferos bajo condiciones que posibilitan una expresión del(de los) gen(es) de interés, del gen de neomicina-fosfotransferasa modificado; (iii) se cultivan las células de mamíferos en presencia de por lo menos un agente de selección, el cual actúa selectivamente sobre el crecimiento de células de mamíferos y prefiere aquellas células en el crecimiento que expresan el gen de neomicina-fosfotransferasa; (iv) se seleccionan las células de mamíferos por medio de análisis flujocitométrico que muestran una alta expresión de la proteína fluorescente; (v) se cultivan las células seleccionadas bajo condiciones bajo las cuales se expresa el gen marcador de selección amplificable; y (vi) se agrega al medio de cultivo un agente de selección que tiene como consecuencia la amplificación del gen marcador de selección amplificable.

35 También es de acuerdo con la invención un procedimiento para la preparación de un producto biofarmacéutico, caracterizado por la siguientes etapas:

- (a) integración de un ácido nucleico de acuerdo con la invención en un vector de expresión eucariótico que contiene un gen de interés;
- (b) transfección de una célula huésped eucariótica con este vector de expresión;
- (c) selección de una célula huésped transfectada de alta producción y
- (d) cultivo de la célula huésped transfectada de alta producción obtenida, bajo condiciones que permiten una expresión del(de los) gen(es) de interés. Para ello se cultivan las células de alta producción seleccionadas preferentemente en un medio de cultivo libre de suero y preferentemente en cultivo de suspensión bajo condiciones que permiten una expresión del gen de interés. La proteína/el producto de interés se obtiene así preferentemente como producto de gen segregado a partir del medio de cultivo de células. En la expresión de la proteína sin señal de secreción se puede aislar también el producto de gen a partir de lisados de células. Para obtener un producto puro, homogéneo, que se encuentra esencialmente libre de otras proteínas recombinantes y proteínas de células huésped se realizan pasos de purificación usuales. Para ello se retiran frecuentemente células y detritos celulares del medio de cultivo o lisado. El producto de gen deseado puede ser liberado luego de proteínas, polipéptidos y ácidos nucleicos solubles contaminantes, por ej., por fraccionamiento en columnas de inmunoafinidad y de intercambio de iones, precipitación de etanol, HPLC de fases inversas o cromatografía en Sephadex, sílice o resinas de intercambio de cationes como DEAE. Los métodos que llevan a una purificación de una proteína heteróloga expresada por células huésped recombinantes son conocidos por el experto y se describieron en la literatura, por ej., en Harris et al., (1995) y Scopes (1988).

55 COMPOSICIONES DE ACUERDO CON LA INVENCION

60 La presente invención se refiere a un ácido nucleico que contiene TE-13 (SEQ ID N° 15) o un fragmento de TE-13 (SEQ ID N° 15) o sus secuencias de nucleótidos complementarias o un derivado de TE-13 (SEQ ID N° 15) o sus secuencias de nucleótidos complementarias, en donde el ácido nucleico, el fragmento, el derivado o sus secuencias de nucleótidos complementarias conducen, en el caso de una integración cromosómica, a un aumento de la transcripción o bien expresión de un gen de interés en un sistema de expresión, y en donde el derivado presenta una identidad de la secuencia de la menos el 85%.

65 La presente invención se refiere a un ácido nucleico que contiene TE-13 (SEQ ID N° 15) o un fragmento de TE-13

(SEQ ID N° 15) o sus secuencias de nucleótidos complementarias o un derivado de TE-13 (SEQ ID N° 15) o sus secuencias de nucleótidos complementarias, en donde el ácido nucleico, el fragmento, el derivado o sus secuencias de nucleótidos complementarias conducen, en el caso de una integración cromosómica, a un aumento de la transcripción o bien expresión de un gen de interés en un sistema de expresión, y en donde el derivado presenta una identidad de la secuencia de la menos el 85%, con la condición de que el fragmento o el derivado comprenda por lo menos una zona de secuencia de la zona de ácidos nucleicos entre 1 pb y 1578 pb (con referencia a la SEQ ID N° 01). En este caso, con una zona de secuencias se quiere dar a entender una zona de ácidos nucleicos de por lo menos 10 pb, 15 pb, 20 pb, 50 pb, 100 pb.

La presente invención se refiere a un ácido nucleico que contiene TE-13 (SEQ ID N° 15) o un fragmento de TE-13 (SEQ ID N° 15) o sus secuencias de nucleótidos complementarias o un derivado de TE-13 (SEQ ID N° 15) o sus secuencias de nucleótidos complementarias, en donde el ácido nucleico, el fragmento, el derivado o sus secuencias de nucleótidos complementarias conducen, en el caso de una integración cromosómica, a un aumento de la transcripción o bien expresión de un gen de interés en un sistema de expresión, y en donde el derivado presenta una identidad de la secuencia de la menos el 85%, con la condición de que el fragmento o derivado comprenda por lo menos una zona de secuencias de TE-08 (SEQ ID N° 11) o TE-13 (SEQ ID N° 15). También en este caso, con una zona de secuencias se quiere dar a entender una zona de ácidos nucleicos de por lo menos 10 pb, 15 pb, 20 pb, 50 pb, 100 pb.

El aumento de expresión del gen de interés se puede determinar, por ejemplo, por medición del título de producto por medio de ELISA.

La invención se refiere, en una forma de realización preferida, a un ácido nucleico que contiene TE-08 (SEQ ID N° 10) o un fragmento de TE-08 (SEQ ID N° 10) o sus secuencias de nucleótidos complementarias o un derivado de TE-08 (SEQ ID N° 10) o sus secuencias complementarias, en donde el ácido nucleico, el fragmento, el derivado o sus secuencias de nucleótidos complementarias conducen, en el caso de una integración cromosómica, a un aumento de la transcripción y/o expresión de un gen de interés en un sistema de expresión, y en donde el derivado presenta una identidad de la secuencia de la menos el 85%.

En una forma de realización preferida del ácido nucleico de acuerdo con la invención arriba mencionado existe la condición de que el fragmento o derivado comprenda por lo menos una zona de secuencias de la zona de ácidos nucleicos entre 1 pb y 1578 pb (con referencia a la SEQ ID N° 01).

En una forma de realización especialmente preferida del ácido nucleico de acuerdo con la invención arriba mencionado, existe la condición de que el fragmento o derivado comprenda por lo menos una zona de secuencias de TE-08 (SEQ ID N° 11) o TE-13 (SEQ ID N° 15). En este caso, con una zona de secuencias se quiere dar a entender una zona de ácidos nucleicos de por lo menos 10 pb, 15 pb, 20 pb, 50 pb, 100 pb.

La invención se refiere en otra forma de realización preferida a un ácido nucleico que contiene la SEQ ID N° 1 o un fragmento de SEQ ID N° 1 o sus secuencias de nucleótidos complementarias o un derivado de la SEQ ID N° 1 o sus secuencias de nucleótidos complementarias, en donde el ácido nucleico, el fragmento, el derivado o sus secuencias de nucleótidos complementarias conducen, en el caso de una integración cromosómica, a un aumento de la transcripción o bien expresión de un gen de interés en un sistema de expresión, en donde el fragmento o derivado comprende por lo menos una zona de secuencias de la zona de ácidos nucleicos entre 1 pb y 1578 pb (con referencia a la SEQ ID N° 01), y en donde el derivado presenta una identidad de la secuencia de la menos el 85%.

En una forma de realización especialmente preferida del ácido nucleico de acuerdo con la invención arriba mencionado, existe la condición de que el fragmento o derivado comprenda por lo menos una zona de secuencias de TE-08 (SEQ ID N° 11) o TE-13 (SEQ ID N° 15). En este caso, con una zona de secuencias se quiere dar a entender una zona de ácidos nucleicos de por lo menos 10 pb, 15 pb, 20 pb, 50 pb, 100 pb.

El aumento de expresión del gen de interés se puede determinar, por ejemplo, mediante la medición del título del producto por medio de ELISA.

En una forma de realización especial, el ácido nucleico de acuerdo con la invención presenta una longitud de por lo menos 511 pb (=longitud TE-13, SEQ ID N° 15) o bien por lo menos 1015 pb (= longitud TE-08, SEQ ID N° 10).

La presente invención se refiere en una forma de realización preferida al fragmento 5' del elemento TE TE-00 (SEQ ID N° 2). Esto corresponde a la zona parcial de la SEQ ID N° 1 entre 1 pb y 1578 pb o su secuencia de nucleótidos complementaria.

La presente invención se refiere especialmente a un ácido nucleico y/o un elemento de ácido nucleico que aumenta la transcripción y/o aumenta la expresión (elemento TE) que contiene TE-13 (SEQ ID N° 15) o bien TE-08 (SEQ ID N° 10) o un derivado del mismo o sus secuencias de nucleótidos complementarias, en donde el ácido nucleico, el derivado o sus secuencias de nucleótidos complementarias conducen, en el caso de una integración cromosómica, a un aumento de la transcripción o bien expresión de un gen de interés, y en donde el derivado presenta una identidad de la secuencia de la menos el 85%.

La presente invención se refiere preferentemente a un ácido nucleico aislado y/o una molécula de ácidos nucleicos aislada y/o una secuencia de ácidos nucleicos aislada y/o un elemento de ácido nucleico que aumenta la transcripción aislado o bien un elemento TE aislado.

5 La presente invención se refiere especialmente a un ácido nucleico aislado que contiene TE-08 (SEQ ID N° 10) o su secuencia de ácidos nucleótidos complementaria y que en la integración cromosómica lleva a un aumento de la transcripción o bien expresión de un gen de interés en un sistema de expresión.

10 En una forma de realización el ácido nucleico o bien el elemento de ácido nucleico que aumenta la transcripción y/o el ácido nucleico aislado, contiene un derivado de un elemento TE o bien de la SEQ ID N° 1 que presenta por lo menos aprox. 85% de identidad de secuencias, más preferentemente por lo menos aprox. 90% de identidad de secuencias y más preferentemente aún por lo menos aprox. 95% de identidad de secuencias con la zona parcial correspondiente de la secuencia del elemento TE y/o su secuencia complementaria, especialmente con la zona de secuencias entre la posición de nucleótidos de 1 pb y 1578 pb con respecto a la SEQ ID N° 1, lo que corresponde a la zona de secuencias 5' de la secuencia TE-00 y más preferentemente con TE-13 (SEQ ID N° 15) o bien TE-08 (SEQ ID N° 10).

20 En una forma de realización preferida, el ácido nucleico o bien el elemento de ácido nucleico que aumenta la transcripción y/o el ácido nucleico aislado, contiene un derivado de un ácido nucleico TE-08 (SEQ ID N° 10) o preferentemente un ácido nucleico (SEQ ID N° 15) que presenta por lo menos aprox. 70% de identidad de secuencias, preferentemente por lo menos aprox. 80% de identidad de secuencias o por lo menos aprox. 85% de identidad de secuencias, más preferentemente por lo menos aprox. 90% de identidad de secuencias y más preferentemente aún por lo menos aprox. 95% de identidad de secuencias con la zona parcial correspondiente de la secuencia del elemento TE o bien su secuencia complementaria.

25 En otra forma de realización, la invención se refiere a un ácido nucleico de acuerdo con la invención o bien a un elemento de ácido nucleico de acuerdo con la invención que aumenta la transcripción o bien un ácido nucleico aislado de acuerdo con la invención o bien un derivado de un elemento TE de acuerdo con la invención que se hibrida con la secuencia de un elemento TE o con la secuencia complementaria de un elemento TE, especialmente con la zona de secuencias entre la posición de nucleótidos de 1 pb y 1578 pb con respecto a la SEQ ID N° 1, lo que corresponde a la zona de secuencias 5' de la secuencia TE-00 (SEQ ID N° 2) o especialmente con el elemento TE-08 (SEQ ID N° 10). Preferentemente la hibridación se realiza bajo condiciones de hibridación y lavado severas.

35 En otra forma de realización preferida, el ácido nucleico de acuerdo con la invención o bien el elemento que aumenta la transcripción (elemento TE) seleccionado entre el grupo compuesto por: TE-01 (SEQ ID N° 3), TE-02 (SEQ ID N° 4), TE-07 (SEQ ID N° 9), TE-08 (SEQ ID N° 10), TE-10 (SEQ ID N° 12), TE-11 (SEQ ID N° 13), TE-12 (SEQ ID N° 14), TE-13 (SEQ ID N° 15), TE-15 (SEQ ID N° 17), TE-17 (SEQ ID N° 19), TE-18 (SEQ ID N° 20).

40 En una forma de realización especialmente preferida, el ácido nucleico o bien el elemento que aumenta la transcripción (elemento TE) es TE-08 (SEQ ID N° 10).

En una forma de realización preferida, el ácido nucleico o bien el elemento que aumenta la transcripción (elemento TE) es TE-18 (SEQ ID N° 20).

45 En una forma de realización preferida, el ácido nucleico de acuerdo con la invención es TE-13 (SEQ ID N° 15).

En otra forma de realización, el ácido nucleico de acuerdo con la invención o el fragmento o el derivado es un ácido nucleico aislado.

50 La presente invención se refiere, además, a un ácido nucleico, caracterizado porque un ácido nucleico de acuerdo con la invención o bien un elemento TE de acuerdo con la invención está unido a una secuencia heteróloga. El ácido nucleico unido a una secuencia de gen heteróloga, en una forma de realización preferida, puede ser un vector de expresión. Son ejemplos plásmidos, bacteriófagos, fagémicos, cósmidos, vectores virales o también especialmente un vector diana.

55 El ácido nucleico unido a una secuencia de gen heteróloga también puede ser otra molécula de ácidos nucleicos sintética como, por ej., cromosomas sintéticos, artificiales o mini-cromosomas.

60 La presente invención se refiere además a un vector de expresión eucariótico, caracterizado porque este vector de expresión contiene uno o más ácidos nucleicos de acuerdo con la invención y/o uno o más elementos de transcripción de acuerdo con la invención (elemento TE).

En una forma de realización especial, el vector de expresión eucariótico está caracterizado porque contiene un promotor y/o un gen heterólogo de interés y/o un marcador de selección y/u opcionalmente un potenciador.

65 La presente invención se refiere además a un vector de expresión eucariótico caracterizado porque este vector de

expresión contiene uno o más ácidos nucleicos de acuerdo con la invención o bien uno o más elementos que aumentan la transcripción de acuerdo con la invención (elemento TE) y un promotor y/o un gen heterólogo de interés y/o un marcador de selección y/u opcionalmente un potenciador.

5 En otra forma de realización, el vector de expresión eucariótico está caracterizado porque se trata de un vector diana para la integración específica del gen de interés.

10 En una forma de realización preferida, el vector de expresión eucariótico está caracterizado porque el promotor es un promotor heterólogo como el promotor temprano del virus de citomegalia humana (promotor CMV), el promotor temprano de SV40, el promotor principal tardío del adenovirus, el promotor de metalotionina-I del ratón, la región de repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous, el o los promotores de actina, inmunoglobulina o del choque térmico, preferentemente el promotor de CMV.

15 En otra forma de realización preferida, el vector de expresión eucariótico está caracterizado porque el promotor es un promotor heterólogo, preferentemente el promotor de ubiquitina/S27a, más preferentemente el promotor de ubiquitina/s27A del hámster.

20 En una forma de realización especial, el vector de expresión eucariótico está caracterizado porque contiene una combinación de varios ácidos nucleicos o bien elementos TE de acuerdo con la invención, iguales o diferentes en cualquier orientación entre sí, en donde uno o más de los ácidos nucleicos o bien elementos TE están posicionados delante (es decir, 5') y/o uno o más ácidos nucleicos o bien elementos TE detrás (es decir, 3') del gen de interés.

25 En una forma de realización preferida, el vector de expresión eucariótico está caracterizado porque los ácidos nucleicos o bien elementos TE combinados son una combinación con TE-08 (SEQ ID N° 10).

30 En una forma de realización especialmente preferida, el vector de expresión eucariótico está caracterizado porque uno o más ácidos nucleicos TE-08 o bien elementos (SEQ ID N° 10) están posicionados delante (es decir, 5') y uno o más detrás (es decir, 3') del gen de interés, preferentemente un elemento TE-08 (SEQ ID N° 10) delante y uno detrás (ver al respecto también la Figura 13).

Otras combinaciones preferidas de ácidos nucleicos o bien elementos TE son 2 ácidos nucleicos/elementos TE-08 (SEQ ID N° 10) antes y/o después del gen de interés.

35 En una forma de realización preferida, el vector de expresión eucariótico está caracterizado porque una combinación de uno o más ácidos nucleicos o bien elementos TE-08 (SEQ ID N° 10) con uno o más ácidos nucleicos o bien elementos TE-06 (SEQ ID N° 8) están posicionados delante (es decir, 5') y/o detrás (es decir, 3') del gen de interés, se prefiere una combinación de un ácido nucleico o bien un elemento TE-08 (SEQ ID N° 10) seguido de un ácido nucleico o bien un elemento TE-06 (SEQ ID N° 8) delante (es decir, 5') del gen de interés (ver al respecto también la Figura 13).

40 En otra forma de realización, el vector de expresión eucariótico está caracterizado porque uno o varios ácidos nucleicos o bien elementos TE-13 (SEQ ID N° 15) están posicionados delante (5') y/o detrás (3') del gen de interés.

45 En una forma de realización preferida, el vector de expresión eucariótico está caracterizado porque contiene además una integrasa.

50 En otra forma de realización preferida, las células huésped son cotransfectadas con por lo menos dos vectores de expresión eucarióticos, en donde por lo menos uno de los dos vectores contiene por lo menos un gen que codifica por lo menos una proteína de interés, y el otro vector contiene uno o más ácidos nucleicos de acuerdo con la invención en cualquier combinación, posición y orientación, y opcionalmente también codifica para por lo menos un gen de interés, y estos ácidos nucleicos de acuerdo con la invención transmiten su efecto aumentador de la transcripción y/o de la expresión sobre los genes de interés, que están localizados sobre el otro vector cotransfectado, a través de la co-integración con el otro vector.

55 En una forma de realización especial, el vector de expresión eucariótico está caracterizado porque el marcador de selección es DHFR o Neo, por ejemplo, Neo F240I.

La invención se refiere, además, a un procedimiento para la preparación de un vector de expresión eucariótico, caracterizado por la integración de un ácido nucleico de acuerdo con la invención en un vector de expresión.

60 La invención se refiere además a una célula huésped eucariótica caracterizada porque contiene un vector de expresión eucariótico de acuerdo con la invención.

65 En una forma de realización especial, la célula huésped eucariótica está caracterizada porque tiene una alta producción, es decir, posee una mayor productividad específica que una célula huésped eucariótica comparable sin el elemento TE o bien el ácido nucleico de acuerdo con la invención, teniendo esta célula huésped un nivel de

expresión aumentado dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o diez veces, o un nivel de expresión aumentado más de dos, más de tres, más de cuatro, más de cinco, más de siete, más de diez veces, se prefiere hasta cinco veces o más de tres veces.

5 En una forma de realización especialmente preferida, la célula huésped eucariótica está caracterizada porque el vector de expresión está integrado en el genoma en forma estable.

10 En otra forma de realización, la célula huésped eucariótica es una célula de hámster o ratón, como por ejemplo, una célula CHO, NS0, Sp2/0-Ag14, BHK21, BHK TK', HaK-, 2254-62.2 (derivado BHK-21), CHO-K1, CHO-DUKX (=CHO duk-, CHO/dhfr-), CHO-DUKX B1, CHO-DG44, CHO Pro-5, V79, B14AF28-G3, CHL, preferentemente una célula CHO y más preferentemente una célula CHO-DG44.

15 En otra forma de realización, la célula huésped eucariótica es una célula de mamífero, inclusive, pero no limitado a, líneas celulares de ser humano, ratón, rata, mono, roedores.

En una forma de realización adicional, la célula huésped es una célula eucariótica inclusive, pero no limitado a, células de levaduras, insectos, aves y plantas.

20 En otra forma de realización especial, la célula huésped eucariótica está caracterizada porque contiene además un gen anti-apoptosis, como BCL-xL, BCL-2, BCL-w, BFL-1, A1, MCL-1, BOO, BRAG-1, NR-13, CDN-1, CDN-2, CDN-3, BHRF-1, LMW5-HL o CED-9, preferentemente Bcl-xL o BCL-2, más preferentemente BCL-xL.

La presente invención se refiere, además, a un procedimiento para el desarrollo de una línea celular eucariótica transfectada en forma estable, de alta producción, caracterizado por los siguientes pasos:

- 25 (a) integración de por lo menos un ácido nucleico de acuerdo con la invención o bien un elemento TE de acuerdo con la invención en un vector de expresión eucariótico que contiene un gen de interés,
 (b) transfección de una célula huésped eucarionte con este vector de expresión,
 (c) selección de una célula huésped transfectada de alta producción.

30 La presente invención se refiere, además, a un procedimiento para el desarrollo de una línea celular eucariótica transfectada en forma estable, de alta producción, caracterizado por los siguientes pasos:

- (a) integración de por lo menos un gen (genes) de interés en un vector de expresión eucariótico que contiene por lo menos un ácido nucleico de acuerdo con la invención y/o un elemento TE de acuerdo con la invención,
 (b) transfección de una célula huésped eucarionte con este vector de expresión,
 35 (c) selección de una célula huésped transfectada de alta producción.

En una forma de realización especial, el procedimiento está caracterizado por al menos un paso de amplificación adicional.

40 La presente invención se refiere, además, a un procedimiento para la preparación y selección de células recombinantes de mamíferos caracterizado por los siguientes pasos:

- (a) transfección de las células huésped con genes que por lo menos codifican una proteína/producto de interés, una neomicina-fosfotransferasa, preferentemente modificada, y el marcador de selección amplificable DHFR, en donde por lo menos el gen (o bien los genes) de interés está unido funcionalmente para el incremento de transcripción o bien expresión con por lo menos un ácido nucleico de acuerdo con la invención,
 45 (b) cultivo de las células en condiciones que permiten una expresión de los distintos genes,
 (c) la selección de estos genes cointegrados por cultivo de las células en presencia de un medio de selección como, por ejemplo, G418, en medio sin hipoxantina/timidina y
 (d) la amplificación de estos genes cointegrados por cultivo de las células en presencia de un medio de selección,
 50 que permite la amplificación de por lo menos el gen marcador de selección como, por ejemplo, metotrexato.

55 En una forma de realización especial, este procedimiento está caracterizado porque las células transfectadas son cultivadas en medio libre de hipoxantina/timidina, suplementado con por lo menos 200 µg/mL de G418, preferentemente 400 µg/mL o también más G418, en ausencia de suero y bajo adición de concentraciones crecientes de MTX.

En otra forma de realización especial, este procedimiento está caracterizado porque la concentración de MTX en el primer paso de amplificación es de por lo menos 100 nM o por lo menos 250 nM y escalonadamente se puede aumentar hasta 1 µM o más. En casos individuales, la concentración de MTX puede ser de 2 µM.

60 En otra forma de realización especial, el procedimiento está caracterizado por un paso de clonación adicional.

65 En otra forma de realización del procedimiento de acuerdo con la invención, la célula huésped es una célula de roedor/hámster, como por ejemplo, una célula de CHO, NS0, Sp2/0-Ag14, BHK21, BHK TK-, HaK, 2254-62.2 (derivado BHK-21), CHO-K1, CHO-DUKX (=CHO duk-, CHO/dhfr-), CHO-DUKX B1, CHO-DG44, CHO Pro-5, V79,

B14AF28-G3, CHL, preferentemente una célula CHO y más preferentemente una célula CHO-DG44.

En un procedimiento preferido de acuerdo con la invención, el vector de expresión contiene un marcador de selección como DHFR o NPT, por ejemplo, NPT F340I o NPT D227G.

En una forma de realización más preferida del procedimiento de acuerdo con la invención, la proporción de altos productores está aumentada dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o diez veces, o aumentada más de dos, más de tres, más de cuatro, más de cinco, más de siete, más de diez veces, más preferentemente hasta cinco veces o más de tres veces.

La presente invención se refiere, además, a un procedimiento para la preparación de un producto biofarmacéutico, caracterizado por los siguientes pasos:

- (a) integración de por lo menos un ácido nucleico de acuerdo con la invención o bien un elemento TE de acuerdo con la invención en un vector de expresión eucariótico que contiene un gen de interés,
- (b) transfección de una célula huésped eucarionte con este vector de expresión,
- (c) selección de una célula huésped transfectada de alta producción y
- (d) cultivo de la célula huésped transfectada obtenida de alta producción en condiciones que permiten una expresión del o de los genes de interés.

La presente invención se refiere además a un procedimiento para el desarrollo de una línea celular eucariótica transfectada en forma estable, de alta producción, caracterizado por los siguientes pasos:

- (a) integración de por lo menos un gen (genes) de interés en un vector de expresión eucariótico que contiene por lo menos un ácido nucleico de acuerdo con la invención y/o un elemento TE de acuerdo con la invención,
- (b) transfección de una célula huésped eucarionte con este vector de expresión,
- (c) selección de una célula huésped transfectada de alta producción y
- (d) cultivo de la célula huésped transfectada obtenida de alta producción en condiciones que permiten una expresión del o de los genes de interés.

En una forma de realización especial, el procedimiento de acuerdo con la invención está caracterizado por al menos un paso de amplificación adicional.

En una forma de realización especial, el procedimiento de acuerdo con la invención está caracterizado por el siguiente paso adicional:

- (e) siembra y purificación de la proteína de interés.

La presente invención se refiere, además, al uso de un ácido nucleico de acuerdo con la invención o bien un elemento que aumenta la transcripción de acuerdo con la invención (elemento TE) en un vector de expresión eucariótico, para aumentar la transcripción y/o expresión de un gen de interés en un sistema de expresión en una célula huésped eucariótica o para la preparación de un producto biofarmacéutico.

La presente invención se refiere, además, al uso de un ácido nucleico de acuerdo con la invención o bien un elemento que aumenta la transcripción de acuerdo con la invención (elemento TE) para la generación de animales o plantas transgénicos.

La presente invención se refiere además al uso de un ácido nucleico de acuerdo con la invención o bien un elemento que aumenta la transcripción de acuerdo con la invención (elemento TE) en la terapia génica.

La presente invención se refiere especialmente al uso de un ácido nucleico de acuerdo con la invención o bien un elemento que aumenta la transcripción de acuerdo con la invención (elemento TE) como medicamento o en una composición farmacéutica.

La presente invención se refiere además a un kit compuesto por un ácido nucleico de acuerdo con la invención o bien uno o más elementos TE de acuerdo con la invención, opcionalmente vectores de expresión, opcionalmente células huésped y opcionalmente reactivos de transfección.

Otra forma de realización de la presente invención se refiere a un elemento-TE de acuerdo con la invención, fragmento o derivado, el cual tiene más de 160 pb, preferentemente más de 170 pb de longitud. En una forma de realización especial, el elemento TE es un fragmento de entre 160 pb y 1200 pb y/o entre 170 pb y 1000 pb, preferentemente más de 200 pb y entre 200 pb y 1000 pb de longitud.

En una forma de realización preferida, el fragmento del elemento TE de acuerdo con la invención se encuentra en la zona parcial de la SEQ ID N° 1 entre 1 pb y 1578 pb (esto corresponde a un fragmento 5' del elemento TE-00 (SEQ ID N° 2) y tiene más de 113 pb de longitud y/o más de 132 pb y preferentemente más de 160 pb y/o más de 170 pb de longitud. En una forma de realización especial, el fragmento del elemento TE de acuerdo con la invención tiene entre 113 pb y 1200 pb y/o entre 132 pb y 1200 pb y/o entre 160 pb y 1200 pb, preferentemente más de 200 pb y

entre 200 pb y 1000 pb de longitud.

En una forma de realización adicional, el fragmento del elemento TE de acuerdo con la invención se presenta sin secuencias vecinas. Esto significa que el fragmento no es parte integrante de una secuencia más grande o de una zona de secuencias, que por ejemplo, no se le han agregado otras secuencias delante (5') o detrás (3').

En otra forma de realización especial, la presente invención se refiere a un ácido nucleico de acuerdo con la invención, que no contiene islas de CpG.

De los siguientes experimentos se puede ver que en una comparación de células huésped eucarióticas con y sin elemento TE se pudo demostrar un aumento de hasta siete veces de la modificación relativa de la productividad específica del gen de interés.

La obtención de datos para el título del producto y para la productividad específica dio por resultado que casi todos los pools de células con elementos TE de acuerdo con la invención, que representaban fragmentos o bien derivados de la SEQ ID N° 1, expresaban en promedio más gen de interés que los pools de células sin elemento TE. Los elementos TE 01 (SEQ ID N° 3), 02 (SEQ ID N° 4) y 08 (SEQ ID N° 10) dieron por resultado la mayor productividad en dos series de transfección independientes, en las cuales se usó en cada caso otro marcador de selección (NPT o bien DHFR). Pueden aumentar la productividad por un factor de 4 - 7. No obstante, los elementos TE 01 (SEQ ID N° 3) y 02 (SEQ ID N° 4) con 3 kb y 2,5 kb son muy grandes para agregar adicionalmente a un vector de expresión. Más interesante es en cambio el elemento TE 08 (SEQ ID N° 10) de solo 1 kb de tamaño, que puede aumentar la expresión por un factor de 5 - 6. Es muy ventajoso dejar los vectores de expresión tan pequeños como sea posible, pues los vectores más pequeños son en general más estables y son más fáciles de manipular tanto en la clonación como también en la transfección. Por lo tanto, los elementos TE 08 (SEQ ID N° 10) y 13 (SEQ ID N° 15) son especialmente interesantes para el uso como elemento que promueve la transcripción.

De los siguientes ejemplos se puede observar además, que los pools de células, que contenían el elemento TE 07 (SEQ ID N° 9), mostraban una expresión de 3 a 3,5 veces del gen de interés y el pool de células con los elementos TE 10 (SEQ ID N° 12), 11 (SEQ ID N° 13) o bien 12 (SEQ ID N° 14) mostraban una expresión del gen de interés de aproximadamente el doble.

El elemento TE 08 (SEQ ID N° 19) mostraba junto con el NPT F240I como marcador de selección con el factor 5 el mayor aumento de la productividad específica del gen de interés con respecto al pool de control sin elemento TE. Junto con el DHFR como marcador de selección, el elemento TE 08 (SEQ ID N° 10) muestra un aumento aún mayor de aprox. factor 6,0.

El elemento TE 02 (SEQ ID N° 4) provoca, además, en la serie de ensayos con DHFR como marcador de selección un aumento de la productividad del gen de interés por un factor de 6,8.

El mayor aumento (15 veces) lo provoca el elemento 13.

De los ejemplos siguientes se observa además, que los pools con los elementos TE 05 (SEQ ID N° 7) y 09 (SEQ ID N° 11) en una serie de ensayos no presentan un aumento de la expresión del gen de interés y en una serie de ensayos mostraron inclusive una expresión menor del gen de interés que el pool control. Estos dos elementos así como también posiblemente fragmentos parciales en estas zonas de secuencias pueden tener bajo algunas circunstancias un efecto de inhibición, aunque no tiene que ser así.

Además, en los siguientes ejemplos, las modificaciones relativas de la productividad específica para los diversos elementos TE probados pudieron ser obtenidos independientemente del sistema de vectores, es decir, independientemente del marcador de selección usado o independientemente del gen de interés en cada caso.

De los siguientes ejemplos se puede ver que la modificación de la expresión del gen marcador se correlaciona con las modificaciones de la expresión del gen de interés.

De los ejemplos siguientes se puede observar, además, que ninguno de los elementos TE probados tiene un efecto potenciador. Esto evidencia que los elementos TE sólo provocan un aumento de la expresión del gen de interés a nivel cromosómico.

Los siguientes ejemplos evidencian además, que la combinación y/o la colocación uno después del otro de varios elementos TE cortos iguales o diferentes, como por ej., el elemento TE 06 y el 08 ó 21, puede llevar a un efecto aumentador de la expresión adicional.

EJEMPLOS

65 ABREVIATURAS

AP:	fosfatasa alcalina
Asp (=D):	ácido aspártico
pb:	par de bases
CHO:	ovario de hámster chino
5 DHFR:	dihidrofolato reductasa
ELISA:	ensayo de inmunoabsorción unido a enzima
FACS:	clasificador celular activado por fluorescencia
GFP:	proteína fluorescente verde
Gly (=G):	glicina
10 HT:	hipoxantina/timidina
IgG:	inmunoglobulina G
Ile (=I):	isoleucina
IRES:	sitio interno de entrada al ribosoma
kb:	kilobase
15 mAk:	anticuerpo monoclonal
MCP-1:	proteína quimioatrayente de monocitos 1
MTX:	metotrexato
NPT:	neomicina-fosfotransferasa
PCR:	reacción en cadena de la polimerasa
20 Phe (=F):	fenilalanina
SEAP:	fosfatasa alcalina secretada
Ub:	ubiquitina
UTR:	región no traducida

25 MÉTODOS

Cultivo celular y transfección

30 Las células CHO-DG44/dhfr^{-/-} (Urlaub et al., 1983) fueron cultivados de forma permanente como células de suspensión en medio CHO-S-SFMII libre de suero y suplementado con hipoxantina y timidina (HT) (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE), en frascos de cultivo celular a 37°C en atmósfera húmeda y 5% de CO₂. El número de células así como también la viabilidad se determinaron con un Contador Coulter Z2 (Beckmann Coulter) o con un Cedex (Innovatis) y las células se sembraron luego en una concentración de 1-3 x 10⁵/mL y se realizaron pasajes cada 2 - 3 días.

35 Para la transfección de CHO-DG44 se usó reactivo Lipofectamine Plus (Invitrogen). Por cada tanda de transfección se mezclaron en total 1,0-1,3 µg de ADN de plásmido, 4 µL de lipofectamina y 6 µL de reactivo Plus según las instrucciones del fabricante y se agregaron en un volumen de 200 µL a 6x10⁵ células en 0,8 mL de medio CHO-S-SFMII suplementado con HT. Después de una incubación de tres horas a 37°C en una incubadora de células se realizó una adición de 2 mL de medio CHO-S-SFMII suplementado con HT. Después de un tiempo de cultivo de 48 horas, las mezclas de transfección se cosecharon (transfección transitoria) o se sometieron a una selección. Para la selección basada en NPT se transfirieron las células 2 días después de la transfección a un medio CHO-S-SFMII suplementado con HT con 400 µg/mL de G418 (Invitrogen). Para la selección basada en DHFR las células se transfirieron 2 días después de la transfección a un medio CHO-S-SFMII libre de HT. En una selección basada en DHFR y NPT en el caso de una co-transfección, en la cual un vector de expresión contenía un marcador de selección DHFR y el otro un marcador de selección NPT, se transfirieron las células 2 días después de la transfección a medio CHO-S-SFMII sin adición de hipoxantina ni timidina y se agregó al medio además G418 (Invitrogen) en una concentración de 400 µg/mL.

50 Una amplificación del gen basada en DHFR del gen heterólogo integrado se puede lograr por adición del gen de selección MTX (Sigma, Deisenhofen, DE) en una concentración de 5 - 2000 nM a un medio CHO-S-SFMII libre de HT.

Vectores de expresión

55 Para el análisis de expresión se usaron vectores de expresión eucarióticos, que se basan en el vector pAD-CMV (Werner et al., 1998) y que transmiten la expresión de un gen heterólogo a través de la combinación promotor de CMV/promotor de ubiquitina de hámster/S27a (documento WO 97/15664) o potenciador de CMV/promotor de CMV. Mientras que el vector base pBID contiene el minigén dhfr, que sirve como marcador de selección amplificable (ver, por ej., el documento EP-0-393-438), en el vector pBING se ha reemplazado el minigén dhfr por un gen NPT modificado. Se trata aquí de la variante de NPT D227G (Asp227Gly). La clonación de pBING con la variante de NPT D227G así como también de la región de gen IRES-GFP se realizó como se describió (documento WO 2004/050884). El plásmido base pTE4 contiene la variante NPT F240I (Phe240Ile) como marcador de selección y es un derivado del plásmido pBING. Aparte del reemplazo de la variante de NPT D227G por la variante de NPT F240I, se reemplazó también el GFP por la proteína fluorescente roja DsRed2 del vector pDsRed2 (Clontech, Palo Alto, CA, EE.UU.). El plásmido base pTE5 contiene DHFR como marcador de selección y es un derivado del vector pBIDG (documento WO 2004/050884) en el cual también se reemplazó la proteína fluorescente roja DsRed2 del vector

pDsRed2 (Clontech, Palo Alto, CA, EE.UU).

Para la expresión de un anticuerpo IgG1 humanizado monoclonal se clonó la cadena pesada como fragmento Sall/Spel de 1,4 kb en el plásmido pBID digerido con XbaI y Sall, dando por resultado el plásmido pBID-HC (Fig. 1A). La cadena ligera, en cambio, fue clonada como fragmento BamHI/HindIII de 0,7 kb en los sitios de corte BglII/HindI del plásmido pBING, por medio de lo cual se obtuvo el plásmido pBING-LC (Fig. 1A).

El cADN de MCP-1 humano (Yoshimura et al., 1989) fue clonado como fragmento HindIII/EcoRI de 0,3 kb en los sitios de corte correspondientes del vector pTE4 y/o pTE4, dando por resultado los plásmidos pTE4/MCP-1 y/o pTE5/MCP-1 (Fig. 1B y/o Fig. 2).

FACS (clasificador de células activado por fluorescencia)

Los análisis flujocitométricos se realizaron con un BD FACScalibur (BD Bioscience). El FACS está equipado con un láser de helio-argón con una longitud de onda de excitación de 488 nm. La intensidad de fluorescencia se capta a una longitud de onda adecuada para cada proteína de fluorescencia y se procesa por medio del Software Cell Quest Pro adjunto.

ELISA (análisis de inmunosorbente ligado a enzima)

Los títulos de MCP-1 en sobrenadantes de células CHO-DG44 transfectadas en forma transitoria fueron cuantificados por medio de ELISA con el kit OptEIA Human MCP-1 Set según el protocolo del fabricante (BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Alemania).

La cuantificación del mAk de IgG1 en los sobrenadantes de células CHO-DG44 transfectados en forma estable se realizó por medio de ELISA según protocolos estándar (Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., 1994, actualizado), usándose por un lado un fragmento de Fc de IgG anti-humana de cabra (Dianova, Hamburgo, Alemania) y por el otro un anticuerpo de cadena ligera kappa anti-humano de cabra AP-conjugado (Sigma). Como estándar servía un anticuerpo IgG1 purificado.

Las productividades (pg/célula/día) se calcularon en tal caso con la fórmula $pg/((Ct-Co) t / \ln(Ct-Co))$, en donde Co y Ct indican el número de células en la siembra y/o la cosecha y t la duración del cultivo.

Ensayo SEAP

El título de SEAP en los sobrenadantes de cultivo de células CHO-DG44 transfectadas de forma transitoria se cuantificó usando el Ensayo de Gnes Informadores SEAP según las indicaciones del protocolo del fabricante (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE).

EJEMPLO 1: Aislamiento y clonación del elemento TE TE-A

Partiendo de la secuencia del genoma del hámster que se describe en el documento WO97/15664, que abarca además de la región codificadora del gen de la ubiquitina/S27a, también áreas adyacentes 5'UTR inclusive las del promotor Ub/S27a, se aislaron otras áreas de secuencias hasta ahora desconocidas ubicadas más aguas arriba. Para ello se utilizó ADN de CHO-DG44 ligado con adaptadores, como matriz para "PCRs anidadas". La primera PCR se realizó en combinación con cebadores complementarios al adaptador o bien a una secuencia de hámster en la zona 5' de la secuencia indicada en el documento WO97/15664 bajo la SEQ ID N° 5 (cebador Ub20: 5'-CTCCACACATTTACACATGGACAC-3' (SEQ ID N° 39)); correspondiente a los nucleótidos 62 a 85 (secuencia complementaria) de la SEQ ID N° 5 del documento WO 97/15664). A continuación se realizó una segunda PCR con una segunda combinación de cebador, que se compone de un cebador interno del adaptador y un cebador interno específico de hámster ("anidado") (cebador Ub21:

5'-GGGTTTCTCTGTGTAATAGCCATG-3' (SEQ ID N° 40); correspondiente a los nucleótidos 16 a 39 (secuencia complementaria) de la SEQ ID N° 5 del documento WO97/15664). Los fragmentos ADN superpuestos resultantes, que se iniciaron en el extremo del cebador específico de hámster con una secuencia conocida y luego pasaron a nuevas zonas de secuencia desconocidas ubicadas aguas arriba, fueron subclonadas en vectores pCR2.1 TOPO (Invitrogen) y analizadas mediante secuenciación. En total se obtuvieron 348 pb de una nueva secuencia hasta ahora desconocida aguas arriba del gen Ub/S27a de hámster.

Sobre la base de esta nueva información de secuencia, se aisló un sector de ADN que se ubicaba más aguas arriba, mediante la antes descrita "PCR anidada". Esta vez se ubicó la primera PCR con un cebador del adaptador y el cebador Ub33 5'-ATCTCACTGTGTCTACCAACTTAG-3' (SEQ ID N° 41); en el sector 5' de la nueva secuencia aislada de 384 pb; correspondiente a los nucleótidos 1268 – 1291 (secuencia complementaria) de la SEQ ID N° 1) y la segunda PCR con un cebador interno del adaptador y un cebador interno específico de hámster Ub32a (5'-TCTGCACCACACTACTGACT-3' (SEQ ID N° 42); ubicado aguas arriba del cebador Ub33 dentro de la nueva secuencia aislada de 384 pb; correspondiente a los nucleótidos 1243 – 1264 (secuencia complementaria) de la SEQ ID N° 1). El amplificado resultante fue subclonado en el vector pCR2.1 TOPO (Invitrogen) y se secuenció. Comprendía otros 1239 pb de una nueva secuencia hasta ahora desconocida, ubicada aguas arriba del gen Ub/S27a de hámster.

La información obtenida de los fragmentos PCR superpuestos se aprovechó para amplificar vía PCR utilizando el cebador

a) Ub34 (5'-CTAAGAGTACTTGCCATGAGAGCCTGAA-3' (SEQ ID N° 43); localizado en el extremo final 5' de la nueva secuencia de 1239 pb aislada; contenida tan sólo parcialmente en la SEQ ID N° 1 (nucleótidos 1 a 14))

y

b) Ub35 (5'-CATTGATACACCACCAAAGAAGCTTG-3' (SEQ ID N° 44); correspondiente a los nucleótidos 1941 a 1965 (secuencia complementaria) de la SEQ ID N° 1)

una zona de la secuencia relacionada del ADN genómico de CHO-DG44, que comprendía todos los fragmentos parciales aislados hasta el momento y se introducía 383 pb dentro de la zona de secuencia 5' de la SEQ ID N° 5 del documento WO 97/15664. El fragmento de ADN de 2 kb resultante se ligó con el sector 5' UTR de la secuencia ID N° 5 que se describió en el documento WO 97/15664, a través de la interfase EcoRI (posición 353 – 358), pero donde esta interfase fue eliminada mediante una reacción de rellenado con la ADN polimerasa de Klenow. Se eliminó del mismo modo una segunda interfase endógena EcoRI en el nuevo sector genómico aislado, de lo que resultaron los nucleótidos adicionales 326 a 329 de la SEQ ID N° 1 respecto de la secuencia genómica originaria. En total se incorporaron de este modo en la SEQ ID N° 1, 8 nucleótidos adicionales en comparación con la secuencia endógena de hámster. El fragmento de ADN resultante de 3788 pb de tamaño de una zona de la secuencia ubicada aguas arriba del gen Ub/S27a de hámster, se denominó elemento TE A con la secuencia ID N° 1 y se subclonó dentro del vector pBluescript SKM (Stratagene, La Jolla, CA).

EJEMPLO 2: Generación de diversos vectores de expresión TE

Partiendo del elemento TE TE-A de 3,8 kb de tamaño (Fig. 3, secuencia ID N° 1) se generaron desde el genoma de CHO, mediante PCR, diversos fragmentos, que en comparación con el elemento TE TE-A presentaron delecciones en el extremo 5' o en el extremo 3' (Fig. 4 y Fig. 5). Para la síntesis de estos fragmentos se utilizaron en cada caso combinaciones de cebadores directos y reversos (Fig. 5 y Fig.6). A los efectos de clonación se agregó mediante el cebador en cada caso en el extremo 5' de la porción, una interfase BamHI y en el extremo 3' una interfase BsrGI. De ese modo se generaron 12 elementos TE de diferente longitud con la denominación TE-01 a TE-12 (Fig. 4 y 5). Después de la digestión con BsrGI y BamHI, éstos se clonaron en cada caso en orientación directa dentro de la región de adaptación de los plásmidos base pTE4/MCP-1 (Fig. 1B) o bien pTE5/MCP-1 (Fig. 2).

El fragmento TE-00 (SEQ ID N° 2) se aisló a través de digestión de la enzima de restricción SacII a partir de un subclon de TE-A y se clonó tanto en orientación directa, como también en orientación inversa a través de la interfase SpeI ubicada 5' del elemento promotor/potenciador dentro de los vectores base pBING-LC (Fig. 1A) o bien pBID-HC (Fig. 1A).

Secuencias de los elementos TE

TE-A (SECUENCIA ID N° 1)

ccatgagagcctgaagacctgagtgatgccagaaccagatcaagatggaggagagaaccagccccactaagctgtccctgacccccataaatgcctccct
gtccagttatgccacacaatgataggtgaatacagaaaaacaccctccttagacactaagcggattcctctacgcataccagtaagtgatagttcctgctcaac
tcagcactttaaaaagtattttgcaatgctgggactaaataggggtgacacatgtaagtaagcactctactttgatcacatttaataattgaagaattaatcgt
gaaatagtagctgagacaatagattgttcttcatgtgggaactgctgtgtgcttctgtgatgcaacaaggtaacaatacttattccccagtgctgctagcctgt
aacactctctattatacaatgaccacaataaattagtgagtggtgtttgtttcattttaaattgttctatttagagacaggattctgcaaacctggttgcttaaactcc
gtatgtagctgagaatgacctgaaaccttctgtccaccctcaaatccagaattatagacaccaccacatggcttaataagcaacaacaataaaagc
atgacttctgggtctggaggaggcctgccagtaagagcaatggacttccatagaaacctgggttactccagcactaacctacatggtgatagtgatgcag
cagacatacatgagggaacacacacacatgggcacatacacacgcaccgcccaccatggctttccccatcactagacagccatatttaaacgtagtgagcca
ggctgggggtggtggccacaccttaatccagcactccagaaggcagaggtaggcggatctctgtgggttgagaccagcctgtctacaagagctagttccagga
cagcctccaaagccatagagaacctatctaaaaaactgaacaacaacaacaacaacaataaaaaaacaacaagaatcttagtggtcagtggt
tccacacacaggaagtagaaggcctgatgggaagggtttcagaggaggagatggatgagacaggatgatagtgaaaagaactcaaatataatattt
gaaactatctaagaataaaagctaaaataattaaataacagtcaggtagtggtggtgagagggttaagtgtagacacagtgagatccagccagccagggct
acctagttagacctgttcaataaactaataaaatacaaaaataaaggagaccacaataaatttgaatgtaaaagactaaattacctttatattgatgagtgga
taaaaaaatcaattaccagagaacataaagtagtcccatcaaaagcaaaagcaatatatgtaaactctaatttaaaagttgttagacctggcaacgtggcaca
taccttaatcccagcaccaggagacagaggccatcctgtctaaaagtagtctccaggacagccatggctattcacagagaaacctgtctgaaaaaaca
aaaatagtgccatgtgtaaatgtgtggatgatgctgtcatgccacatacagaggttagaggcagttatgggagtcagttcctattctcttatgggggacctggg
actgaactcaggatcagcagctggcagaaagtgcattagctcacggagccttatcattggcgaaagctctcaagtagaaaatcaatggtttgctcatagtgcaatc
attatgttcgagagggaagggtacaactcgtggggcatgtgtggtcacatctgaactgacagtagcctcctaggagaattaattccaagttcttgggtggtatcaatgc
cctaaaggggtcaacaactttttccctctgacaaaactatcttctgtccctcatattgagatatttattcttgcagtggtgtaataactcaactcagcactcaga
catgttaggtaagctaccctcaggttaactaatttaactaatttaacccaacacttttttttttccacattgtgagtggtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt
gt
ctgagggtaactgtcgggtcagttcttccactataggacagaactccaggtgtcaactcttactgacagaacctcaaatagccctatctaatttagtttttattt
tatttttttttcgagacagggttctctgtgcttggaggctgctcctggaactagctctgttagaccaggctgtctcgaactcagagatccacctgctctgctcctga
gtgctgggataaaggcatgcccaccaacgcttgcctcaactaatttaaaagagattgtgtgtcacaagggtgcatgtgcccctgcaaccaccccccccccaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaactcactgaagctgaagcagcatgatttggtactctgctggcctatgagctctagggagctcctgtcaaacagaatctcaacaggcg
cagcagcttttttaagtggggtacaacacaggttttgcatacaggcattttatctaagctatttcccagccaaaatgtgattttggaggcagcagagctaatagatt
aaaatgagggaagagcccacacaggttattagaagataagcatctctttatataaaaacaaaaccaaactggaggaggtctaccttagggatggaaga

gaggggctacacggaagaggccacaccgacttgggaagactcgatttggctcagctggctgagacgccccagcaggtcctcggtacacctcagcccc
gaatgcctccggccataaccctccctctagggcatttccggcgaggaccaccctcgcgccaaacattcggccccatccccggctcctcacctgaatcctaactc
gactccagagtttagactataaccagatag

5 ELEMENTO TE 06 (SECUENCIA ID N° 8)
Cttgctgctgaggactacagtcatttgcaggtttctactgtatggctttaaaccgtgcaaaggtgaccattaaccgttccagctgggagggcacgtgctgagctcaga
tgcttctctgactgagggccaggaggggctacacggaagaggccacaccgacttgggaagactcgatttggctcagctggctgagacgccccagcaggg
tcctcgctacacctcagccccgaatgcctccggccataacccttccctctagggcatttccggcgaggaccaccctcgcgccaaacattcggccccatccccg
gtcctcacctgaatcctaactcctgactccagagtttagcactataaccagatag

10 ELEMENTO TE 07 (SECUENCIA ID N° 9)
Gcctgaagacctgagttgataccagaaccagatcaagatggaggagagaaccagccccactaagctgtcccctgacccccataaatgcctccctgtccagttat
gccacacaatgataggtgaatacagaaaaacaccttcccttagacactaagcggattcctctacgcataaccagttaagtgatagttcttaggctcaactcagcacttt
aaaagtttataatgtcaatgctgggactaaatagggttggcatgtaagtaagcactctactttgatcacatttataatgtaagaattaatcgtgaaatagt
15 agctgagacaatagattgttcttcatgtgggaactgctgtgtgcttcttctgctgcaaaacaggtcaatacttattccccagtgctgctagccctgtaacactct
ctattatacaatgaccacaataatagggtgagtggttggcttctttaaattgtgctatttttagagacaggatttcc

ELEMENTO TE 08 (SECUENCIA ID N° 10)
Gcctgaagacctgagttgataccagaaccagatcaagatggaggagagaaccagccccactaagctgtcccctgacccccataaatgcctccctgtccagttat
20 gccacacaatgataggtgaatacagaaaaacaccttcccttagacactaagcggattcctctacgcataaccagttaagtgatagttcttaggctcaactcagcacttt
aaaagtttataatgtcaatgctgggactaaatagggttggcatgtaagtaagcactctactttgatcacatttataatgtaagaattaatcgtgaaatagt
agctgagacaatagattgttcttcatgtgggaactgctgtgtgcttctgctgcaaaacaggtcaatacttattccccagtgctgctagccctgtaacactct
ctattatacaatgaccacaataatagggtgagtggttggcttctttaaattgtgctatttttagagacaggatttcc
25 gagaatgaccttgaacacctctgtcccaccctcaaatccagaattatagacccccaccatggcttaataagtaaaacaacaataaaaagcatgactctg
ggtctggaggagggtgctccagtttaagagcaatggatacttccatagaaacctgggttactcccagcactaacctacatgggtgatagtgatgacgacagacatac
atgagggcaacacacacatgggcacatacacacgcccaccatggcttcccccatcacttagacagccatattttaaactgtagtgagccaggctgggggt
25 ggtggcccacaccttattccagcactccagaaggcagaggtaggcgatctctgtgggtttagaccagcctggtctacaagagctagttccaggacagcctcca
aagccatagagaaccctatc

ELEMENTO TE 09 (SECUENCIA ID N° 11)
30 gcctgaagacctgagttgataccagaaccagatcaagatggaggagagaaccagccccactaagctgtcccctgacccccataaatgcctccctgtccagttat
gccacacaatgataggtgaatacagaaaaacaccttcccttagacactaagcggattcctctacgcataaccagttaagtgatagttcttaggctcaactcagcacttt
aaaagtttataatgtcaatgctgggactaaatagggttggcatgtaagtaagcactctactttgatcacatttataatgtaagaattaatcgtgaaatagt
agctgagacaatagattgttcttcatgtgggaactgctgtgtgcttctgctgcaaaacaggtcaatacttattccccagtgctgctagccctgtaacactct
ctattatacaatgaccacaataatagggtgagtggttggcttctttaaattgtgctatttttagagacaggatttccgaaacctggttggctttaaactccgtagtagct
35 gagaatgaccttgaacacctctgtcccaccctcaaatccagaattatagacccccaccatggcttaataagtaaaacaacaataaaaagcatgactctg
ggtctggaggagggtgctccagtttaagagcaatggatacttccatagaaacctgggttactcccagcactaacctacatgggtgatagtgatgacgacagacatac
atgagggcaacacacacatgggcacatacacacgcccaccatggcttcccccatcacttagacagccatattttaaactgtagtgagccaggctgggggt
ggtggcccacaccttattccagcactccagaaggcagaggtaggcgatctctgtgggtttagaccagcctggtctacaagagctagttccaggacagcctcca
aagccatagagaaccctatc
40 aagaaagtagaaaggcctgtaggggaaggtttagaggggagatgtagtagacagagatgataagaaactcaaatataatgaaactatct
aagaataaaagctaaatattaaatcagctaggtggtgtaggggtaagttgtagacacagtgatccaggccagggctacactagtgag
acctgttcaataaataataataatacaaaataaaggagacaccaataatgtgaaatgtaaaagactaaattacctttatattgtagagttgataaaaaaatc
aattaccagagacaataaagtagtccatcaaaagcaaaagcaatataatgaaactcaattttaaagttttagagcctggcaactggtgacataccttattacc
cagcaccagg

45 ELEMENTO TE 10 (SECUENCIA ID N° 12)
gcctgaagacctgagttgataccagaaccagatcaagatggaggagagaaccagccccactaagctgtcccctgacccccataaatgcctccctgtccagttat
gccacacaatgataggtgaatacagaaaaacaccttcccttagacactaagcggattcctctacgcataaccagttaagtgatagttcttaggctcaactcagcacttt
aaaagtttataatgtcaatgctgggactaaatagggttggcatgtaagtaagcactctactttgatcacatttataatgtaagaattaatcgtgaaatagt
agctgagacaatagattgttcttcatgtgggaactgctgtgtgcttctgctgcaaaacaggtcaatacttattccccagtgctgctagccctgtaacactct
ctattatacaatgaccacaataatagggtgagtggttggcttctttaaattgtgctatttttagagacaggatttccgaaacctggttggctttaaactccgtagtagct
50 gagaatgaccttgaacacctctgtcccaccctcaaatccagaattatagacccccaccatggcttaataagtaaaacaacaataaaaagcatgactctg
ggtctggaggagggtgctccagtttaagagcaatggatacttccatagaaacctgggttactcccagcactaacctacatgggtgatagtgatgacgacagacatac
atgagggcaacacacacatgggcacatacacacgcccaccatggcttcccccatcacttagacagccatattttaaactgtagtgagccaggctgggggt
ggtggcccacaccttattccagcactccagaaggcagaggtaggcgatctctgtgggtttagaccagcctggtctacaagagctagttccaggacagcctcca
aagccatagagaaccctatc
55 aagaaagtagaaaggcctgtaggggaaggtttagaggggagatgtagtagacagagatgataagaaactcaaatataatgaaactatct
aagaataaaagctaaatattaaatcagctaggtggtgtaggggtaagttgtagacacagtgatccaggccagggctacactagtgag
acctgttcaataaataataataatacaaaataaaggagacaccaataatgtgaaatgtaaaagactaaattacctttatattgtagagttgataaaaaaatc
aattaccagagacaataaagtagtccatcaaaagcaaaagcaatataatgaaactcaattttaaagttttagagcctggcaactggtgacataccttattacc
60 cagcaccagggagacagaggccatcctgtctaaaaagtgatctccaggacagccatggctattacacagagaaacctgtctgaaaaacaataaattagtg
ccatgtgaaatgtagtgatgctgtcatgcccacatacagaggttaggggaggtttagggagtcagttcctattcttctttagggggactgggactgaactca
ggtcatcaggttgcagaaagtgcttagctcagggccttatcttggcgaagctctcaagtagaaatcaatgttggctcatagtgcaatcattatgttccga
gaggggaagggtaaatcgttgggcatgtgtgtcactctgaatgacagtagctccctaggagaattaattcaagttcttgggtgtagtaaatgcctttaaaggg
gtcaacaacttttccctctgacaaaactatcttctgcttctgctc

- a) plásmidos de control pBING-LC (Fig.1A) y pBID-HC (Fig. 1A) sin elemento TE
- b) pBING-LC y pBID-HC con un elemento TE TE-00 integrado en cada caso aguas arriba del promotor/potenciador en orientación directa
- c) pBING-LC y pBID-HC con un elemento TE TE-00 integrado en cada caso aguas arriba del promotor/potenciador en orientación inversa

En la serie de transfección A se produjeron en cada caso cuatro pools, en la serie de transfección B en cada caso diez pools por variante. Allí se utilizaron en cada caso cantidades equimolares de ambos plásmidos. A fin de llegar a la misma cantidad total de moléculas, la cantidad total de ADN utilizada para la transfección en la serie A fue en las preparaciones de control de 1 µg, en las preparaciones con el elemento TE de 1,3 µg. Esta diferencia resultó de los diferentes tamaños de plásmidos, dado que los plásmidos con el elemento TE fueron mayores en un factor 1,3 que los plásmidos control. Dado que la cantidad de ADN en la mezcla de transfección puede tener una influencia sobre la eficiencia de transfección, en la serie B se equiparó la cantidad total de ADN con 300 ng de "ADN-Mock" (= vector sin gen del producto, elemento TE y marcador de selección eucarionte), de modo que en la preparación con los plásmidos de control en total también estaban contenidos 1,3 µg de ADN. Como control negativo en cada serie de transfección también se mantuvo un pool transfectado con Mock, es decir, con el mismo tratamiento, pero sin adición de ADN en la preparación de transfección. La selección de células transfectadas de modo estable se realizó dos días después de la transfección con -HT/+G418 (400 µg/mL).

Después de la selección se determinó en el FACS la proporción de células que expresan GFP. De la comparación de las variantes en el Plot-Overlay resultó en ambas series de transfección para pools con elemento TE 00 una mayor proporción de células que expresan GFP que en pools con plásmidos de control (Fig. 7). Entre los pools, en los cuales ya existía el elemento TE ya sea en orientación directa o inversa en el plásmido, no se evidenciaron diferencias de ningún tipo. El efecto del elemento TE 00, es decir, aumentar la proporción de células con mayor productividad en una población mixta, por lo tanto no dependía de su orientación.

Adicionalmente también se determinaron las titulaciones de IgG1 y la productividad específica de los pools a través de un período de seis a ocho pasajes (ritmo de realización de pasajes 2-2-3 días). También aquí se confirmó, que los pools celulares con el elemento TE 00 en promedio efectuaron mayor expresión que los pools celulares sin elemento TE (Fig. 9, serie A y B). En ambas series pudo comprobarse una duplicación de la producción del pool mediante la existencia del elemento TE, donde carecía de importancia, en qué orientación el elemento se incluía por clonación en el plásmido de expresión.

EJEMPLO 4 Influencia de los elementos TE TE-01 a TE-12 sobre la expresión de MCP-1

La acción de los elementos TE TE-01 a TE-12 sobre la expresión del MCP-1 segregado se analizó en 3 series estables de transfección (series C, D y E) de células CHO-DG44 en comparación a la expresión sin el elemento TE. En las tres series se produjeron cada vez seis pools por variante de plásmido. El plásmido base estaba en la serie C y D pTE4/MCP-1 (Fig. 1B; marcador de selección NPT= neomicina-fosfotransferasa F240I), en serie E pTE5/MCP-1 (Fig. 2; marcador de selección DHFR = dihidrofolato-reductasa). Estas no contenían ningún elemento TE (= preparados de control) o en cada caso uno de los elementos TE TE-01 a TE-12 en orientación directa aguas arriba del promotor/ potenciador. A fin de minimizar una influencia de la eficiencia de transfección mediante diferentes cantidades de ADN en la preparación de transfección, se utilizó cada vez en total 1,2 µg del ADN del plásmido. Dependiendo del tamaño del elemento TE insertado, varió el tamaño del plásmido entre 6,7 kb y 10,7 kb. Sin embargo, para que en todas las preparaciones pudiera mantenerse constante la cantidad total de moléculas de los plásmidos de ensayo, en las preparaciones con cantidades menores de moléculas se equiparó la cantidad total de ADN con un así llamado plásmido mock, que no contenía el gen del producto, ni el elemento TE, ni tampoco un marcador de selección eucarionte. Como control negativo en cada serie de transfección también se mantuvo un pool transfectado con Mock, es decir, con el mismo tratamiento, pero sin adición de ADN en la tanda de transfección. La selección de células transfectadas de modo estable se realizó dos días después de la transfección, en las series C y D con CHO-S-SFMII +G418 suplementado con HT (400 µg/mL), en serie E con CHO-S-SFMII sin HT.

Después de la selección se determinó en el FACS la proporción de células que expresaban dsRed2. La figura 8 representa la fluorescencia porcentual relativa de las células vivas transfectadas de la serie C. En comparación con los pools de control, los pools que incluían los elementos TE TE-01, TE-02 o TE-08, contenía aproximadamente 3 a 3,5 veces más células que expresaban dsRed2 y los pools con el elemento TE-06 una cantidad de aproximadamente el doble de células que expresaban dsRed2. En pools con los fragmentos TE-05 y TE-09, en cambio no pudo observarse un aumento de la proporción de células que expresaban DsRed2 en comparación al control.

Además también se relevaron las titulaciones del producto MCP-1 y la productividad específica durante un período de 6 pasajes (ritmo de realización de pasajes 2-2-3 días). En la ilustración 9 (serie C y D) y la ilustración 10 (serie E) se representaron las productividades específicas relativas de MCP-1. El elemento TE-08 muestra aquí junto con NPT F240I como marcador de selección con el factor 5,3 el mayor aumento de la productividad específica MCP-1 respecto del pool de control sin elemento TE (Fig. 9). Junto con DHFR como marcador de selección se obtuvo con esta variante un aumento de 6 veces (Fig. 10). De los elementos TE 01, 02 y 03 resultó en los pools seleccionados con NPT, un aumento de 4 o bien 4,5 veces de la productividad (Fig. 9) y en los pools seleccionados con DHFR, un

aumento de 2,6 a 6,8 veces de la productividad (Fig. 10) respecto de los pools de control. Incluso el elemento TE 06 de un tamaño de sólo 300 pb, pudo lograr un aumento de la productividad en todas las series en un factor 2,5 a 3,2 (Fig. 9 y 10). Los aumentos logrados con los fragmentos TE-04 y TE-07 también se ubicaron en este intervalo (Fig. 10). Los pools, en los cuales se utilizaron los fragmentos TE-10, TE-11 y TE-12 de una longitud algo mayor, presentaron una duplicación de la expresión MCP-1 (Fig. 9 y 10). Evidentemente, en todos estos pools está reducida la cantidad de células que no expresan un producto o sólo expresan poca cantidad de producto, y por lo tanto aumentó la proporción total de altos productores en la población de células. Esto es un indicio de que los elementos TE pueden suprimir, prevenir o anular los efectos de la posición cromosómica negativa.

En contraposición a ello, mediante el uso de los fragmentos TE-05 y TE-09 no pudo aumentarse la expresión, como ya se demostró también en la expresión DsRed2 (Fig. 8), en comparación con el control, la que incluso fue menor en algunos casos (Fig. 9 y 10). Es posible por lo tanto que estos elementos, o bien fragmentos parciales en estos rangos de secuencia puedan más bien ejercer una acción represora.

Considerado en conjunto, la modificación observada en la expresión de MCP-1 fue correlativa con la proporción de las células que expresaban DsRed2 en los pools celulares estables.

EJEMPLO 5: Prueba de los elementos TE TE-01 a TE-12 respecto de la actividad

Mediante la transfección transitoria de células CHO-DG44 se verificó si el aumento observado de la expresión del producto realmente se debe a un efecto de apertura de cromatina de los elementos TE o si se basa en una actividad del potenciador. Dado que en una transfección transitoria el plásmido no es integrado en el genoma, la información genética es leída directamente del plásmido. De ese modo no pueden producirse efectos debido a la ubicación cromosómica. Si a pesar de ello se presentan efectos positivos en la expresión génica, estos podrían deberse al potenciador presente en el elemento TE. Tales potenciadores pueden actuar en ubicación *cis* independientemente de la posición y la orientación, sobre la actividad de un promotor y estimular la transcripción de un gen enlazado funcionalmente.

En el estudio de expresión transitoria que se muestra en la figura 11, se realizó la transfección de en cada caso 6 pools con el plásmido base pTE4/MCP-1 (= control; Fig. 1B) o bien de sus derivados, que en cada caso contenían adicionalmente uno de los elementos TE TE-01 a TE-12 aguas arriba del promotor/potenciador. Después de 48 h de cultivo en un volumen total de 3 mL, se realizó la cosecha y la determinación de la titulación MCP-1 en el sobrenadante del cultivo celular mediante ELISA. Las diferencias en la eficiencia de transfección se corrigieron mediante la cotransfección con un plásmido de expresión SEAP (adición de en cada caso 100 ng de ADN del plásmido por preparación de transfección) y la posterior medición de la actividad SEAP. En la figura 11 se representó el valor medio de los 6 pools paralelos en cada caso. Los datos demuestran que las titulaciones MCP-1 en el sobrenadante del cultivo celular fueron muy similares en todos los pools y que no existían diferencias significativas de expresión respecto del plásmido de control pTE4/MCP-1 sin elemento TE. Por lo tanto, el aumento de productividad causada por algunos elementos TE, en más del factor 2 en pool celulares de transfección estable, no se debe a la existencia de un potenciador en la secuencia TE. En consecuencia, es imprescindible una integración cromosómica para el aumento de expresión causada por los elementos TE.

EJEMPLO 6: Producción de otros elementos TE y ensayo de diferentes posiciones y combinaciones del elemento TE

Análogamente a la forma de proceder que se describe en el Ejemplo 2, pueden generarse otros fragmentos parciales de la secuencia ID N° 1 o también de derivados de los mismos y, como se indicó en los Ejemplos 3 y 4, y verificarse respecto de su influencia positiva sobre la productividad. Se representan algunos ejemplos de realización para posibles fragmentos en la figura 12. Los resultados obtenidos hasta el momento indican, por ejemplo, que las áreas de la secuencia ID N° 1 que se muestran en la figura 12, también podrían producir un aumento de la expresión génica. En series de transfección estables, deben caracterizarse en mayor detalle estos nuevos elementos TE respecto de su influencia sobre la productividad específica, a fin de localizar con mayor exactitud y limitar aún más las zonas de secuencia importantes para la función. Una limitación de la función a determinadas zonas, se consecuentemente posible reducción de longitud de fragmento, es ventajosa para un uso eficiente de vectores de expresión, dado que los plásmidos de expresión más pequeños son más estables y de manipulación más sencilla tanto durante la clonación como también durante la transfección.

Además es posible que se presente una disposición cualquiera de zonas de fragmentos del mismo tipo o diferentes en cualquier orientación entre sí, como también en una posición cualquiera dentro del plásmido. El análisis que resulta de la combinación en un aumento lo más favorable posible de la expresión, puede nuevamente realizarse en series de transfección estables. Algunos ejemplos de realización, que de ningún modo son limitativos, se representan en la figura 13. De ese modo debe analizarse por ejemplo, si los elementos TE TE-06 y TE-08 en el caso de un flanqueamiento de ambos lados del gen del producto o en el caso de conexión sucesiva, puede provocar un aumento adicional de la expresión. Además es factible que una conexión sucesiva de elementos TE cortos, ya sean iguales o diferentes, como por ej. los elementos TE 06 y 08, asimismo producen un efecto adicional incrementador de la expresión.

Otros elementos TE

ELEMENTO TE 13 (SECUENCIA ID N° 15)

gttgctatthtagagacaggattctgcaaacctggtggtcttaaacctcgtatgtagctgagaatgacctgaaaacctctgtccaccctcaaattccagaattata
gacaccaccacatggcttaataagtaaaacaacaataaaaagcatgacttctgggtctggaggaggctgccagtaagagcaatggatactttccataga
acctgggttgactcccagcactaacctacatggtgatagtgatgagcagacatacatgagggcaacacacacatggccacatacacacgcaccgcccacat
5 ggcttttccccatcacttagacagccatatttaaacgtagtgagccaggctgggtgggtggccacaccttaatcccagcactccagaaggcagaggtaggcgg
atctctgtgggttgagaccgctggtctacaagagctagttccaggacagcctcaaaagccatagagaaaccctatc

ELEMENTO TE 14 (SECUENCIA ID N° 16)

caaagccatagagaaaccctatctcaaaaaactgaacaacaacaacaacaaacaaataaaaaaacaacaaagaatcttagtggttcagtggtccacac
10 acaggaagtagaaagggccttgatgggaaggtttcagagggaggatgtagatgagacaggtatgtagaaaagaactcaaattaataatattgaaacta
tctaagaataaaagctaaaatattaaaatcagtcaggtagtggtgggtcagagggtaagtgtgtagacacagtgagatccagggccagggctacactagtg
agacctgttcaaataactaataaaatacaaaaataaaggagacaccacaataatgtgaaatgtaaaagactaaattaccctttatattgatgagttggataaaaa
atcaattaccagagaacataaagtagtccatcaaagcaaaagcaatataatgattaaactctaatttaaaagttgttagagcctggcaactggtgacacataccttta
15 atcccagcaccagg

ELEMENTO TE 15 (SECUENCIA ID N° 17)

gttgctatthtagagacaggattctgcaaacctggtggtcttaaacctcgtatgtagctgagaatgacctgaaaacctctgtccaccctcaaattccagaattata
gacaccaccacatggcttaataagtaaaacaacaataaaaagcatgacttctgggtctggaggaggctgccagtaagagcaatggatactttccataga
acctgggttgactcccagcactaacctacatggtgatagtgatgagcagacatacatgagggcaacacacacatggccacatacacacgcaccgcccacat
20 ggcttttccccatcacttagacagccatatttaaacgtagtgagccaggctgggtgggtggccacaccttaatcccagcactccagaaggcagaggtaggcgg
atctctgtgggttgagaccgctggtctacaagagctagttccaggacagcctcaaaagccatagagaaaccctatctcaaaaaactgaacaacaacaacaa
caaaacaaaataaaaaacaacaaagaatcttagtggttcagtggtccacacacaggaagtagaaagggccttgatgggaaggtttcagagggagggagta
tggatgagacaggtatgtagtgaagaactcaaattaataatattgaaactatctaaataaaagctaaatattaaatfacagtcaggtagtggtggtgca
gagggtaagtgtgtagacacagtgagatccagggccagggctacactagtgagacctgttcaataactaataaaatacaaaaataaaggagacaccaca
25 ataatttgaaatgtaaaagactaaattaccctttatattgatgagttggataaaaaatcaattaccagagaacataaagtagtccatcaaagcaaaagcaat
atgattaaactctaatttaaaagttgttagagcctggcaactggtgacacatacctttaatcccagcaccagg

ELEMENTO TE 16 (SECUENCIA ID N° 18)

accttaatcccagcaccagggagacagaggccatcctggtctaaaaagtgatctccaggacagccatggctattacacagagaaacctgtctgaaaaacaaa
30 aaattagtgctcatgtgtaaatgtgtagatgctgtcatgccacatacagaggtagagggcagttatgggagtcagttcctattctttaggggacctgggga
ctgaactcaggtcatcaggctggcagaaagtcattagctcacggagccttatcatgtggcgaagctctcaagtagaaaatcaatgtttgctcatatgcaatca
ttatgtttagaggggaaggttacaatcgttggggcatgtgtggtcacatctgaatagcagtagctccctaggagaattaattccaagttctttggtggtatcaatgcc
ctaaaggggtcaacaacttttccctctgacaaaactatcttctatgtcctgtgcc

ELEMENTO TE 17 (SECUENCIA ID N° 19)

caaagccatagagaaaccctatctcaaaaaactgaacaacaacaacaacaaacaaataaaaaaacaacaaagaatcttagtggttcagtggtccacac
35 acaggaagtagaaagggccttgatgggaaggtttcagagggaggatgtagatgagacaggtatgtagaaaagaactcaaattaataatattgaaacta
tctaagaataaaagctaaaatattaaaatcagtcaggtagtggtgggtcagagggtaagtgtgtagacacagtgagatccagggccagggctacactagtg
agacctgttcaaataactaataaaatacaaaaataaaggagacaccacaataatgtgaaatgtaaaagactaaattaccctttatattgatgagttggataaaaa
atcaattaccagagaacataaagtagtccatcaaagcaaaagcaatataatgattaaactctaatttaaaagttgttagagcctggcaactggtgacacataccttta
40 atcccagcaccagggagacagaggccatcctggtctaaaaagtgatctccaggacagccatggctattacacagagaaacctgtctgaaaaacaaaaatta
gtgctcatgtgtaaatgtgtagatgctgtcatgccacatacagaggtagagggcagttatgggagtcagttcctattctttaggggacctgggactgaac
tcaggtcatcaggtggcagaaagtcattagctcacggagccttatcattggcgaagctctcaagtagaaaatcaatgtttgtcicatagtgcaatcattatgtt
cgagaggggaaggtacaatcgttggggcatgtgtggtcacatctgaatagcagtagctccctaggagaattaattccaagttctttggtggtatcaatgcccttaaa
45 ggggtcaacaacttttccctctgacaaaactatcttctatgtcctgtgcc

ELEMENTO TE 18 (SECUENCIA ID N° 20)

gttgctatthtagagacaggattctgcaaacctggtggtcttaaacctcgtatgtagctgagaatgacctgaaaacctctgtccaccctcaaattccagaattata
gacaccaccacatggcttaataagtaaaacaacaataaaaagcatgacttctgggtctggaggaggctgccagtaagagcaatggatactttccataga
acctgggttgactcccagcactaacctacatggtgatagtgatgagcagacatacatgagggcaacacacacatggccacatacacacgcaccgcccacat
50 ggcttttccccatcacttagacagccatatttaaacgtagtgagccaggctgggtgggtggccacaccttaatcccagcactccagaaggcagaggtaggcgg
atctctgtgggttgagaccgctggtctacaagagctagttccaggacagcctcaaaagccatagagaaaccctatctcaaaaaactgaacaacaacaacaa
caaaacaaaataaaaaacaacaaagaatcttagtggttcagtggtccacacacaggaagtagaaagggccttgatgggaaggtttcagagggaggagta
tggatgagacaggtatgtagtgaagaactcaaattaataatattgaaactatctaaataaaagctaaatattaaatfacagtcaggtagtggtggtgca
gagggtaagtgtgtagacacagtgagatccagggccagggctacactagtgagacctgttcaataactaataaaatacaaaaataaaggagacaccaca
55 ataatttgaaatgtaaaagactaaattaccctttatattgatgagttggataaaaaatcaattaccagagaacataaagtagtccatcaaagcaaaagcaat
atgattaaactctaatttaaaagttgttagagcctggcaactggtgacacatacctttaatcccagcaccagggagacagaggccatcctggtctaaaaagtgatctcca
ggacagccatggctattacacagagaaacctgtctggaacaaacaaaataaagtagtctcaatgtgtgtagatgctgtcatgcccacatacagaggtaga
gggagttatgggagcttctattctcctttatggggagcagcctggggaactgagcaggtcaggtcaggtcagggcagaaagtgcaatgctcagccttatcattg
60 gcgaaagctctcaagtagaaaatcaatgtttgctcatatgcaatcattatgtttagaggggaaggttacaatcgttggggcatgtgtggtcacatctgaatag
cagtagctccctaggagaattaattccaagttctttggtggtatcaatgcccttaaaaggggtcaacaacttttccctctgacaaaactatcttctatgtcctgtgcc

ELEMENTO TE 21 (SECUENCIA ID N° 21)

cttgcggtcagggactacagtcattttcaggttcttactgtatggcttttaaacgtgcaaaagtgaccattaaccgtttcacgctgggagggcagctgctgctcaga
75 tcttctctgactgagggccaggggggtacacggaagaggccacaccgcaactgggaagactcgatttgggcttcagctggtgagacgccccagcaggc
tctcggctacaccttcagccccgaatgctcggccataaaccttcccttaggcaattccggcgaggaccaccctcgcgcaaaacttcggccccatccccg

gtcctcacctgaatctctaactctgactccagagtttagactataaccagatag

EJEMPLO 7: Influencia de los elementos TE TE-13 a TE-18 sobre la expresión de MCP-1

5 La acción de los elementos TE TE-13 a TE-18 sobre la expresión del MCP-1 segregado se analizó en series estables de transfección (series C, D y E) de células CHO-DG44 en comparación a la expresión sin el elemento TE. Se generaron en cada caso cuatro pools por variante de plásmido. El plásmido base estaba en todas las series pTE4/MCP-1 (Fig. 1B; marcador de selección NPT = neomicina-fosfotransferasa F240I). Las distintas variantes de plásmido no contenían ningún elemento TE (= preparados de control) o en cada caso uno de los elementos TE TE-13 a TE-18 en orientación directa aguas arriba del promotor/potenciador (Figura 12). A fin de minimizar una influencia de la eficiencia de transfección mediante diferentes cantidades de ADNn en la preparación de transfección, se utilizaron cada vez en total 1,2 µg del ADN del plásmido. Dependiendo del tamaño del elemento TE insertado, varió el tamaño del plásmido entre 6,7 kb y 8,2 kb. Como control negativo en cada serie de transfección también se mantuvo un pool transfectado con Mock, es decir, con el mismo tratamiento, pero sin agregado de ADN en la preparación de transfección. La selección de células transfectadas de modo estable se realizó dos días después de la transfección con CHO-S-SFMII suplementado con HT +G418 (400 µg/mL). También se relevaron las titulaciones del producto MCP-1 y la productividad específica durante un período de 5 a 6 pasajes (ritmo de realización de pasajes 2-2-3 días). En la figura 14 (serie F) se representan las productividades específicas relativas de producto MCP-1. Cada uno de los elementos lleva a un aumento de la expresión promedio de MCP-1. El máximo aumento (15 veces) fue provocado por el elemento 13, que incluso supera el aumento de diez veces con el elemento 08.

EJEMPLO 8: Influencia de los elementos TE en diversas posiciones y en diversas combinaciones sobre la expresión de MCP-1

25 La acción de los elementos TE TE-06 y TE-08 en diversas combinaciones y en distintas posiciones en el plásmido de expresión sobre la expresión del MCP-1 extraído se ensaya en dos series estables de transfecciones (series G y H) de células CHO en comparación con la expresión sin el elemento TE. En ambas series se producen cada vez seis pools por variante de plásmido. El plásmido de base es pTE4/MCP-1 (Fig. 1B; marcador de selección NPT = neomicina-fosfotransferasa F240I). Las distintas variantes de plásmido no contienen ya sea ningún elemento TE (= preparaciones de control) o TE-08 o bien TE-A delante del elemento potenciador/promotor o la combinación de TE-06 y TE-08 delante del elemento potenciador/promotor o TE-08 o bien TE-09 en orientación inversa delante del elemento potenciador/promotor (serie G). En la serie H se emplean los elementos TE-06 y TE-21 o bien TE-08 delante del elemento potenciador/promotor (E/P) y adicionalmente detrás de la señal de terminación (T) (figura 13). A fin de minimizar una influencia de la eficiencia de transfección mediante diferentes cantidades de ADNn en la preparación de transfección, se utilizan cada vez en total 1,2 µg del ADN del plásmido. Dependiendo del tamaño del elemento TE insertado, varía el tamaño del plásmido entre 6,7 kb y 10,2 kb. Como control negativo en cada serie de transfección también se mantiene un pool transfectado con Mock, es decir, con el mismo tratamiento, pero sin adición de ADN en la preparación de transfección. La selección de células transfectadas de modo estable se realiza dos días después de la transfección con CHO-S-SFMII suplementado con HT +G418 (300 µg/mL). También se relevan las titulaciones del producto MCP-1 y la productividad específica durante un período de 6 pasajes (ritmo de realización de pasajes 2-2-3 días). En la figura 15 se representan las productividades específicas relativas de la serie G del producto MCP-1. Todos los elementos llevan a un aumento de la expresión promedio de MCP-1. El mayor aumento (4 veces) es ocasionado por el elemento TE-A. El empleo de los elementos TE-06 y TE-21 o bien TE-08 antes y después de la casete de expresión produce un aumento.

EJEMPLO 9: Influencia del elemento TE TE-08 sobre la expresión de dos inmunoglobulinas G 4 (IgG4)

50 La acción del elemento TE TE-08 sobre la expresión dos anticuerpos IgG4 se ensaya en una serie estable de transfecciones (serie J) de células CHO-DG44 en comparación con la expresión sin el elemento TE. Se generan en cada caso 24 pools con los plásmidos de base pBIN-LC2 o bien pBIN-LC3 y pBID-HC2 o bien pBID-HC3 y 24 pools con pBIN-LC2/TE08 o bien pBIN-LC3/TE08 y pBID-HC2/TE08 o bien pBID-HC3/TE08 (Fig. 16; marcador de selección NPT= neomicina-fosfotransferasa F240I y dhfr = dihidrofolato-reductasa). A fin de minimizar una influencia de la eficiencia de transfección mediante diferentes cantidades de ADN en la preparación de transfección, se utiliza cada vez en total 1,2 µg del ADN del plásmido. Dependiendo del tamaño del elemento TE insertado, varió el tamaño del plásmido entre 6,1 kb y 7,5 kb. Como control negativo en cada serie de transfección también se mantiene un pool transfectado con Mock, es decir, con el mismo tratamiento, pero sin agregado de ADN en la preparación de transfección. La selección de células transfectadas de modo estable se realiza dos días después de la transfección con CHO-S-SFMII sin HT +G418 (400 µg/mL). También se relevan las titulaciones del producto IgG4 y la productividad específica durante un período de 4 pasajes (ritmo de realización de pasajes 2-2-3 días). El elemento 08 conduce en la expresión de anticuerpos IgG4 a un aumento del índice promedio de expresión. Además, con la presencia del elemento TE-08 se puede aumentar la posibilidad de hallar un pool celular de alta producción.

65 EJEMPLO 10: Influencia de elementos TE sobre la expresión de proteína en células 293F

La acción de distintos elementos TE sobre la expresión del MCP-1 segregado se ensaya en una serie estable de transfecciones (serie K) de células HEK293Freestyle en comparación con la expresión de MCP-1 sin un elemento TE. El plásmido de base era pTE4/MCP-1 (Fig. 1B; marcador de selección NPT = neomicina-fosfotransferasa F240I). Se emplean los elementos TE-08, TE-13 y TE-A en orientación directa aguas arriba del potenciador/promotor y se generan en cada caso 7-10 pools por variante de plásmido. A fin de minimizar una influencia de la eficiencia de transfección mediante diferentes cantidades de ADNn en la preparación de transfección, se utilizan cada vez en total 1,2 µg del ADN del plásmido. Dependiendo del tamaño del elemento TE insertado, varió el tamaño del plásmido entre 6,7 kb y 10,2 kb. Como control negativo en cada serie de transfección también se mantiene un pool transfectado con Mock, es decir, con el mismo tratamiento, pero sin agregado de ADN en la preparación de transfección. La selección de células establemente transfectadas se realiza dos días después de la transfección con medio 293 SFM II + 4 mM de glutamina + G418 (100 µg/mL). También se revelan las titulaciones del producto MCP-1 y la productividad específica durante un período de 5 a 6 pasajes (ritmo de realización de pasajes 2-2-3 días).

Ejemplo 11: Influencia del elemento TE TE-08 sobre la expresión de una enzima (SEAP)

La acción del elemento TE TE-08 sobre la expresión de una enzima (SEAP) se ensaya en una serie estable de transfecciones (serie L) de células CHO-DG44 en comparación con la expresión de SEAP sin el elemento TE. Se generaron en cada caso seis pools por variante de plásmido. El plásmido base es pTE-4/SEAP. Se genera a través de un intercambio de la casete de expresión MCP-1 – IRES – DsRed2 por SEAP. El elemento TE-08 se clona en el adaptador A (Fig. 1B; marcador de selección NPT = neomicina-fosfotransferasa F240I). A fin de minimizar una influencia de la eficiencia de transfección mediante diferentes cantidades de ADN en la preparación de transfección, se utiliza cada vez en total 1,2 µg del ADN del plásmido. Dependiendo del tamaño del elemento TE insertado, varió el tamaño del plásmido entre 6,6 kb y 7,6 kb. Como control negativo en cada serie de transfección también se mantiene un pool transfectado con Mock, es decir, con el mismo tratamiento, pero sin agregado de ADN en la preparación de transfección. La selección de células transfectadas de modo estable se realiza dos días después de la transfección con CHO-S-SFMII suplementado con HT +G418 (400 µg/mL). La expresión relativa de SEAP se calcula por medio de ensayos de SEAP (Clontech) asequibles en comercios y durante un período de 6 pasajes (ritmo de pasajes 2-2-3 días).

LISTA DE REFERENCIAS

- Adam, M.A. et al., *J Virol* **1991**, 65, 4985 - 4990
- Altschul, S.F. et al., *Nucleic Acids Res.* **1997**, 25, 3389 - 3402
- 5 Altschul, S.F. et al., *J Mol Biol* **1990**, 215, 403 - 410
- Aronow, B.J. et al., *Mol. Cell. Biol.* **1995**, 15, 1123-1135.
- Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in molecular biology*. New York : Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience **1994** (actualizado)
- Baker, J.E., *Journal of Experimental Medicine* **1999**, 190, 669-679.
- 10 Bell, A.C. y Felsenfeld, G., *Current Opinion in Genetics & Development* **1999**, 9, 191-198.
- Bennett, R.P. et al., *BioTechniques* **1998**, 24, 478 - 482
- Chalfie, M. et al., *Science* **1994**, 263, 802 - 805
- Chamov, S.M. et al., *Antibody Fusion Proteins*, Wiley-Liss Inc., **1999**
- Davies, M.V. et al., *J Virol* **1992**, 66, 1924 - 1932
- 15 Delgado, S. et al., *EMBO Journal* **1998**, 17, 2426-2435.
- Faisst, S. et al., *Nucleic Acids Research* **1992**, 20, 3 - 26
- Gossen, M. et al., *Curr Opi Biotech* **1994**, 5, 516 - 520
- Haber, D.A. et al., *Somatic Cell Genetics* **1982**, 8, 499 - 508
- Harris et al., *Protein Purification: A Practical Approach*, Pickwood and Hames, eds., IRL Press, **1995**
- 20 Hemann, C. et al., *ADN Cell Biol* **1994**, 13 (4), 437 - 445
- Hu, S. et al., *Cancer Res.* **1996**, 56 (13), 3055 - 3061
- Huston, C. et al., *Proc Natl Acad Sci USA* **1988**, 85 (16), 5879 - 5883
- Jang, S. K. et al., *J Virol* **1989**, 63, 1651 - 1660
- Jenuwein, T. et al., *Nature* **1997**, 385, 269-272.
- 25 Kaufman, R.J., *Methods en Enzymology* **1990**, 185, 537 - 566
- Klehr, D. et al., *Biochemistri* **1991**, 30, 1264-1270.
- Kortt, A. A. et al., *Protein Engineering* **1997**, 10 (4), 423 - 433
- Kwaks, T.H.J. et al., *Nature Biotechnology* **2003**, 21, 553-558.
- Li, Q. et al., *Blood* **2002**, 100, 3077-3086.
- 30 Lottspeich F. and Zorbas H. eds., *Bioanalytic*, Spektrum Akad. Verl., **1998**
- Lovejoy, B. et al., *Science* **1993**, 259, 1288 - 1293
- McKnight, R.A. et al., *PNAS* **1992**, 89, 6943-6947.
- Monaco, L. et al., *Gene* **1996**, 180, 145 - 15
- Morgan, R. A. et al., *Nucleic Acids Research* **1992**, 20, 1293 - 1299
- 35 Mosser, D. D. et al., *BioTechniques* **1997**, 22, 150 - 161
- Ortiz, B.D. et al., *Molecular & Cellular Biologi* **1999**, 19, 1901-1909.
- Ortiz, B.D. et al., *EMBO J* **1997**, 16, 5037-5045.
- Ohshima, Y. et al., *J Mol Biol* **1987**, 195, 247 - 259
- Pack, P. et al., *Biotechnology* **1993**, 11, 1271 - 1277
- 40 Pack, P. et al., *J Mol Biol* **1995**, 246 (11), 28 - 34
- Pelletier, J. et al., *Nature* **1988**, 334, 320 - 325
- Pelisc, O. et al., *Structure* **1994**, 2, 1217 - 1226
- Pikaart, M.J. et al., *Genes Dev* **1998**, 12, 2852-2862.
- Poljak, L. et al., *Nucl. Acids. Res* **1994**, 22, 4386-4394.
- 45 Ramesh, N. et al., *Nucleic Acids Research* **1996**, 24, 2697 - 2700
- Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, **1989**
- Sautter, K. and Enenkel, B., *Biotechnology and Bioengineering* **2005**, 89, 530-538.
- Scopes, R., *Protein Purification*, Springer Verlag, **1988**
- 50 Simonson, C.C. et al., *Proc Natl Acad Sci USA* **1983**, 80, 2495 - 2499
- Stief, A. et al., *Nature* **1989**, 341, 343-345.
- Sugimoto et al., *Biotechnology* **1994**, 12, 694 - 698
- Udvardi, A. et al., *Journal of Molecular Biology* **1985**, 185, 341-358.
- Udvardi, A., *EMBO J* **1999**, 18, 1-8.
- 55 Urlaub, G. et al., *Cell* **1983**, 33, 405 - 412
- Urlaub, G. et al., *Somatic Cell & Molecular Genetics* **1986**, 12, 555-566.
- Werner, R. G. et al., *Arzneimittel-Forschung* **1998**, 48, 870-880.
- Wigler, M. et al., *Proc Natl Acad Sci USA* **1980**, 77, 3567 - 3570
- Yoshimura, T., *FEBS Letters* **1989**, 244, 487-493.
- 60 Zahn-Zabal, M. et al., *Journal of Biotechnology* **2001**, 87, 29-42.
- WO97/15664
- EP-0-393-438
- WO2004/050884
- WO02/081677
- 65 US6.027.915

ES 2 401 654 T3

US6.309.851
WO01/04306
WO00/34318
WO00/34326
5 WO00/34526
WO01/27150
US5.122.458
WO94/05785
WO92/08796
10 WO94/28143
WO03/004704

ES 2 401 654 T3

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG
Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG

5 <120> Elementos reguladores de ácidos nucleicos

<130> P01-2092

10 <160> 44

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

15 <211> 3788

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

20 <223> Derivado de Cricetulus griseus, 8 nucleótidos adicionales

<400> 1

ccatgagagc ctgaagacct gagttgatac ccagaacca gatcaagatg gaggagagaa 60

25 ccagccccac taagctgtcc cctgaccccc ataatgacct cctgtccag ttatgccaca 120

caatgatagg tgaatacaga aaaacaccct tccttagac actaagcgga ttctcttac 180

gcataccagt taagtgatag ttcttagct tcaactcagc acttataaaa gtttatatt 240

30 tgcaatgctg gggactaaat tagggttgtg cacatgctaa gtaagcactc tactttgtgta 300

tcacatttta ataattgtaa gaattaattc gtgaatagt agctgagaca atagattgt 360

35 ttcttcatg tggaactgc tgtgtgtgct tctgtctgat gcaacaagg tcaaatact 420

tattccccag tgtctgccta gccctgtaac acttctctat tatacaatga ccacaaataa 480

ttagtgagt gggtttgtt tcatthaaa ttgtgctat ttagagaca ggatttctg 540

40 caaacctggt tggcttaaa ctccgtatgt agctgagaat gacctgaaa accttctgt 600

cccaccctc aaattccaga attatagaca ccaccacat ggcttaataa gtaacaaca 660

45 acaataaaag catgacttct gggctctggag ggagggcttg ccagtaaga gcaatggata 720

cttcccata gaacctgggt tgactccca gctaacct acatggtgat agtgatgcag 780

cagacataca tgagggaac acacacatgg gcacatacac acgcaccgc ccaccatggc 840

50 tttcccca tcacttagac agccatatt aaacgtatg gagccaggct ggggtggtg 900

cccacactt taatccagc actccagaag gcagaggtag gcgatctct gtgggttga 960

55 gaccagctg gtctacaaga gctagtcca ggacagcctc caaagccata gagaaacct 1020

atctcaaaa actgaacaa caacaacaac aaaacaaaat aaaaaaaca caaagaatc 1080

ttagtggttc agtggtcca cacacaggaa agtagaaagg gcctgatgg gaaggtttc 1140

60 agagggagga gtatggatga gacaggatga tagtgaag aactcaaatt aattaaat 1200

ttgaaactat ctaagaataa aagctaaaat atttaaaatt acagtcaggt agtggtggtg 1260

65 cagagggcta agttgtaga cacagtgaga tccaggccag ccagggctac ctagtgagac 1320

ES 2 401 654 T3

ctgttcaaa taactaataa aatatacaaa ataaaggaga caccacaata attttgaat 1380
gtaaaagact aaattacct tttatattga tgagttggat aaaaaaatca attaccaga 1440
5 gaacataaag tagtcccatc aaagacaaaa gcaatatatg attaaactct aatttaaaag 1500
ttgttagag cctggcaacg tggcacatac cttaatccc agcaccaggg agacagaggc 1560
10 catcctggtc taaaaagta tctccaggac agccatggct attacacaga gaaaccctgt 1620
ctggaaaaac aaaaaattag tgtccatgtg taaatgtgtg gagtatgctt gtcattccac 1680
15 atacagagggt agagggcagt ttatgggagt cagttcctat tctccttta tgggggacct 1740
ggggactgaa ctacaggtcat caggcttggc agaaagtga ttagctcacg gacccctatc 1800
attggcgaaa gctctctcaa gtagaaaatc aatgtgttg ctcatagtc aatcattatg 1860
20 tttcgagagg ggaagggtag aatcgttggg gcatgtgtgg tcacatctga atagcagtag 1920
ctccctagga gaattaatc caagttctt ggtggtgtat caatgccctt aaaggggtca 1980
acaactttt tccctctga caaaactatc ttctatgtc ctgtccctc atatttgaag 2040
25 tattttatc ttgcaggtgt tgaatacaa ttctagcacc tcagacatgt taggtaagta 2100
ccctacaact caggtaact aatttaatt aactaattta accccaacac ttttcttg 2160
30 ttatccaca ttgtggagt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt 2220
gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gcgcgcgcgc gcgcgcgcgc atcattctac cttttgtta 2280
aaaaatgta gtccaggggt ggggtgact gtgaaagtct gagggtaact tgctggggc 2340
35 agttcttcc actataggac agaactccag gtgtcaactc ttactgaca gaaccatcca 2400
aatagcccta tctaattta gtttttatt tatttttt ttgttttcg agacagggt 2460
40 tctctgtggc ttggaggct gtccctggaac tagctctgt agaccaggct ggtctcgaac 2520
tcagagatcc acctgcctct gcctctgag tgctgggatt aaaggcatgc gccaccaacg 2580
cttggctcta cctaattta aaagagattg tgtgcacaa ggggtcatg tcgccctgca 2640
45 accaccccc ccccaaaaa aaaaaaaaaa aaacttcaact gaagctgaag cacgatgatt 2700
tggttactct ggctggccaa tgagctctag ggagtctct gtcaaacaga atctcaacag 2760
50 gcgcagcagt ctttttaaa gtggggttac aacacaggtt ttgcatatc aggcattta 2820
tctaagctat tcccagcca aaaatgtgta tttggaggc agcagagcta atagattaaa 2880
atgaggaag agcccacaca ggttattagg aagataagca tcttcttat ataaaacaaa 2940
55 accaaaccaa actggaggag gtctacctt agggatggaa gaaaagacat ttagagggtg 3000
caatagaaag ggactgagt ttgtgagggt gaggactggg agagggcgca accgcttaa 3060
60 ctgtcctgtt tgcctattt ttgggggaca gcacatgtc ctattttcc caggatggc 3120
aatctccacg tccaaactg cggtcgagga ctacagtcatt ttgcagggt tcctactgt 3180
atggctttta aaacgtgcaa aggtgacct taaccgttcc acgctgggag ggcacgtgcg 3240
65

ES 2 401 654 T3

gctcagatgc ttctctgac tgagggccag gagggggcta cacggaagag gccacacccg 3300
cacttgggaa gactcgattt gggcttcagc tggctgagac gccccagcag gctcctcggc 3360
5 tacacctca gccccgaatg ccttccggcc cataaccctt ccttctagg catttccggc 3420
gaggaccac cctcgcgcca aacattcggc cccatcccc ggtcctcacc tgaatctcta 3480
actctgactc cagagtttag agactataac cagatagccc ggtgtgtgg aactgcatct 3540
10 tgggacgagt agtttagca aaaagaaagc gacgaaaaac tacaattccc agacagactt 3600
gtgttacctc tcttctcatg ctaaacaagc cccctttaa ggaaagcccc tcttagtcgc 3660
15 atcgactgtg taagaaaggc gtttgaaca tttaatgtt gggcacaccg ttccgaggac 3720
cgaaatgaga aagagcatag ggaaacggag cgcccagact agtctggcac tgcgtagac 3780
agccgcgg 3788
20
<210> 2
<211> 2210
<212> DNA
25 <213> Cricetulus griseus

<400> 2
gatctccagg acagccatgg ctattacaca gagaaccct gtctggaaaa acaaaaaatt 60
30 agtgtccatg tgtaaatgtg tggagtatgc ttgcatgcc acatacagag gtagagggca 120
gtttatggga gtcagttcct atttctctt tatgggggac ctggggactg aactcaggtc 180
atcaggcttg gcagaaagtg cattagctca cggagccta tcattggcga aagctctctc 240
35 aagtagaaaa tcaatgtgtt tgctcatagt gcaatcatta tgttcgaga ggggaagggt 300
acaatcgttg gggcatgtgt ggtcacatct gaatagcagt agctccctag gagaattaat 360
40 tccaagttct ttggtgtgt atcaatgcc ttaaagggt caacaacttt tttccctct 420
gacaaaacta tcttctatg tcttgcctc tcataattga agtattttat tcttgcagt 480
gttgaataat aattctagca cctcagacat gttagtaag tacctacaa ctcaggtaa 540
45 ctaatttaat ttaactaatt taacccaac acttttctt tgtttatcca catttggtga 600
gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt 660
50 gtgcgcgctc gcgcgcgctc ggatcattct acctttgtt taaaaaatgt tagtccaggg 720
gtggggtgca ctgtgaaagt ctgagggtaa ctgctgggg tcagttcttt ccactatagg 780
acagaactcc aggtgtcaac tcttactga cagaaccatc caaatagccc tatctaatt 840
55 tagttttta tttatttat tttgtttt cgagacaggg ttctctgtg gctttggagg 900
ctgtcctgga actagctctt gtagaccagg ctggtctcga actcagagat ccacctgcct 960
60 ctgcctcctg agtgctggga ttaaaggcat gcgccacaa cgcttgctc tacctaatt 1020
taaaagagat tgtgtgtcac aagggtgtca tgcgccctg caaccacccc cccccaaaa 1080
aaaaaaaaa aaaaactca ctgaagctga agcacgatga tttggttact ctggctggcc 1140
65

ES 2 401 654 T3

aatgagctct agggagtctc ctgtcaaaca gaatctcaac aggcgcagca gtcttttta 1200
aagtggggft acaacacagg ttttgcata tcaggcattt tatctaagct atttcccagc 1260
5 caaaaatgtg tattttggag gcagcagagc taatagatta aaatgagga agagcccaca 1320
caggttatta ggaagataag catcttcttt atataaaca aaaccaaac aactggagg 1380
aggtctacct ttaggatgg aagaaaagac atttagaggg tgcaatagaa agggcactga 1440
10 gtttgaggagg tggaggactg ggagagggcg caaccgctt aactgtcctg tttgcctat 1500
ttttgggga cagcacatgt tcctatttt cccaggatgg gcaatctcca cgtccaaact 1560
15 tgcggtcgag gactacagtc atttgcagg ttccttact gtatggcttt taaaacgtgc 1620
aaagtgacc attaaccgtt tcacgctggg agggcacgtg cggctcagat gcttctctg 1680
actgagggcc aggagggggc tacacggaag aggccacacc cgcacttggg aagactcagat 1740
20 ttgggctca gctggctgag acgccccagc aggtcctctg gctacacctt cagccccgaa 1800
tgccttccg cccataacc ttccttcta ggcatttccg gcgaggacc accctcgcgc 1860
25 caaacattg gcccatccc ccggtcctca cctgaatctc taactctgac tccagagttt 1920
agagactata accagatagc ccggatgtgt ggaactgcat ctggggacga gtagttttag 1980
caaaaagaaa gcgacgaaaa actacaattc ccagacagac ttgtgttacc tctcttca 2040
30 tgctaaacaa gcccccfta aaggaaagcc cctcttagtc gcatcgactg tgtaagaaag 2100
gcgttgaaa catttaatg ttgggcacac cgtttcgagg accgaaatga gaaagagcat 2160
35 agggaaacgg agcgcgccgag ctagtctggc actgcgtag acagccgcgg 2210

<210> 3
<211> 3005
40 <212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cricetulus griseus con manipulación del sitio EcoRI endógeno
45 por sustitución de 4 bases

<400> 3
gttgctatt tagagacagg atttctgca aacctggtg gtctaaact ccgatgtag 60
50 ctgagaatga cctgaaaac ctctctgtcc caccctcaa attccagaat tatagacacc 120
caccacatgg ctaataagt aaacaacaac aataaaagca tgacttctgg gtctggaggg 180
agggcttggc agttaagagc aatggatact ttccataga acctgggttt gactcccagc 240
55 actaacctac atggtgatag tgatgcagca gacatacatg agggcaacac acacatgggc 300
acatacacac gcaccgccc accatggctt tcccccatc acttagacag ccatatttaa 360
60 acgtagtgga gccaggctgg ggtggtggcc cacacctta atcccagcacc tccagaaggg 420
agaggtaggc ggatctctgt gggttgaga ccagcctgtt ctacaagagc tagtccagg 480
acagcctcca aagccataga gaaacctat ctcaaaaaac tgaacaaca acaacaaca 540
65

ES 2 401 654 T3

aacaaaataa aaaaacaaca aaagaatctt agtgggtcag tggttccaca cacaggaaag 600
tagaaagggc ctgatggga aggttttcag agggaggagt atggatgaga caggatgata 660
5 gtgaaaagaa ctcaaattaa ttaaatattt gaaactatct aagaataaaa gctaaaatat 720
ttaaattac agtcaggtag tgggtgtgca gagggctaag ttggtagaca cagtgagatc 780
caggccagcc agggctacct agtgagacct tgttcaaata actaataaaa tatacaaaat 840
10 aaaggagaca ccacaataat ttgaaatgt aaaagactaa attacctt tatattgatg 900
agttggataa aaaaatcaat ttaccagaga acataaagta gtccatcaa agacaaaagc 960
15 aatatatgat taaactctaa ttaaaagt ttgtagagcc tggcaacgtg gcacatacct 1020
tfaatcccag caccagggag acagaggcca tctgtgtcta aaaagtatc tccaggacag 1080
ccatggctat tacacagaga aacctgtct ggaaaaacaa aaaattagt tccatgtgta 1140
20 aatgtgtgga gtatgctgt catgccacat acagaggtag agggcagttt atgggagtca 1200
gttctatct ttctttatg ggggacctgg ggactgaact caggctatca ggcttggcag 1260
25 aaagtgcatt agctcacgga gccttatcat tggcgaagc tctctcaagt agaaaatcaa 1320
tgtgtttct catagtcaa tcattatgt tcgagagggg aagggtacaa tcgttggggc 1380
atgtgtgtc acatctaat agcagtagct ccctaggaga attaattcca agttctttg 1440
30 tgggtatca atgccctaa aggggtcaac aactttttt ccctctgaca aaactatct 1500
cttatgtcct tgcctcat attgaagta tttattct tgcagtgtg aatatcaatt 1560
35 ctgacacctc agacatgta ggtaagtacc ctacaactca ggttaactaa ttaatttaa 1620
ctaattaac cccaacactt tttcttgtt tatccacatt tgtggagtgt gttgtgtgt 1680
gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gctgctgctg 1740
40 gctgctgctg cttctacct tttgtttaa aaatgttagt ccaggggtgg ggtgactgt 1800
gaaagtctga ggtaactg ctggggctag ttcttccac tataggacag aactccaggt 1860
45 gtcaactct tactgacaga accatccaaa tagccctatc taatttagt ttttattta 1920
tttattttt gttttcag acagggttc tctgtgctt tggaggctgt cctggaacta 1980
gctctgtag accaggctgg tctgaactc agagatccac ctgctctgc ctctgagtg 2040
50 ctgggattaa aggcattgct caccaacgct tggctctacc taattttaa agagattgtg 2100
tgtcacaagg gtgcatgct gccctgcaac cccccccc ccaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2160
55 acttactga agctgaagca cgatgatttg gttactctgg ctggccaatg agctctaggg 2220
agtctcctgt caaacagaat ctcaacagc gcagcagct ttttaaagt ggggttaca 2280
cacaggttt tgcatactag gcatattatc taagctattt cccagccaaa aatgtgtatt 2340
60 ttggaggcag cagagctaat agattaaat gaggaagag cccacacagg ttattaggaa 2400
gataagcatc ttcttatat aaaacaaaac caaaccaaac tggaggaggt ctaccttag 2460
65 ggatggaaga aaagacatt agaggggtca atagaaagg cactgagttt gtgaggtgga 2520

ES 2 401 654 T3

ggactgggag agggcgcaac cgcttact gtctgttt gcctatfff tggggacagc 2580
acatgtcct atffttcca ggatgggcaa tctccagtc caaactgcg gtcgaggact 2640
5 acagtcatff tgcaggtffc ctactgtat ggctfftaa acgtgcaaag gtgaccatta 2700
accgfftcac gctgggaggg cacgtgcggc tcagatgct cctctgactg agggccagga 2760
10 gggggctaca cggaagagc cacacccgca ctgggaaga ctgattgg gcttcagctg 2820
gctgagagc cccagcagc tctcggcta cacctcagc cccgaatgcc tccggccca 2880
taaccctcc ctctaggca ttcggcgga ggaccaccc tcgcccaca cattcgccc 2940
15 catccccgg tctcacctg aatctctaac tctgactca gagtttagag actataacca 3000
gatag 3005
20
<210> 4
<211> 2517
<212> DNA
<213> Cricetulus griseus
25
<400> 4
caaagccata gagaaccct atctcaaaa actgaaaca caacaacaac aaaacaaaat 60
aaaaaaaca caaagaatc ttagtggtc agtggttca cacacaggaa agtagaaag 120
30 gcctgtag ggaggtffc agaggggga gtatggatga gacaggatga tagtgaaaag 180
aactcaaat aattaaat ttgaaacta ctaagaataa aagctaaaat attaaaatt 240
35 acagtcagg agtgggtgg cagagggcta agttggtaga cacagtgaga tccaggccag 300
ccagggtac ctagtgagc ctgttcaaa taactataa aatatacaaa ataaaggaga 360
caccacaata atffgaaat gtaaaagact aaatttacct ttatattga tgagttggat 420
40 aaaaaatca atffaccaga gaacataaag tagtccatc aaagacaaa gcaatatatg 480
attaaactc aatffaaaag ttgttagag cctggcaacg tggcacatac ctffaatccc 540
45 agcaccagg agacagagc catcctggtc taaaaagtga tctccaggac agccatggct 600
attacacaga gaaacctgt ctgaaaaac aaaaattag tgcctatgt taaatgtgt 660
gagtatgct gtcagccac atacagaggt agagggcagt ttatgggagt cagttcctat 720
50 tctcctffa tgggggacct ggggactgaa ctgaggtcat caggctggc agaaagtgca 780
ttagctcag gagcctatc atggcgaaa gctctctca gtagaaaac aatgtgttg 840
ctcatagtc aatcattatg ttctgagag ggaagggtag aatcgtggg gcatgtgtg 900
tcacatctga atagcagtag ctccctagga gaattaatc caagttctt ggtggtgat 960
caatgccct aaaggggtca acaactfff tccctctga caaaactatc ttctatgct 1020
60 ctgtccctc atattgaaag tattttatc ttgcaggtg tgaatatca ttctagcacc 1080
tcagacatg taggtaagta cctacaact caggttaact aatffaatff aactaattff 1140
65 acccaacac ttttcttg ttatccaca ttgtggagt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt 1200

ES 2 401 654 T3

gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt ggcgcgcgcgc ggcgcgcgcgc 1260
atcattctac cttttgttta aaaaatgta gtccaggggt ggggtgcact gtgaaagtct 1320
5 gagggtaact tgctggggtc agttcttcc actataggac agaactccag gtgtcaactc 1380
tttactgaca gaaccatcca aatagcccta tctaatttta gttttttatt tattttttt 1440
10 ttgttttcg agacaggggt tctctgtggc ttggaggct gtctggaac tagctctgt 1500
agaccaggct ggtctcgaac tcagagatcc acctgcctct gcctctgag tgctgggatt 1560
aaaggcatgc gccaccaacg ctggctcta cctaatttta aaagagattg tgtgtcacia 1620
15 ggggtgcatg tcgccctgca accaccccc ccccaaaaaa aaaaaaaaaa aaactcact 1680
gaagctgaag cacgatgatt tggttactct ggctggccaa tgagctctag ggagtctct 1740
20 gtcaaacaga atctcaacag ggcgcagcagt ctttttaaa gtggggttac aacacaggtt 1800
ttgcatatc aggcatttta tctaagctat tcccagcca aaaatgta tttggaggc 1860
agcagagcta atagattaaa atgaggaag agcccacaca ggttattagg aagataagca 1920
25 tctctttat ataaaacaaa accaaaccaa actggaggag gtctaccttt agggatggaa 1980
gaaaagacat ttgaggggtg caatagaaag ggcactgagt ttgtgaggtg gaggactggg 2040
30 agagggcgca accgccttaa ctgtctgtt ttgcctattt ttggggaca gcacatgttc 2100
ctattttcc caggatgggc aatctccacg tccaaactg cggtcgagga ctacagtc 2160
ttgcagggt tccttactgt atggctttta aaactgcaa agtgaccat taaccgttc 2220
35 acgctgggag ggcacgtgcg gctcagatgc ttctctgac tgagggccag gagggggcta 2280
cacggaagag gccacaccg cactgggaa gactcgattt gggctcagc tggctgagac 2340
40 gccccagcag gctcctcggc tacacctca gccccgaatg cctccggcc cataaccctt 2400
ccctttagg cattccggc gaggaccac cctcgcgcca aacattcggc cccatcccc 2460
50 ggtcctcacc tgaatctcta actctgactc cagagtttag agactataac cagatag 2517
45
<210> 5
<211> 1989
<212> DNA
50 <213> Cricetulus griseus
<400> 5
acctttaatc ccagcaccag ggagacagag gccatcctgg tctaaaaagt gatctccagg 60
acagccatgg ctattacaca gagaaacct gtctgaaaa acaaaaaatt agtgtccatg 120
55 tgtaaatgtg tggagtatgc ttgtcatgcc acatacagag gtagagggca gtttatggga 180
gtcagttcct attctcctt tatgggggac ctggggactg aactcaggtc atcaggcttg 240
60 gcagaaagtg cattagctca cggagcctta tcattggcga aagctctctc aagtagaaaa 300
tcaatgtgtt tgctcatagt gcaatcatta tgttcgaga ggggaagggt acaatcgtt 360
gggcatgtgt ggtcacatct gaatagcagt agctccctag gagaattaat tccaagttct 420
65

ES 2 401 654 T3

ttggtgggtg atcaatgccc ttaaaggggt caacaacttt tttccctct gacaaaacta 480
tcttctatg tctctgccc tcatattga agtattttat tctttgcagt gttgaatc 540
5 aattctagca cctcagacat gttaggtgaag taccctacaa ctcagggtaa ctaattaat 600
ttaactaatt taacccaac acttttctt tgtttatcca catttggtga gttgtgtgt 660
gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtcgcgcgcg 720
10 gcgcgcgctc ggatcattct acctttgtt taaaaatgt tagtccagggt gttgggtgca 780
ctgtgaaagt ctgagggtaa ctgtctgggg tcagttctt cactataggt acagaactcc 840
15 aggtgtcaac tcttactga cagaaccatc caaatagccc tatctaatt tagttttta 900
tttattttt tttgtttt cgagacaggg tttctctgtg gctttggagg ctgtcctgga 960
actagctctt gtagaccagg ctggctcga actcagagat ccacctgcct ctgcctcctg 1020
20 agtctctgga taaaggtcat gcgccaccaa cgcttgctc tacctaatt taaaagagat 1080
tgtgtgtcac aagggtgtca tgtcgccctg caaccacccc cccccaaaa aaaaaaaaaa 1140
25 aaaaactca ctgaagctga agcagcatga ttgggtact ctggctggcc aatgagctct 1200
agggagtctc ctgcaaaaca gaatctcaac aggcgagca gttttttta aagtggggtt 1260
acaacacagg ttttgata tcaggcattt tatctaagct atttccagc caaaaatgtg 1320
30 tttttggag gcagcagagc taatagatta aatgagggga agagcccaca caggttatta 1380
ggaagataag catctcttt atataaaaca aaaccaaacc aaactggagg aggtctacct 1440
35 ttaggatgg aagaaaagac atttagaggg tgcaatagaa agggcactga gttgtgagg 1500
tggaggactg ggagagggcg caaccgctt aactgtcctg tttgcctat ttttgggga 1560
cagcacatgt tctattttt cccagatgg gcaatctcca cgtccaaact tgcggtcag 1620
40 gactacagtc atttgcagg tttcttact gtatggctt taaaactgc aaaggtgacc 1680
attaaccgtt tcacgctggg agggcacgtg cggtcagat gcttctctg actgagggcc 1740
45 aggggggggc tacacggaag aggccacacc cgcactggg aagactcag ttgggctca 1800
gctggctgag acgcccagc aggtcctcg gctacacct cagccccgaa tgcctccgg 1860
cccataacc ttccttcta ggcatttccg gcgaggacc acctcgcgc caaacattcg 1920
50 gcccatccc cggctctca cctgaatctc taactctgac tccagagtt agagactata 1980
accagatag 1989
55 <210> 6
<211> 1512
<212> DNA
<213> *Cricetulus griseus*
60 <400> 6
ctatctct atgtcctgt ccctcatatt tgaagtatt tattctttgc agtttgaat 60
atcaattcta gcacctcaga catgttaggt aagtacccta caactcaggt taactaatt 120
65

ES 2 401 654 T3

aatttaacta atttaacccc aacactttt cttgtttat ccacattgt ggagtgtgtg 180
tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgctg 240
5 cgcgcgcgcg ctcggatcat tctacctttt gtttaaaaaa tgtagtcca ggggtgggg 300
gcaactgtgaa agtctgaggg taactgtctg gggtcagttc ttccactat aggacagaac 360
tccagggtgc aactctttac tgacagaacc atccaaatag ccctatctaa ttttagtttt 420
10 ttatttattt atttttgtt ttcgagaca gggtttctct gtggcttgg aggctgtcct 480
ggaactagct ctgtagacc aggctgtct cgaactcaga gatccacctg cctctgcctc 540
15 ctgagtgtgt ggattaaagg catgcccac caacgctgg ctctacctaa ttttaaaga 600
gattgtgtgt cacaagggtg tcatgtgcc ctgcaaccac cccccccca aaaaaaaaaa 660
aaaaaaaaact tcaactgaagc tgaagcacga tgattgggtt actctggctg gccaatgagc 720
20 tctaggaggt ctctgtcaa acagaatctc aacaggcgca gcagtcttt taaagtggg 780
gttacaacac aggttttgc atatcaggca tttatctaa gctatttccc agccaaaaat 840
25 gtgtatttg gaggcagcag agctaataga taaaatgag ggaagagccc acacaggta 900
ttaggaagat aagcatctc tttatataaa acaaaaccaa accaaactgg aggaggctc 960
ccttaggga tgaagaaaa gacattaga ggggtcaata gaaagggcac tgagtgtgtg 1020
30 aggtggagga ctgggagagg gcgcaaccgc ttaactgtc ctgtttgccc tatttttgg 1080
ggacagcaca tgttctatt tttccagga tgggcaatct ccacgtcaa acttgctgctc 1140
35 gaggactaca gtcatttgc aggttctt actgtatggc ttttaaacg tgcaaagggt 1200
accattaacc gttcacgct gggagggcac gtgctgctca gatgcttct ctgactgagg 1260
gccaggaggg ggctacacgg aagaggccac acccgactt ggaagactc gatttgggt 1320
40 tcagctggct gagacgccc agcaggctcc tcggctacac cttagcccc gaatgcctc 1380
cggccataa ccttccctt ctaggcattt ccggcgagga cccaccctg cgccaaacat 1440
45 tcggcccat cccccgttc tcaactgaat cttaactct gactccagag ttagagact 1500
ataaccagat ag 1512

50 <210> 7
<211> 1013
<212> DNA
<213> Cricetulus griseus

55 <400> 7
caggctgtgc tcgaactcag agatccacct gcctctgct cctgagtgtc gggattaaag 60
gcatgcccga ccaacgctg gctctaccta attttaaag agattgtgtg tcacaagggt 120
60 gtcattgtgc cctgcaacca cccccccc aaaaaaaaaa aaaaaaaaaac ttactgaag 180
ctgaagcacg atgatttgg tactctggct ggccaatgag cttagggag tctctgtca 240
aacagaatct caacaggcgc agcagtctt ttaaagtgg gttacaaca caggttttg 300
65

ES 2 401 654 T3

catatcaggc atttatcta agctatttcc cagccaaaaa tgtgtatfff ggaggcagca 360
 gagctaatag attaaaaatga gggaagagcc cacacagggt attaggaaga taagcatctt 420
 5 ctttatataa aacaaaacca aaccaaaactg gaggagggtct accttaggg atggaagaaa 480
 agacatttag aggggtgcaat agaaagggca ctgagttgt gaggtggagg actgggagag 540
 ggcgcaaccg cttaactgt cctgtttgc ctatffffg gggacagcac atgttctat 600
 10 tttcccagg atgggcaatc tccacgtcca aactgcggt cgaggactac agtcattttg 660
 caggttct tactgtatgg ctttaaaac gtgcaaagg gaccattaac cgtttcacgc 720
 15 tgggagggca cgtgcgctc agatgcttcc tctgactgag ggccaggagg gggctacacg 780
 gaagaggcca caccgcact tgggaagact cgattgggc ttcagctggc tgagacgccc 840
 cagcaggctc ctggctaca cctcagccc cgaatgcctt ccggcccata acccttccct 900
 20 tctaggcatt tccggcgagg acccacctc gcgcaaaca ttcggccca tccccggtc 960
 ctcacctgaa tctctaact tgactccaga gtttagagac tataaccaga tag 1013
 25
 <210> 8
 <211> 381
 <212> DNA
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> mutante/mutación puntual en una secuencia de *Cricetulus griseus*
 <400> 8
 35 cttgcggtgc aggactacag tcattttgca ggttcctta ctgtatggct ttaaaacgt 60
 gcaaaggga ccattaaccg ttcacgctg ggagggcagc tgcggctcag atgcttctc 120
 tgactgaggg ccaggagggg gctacacgga agaggccaca cccgacttg ggaagactcg 180
 40 atttgggctt cagctggctg agacgcccc gcaggctcct cggctacacc ttcagccccg 240
 aatgcctcc ggcccataac ccttccctc taggcattc cggcgaggac ccacctcgc 300
 45 gccaacatt cgccccatc ccccggtct cacctgaatc tctaacttg actccagagt 360
 ttagcgacta taaccagata g 381
 50
 <210> 9
 <211> 529
 <212> DNA
 <213> *Cricetulus griseus*
 55
 <400> 9
 gcctgaagac ctgagttgat acccagaacc cagatcaaga tggaggagag aaccagcccc 60
 actaagctgt cccctgacct ccataaatgc ctccctgtcc agttatgcca cacaatgata 120
 60 ggtgaataca gaaaaacacc cttccttag aactaagcg gattccttt acgcatacca 180
 gtaagtgat agttcttag ctcaactca gcacttaaa aagttatata tttgcaatgc 240
 tggggactaa attaggggtg tgcacatgct aagtaagcac tctactttg taccacatt 300
 65

ES 2 401 654 T3

taataattgt aagaattaat tcgtgaaata gtagctgaga caatagattt gtttcttca 360
 tgtgggaact gctgtgtgtg cttcttgctg atgcaaaciaa ggtcaaatac ttattcccc 420
 5 agtgtctgcc tagccctgta acacttctct attatacaat gaccacaaat aattaggtga 480
 gtgggttttg tttcatttta aattgttgct attttagaga caggatttc 529

 10 <210> 10
 <211> 1015
 <212> DNA
 <213> Cricetulus griseus

 15 <400> 10
 gcctgaagac ctgagttgat acccagaacc cagatcaaga tggaggagag aaccagcccc 60
 actaagctgt cccctgacc ccataaatgc ctccctgtcc agttatgcca cacaatgata 120
 20 ggtgaataca gaaaaacacc cttccttag acactaagcg gattcctctt acgcatacca 180
 gttaagtgat agttcttagg cttcaactca gcactttaa aagttatat ttgcaatgc 240
 tggggactaa attaggggtg tgcacatgct aagtaagcac tctacttttg taccacatt 300
 25 taataattgt aagaattaat tcgtgaaata gtagctgaga caatagattt gtttcttca 360
 tgtgggaact gctgtgtgtg cttcttgctg atgcaaaciaa ggtcaaatac ttattcccc 420
 30 agtgtctgcc tagccctgta acacttctct attatacaat gaccacaaat aattaggtga 480
 gtgggttttg tttcatttta aattgttgct attttagaga caggatttct tgcaaacctg 540
 gttggtctta aactccgat gtagctgaga atgacctga aaaccttct gtcccacccc 600
 35 tcaaattcca gaattataga caccaccac atggcttaat aagtaaciaa caacaataaa 660
 agcatgactt ctgggtctgg agggagggtg tgccagttaa gagcaatgga tactttcca 720
 40 tagaacctgg gtttactcc cagcactaac ctacatggtg atagtatgc agcagacata 780
 catgagggca acacacacat gggcacatac acacgcacc gccaccatg gctttcccc 840
 catcacttag acagccatat ttaaactgag tggagccagg ctgggtgtg ggcccacacc 900
 45 ttaattcca gcactccaga aggcagaggt aggcgatct ctgtgggtt gagaccagcc 960
 tggctaciaa gagctagttc caggacagcc tcaaagcca tagagaaacc ctatc 1015

 50 <210> 11
 <211> 1541
 <212> DNA
 <213> Cricetulus griseus

 55 <400> 11
 gcctgaagac ctgagttgat acccagaacc cagatcaaga tggaggagag aaccagcccc 60
 actaagctgt cccctgacc ccataaatgc ctccctgtcc agttatgcca cacaatgata 120
 60 ggtgaataca gaaaaacacc cttccttag acactaagcg gattcctctt acgcatacca 180
 gttaagtgat agttcttagg cttcaactca gcactttaa aagttatat ttgcaatgc 240
 65 tggggactaa attaggggtg tgcacatgct aagtaagcac tctactttg taccacatt 300

ES 2 401 654 T3

taataattgt aagaattaat tcgtgaaata gtagctgaga caatagattt gtttcttca 360
 5 tgtgggaact gctgtgtgtg cttcttgctg atgcaaaciaa ggtcaaatac tttattcccc 420
 agtgtctgcc tagccctgta acacttctct attatacaat gaccacaaat aattagggtga 480
 gtggggtttg tttcatttta aattgttctt attttagaga caggatttct tgcaaacctg 540
 10 gtttgtctta aactccgtat gtagctgaga atgacctga aaaccttctt gtcccacccc 600
 tcaaattcca gaattataga cacccaccac atggcttaat aagtaaaciaa caacaataaa 660
 15 agcatgactt ctgggtctgg agggagggtt tgccagttaa gagcaatgga tactttccca 720
 tagaacctgg gtttgactcc cagcactaac ctacatggtg atagtgatgc agcagacata 780
 catgagggca acacacacat gggcacatac acacgcaccc gccaccatg gcttttcccc 840
 20 catcacttag acagccatat ttaaactgtag tggagccagg ctggggtggt ggcccacacc 900
 ttaattccca gactccaga aggcagaggt aggcggatct ctgtgggtt gagaccagcc 960
 25 tggctacaa gagctagttc caggacagcc tcaaagcca tagagaaacc ctatctcaa 1020
 aaactgaaac aacaaciaa acaaaaciaa ataaaaaac aaaaaagaa tcttagtgg 1080
 tcagtgggtc cacacacagg aaagtagaaa gggccttgat gggaaggtt tcagaggag 1140
 30 gagtatggat gagacaggat gatagtgaaa agaactcaaa ttaattaaat attgaaact 1200
 atctaagaat aaaagctaaa atattaaaa ttacagttag gtagtgggtg tgcagagggc 1260
 taagtggta gacacagtga gatccaggcc agccagggtt acctagttag acctgttca 1320
 35 aataactaat aaaatataca aaataaagga gacaccaciaa taatttgaa atgtaaaaga 1380
 ctaaatttac cttttatatt gatgagttgg ataaaaaat caattacca gagaacataa 1440
 40 agtagtccca tcaaagaciaa aagcaatata tgattaaact ctaattaaa agttgttag 1500
 agcctggcaa cgtggcacat accttaac ccagcaccag g 1541
 45 <210> 12
 <211> 2020
 <212> DNA
 <213> Cricetulus griseus
 50 <400> 12
 gcctgaagac ctgagttgat acccagaacc cagatcaaga tggaggagag aaccagcccc 60
 actaagctgt cccctgacc ccataaatgc ctcctgtcc agttatgcca cacaatgata 120
 55 ggtgaataca gaaaaacacc ctcctttag aactaagcg gattcctctt acgcatacca 180
 gttaagtgat agttcttagg ctcaactca gcactttaa aagttatat tttgcaatgc 240
 60 tggggactaa attagggttgc tgcacatgct aagtaagcac tctactttg tatcacattt 300
 taataattgt aagaattaat tcgtgaaata gtagctgaga caatagattt gtttcttca 360
 tgtgggaact gctgtgtgtg cttcttgctg atgcaaaciaa ggtcaaatac tttattcccc 420
 65 agtgtctgcc tagccctgta acacttctct attatacaat gaccacaaat aattagggtga 480

ES 2 401 654 T3

gtgggtttg tttcattta aattgttgc attttagaga caggatttct tgcaaacctg 540
gttggtcta aactccgat gtagctgaga atgacctga aaaccttct gtcccacccc 600
5 tcaaattcca gaattataga cacccaccac atggctaat aagtaaaca caacaataa 660
agcatgactt ctgggtctgg agggagggtc tgccagttaa gagcaatgga tactttcca 720
10 tagaacctgg gttgactcc cagcactaac ctacatggtg atagtgatgc agcagacata 780
catgagggca acacacacat gggcacatac acacgcaccc gccaccatg gctttcccc 840
catcacttag acagccatat ttaaacttag tggagccagg ctggggtggt ggcccacacc 900
15 ttaatccca gcactccaga aggcagaggt aggcggatct ctgtgggtt gagaccagcc 960
tggctacaa gagctagttc caggacagcc tcaaagcca tagagaaacc ctatctcaa 1020
20 aaactgaaac aacaacaaca acaaaacaaa ataaaaaac acaaaaagaa tcttagtgg 1080
tcagtggtc cacacacagg aaagtagaaa ggccttgat gggaaggtt tcagagggag 1140
gagtatggat gagacaggat gatagtgaaa agaactcaaa ttaattaaat attgaaact 1200
25 atctaagaat aaaagctaaa atattaaaa ttacagtcag gtagtgggtg gcagagggc 1260
taagtggta gacacagtga gatccaggcc agccagggtc acctagttag acctgttca 1320
30 aataactaat aaaatataca aaataaagga gacaccacaa taatttgaa atgtaaaaga 1380
ctaaattac cttttatatt gatgagttg ataaaaaat caattacca gagaacataa 1440
agtagtcca tcaaagacaa aagcaatata tgattaaact ctaattaaa agttgttag 1500
35 agcctggcaa cgtggcacat accttaatc ccagcaccag ggagacagag gccatcctg 1560
tctaaaaagt gatctccagg acagccatg ctattacaca gagaaacct gtctggaaaa 1620
40 acaaaaaat agtgccatg tgtaaatg tggagtatgc ttgtcatgcc acatacagag 1680
gtagagggca gttatggga gtcagttct atttctctt tatgggggac ctggggactg 1740
aactcaggtc atcaggctg gcagaaagt cattagtca cggagcctta tcattggcga 1800
45 aagctctc aagtagaaa tcaatgtt tgctcatagt gcaatcatta tgttcgaga 1860
ggggaagggt acaatcgtg gggcatgtg ggtcacatct gaatagcagt agtccctag 1920
50 gagaattaat tcaaagtct ttggtggtg atcaatgcc taaagggt caacaactt 1980
tttccctct gacaaaacta tcttctatg tcttgtccc 2020

55 <210> 13
<211> 2516
<212> DNA
<213> *Cricetulus griseus*

60 <400> 13
gcctgaagac ctgagttgat acccagaacc cagatcaaga tggaggagag aaccagcccc 60
actaagctgt ccctgaccc ccataaatgc ctccctgtcc agttatgcca cacaatgata 120
65 ggtgaataca gaaaaacacc ctccttag acactaagcg gattcctct acgcatacca 180

ES 2 401 654 T3

gttaagtgat agttcttagg cttcaactca gcactttaa aagttatata tttgcaatgc 240
 tggggactaa attaggggtg tgcacatgct aagtaagcac tctactttg taccacattt 300
 5 taataattgt aagaattaat tcgtgaaata gtagctgaga caatagattt gtttcttca 360
 tgtgggaact gctgtgtgtg cttcttgctg atgcaaaciaa ggtaaaatac ttattcccc 420
 10 agtgtctgcc tagccctgta acacttctct attatacaat gaccacaaat aattaggtga 480
 gtgggtttg ttcatftta aattgttct attttagaga caggatttct tgcaaacctg 540
 gttgtctta aactccgat gtagctgaga atgacctga aaaccttct gtcccacccc 600
 15 tcaaatcca gaattataga caccaccac atggctaat aagtaaaciaa caacaataaa 660
 agcatgactt ctgggtctgg agggagggt tgcaggtta gagcaatga tactttcca 720
 20 tagaacctgg gttgactcc cagcactaac ctacatggtg atagtgatgc agcagacata 780
 catgagggca acacacacat gggcacatac acacgaccc gccaccatg gctttcccc 840
 catcacttag acagccatat ttaaactgag tggagccagg ctgggtgtg ggcccacacc 900
 25 ttaattcca gcactccaga aggcagaggt aggcgatct ctgtgggtt gagaccagcc 960
 tggctaciaa gagctagttc caggacagcc tcaaagcca tagagaaacc ctatctaaa 1020
 30 aaactgaaac aacaaciaa acaaaaciaa ataaaaaac acaaaaagaa tcttagtgtt 1080
 tcagtgttc cacacacagg aaagtagaaa gggccttgat gggaaggtt tcagaggag 1140
 gagtatgat gagacaggat gatagtgaia agaactcaaa ttaattaaat attgaaact 1200
 35 atctaagaat aaaagctaaa atattaaaa ttacagttag gtagtgtgtg tgcagagggc 1260
 taagtgtga gacacagta gatccaggcc agccagggt acctagttag acctgttca 1320
 40 aataactaat aaaatataca aaataaagga gacaccacia taatttgaa atgtaaaaga 1380
 ctaaattac cttttatatt gatgagttg ataaaaaat caattacca gagaacataa 1440
 agtagtcca tcaaagacia aagcaatata tgattaaact ctaattaaa agttgttag 1500
 45 agcctggcaa cgtggacat accttaac ccagcaccag ggagacagag gccatcctgg 1560
 tctaaaaagt gatctccagg acagccatg ctattacaca gagaaacct gtctgaaaa 1620
 50 acaaaaaatt agtgccatg tgtaaatgt tggagtatgc ttgtcatgcc acatacagag 1680
 gtagagggca gttatggga gtcagttct atttctctt tatgggggac ctggggactg 1740
 aactcaggtc atcaggctt gcagaaagt cattagctca cggagccta tcattggcga 1800
 55 aagctctctc aagtagaaaa tcaatgtt ttctcatagt gcaatcatta ttttcgaga 1860
 ggggaagggt acaatcgtt gggcatgtt ggtcacatct gaatagcagt agtccctag 1920
 60 gagaattaat tcaagtct ttggtgtg atcaatgcc taaaggggt caacaactt 1980
 tttccctct gacaaaacta tcttctatg tctgtccc tcatattga agtatttat 2040
 tcttgcagt gttgaatac aattctaga cctcagacat gttaggaag taccctacia 2100
 65

ES 2 401 654 T3

ctcaggttaa ctaattaat ttaactaatt taacccaac acttttctt tgttatcca 2160
 catttggga gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt 2220
 5 gtgtgtgtgt gtgcgcgcgc gcgcgcgcgc ggatcattct accttttgtt taaaaaatgt 2280
 tagtccaggg gtgggggtgca ctgtgaaagt ctgagggtaa ctgctgggg tcagttcttt 2340
 ccactatagg acagaactcc aggtgtcaac tctttactga cagaacctc caaatagccc 2400
 10 tatctaatt tagttttta ttatttatt tttgtttt cgagacaggg tttctctgtg 2460
 gctttggagg ctgtcctgga actagctctt gtagaccagg ctggtctgca actcag 2516
 15 <210> 14
 <211> 3148
 <212> DNA
 <213> Cricetulus griseus
 20 <400> 14
 gcctgaagac ctgagttgat acccagaacc cagatcaaga tggaggagag aaccagcccc 60
 actaagctgt cccctgacc ccataaatgc ctccctgtcc agttatgcca cacaatgata 120
 25 ggtgaataca gaaaaacacc ctcccttag acactaagcg gattcctctt acgcatacca 180
 gttaagtgat agttcttagg ctcaactca gcactttaa aagttatat ttgcaatgc 240
 30 tggggactaa attaggggtg tgcacatgct aagtaagcac tctactttg tatcacattt 300
 taataattgt aagaattaat tcgtgaaata gtagctgaga caatagattt gtttcttca 360
 tgtgggaact gctgtgtgtg ctctgtctg atgcaaaca ggtcaaatac ttattcccc 420
 35 agtgtctgcc tagccctgta acacttctct attatacaat gaccacaaat aattaggtga 480
 gtgggtttg tttcatttta aattgttct attttagaga caggatttct tgcaaacctg 540
 40 gttggtcta aactccgtat gtagctgaga atgacctga aaaccttct gtcccacccc 600
 tcaaattcca gaattataga caccaccac atggctaat aagtaaaca caacaataa 660
 agcatgactt ctgggtctgg agggagggtc tgccagttaa gagcaatgga tactttcca 720
 45 tagaacctgg gttgactcc cagcactaac ctacatggtg atagtgatgc agcagacata 780
 catgagggca acacacacat gggcacatac acacgcacc gccaccatg gctttcccc 840
 50 catcacttag acagccatat ttaaactgtag tggagccagg ctggggtggt ggcccacacc 900
 tttatccca gcactccaga aggcagaggt aggcggatct ctgtgggtt gagaccagcc 960
 tggctacaa gagctagttc caggacagcc tcaaagcca tagagaaacc ctatctcaa 1020
 55 aaactgaaac aacaacaaca acaaaacaaa ataaaaaac acaaaaagaa tcttagtgg 1080
 tcagtgggtc cacacacagg aaagtagaaa ggccttgat ggaaggtt tcagagggag 1140
 60 gagtatggat gagacaggat gatagtgaaa agaactcaaa ttaattaaat attgaaact 1200
 atctaagaat aaaagctaaa atattfaaa ttacagtcag gtagtgggtg gcagagggc 1260
 taagttgta gacacagtga gatccagccc agccagggtc acctagttag acctgttca 1320
 65

ES 2 401 654 T3

aataactaat aaaatataca aaataaagga gacaccacaa taattttgaa atgtaaaaga 1380
ctaaatttac cttttatatt gatgagttgg ataaaaaaat caatttacca gagaacataa 1440
5 agtagtccca tcaaagacaa aagcaatata tgattaaact ctaatttaaa agtttgtag 1500
agcctggcaa cgtggcacat accttaatc ccagcaccag ggagacagag gccatcctgg 1560
tctaaaaagt gatctccagg acagccatgg ctattacaca gagaaaccct gtctggaaaa 1620
10 acaaaaaatt agtgcctatg tgtaaattg tgagatgct ttgcatgcc acatacagag 1680
gtagagggca gtttatggga gtcagtctct atttctctt tatgggggac ctggggactg 1740
15 aactcaggtc atcaggcttg gcagaaagtg cattagctca cggagcctta tcattggcga 1800
aagctctctc aagtagaaa tcaatgtgt tgctcatagt gcaatcatta tgttcgaga 1860
ggggaagggt acaatcgtg gggcatgtg ggtcacatct gaatagcagt agtccctag 1920
20 gagaattaat tccaagtct ttggtggtg atcaatgcc taaaggggt caacaacttt 1980
tttctctc gacaaaacta tcttctatg tcttctcc tcatattga agtattttat 2040
25 tcttgcagt gttgaatc aatttagca cctcagacat gtaggtaag taccctaca 2100
ctcagggtta ctaattta ttaactaatt taaccacaac acttttctt tgttatcca 2160
catttgga gtgtgtgt gtgtgtgt gtgtgtgt gtgtgtgt gtgtgtgt 2220
30 gtgtgtgt gtgcgcgc gcgcgcgc ggatcattct acctttgtt taaaaatgt 2280
tagtccagg gtgggtgca ctgtaaagt ctgagggtta ctgctggg tcagttctt 2340
35 ccactatagg acagaactcc aggtgtcaac tcttactga cagaaccatc caaatagccc 2400
tatctaatt tagttttta tttattat tttgtttt cgagacaggg ttctctgtg 2460
gctttggagg ctgtctgga actagctct gtagaccag ctggtctga actcagagat 2520
40 ccacctgcct ctgcctctg agtgcggga ttaaaggcat gcgccacaa cgcttgctc 2580
tacctaatt taaaagagat tgtgtgtcac aagggtgtca tgcgcctg caaccaccc 2640
45 cccccaaaa aaaaaaaaa aaaaactca ctgaagctga agcacgatga tttggtact 2700
ctggctggcc aatgagctct agggagtctc ctgcaaaca gaatctaac aggcgagca 2760
gtcttttta aagtggggtt acaacacagg ttttgcata tcaggcattt tatctaagct 2820
50 atttccagc caaaaatgt tattttggag gcagcagagc taatagatta aatgagga 2880
agagcccaca caggttatta ggaagataag catctctt atataaaca aaaccaaacc 2940
55 aaactggagg aggtctacct ttaggatgg aagaaaagac atttagagg tgcaatagaa 3000
agggcactga gtttgtagg tggaggactg ggagaggcg caaccgctt aactgtcctg 3060
tttgcctat ttttggga cagcacatgt tctattttt cccaggatgg gcaatctca 3120
60 cgtccaaact tgcggtcgag gactacag 3148

<210> 15

65 <211> 511

ES 2 401 654 T3

<212> DNA
<213> Cricetulus griseus

<400> 15

5 gttgctatt tagagacagg atttctgca aacctggtg gtctaaact ccgatgtag 60
ctgagaatga cctgaaaac ctctctgtcc caccctcaa attccagaat tatagacacc 120
caccacatgg ctaataagt aaacaacaac aataaaagca tgacttctgg gtctggaggg 180
10 agggctgcc agttaagagc aatggatact ttccataga acctgggtt gactcccagc 240
actaacctac atggtgatag tgatgcagca gacatacatg agggcaacac acacatgggc 300
15 acatacacac gcacccgccc accatggctt tccccatc acttagacag ccatatftaa 360
acgtagtgga gccaggctgg ggtggtggcc cacacctta atccagcac tccagaaggc 420
agaggtaggc ggatctctgt gggttgaga ccagcctgt ctacaagagc tagtccagg 480
20 acagcctcca aagccataga gaaacctat c 511

<210> 16
<211> 549
<212> DNA
<213> Cricetulus griseus

<400> 16

30 caaagccata gagaaccct atctcaaaaa actgaaacaa caacaacaac aaaacaaaat 60
aaaaaaacaa caaaagaatc ttagtggttc agtggttcca cacacaggaa agtagaaagg 120
gccttgatgg gaaggtttc agaggaggga gtatggatga gacaggatga tagtgaaaag 180
35 aactcaaatt aattaatat tgaaactat ctaagaataa aagctaaaat atttaaaatt 240
acagtcaggt agtgggtgtg cagagggcta agtggtaga cacagtgaga tccaggccag 300
40 ccagggtcac ctatgagac ctgttcaaa taactaataa aatatacaaa ataaaggaga 360
caccacaata atttgaaat gtaaaagact aaatttacct ttatattga tgagttggat 420
aaaaaaatca atftaccaga gaacataaag tagtccatc aaagacaaaa gcaatatatg 480
45 attaaactt aatttaaag ttgttagag cctggcaacg tggcacatac ctftaatccc 540
agcaccagg 549

<210> 17
<211> 1037
<212> DNA
<213> Cricetulus griseus

<400> 17

55 gttgctatt tagagacagg atttctgca aacctggtg gtctaaact ccgatgtag 60
ctgagaatga cctgaaaac ctctctgtcc caccctcaa attccagaat tatagacacc 120
60 caccacatgg ctaataagt aaacaacaac aataaaagca tgacttctgg gtctggaggg 180
agggctgcc agttaagagc aatggatact ttccataga acctgggtt gactcccagc 240
65 actaacctac atggtgatag tgatgcagca gacatacatg agggcaacac acacatgggc 300

ES 2 401 654 T3

acatacacac gcacccgccc accatggctt ttccccatc acttagacag ccatatthaa 360
acgtagtgga gccaggctgg ggtggggcc cacacctta atcccagcac tccagaaggc 420
5 agaggtaggc ggatctctgt gggttgaga ccagcctgt ctacaagagc tagtccagg 480
acagcctcca aagccataga gaaacccat ctcaaaaaac tgaacaaca acaacaaca 540
10 aacaaaataa aaaaacaaca aaagaatctt agtggttcag tggttccaca cacaggaaag 600
tagaaagggc ctgatggga aggtttcag agggaggagt atggatgaga caggatgata 660
gtgaaaagaa ctcaaattaa ttaatattt gaaactatct aagaataaaa gctaaaatat 720
15 ttaaaattac agtcaggtag tgggtgtca gagggctaag ttgtagaca cagtgagatc 780
caggccagcc agggctacct agtgagacct tgtcaaata actaataaaa tatacaaat 840
20 aaaggagaca ccacaataat ttgaaatgt aaaagactaa attaccttt tatattgatg 900
agttgataa aaaaatcaat ttaccagaga acataaagta gtccatcaa agacaaaagc 960
aatatatgat taaactctaa ttaaaagtt tgtagagcc tggcaacgtg gcacatacct 1020
25 ttaatccag caccagg 1037

<210> 18
30 <211> 500
<212> DNA
<213> *Cricetulus griseus*

<400> 18
35 accttaatc ccagcaccag ggagacagag gccatcctgg tctaaaaagt gatctccagg 60
acagccatgg ctattacaca gagaaacct gtctggaaaa acaaaaaatt agtgtccatg 120
tgtaaatgtg tggagatgc ttgtcatgcc acatacagag gtagaggga gtttatggga 180
40 gtcagttcct attcttctt tatgggggac ctggggactg aactcaggtc atcaggcttg 240
gcagaaagtg cattagctca cggagcctta tcattggcga aagctctctc aagtagaaaa 300
45 tcaatgtgtt tgctcatagt gcaatcatta tgtttcgaga ggggaagggt acaatcgtg 360
gggcatgtgt ggtcacatct gaatagcagt agctccctag gagaattaat tccaagttct 420
ttggtgtgt atcaatgcc taaaggggt caacaacttt tttccctct gacaaaacta 480
50 tcttctatg tcttgtccc 500

<210> 19
55 <211> 1028
<212> DNA
<213> *Cricetulus griseus*

<400> 19
60 caaagccata gagaacccct atctcaaaaa actgaaacaa caacaacaac aaaacaaaat 60
aaaaaaacaa caaaagaatc ttagtgggtc agtggttcca cacacaggaa agtagaaagg 120
gcctgatgg gaaggtttc agagggagga gtatggatga gacaggatga tagtgaaaag 180
65

ES 2 401 654 T3

aactcaaatt aattaaatat ttgaaactat ctaagaataa aagctaaaa atttaaatt 240
acagtcaggt agtgggtggg cagagggcta agttggtaga cacagtgaga tccaggccag 300
5 ccagggctac ctagtggagac ctgttcaaa taactaataa aatatacaaa ataaaggaga 360
caccacaata atttgaaat gtaaaagact aaatttacct ttatattga tgagttggat 420
aaaaaaaaatca atttaccaga gaacataaag tagtcccatc aaagacaaaa gcaatatatg 480
10 attaaactct aatttaaag ttgttagag cctggcaacg tggcacatac cttaatccc 540
agcaccaggg agacagaggg catcctggtc taaaaagtga tctccaggac agccatggct 600
15 attacacaga gaaaccctgt ctggaaaaac aaaaaattag tgtccatgtg taaatgtgtg 660
gagtatgctt gtcagtccac atacagaggt agagggcagt ttatgggagt cagttcctat 720
tcttcttta tgggggacct ggggactgaa ctcaggctat caggctggc agaaagtgca 780
20 ttagctcag gagcctatc attggcgaaa gctctctca gtagaaaac aatgtgttg 840
ctcatatgc aatcattatg ttccgagagg ggaagggtag aatcgtggg gcatgtgtg 900
25 tcacatctga atagcagtag ctccctagga gaattaattc caagttctt ggtggtgat 960
caatgccctt aaaggggtca acaactttt ttccctctga caaaactatc ttctatgct 1020
ctgtccc 1028
30
<210> 20
<211> 1516
<212> DNA
35 <213> *Cricetulus griseus*
<400> 20
gttgctatt tagagacagg atttctgca aacctggtg gtcttaact ccgatgtag 60
40 ctgagaatga cctgaaaac ctccctgccc caccctcaa attccagaat tatagacacc 120
caccacatgg ctaataagt aaacaacaac aataaaagca tgacttctgg gtctggaggg 180
agggctgccc agttaaagac aatggatact ttccataga acctgggtt gactcccagc 240
45 actaacctac atggtgatg tgatcgagca gacatacatg agggcaacac acacatgggc 300
acatacacac gcaccgccc accatggctt tccccatc acttagacag ccatattta 360
50 acgtagtga gccaggctgg ggtggtggcc cacacctta atcccagcac tccagaaggc 420
agaggtaggg gcatctctgt gggttgaga ccagcctgt ctacaagagc tagtccagg 480
acagcctcca aagcataga gaaaccctat ctcaaaaaac tgaacaaca acaacaaca 540
55 aacaaaataa aaaaacaaca aaagaatctt agtggttcag tggttccaca cacaggaaag 600
tagaaagggc ctgatggga aggtttcag agggaggagt atggatgaga caggatgata 660
60 gtgaaaagaa ctcaaatata ttaaatattt gaaactatc aagaataaaa gctaaatat 720
ttaaaattac agtcaggtag tgggtgca gagggctaag ttgtagaca cagtgagatc 780
caggccagcc agggctacct agtgagacct tgtcaata actaataaaa tatacaaat 840
65

ES 2 401 654 T3

aaaggagaca ccacaataat ttgaaatgt aaaagactaa atttaccttt tatattgatg 900
agttggataa aaaaatcaat ttaccagaga acataaagta gtcccatcaa agacaaaagc 960
5 aatatatgat taaactctaa tttaaaagtt tgtagagcc tggcaacgtg gcacatacct 1020
ttaatcccag caccagggag acagaggcca tcttggtcta aaaagtgatc tccaggacag 1080
ccatggctat tacacagaga aaccctgtct ggaaaaacaa aaaattagtg tccatgtgta 1140
10 aatgtgtgga gtatgcttgt catgccacat acagaggtag agggcagttt atgggagtca 1200
gttcctattc ttccttatg ggggacctgg ggactgaact caggatca ggcctggcag 1260
15 aaagtgcatt agctcacgga gccttatcat tggcgaagc tctctcaagt agaaaatcaa 1320
tgtgttct catagtcaa tcattatgt tcgagagggg aagggtacaa tcgttggggc 1380
atgtgtggtc acatctgaat agcagtagct ccctaggaga attaattcca agttcttgg 1440
20 tgggtatca atgccctaa aggggtcaac aactttttt cccttgaca aaactatctt 1500
cttatgtcct tgtccc 1516
25 <210> 21
<211> 381
<212> DNA
<213> Cricetulus griseus
30 <400> 21
cttgcggtcg aggactacag tcattttgca ggttcctta ctgtatggct tttaaacgt 60
gcaaaggatga ccattaaccg tttcacgctg ggagggcagc tgcggctcag atgcttctc 120
35 tgactgaggg ccaggagggg gctacacgga agaggccaca cccgcacttg ggaagactcg 180
atgtggctt cagctggctg agacgcccc gcaggctctt cggctacacc ttcagccccg 240
40 aatgcctcc ggccataac ccttccctc taggcattc cggcgaggac ccaccctcgc 300
gccaacatt cggccccatc ccccgctct cacctgaatc tctaactctg actccagagt 360
45 ttagagacta taaccagata g 381
<210> 22
<211> 34
<212> DNA
50 <213> Artificial
<220>
<223> cebador
55 <400> 22
ctatgaggat cgcctgaag acctgagttg atac 34
60 <210> 23
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
65 <223> cebador

ES 2 401 654 T3

<400> 23
tatgcaggat ccgttgctat ttagagaca ggatttc 37

5
<210> 24
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

10
<220>
<223> cebador

<400> 24
15 tatgcaggat cccaaagcca tagagaaacc ctatc 35

<210> 25
<211> 33
20 <212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> cebador

25
<400> 25
tatgcaggat ccaccttaa tcccagcacc agg 33

30
<210> 26
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

35
<220>
<223> cebador

<400> 26
40 ctatgaggat ccctatcttc ttatgtcctt gtccc 35

<210> 27
<211> 32
<212> DNA
45 <213> Artificial

<220>
<223> cebador

50
<400> 27
tatgcaggat cccaggctgg tctcgaactc ag 32

<210> 28
55 <211> 32
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
60 <223> cebador

<400> 28
ctatgaggat cccttgcggt cgaggactac ag 32

65

ES 2 401 654 T3

<210> 29
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> cebador
 <400> 29
 10 ctatgatgta cagcctgaag acctgagttg atac 34
 <210> 30
 <211> 39
 15 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 20
 <400> 30
 attgcatgta cactatctgg ttatagtctc taaactctg 39
 <210> 31
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> cebador
 <400> 31
 30 atagcatgta cagaaatcct gtctctaaaa tagcaac 37
 35
 <210> 32
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> cebador
 <400> 32
 45 atagcatgta cagatagggt ttctctatgg ctttg 35
 <210> 33
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> cebador
 <400> 33
 55 atacgatgta cacctgggtc tgggattaaa ggt 33
 60
 <210> 34
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial
 65

ES 2 401 654 T3

<220>
 <223> cebador

 <400> 34
 5 atagcatgta cagggacaag gacataagaa gatag 35

 <210> 35
 <211> 32
 10 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador
 15
 <400> 35
 tagttatgta cactgagttc gagaccagcc tg 32

 20 <210> 36
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial

 25 <220>
 <223> cebador

 <400> 36
 30 atagcatgta cactgtagtc ctcgaccgca ag 32

 <210> 37
 <211> 33
 35 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador
 40
 <400> 37
 atacgaggat ccctggtgc tgggattaa ggt 33

 <210> 38
 <211> 35
 45 <212> DNA
 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador
 50
 <400> 38
 atagcaggat ccgatagggt ttctctatgg ctttg 35

 55 <210> 39
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial
 60
 <220>
 <223> cebador

 <400> 39
 65 ctccacacat ttacacatgg acac 24

ES 2 401 654 T3

5	<210> 40 <211> 24 <212> DNA <213> Artificial		
10	<220> <223> cebador	<400> 40 gggtttctct gtgtaatagc catg	24
15	<210> 41 <211> 24 <212> DNA <213> Artificial		
20	<220> <223> cebador		
25	<400> 41 atctcactgt gtctaccaac ttag		24
30	<210> 42 <211> 22 <212> DNA <213> Artificial		
35	<220> <223> cebador		
35	<400> 42 tctgcaccac cactacctga ct		22
40	<210> 43 <211> 28 <212> DNA <213> Artificial		
45	<220> <223> cebador		
50	<400> 43 ctaagagtac ttgccatgag agcctgaa		28
55	<210> 44 <211> 25 <212> DNA <213> Artificial		
60	<220> <223> cebador		
60	<400> 44 cattgatata ccaccaaaga acttg		25

REIVINDICACIONES

1. Ácido nucleico que contiene TE-13 (SEQ ID N° 15) o un fragmento de TE-13 (SEQ ID N° 15) o sus secuencias de nucleótidos complementarias o un derivado de TE-13 (SEQ ID N° 15) o sus secuencias de nucleótidos complementarias, en donde el ácido nucleico, el fragmento, el derivado o sus secuencias de nucleótidos complementarias conduce, en el caso de una integración cromosómica, a un aumento de la transcripción o bien de la expresión de un gen de interés en un sistema de expresión, y en donde el derivado presente una identidad de la secuencia de al menos el 85%.
2. Ácido nucleico que contiene TE-08 (SEQ ID N° 10) o un fragmento de TE-08 (SEQ ID N° 10) o sus secuencias de nucleótidos complementarias o un derivado de TE-08 (SEQ ID N° 10) o sus secuencias de nucleótidos complementarias, en donde el ácido nucleico, el fragmento, el derivado o sus secuencias de nucleótidos complementarias conduce, en el caso de una integración cromosómica, a un aumento de la transcripción o bien de la expresión de un gen de interés en un sistema de expresión, y en donde el derivado presente una identidad de la secuencia de al menos el 85%.
3. Ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en donde dicho ácido nucleico contiene la SEQ ID N° 1 o un fragmento de SEQ ID N° 1 que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, o sus secuencias de nucleótidos complementarias o un derivado de SEQ ID N° 1 o sus secuencias de nucleótidos complementarias, en donde el ácido nucleico, el fragmento, el derivado o sus secuencias de nucleótidos complementarias conduce, en el caso de una integración cromosómica, a un aumento de la transcripción o bien de la expresión de un gen de interés en un sistema de expresión, en donde el fragmento o derivado comprende por lo menos una zona de secuencias de la zona de ácidos nucleicos entre 1 pb y 1578 pb y en donde el derivado presente una identidad de la secuencia de al menos el 85%.
4. Ácido nucleico de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el aumento de la transcripción o bien de la expresión de un gen de interés en un sistema de expresión en comparación con un control que no contiene ningún elemento TE se determina por medición de la titulación del producto.
5. Ácido nucleico de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque este ácido nucleico presenta una longitud de al menos 511 pb (= longitud TE-13, SEQ ID N° 15) o bien al menos 1015 pb (= longitud TE-08, SEQ ID N° 10).
6. Ácido nucleico, seleccionado del grupo compuesto por: TE-01 (SEQ ID N° 3), TE-02 (SEQ ID N° 4), TE-07 (SEQ ID N° 9), TE-08 (SEQ ID N° 10), TE-10 (SEQ ID N° 12), TE-11 (SEQ ID N° 13), TE-12 (SEQ ID N° 14), TE-13 (SEQ ID N° 15), TE-15 (SEQ ID N° 17), TE-17 (SEQ ID N° 19), TE-18 (SEQ ID N° 20).
7. Ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el ácido nucleico es TE-08 (SEQ ID N° 10).
8. Ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el ácido nucleico es TE-13 (SEQ ID N° 15).
9. Vector de expresión eucarionte, caracterizado porque este vector de expresión contiene un ácido nucleico de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8.
10. Vector de expresión eucarionte de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizado porque contiene una combinación de varios ácidos nucleicos iguales o diferentes de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8, en donde uno o varios ácidos nucleicos están posicionados delante (es decir, 5' de) y / o uno o varios ácidos nucleicos detrás (es decir, 3' de) del gen de interés.
11. Vector de expresión eucarionte de acuerdo con la reivindicación 10, caracterizado porque uno o varios ácidos nucleicos de TE-08 (SEQ ID N° 10) están posicionados delante (es decir, 5' de) y uno o varios están posicionados detrás (es decir, 3' de) del gen de interés, con preferencia un ácido nucleico de TE-08 delante y uno detrás.
12. Procedimiento para la preparación de un vector de expresión eucarionte, caracterizado por la integración de un ácido nucleico de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8 en un vector de expresión.
13. Célula huésped eucarionte, caracterizada porque contiene un vector de expresión eucarionte de acuerdo con las reivindicaciones 9 a 11.
14. Célula huésped eucarionte de acuerdo con la reivindicación 13, caracterizada porque hay alta producción de ella, es decir, posee una mayor productividad específica que una célula huésped eucarionte comparable sin elemento TE, en donde esta célula huésped tiene un nivel de expresión aumentado en hasta dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces, seis veces, siete veces o diez veces o un nivel de expresión aumentado en más de dos

veces, más de tres veces, más de cuatro veces, más de cinco veces, más de siete veces o más de diez veces.

15. Procedimiento para desarrollar una línea celular huésped eucarionte establemente transfectada de alta producción, caracterizado por las siguientes etapas:

- (a) integración de un ácido nucleico de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8 en un vector de expresión eucarionte que contiene un gen de interés,
- (b) transfección de una célula huésped eucarionte con este vector de expresión,
- (c) selección de una célula huésped transfectada de alta producción.

16. Procedimiento para la preparación y selección de células de mamíferos recombinantes, caracterizado por las siguientes etapas:

- (a) transfección de las células huésped con genes que por lo menos codifican una proteína/producto de interés, una neomicina-fosfotransferasa, preferentemente modificada, y el marcador de selección amplificable DHFR, en donde por lo menos el gen (o bien los genes) de interés está unido funcionalmente para el incremento de la transcripción o bien de la expresión con por lo menos un ácido nucleico de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8,
- (b) cultivo de las células en condiciones que permiten una expresión de los distintos genes,
- (c) la selección de estos genes co-integrados por cultivo de las células en presencia de un medio de selección como, por ejemplo, G418, en medio sin hipoxantina/timidina y
- (d) la amplificación de estos genes co-integrados por cultivo de las células en presencia de un medio de selección, que permite la amplificación de por lo menos el gen marcador de selección como, por ejemplo, metotrexato.

17. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 15 ó 16, en donde la proporción de grandes productores está aumentado en hasta dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces, seis veces, siete veces o diez veces o más de dos veces, más de tres veces, más de cuatro veces, más de cinco veces, más de siete veces, más de diez veces.

18. Procedimiento para preparar un producto biofarmacéutico, caracterizado por las siguientes etapas:

- (a) integración de un ácido nucleico de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8 en un vector de expresión eucarionte que contiene un gen de interés,
- (b) transfección de una célula huésped eucarionte con este vector de expresión,
- (c) selección de una célula huésped transfectada de alta producción y
- (d) cultivo de la célula huésped transfectada obtenida de alta producción en condiciones que permiten una expresión del o de los genes de interés.

19. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 18 caracterizado por la siguiente etapa adicional:

- (e) siembra y purificación de la proteína de interés.

20. Uso de un ácido nucleico de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8 para la preparación de un medicamento para uso medicinal, en donde el ácido nucleico sirve como elemento que aumenta la transcripción para preparar un producto biofarmacéutico.

21. Uso de acuerdo con la reivindicación 20, en donde el producto biofarmacéutico es un anticuerpo monoclonal.

22. Uso de un ácido nucleico de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8 para la generación de animales o plantas transgénicos no humanos.

23. Kit compuesto de ácido o ácidos nucleicos de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8, y célula o células huésped y opcionalmente reactivo o reactivos de transfección.

Figura 1

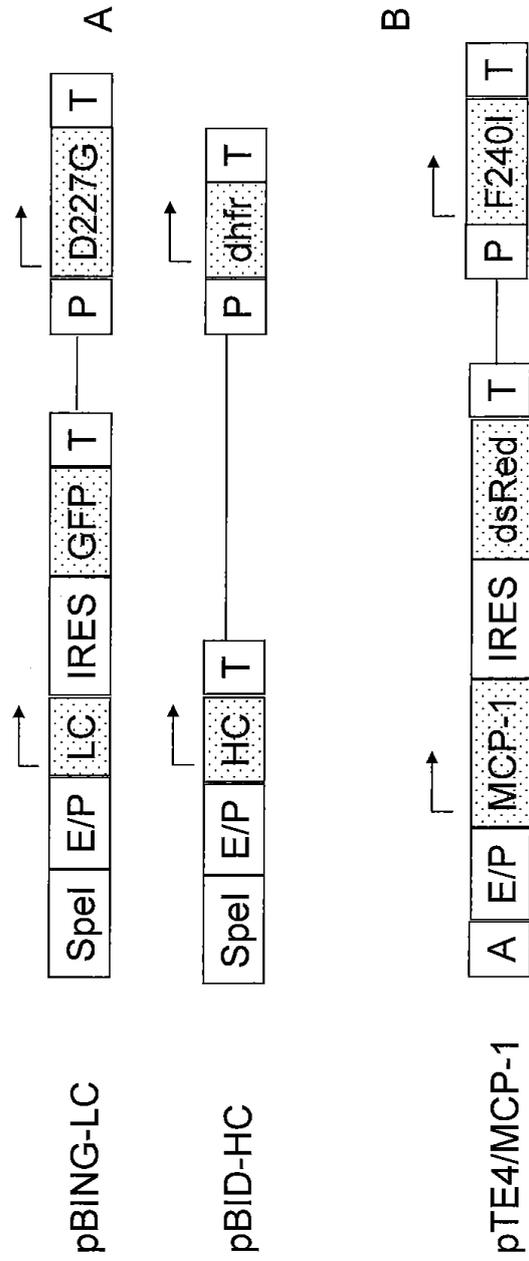


Figura 2



Figura 3

1 CCATGAGAGC CTGAAGACCT GAGTTGATAC CCAGAACCCCA GATCAAGATG GAGGAGAGAA GAGGCCCCAC
 GGTACTCTCG GACTTCTGGA CTCAACTATG GGTCTTGGGT CTAGTTCTAC CTCCCTCTTT GGTCGGGGTG
 71 TAAGCTGTCC CCTGACCCCC ATAAATGCCCT CCCTGTCCAG TTATGCCACA CAATGATAGG TGAATACAGA
 ATTGCACAGG GGACTGGGG TATTTACGGA GGGACAGGTC AATACGGTGT GTTACTATCC ACTTATGTCT
 141 AAAACACCCCT TCCTTTAGAC ACTAAGCGGA TTCCCTTTAC GCATACCAGT TAAGTGATAG TTCTTAGGCT
 TTTTGTGGGA AGGAAATCTG TGATTCGCCCT AAGGAGAAAG CGTATGGTCA ATTCACTATC AAGAATCCGA
 211 TCAACTCAGC ACTTTAAAAA GTTTATATTT TGCAATGCTG GGGACTAAAT TAGGGTTGTG CACATGCTAA
 AGTTGAGTCC TGAAATTTTT CAAATATAAA ACGTTACGAC CCCTGATTTA ATCCCAACAC GTGTACGATT
 281 GTAAGCACTC TACTTTTGTA TCACATTTTA AVAATTGTAA GAATTAATTC GTGAAATAGT AGCTGAGACA
 CATTCTGTGAG ATGAAAACAT AGTGTAAAAT TATTAACATT CTTAATTAAG CACTTTATCA TCGACTCTGT
 351 ATAGATTTGT TTCTTTCATG TGGAACTGC TGTGTGTGCT TCCTTGTGAT GCAAAACAAG TCAAATACTT
 TATCTAAACA AAGAAAAGTAC ACCCTTGACG ACACACACGA AGAACGACTA CGTTTGTTC AGTTTATGAA
 421 TATTCGCCAG TGTCFGCCTA GCCCTGTAAC ACTTCTCTAT TATACAAATGA CCACAAAATAA TTAGGTGAGT
 ATAAGGGGTC ACAGACGGAT CGGGACATTTG TGAAGAGATA ATATGTTACT GGTGTTTATT AATCCACTCA
 491 GGGTTTTGTT TCAATTTTAAA TTGTTGCTAT TTTAGAGACA GGATTTCTTG CAAACCTGGT TGGTCTTAAA
 CCCAAAACAA AGTAAAATTT AACAACGATA AAATCTCTGT CCTAAAAGAAC GTTTGGACCA ACCAGAAATTT
 561 CTCCGATGT AGCTGAGAAAT GACCTTGAAA ACCTTCCCTGT CCCACCCCTC AAATCCAGA ATTATAGACA
 GAGGCATACA TCGACTCTTA CTGGAACCTTT TGGAAAGACA GGTGGGGAG TTTAAGGTCT TAATATCTGT
 631 CCCACCACAT GGCTTAATAA GTAACAACA CAAATAAAAAG CATGACTTCT GGGTCTGGAG GGAGGGCTTG
 GGTGGTGTGA CCGAATTTAT CATTGTGTTGT TGTATTTTC GTAAGTGAAGA CCCAGACCTC CCTCCCAGAC
 701 CCAGTTAAGA GCAATGGATA CTTTCCCATG GAACCTGGGT TTGACTCCCA GCACTAACCT ACATGGTGAT
 GGTCAATCT CGTTACCTAT GAAAGGGTAT CTTGGACCCA AACTGAGGGT CGTGATTGGA TGTACCACATA
 771 AGTGATGCAG CAGACATACA TGAGGGCAAC ACACACATGG GCACATACAC ACGCACCCCG CCACCATGGC
 TCACTACGTC GTCTGTATGT ACTCCCGTTG TGTGTGTACC CGTGTATGTG TCGGTGGGCG GGTGGTACCG

841 TTTTCCCCCA TCACTTAGAC AGCCATAATTT AAACGTTAGT GAGCCAGGCT GGGGTGGTGG CCCACACCTT
 AAAAGGGGT AGTGAATCTG TCGGTATAAA TTTGCATCAC CTCGGTCCGA CCCACACCACC GGGTGTGGAA
 911 TAATCCAGC ACTCCAGAAG GCAGAGGTAG GCGGATCTCT GTGGGTTTGA GACCAGCCCTG GTCATACAAGA
 ATTAGGGTCG TGAGGTCCTC CGTCTCCATC GCCTTAGAGA CACCCAAACT CTGGTCGGAC CAGATGTTCT
 981 GCTAGTTCCA GGACAGCCCTC CAAAGCCATA GAGAAACCCT ATCTCAAAA ACTGAAACAA CAACAACAAC
 CGATCAAGGT CCTGTCCGGG GTTTCGGTAT CTCTTTGGGA TAGAGTTTTT TGACTTTGTT GTTGTGTTG
 1051 AAAACAAAAA AAAAAACAA CAAAAGAATC TTAGTGTTT AGTGGTTCCA CACACAGGAA AGTAGAAAAG
 TTTTGTTTTA TTTTGTGTTT GTTTTCTTAG AATCACCAG TCACCAAGGT GTGTGTCCTT TCATCTTTCC
 1121 GCCTTGATGG GAAGGTTTTC AGAGGGAGGA GTATGGATGA GACAGGATGA TAGTAAAAAG AACTCAAAAT
 CGGAACTACC CTTCCAAAAG TCTCCCTCCT CATACTACT CTGTCTACT ATCACTTTTC TTGAGTTTTAA
 1191 AATTAATAAT TTGAAACTAT CTAAGAATAA AAGCTAAAAT ATTTAAAAT ACAGTCAGGT AGTGGTGGTG
 TTAATTTATA AACITTTGATA GAITCTTATT TTCGATTTA TAAATTTTAA TGTCAGTCCA TCACCACCAC
 1261 CAGAGGGCTA AGTTGGTAGA CACAGTGAGA TCCAGGCCAG CCAGGGCTAC CTAGTGAGAC CTTGTTCAAA
 GTCTCCCGAT TCAACCATCT GTGTCACTCT AGGTCCGGTC GGTCCCGATG GATCACTCTG GAAACAAGTTT
 1331 TAACTAATAA AATATACAAA ATAAAGGAGA CACCACAATA ATTTGAAAAT GTAAAAGACT AAATTTACCT
 ATTGATTAAT TTATATGTTT TATTTCTCT TATTTCTCT TAAAACTTTA CATTTTCTGA TTTAAATGGA
 1401 TTTATATTGA TGAGTTGGAT AAAAAATCA ATTTACCAGA GAAACATAAAG TAGTCCCATC AAAGACAAAA
 AAATATAACT ACTCAACCTA TTTTTTTAGT TAAATGGTCT CTTGTATTTT ATCAGGGTAG TTTCTGTTTT
 1471 GCAATATATG ATTAACCTCT AATTTAAAAG TTTGTTAGAG CCTGGCAACG TGGCACATAC CTTTAAATCCC
 CGTTATATAC TAATTTGAGA TTAATTTTC AAACAATCTC GGACCCTTGC ACCGTGTAIG GAAATTAGGG
 1541 AGCACCCAGG AGACAGAGGC CATCCCTGGC TAAAAAGTGA TCTCCAGGAC AGCCATGGCT ATTACACAGA
 TCGTGGTCCC TCTGTCTCCG GTAGGACCAG ATTTTICACT AGAGGTCCCTG TCGGTACCGA TAAATGTGCT
 1611 GAAACCCCTGT CTGGAAAAAC AAAAAATTAG TGTCCATGTG TAAATGTGTG GAGTATGCTT GTCATGCCAC
 CTTTGGGACA GACCTTTTTG TTTTTTAATC ACAGGTACAC ATTTACACAC CTCATACGAA CAGTACGGTG

1681 ATACAGAGGT AGAGGGCAGT TTATGGGAGT CAGTTCCTAT TCTTCCCTTA TGGGGACCT GGGGACTGAA
 TATGTCTCCA TCTCCCGTCA AATACCCTCA GTCAAGGATA AGAAGGAAAT ACCCCCTGGA CCCCTGACTT
 1751 CTCAGGTCAT CAGGCTTGGC AGAAAGTGCA TTAGCTCAGG GAGCCTTATC ATTGGCGAAA GCTCTCTCAA
 GAGTCCAGTA GTCCGAACCG TCTTTCACGT AATCGAGTGC CFCGGAATAG TAACCCGCTTT CGAGAGAGTT
 1821 GTAGAAAATC AATGTGTTTG CTCATAGTGC AATCATATG TTTCGAGAGG GGAAGGTAC AATCGTTGGG
 CATCTTTTAG TTACACAAAC GAGTATCAGG TTAGTAATAC AAAGCTCTCC CCTTCCCATG TTAGCAACCC
 1891 GCATGTGTGG TCACATCTGA ATAGCAGTAG CTCCCTAGGA GAATTAATTC CAAGTTCCTT GGTGTTGTAT
 CGTACACACC AGTGTAGACT TATCGTCATC GAGGGATCCT CTTAATTAAG GTTCAAGAAA CCACACATA
 1961 CAATGCCCTT AAAGGGTCA ACAACTTTT TTCCCTCTGA CAAAATAIC TTCTTATGTC CTTGTCCCTC
 GTTACGGGAA TTTCCCCAGT TGTGAAAAA AAGGGAGACT GTTTGATAG AAGAATACAG GAACAGGGAG
 2031 ATATTTGAAG TATTTTATC TTTCAGTGT TGAATATCAA TTCTAGCACC TCAGACAIGT TAGGTAAGTA
 TATAAACTTC ATAAAAAAG AAACGTCACT ACTTATAGTT AAGATCGTGG AGTCTGTACA ATCCATTCAT
 2101 CCGTACAACT CAGGTTAACT AATTTAATTT AACTAATTTA ACCCAACAC TTTTCTTTG TTTATCCACA
 GGGATGTTGA GTCCAAATTGA TTAAATTAAT TTGATTAAT TGGGGTTGTG AAAAAAAGAAC AAATAGGTGT
 2171 TTTGTGGAGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT
 AAACACCTCA CACACACACA CACACACACA CACACACACA CACACACACA CACACACACA CACACACACA
 2241 GCGCGCGCGC GCGCGCTCGG ATCATCTTAC CTTTTGTTA AAAAAATGTTA GTCCAGGGGT GGGGTGCACT
 CGCGCGCGCG TAGTAAGATG GAAAACAAAT TTTTACAAAT CAGGTCCCCA CCCACCGTGA
 2311 GTGAAAGTCT GAGGTAACT TGCTGGGGTC AGTTCCTTCC ACTATAGGAC AGAACTCCAG GTGTCAACTC
 CACTTTCAGA CTCCCATTTGA ACGACCCCG TCAAGAAAGG TGATATCCCTG TCTTGAGGTC CACAGTTGAG
 2381 TTTACTGACA GAACCATCCA AATAGCCCTA TCTAAATTTA GTTTTATTTT TATTTATTTT TTGTTTTTCG
 AAATGACTGT CTTGGTAGGT TTATCGGGAT AGATTAATAAT CAAAAAATAA ATAAAAATAA AACAAAAAGC
 2451 AGACAGGGTT TCTCTGTGGC TTTGGAGGCT GTCCGTGAAC TAGCTCTTGT AGACCAGGCT GGTCTCGAAC
 TCTGTCCCAA AGAGACACCG AAACCTCCGA CAGGACCTTG ATCGAGAACA TCTGGTCCGA CCAGAGCTTG

2521 TCAGAGATCC ACCTGCCCTCT GCCTCCTGAG TGCTGGGATT AAAGGCATGC GCCACCAACG CTTGGCTCTA
 AGTCTCTAGG TGGACGGAGA CCGAGGACTC ACGACCCTAA TTCCCGTACG CGGTGGTTGC GAACCGAGAT
 2591 CCTAATTTTA AAAGAGATTG TGTGTACAA GGGTGTATG TCGCCCTGCA ACCACCCCCC CCCAAAAAA
 GGATTAATAA TTCTCTAAC ACACAGTGTT CCCACAGTAC AGCGGGACGT TGGTGGGGGG GGGGTTTTTT
 2661 AAAAAAAAAA AAACCTTCACT GAAGCTGAAG CACGATGATT TGGTTACTCT GGCTGGCCAA TGAGCTCTAG
 TTTTTTTTTT TTGGAAGTGA CTTCCGACTTC GTGCTACTAA ACCAATGAGA CCGACCCGGTT ACTCGAGATC
 2731 GGAGTCTCCT GTCAAACAGA ATCTCAACAG GCGCAGCAGT CTTTTTTAAA GTGGGGTTAC AACACAGGTT
 CCTCAGAGGA CAGTTTGTCT TAGAGTTGTC CCGTCTGTC GAAAAAATTT CACCCCAATG TTGTGTCCAA
 2801 TTGCAATC AGGCATTTTA TCTAAGCTAT TTCCAGCCA AAAATGTGTA TTTTGGAGGC AGCAGAGCTA
 AAACGTATAG TCCGTAAAAA AGATTGATA AAGGTCGGT TTTTACACAT AAAACCTCCG TCGTCTCGAT
 2871 ATAGATTAAT ATGAGGGAAG AGCCACACACA GGTTATTAGG AAGATAAGCA TCTTCTTTAT ATAAAAAATA
 TATCTAATTT TACTCCCTTC TCGGGTGTGT CCAATAATCC TTCTATTCTG AGAAGAAATA TATTTTGTTC
 2941 ACCAAACCAA ACTGGAGGAG GTCTACCTTT AGGATGGAA GAAAAGACAT TTAGAGGGTG CAATAGAAAG
 TGGTTTTGGT TGACCTCCTC CAGATGGAAA TCCCTACCTT CTTTTCTGTA AATCTCCAC GTTATCTTTC
 3011 GGCACAGT TTGTGAGTG GAGGACTGGG AGAGGGCGCA ACCGCTTAA CTGTCTGT TTGCCTATTT
 CCGTGACTCA AACACTCCAC CTCCTGACCC TCTCCCGCGT TGGCGAAAT GACAGGACAA AACGGATAAA
 3081 TTTGGGGACA GCACATGTTTCTATTTTCC CAGGATGGC AATCTCCACG TCCAAACTTG CGGTCGAGGA
 AAACCCCTGT CGTGTACAAG GATAAAAAGG GTCCTACCCG TTAGAGGTG AGGTTTGAAC GCCAGTCTT
 3151 CTACAGTCAT TTTGCAGGTT TCCTTACTGT ATGGCTTTTA AAACGTGCAA AGGTGACCAT TAACCGTTTC
 GATGTCAGTA AAACGTCCAA AGGAATGACA TACCGAAAAA TTTGCACGTT TCCACTGGTA ATTGGCAAAAG
 3221 ACGCTGGGAG GGCACGTGCG GCTCAGATGC TTCCCTGAC TGAGGGCCAG GAGGGGCTA CACGGAAGAG
 TCGGACCCCTC CCGTGCACGC CGAGTCTACG AAGGAGACTG ACTCCCGGTC CTCCCCCGAT GTGCCTTCTC
 3291 GCCACACCCG CACTTGGGAA GACTCGATTT GGGCTTCAGC TGGCTGAGAC GCCCCAGCAG GCTCCTCGGC
 CCGTGTGGGC GTGAACCCCTT CTGAGCTAAA CCCGAAAGTC ACCGACTCTG CCGGGTCTG CGAGGAGCCG

2521 TCAGAGATCC ACCTGCCCTCT GCCTCCTGAG TGCTGGGATT AAAGGCATGC GCCACCAACG CTTGGCTCTA
 AGTCTCTAGG TGGACGGAGA CGGAGGACTC CGGACCTTAA TTTCCGTACG CCGTGGTTGC GAACCCGAGT
 2591 CCTAATTTTA AAAGAGATTG TGTGTCACAA GGGTGTCAATG TCGCCCTGCA ACCACCCCCC CCCCACAAAA
 GGATTAATAAT TTTCTCTAAC ACACAGTGTT CCCACAGTAC AGCGGGACGT TGGTGGGGG GGGTTTTTT
 2661 AAAAAAAAAA AAACCTTCACT GAAGCTGAAG CACGATGATT TGGTTACTCT GGCTGGCCAA TGAGCTCTAG
 TTTTTTTTTT TTTGAAGTGA CTTCGACTTC GTGCTACTAA ACCAATGAGA CCGACCGGTT ACTCGAGATC
 2731 GGAGTCTCCT GTCAAAACAGA ATCTCAACAG GCGCAGCAGT CTTTTTAAA GTGGGTTAC AACACAGGTT
 CCTCAGAGGA CAGTTTGTCT TAGAGTTGTC CGCGTCGTC AAAAAAATTT CACCCCAATG TTGTGTCCAA
 2801 TTTGCATATC AGGCATTTTA TCTAAGCTAT TTCCCAGCCA AAAATGTGTA TTTTGGAGGC AGCAGAGCTA
 AAACGTATAG TCCGTAAAAT AGATTTCGATA AAGGTCGGT TTTTACACAT AAAACCTCCG TCGTCTCGAT
 2871 ATAGATTAAT ATGAGGGAAG AGCCACACA GGTATTAGG AAGATAAGCA TCTTCTTTAT ATAAAAACAAA
 TATCTAATTT TACTCCCTTC CAGATGGAAA TCCCTACCTT CTTTCTGTA AATCTCCAC GTTATCTTTC
 2941 ACCAAACCAA ACTGGAGGAG GTCTACCTTT AGGGATGGAA GAAAAGACAT TTAGAGGGTG CAATAGAAAAG
 TGGTTTGGTT TGACCTCCTC CAGATGGAAA TCCCTACCTT CTTTCTGTA AATCTCCAC GTTATCTTTC
 3011 GGCACGTAGT TTGTGAGGTG GAGGACTGGG AGAGGGCGCA ACCGCTTAA CTGTCCCTGTT TTGCCATATT
 CCGTGACTCA AACACTCCAC CTCCTGACCC TCTCCCGCGT TGGCGAAAT GACAGGACAA AACGGATAAA
 3081 TTTGGGGACA GCACATGTTT CTATTTTTCC CAGGATGGC AATCTCCACG TCCAAACTTG CCGTCGAGGA
 AAACCCCTGT CGTGTACAAG GATAAAAAGG GTCCTACCCG TTAGAGGTGC AGGTTTGAAC GCCAGCTCCT
 3151 CTACAGTCAI TTTGCAGGTT TCCTTACTGT ATGGCTTTTA AAACGTGCAA AGGTGACCAT TAACCGTTTC
 GATGTCAGTA AAACGTCCAA AGGAATGACA TACCGAAAAT TTTGCACGTT TCCACTGGTA ATTGSCAAAAG
 3221 ACGCTGGGAG GGCACGTGCG GCTCAGATGC TTCCTCTGAC TGAGGGCCAG GAGGGGCTA CACGGAAGAG
 TGGGACCCCT CCGTGCACGC CGAGTCTACG AAGGAGACTG ACTCCCGGTC CTCCCCCGAT GTGCCCTTCTC
 3291 GCCACACCCG CACTTGGGAA GACTCGATTT GGGCTTCAGC TGGCTGAGAC GCCCCAGCAG GCTCCTCGGC
 CCGTGTGGGC GTGAACCCCTT CTGAGCTAAA CCCGAAGTGC ACCGACTCTG CGGGTCGTC CGAGGAGCCG

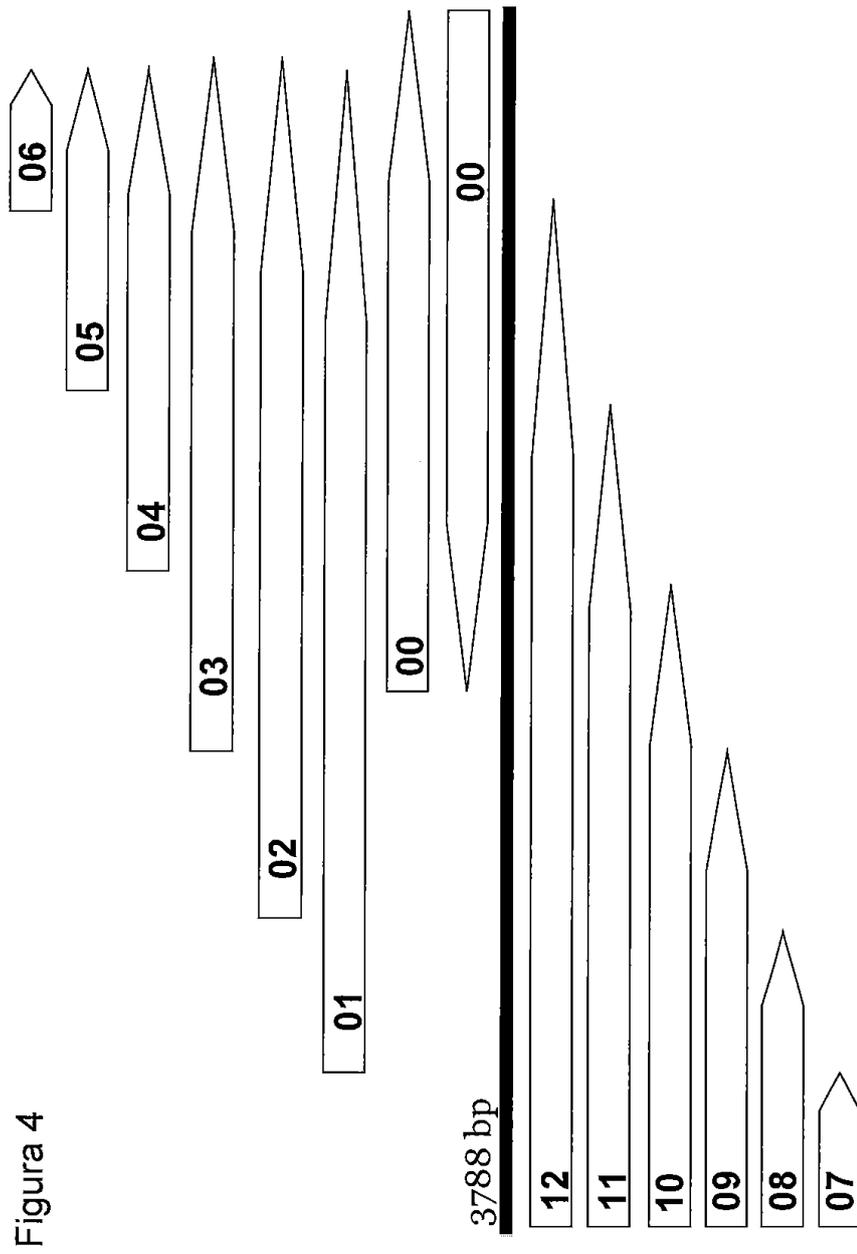


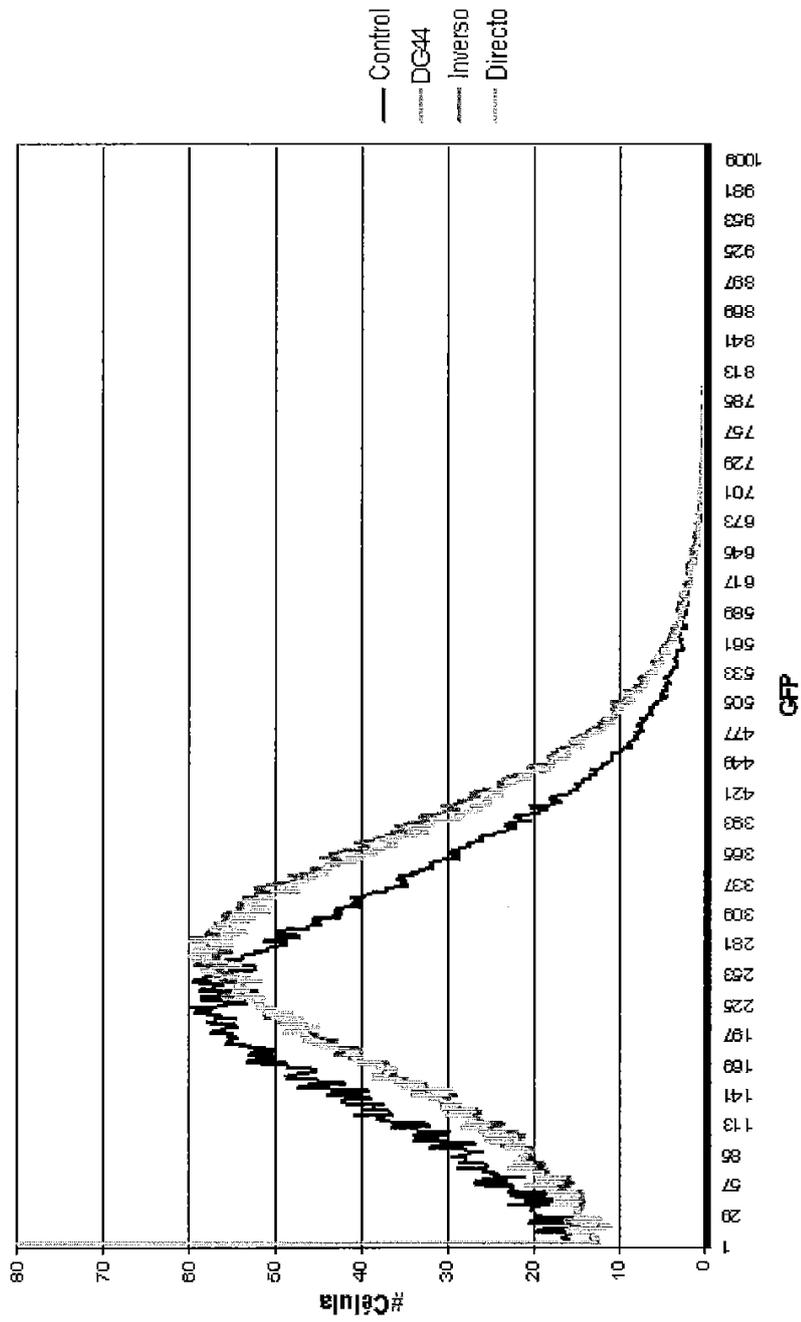
Figura 5

Elemento TE	SEQ ID N.º	Aleance (bp)	Extremo (bp)	Longitud (bp)	Cebador sintetizado
A	1	1	3788	3788	-----
00	2	1579	3788	2210	-----
01	3	513	3517	3005	TE para5, TE rev 4
02	4	1001	3517	2517	TE para6, TE rev 4
03	5	1529	3517	1989	TE para7, TE rev 4
04	6	2006	3517	1512	TE para8, TE rev 4
05	7	2505	3517	1013	TE para9, TE rev 4
06	8	3137	3517	381	TE para10, TE rev 4
07	9	9	537	529	TE para4, TE rev 5
08	10	9	1023	1015	TE para4, TE rev 6
09	11	9	1549	1541	TE para4, TE rev 7
10	12	9	2028	2020	TE para4, TE rev 8
11	13	9	2524	2516	TE para4, TE rev 9
12	14	9	3156	3148	TE para4, TE rev 10
13	15	513	1023	511	TE para5, TE rev 6
14	16	1001	1549	549	TE para6, TE rev 7
15	17	513	1549	1037	TE para5, TE rev 7
16	18	1529	2028	500	TE para7, TE rev 8
17	19	1001	2028	1028	TE para6, TE rev 8
18	20	513	2028	1516	TE para5, TE rev 8
21	21	3137	3517	381	TE para10, TE rev 4

Figura 6

Cebador	Secuencia (5' - 3')	Elemento
TE para 4	CTATGAGGATCCGCCCTGAAGACCTGAGTTGATAC	07, 08, 09, 10, 11, 12
TE para 5	TATGCAGGATCCGGTTGCTATTTAGAGACAGGATTTTC	01, 13, 15, 18
TE para 6	TATGCAGGATCCCAAAGCCATAGAGAACCCTATC	02, 14, 17
TE para 7	TATGCAGGATCCACCTTTAATCCAGCACCAGG	03, 16
TE para 8	CTATGAGGATCCCTATCTTCTTATGTCTTGTCTCC	04
TE para 9	TATGCAGGATCCAGGCTGGTCTCGAACTCAG	05
TE para 10	CTATGAGGATCCCTTGCGGTCGAGGACTACAG	06
TE para 11	CTATGATGTACAGCCTGAAGACCTGAGTTGATAC	08 (orientación inversa) 09 (orientación inversa)
TE rev 4	ATTGCATGTACACTATCTGGTTATAGTCTCTAAACTCTG	01, 02, 03, 04, 05, 06
TE rev 5	ATAGCATGTACAGAAATCCTGTCTCTAAAATAGCAAC	07
TE rev 6	ATAGCATGTACAGATAGGGTTTCTCTATGGCTTTG	08, 13
TE rev 7	ATACGATGTACACCTGGTGTGGGATTAAGGT	09, 14, 15
TE rev 8	ATAGCATGTACAGGGACAAAGGACATAAGAAGATAG	10, 16, 17, 18
TE rev 9	TAGTTATGTACACTGAGTTCGAGACCAGCCTG	11
TE rev 10	ATAGCATGTACACTGTAGTCTCGACCCGCAAG	12
TE rev 11	ATACGAGGATCCCTGGTGTGGGATTAAGGT	09 (orientación inversa)
TE rev 12	ATAGCAGGATCCGATAGGGTTTCTCTATGGCTTTG	08 (orientación inversa)

Figura 7



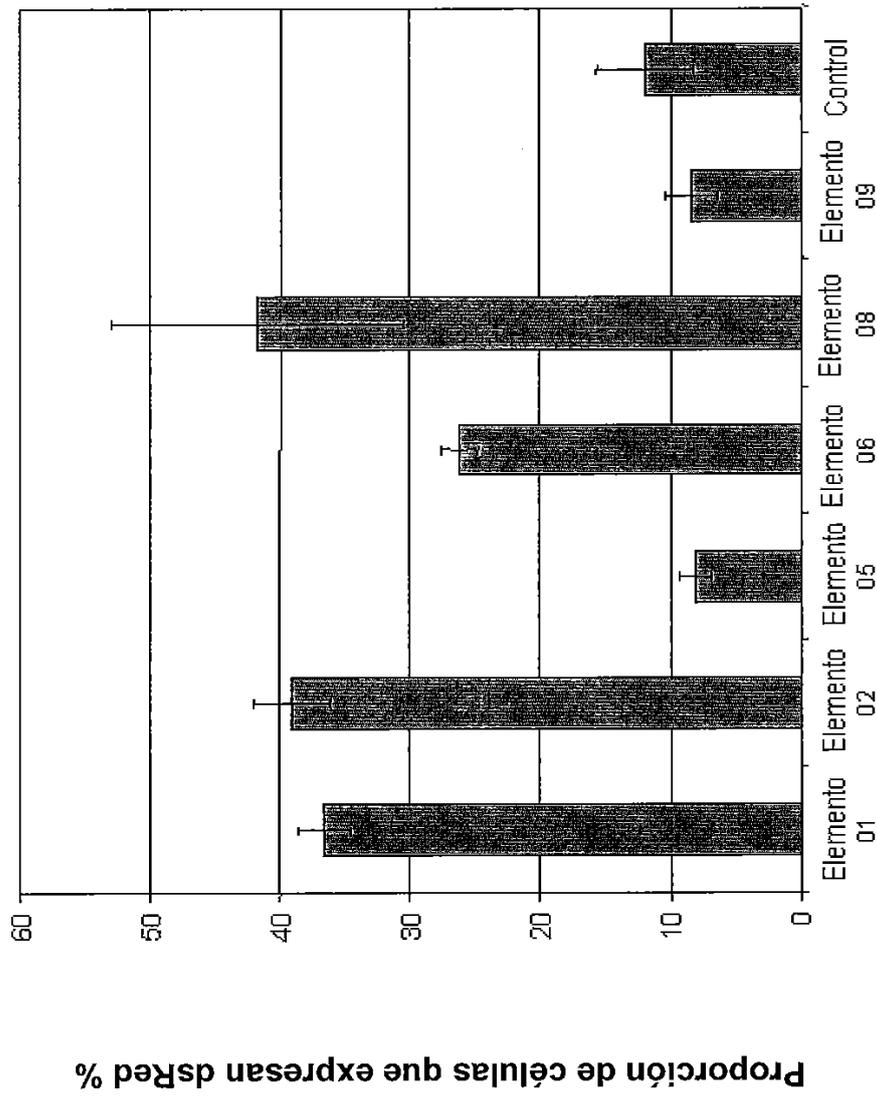


Figura 8

Figura 9 A

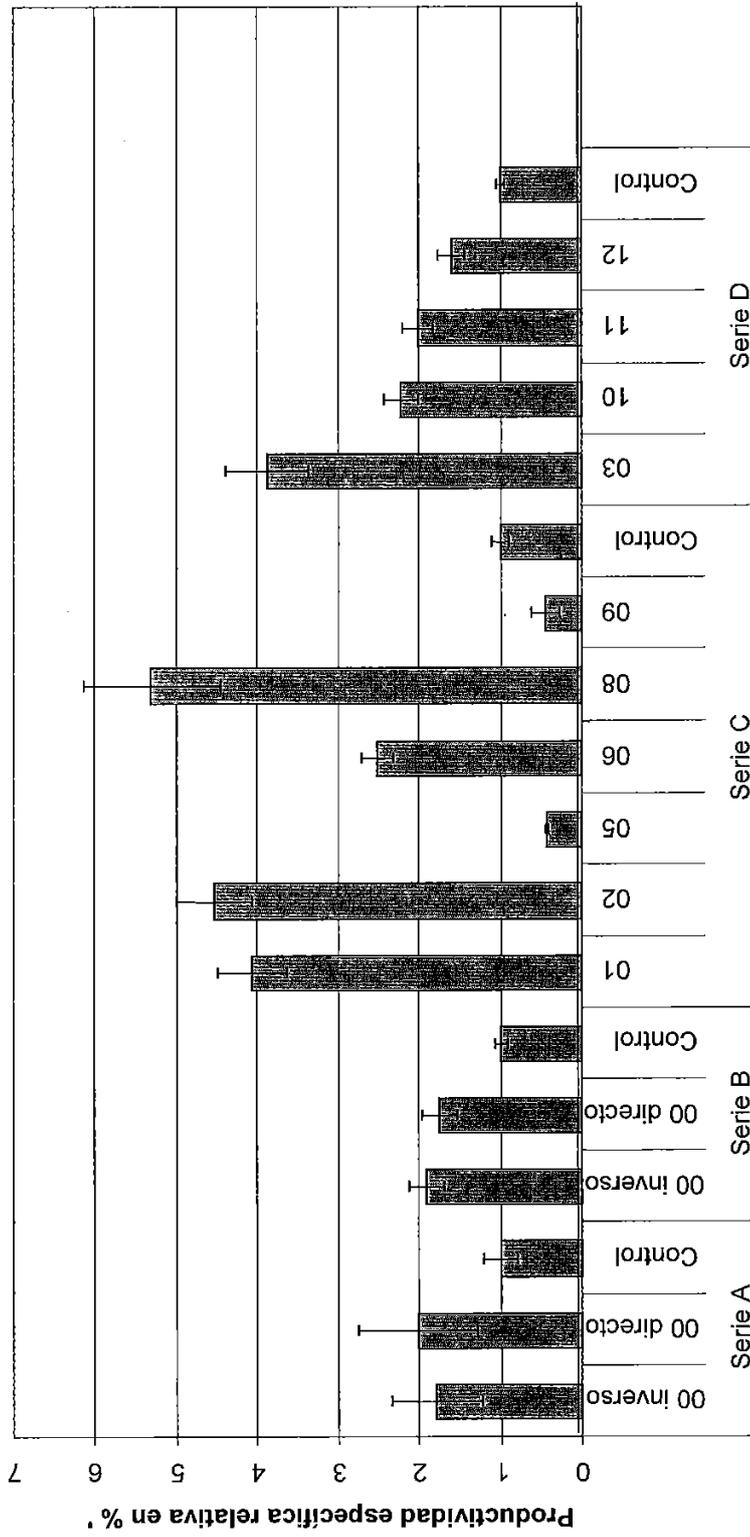


Figura 9 B

	Elemento TE	Productividad específica de factor de crecimiento
Serie A	00 (orientación inversa)	1,8
	00 (orientación directa)	2,0
	Control	1,0
Serie B	00 (orientación inversa)	1,9
	00 (orientación directa)	1,7
	Control	1,0
Serie C	01	4,1
	02	4,5
	05	0,4
	06	2,5
	08	5,3
	09	0,4
	Control	1,0
Serie D	03	3,9
	10	2,2
	11	2,0
	12	1,6
	Control	1,0

Figura 10 A

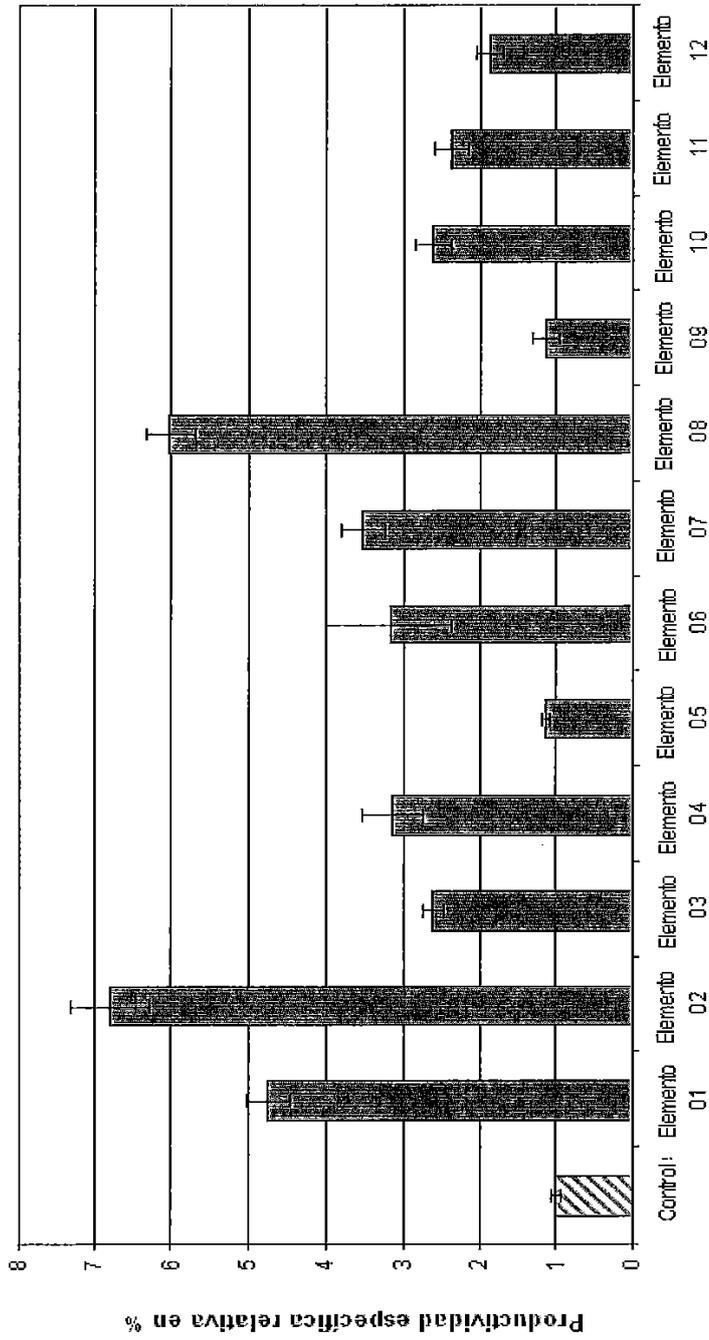


Figura 10 B

Elemento TE	Productividad específica de factor de crecimiento
Control	1,0
Elemento 01	4,8
Elemento 02	6,8
Elemento 03	2,6
Elemento 04	3,1
Elemento 05	1,1
Elemento 06	3,2
Elemento 07	3,5
Elemento 08	6,0
Elemento 09	1,1
Elemento 10	2,6
Elemento 11	2,4
Elemento 12	1,9

Figura 11

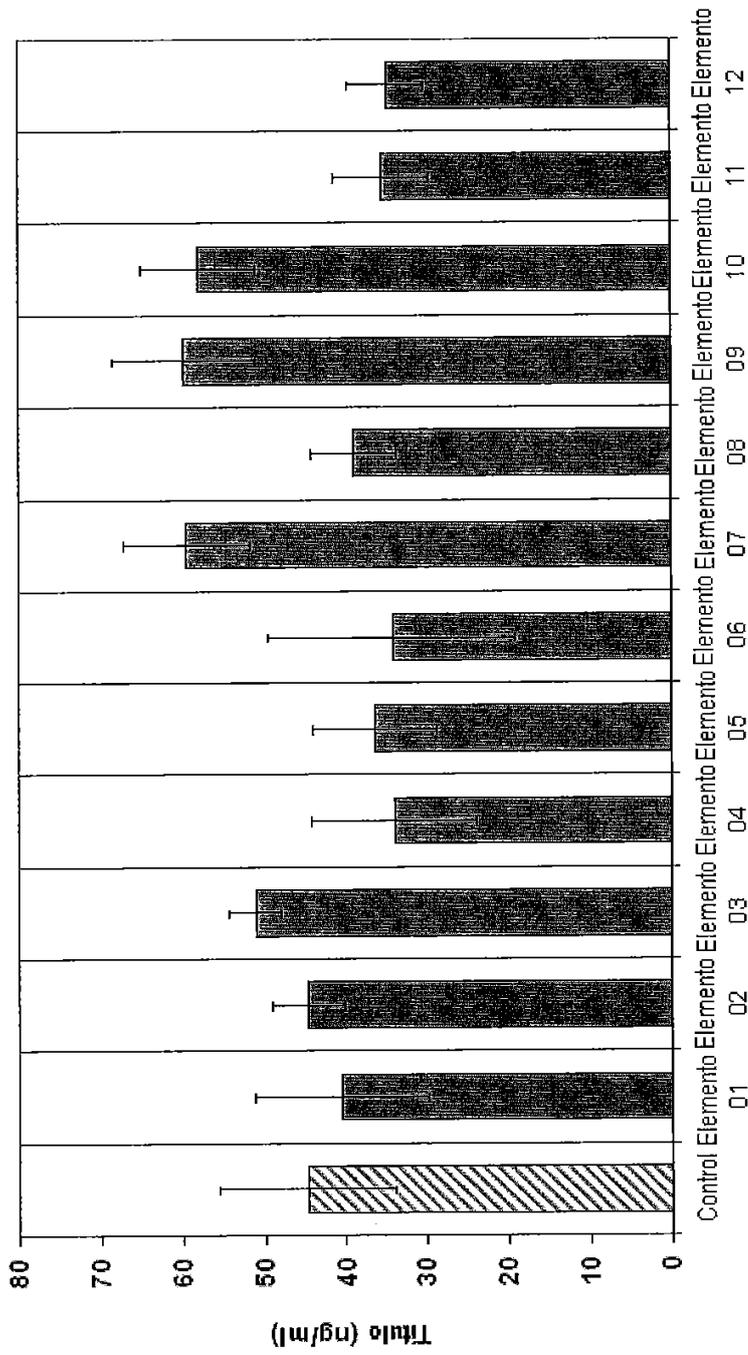


Figura 12

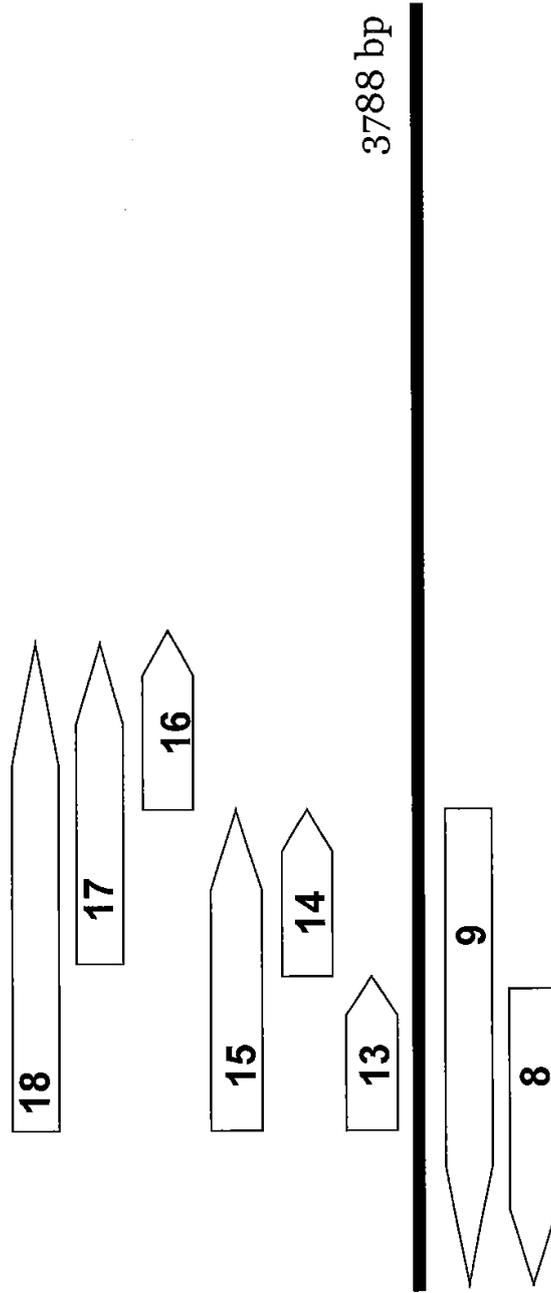


Figura 13

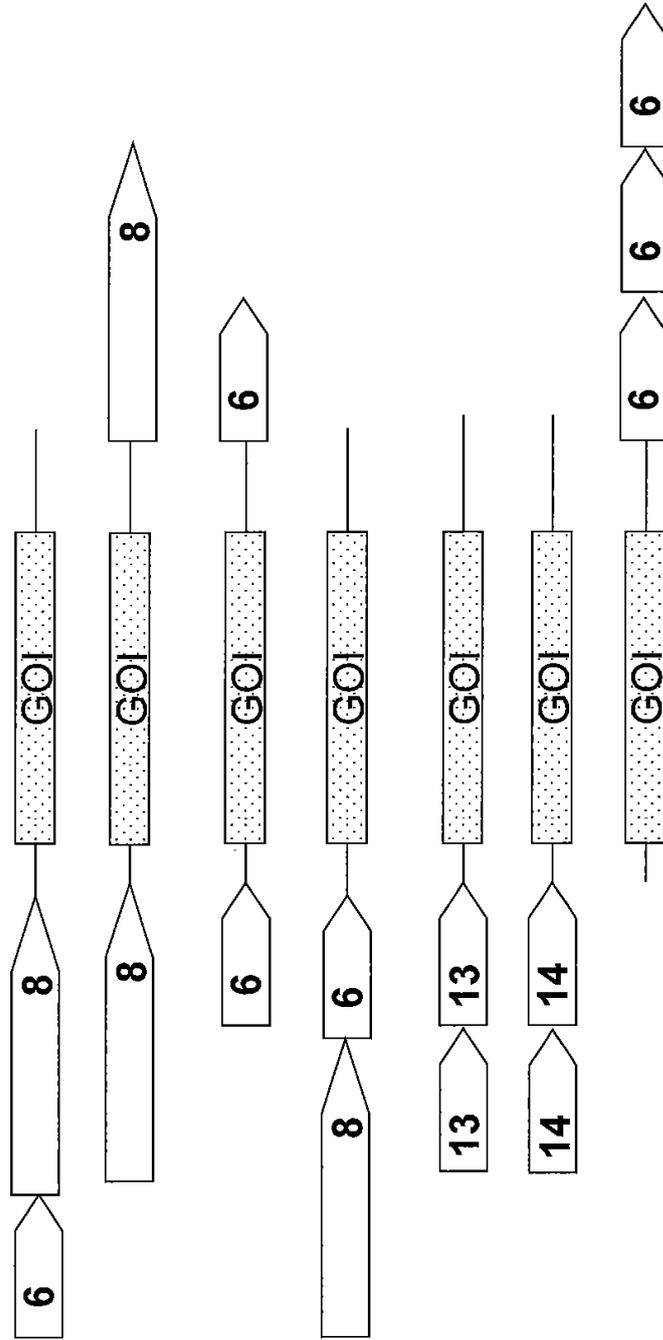


Figura 14

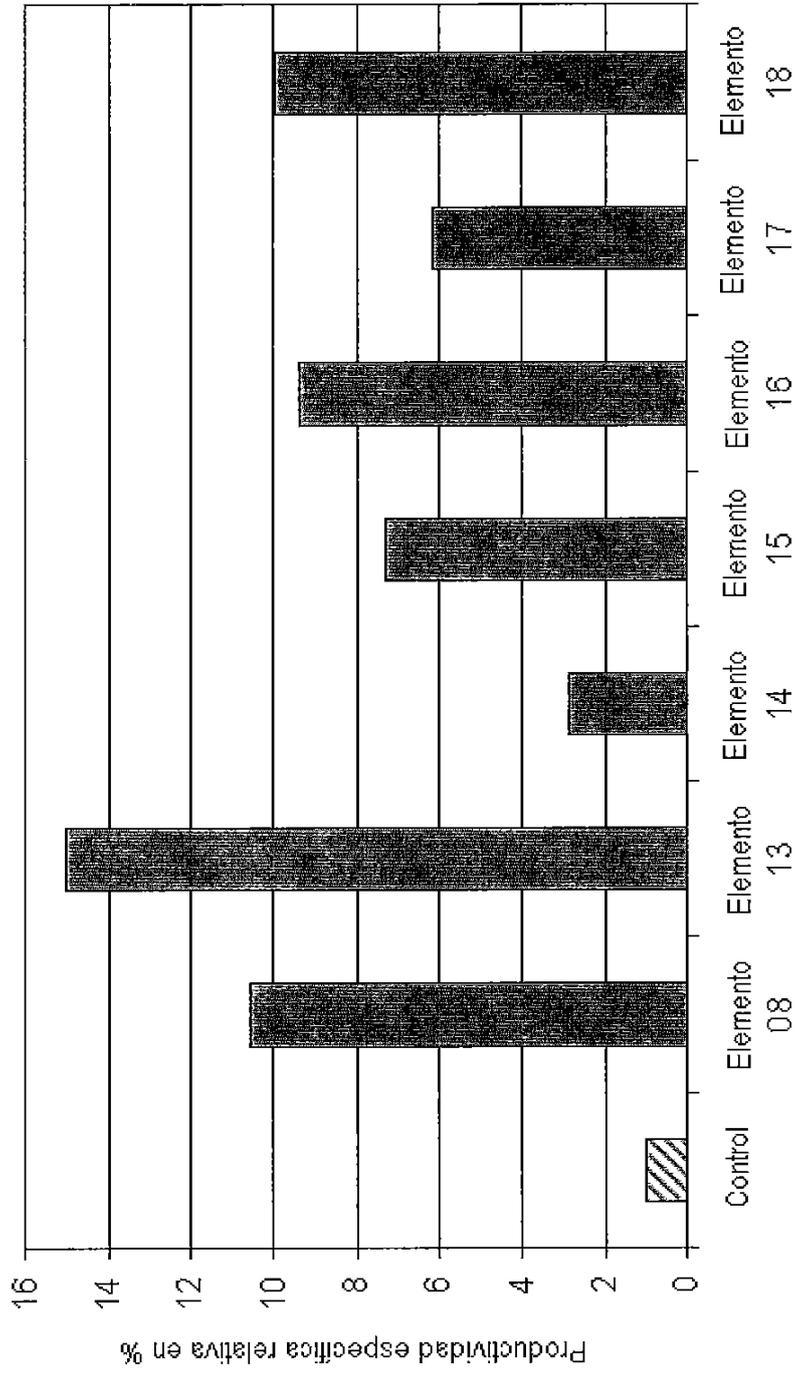


Figura 15

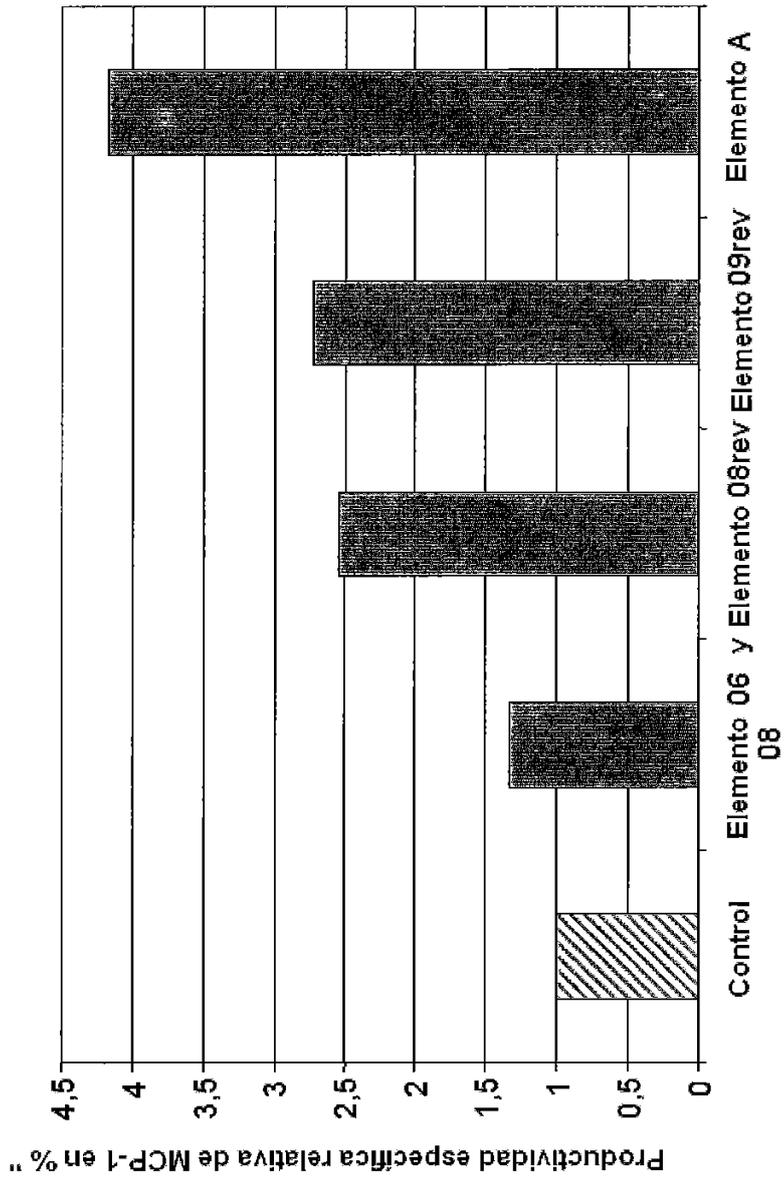


Figura 16

