

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 439 874**

51 Int. Cl.:

**A01K 67/00** (2006.01)

**C07K 19/00** (2006.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

**C12N 15/79** (2006.01)

**C12P 21/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.05.2003 E 03736725 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2013 EP 1531666**

54 Título: **Sistema de expresión en eucariotas inducible**

30 Prioridad:

**29.05.2002 US 384004 P**

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

**27.01.2014**

73 Titular/es:

**REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.  
(100.0%)  
777 OLD SAW MILL RIVER ROAD  
TARRYTOWN, NY 10591, US**

72 Inventor/es:

**FANDL, JAMES P. y  
DOU, CHANGLIN**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO FACES, José**

**ES 2 439 874 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).

**Sistema de expresión en eucariotas inducible****Descripción****5 CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a procedimientos para la expresión inducible de genes en células eucariotas. La invención incluye adicionalmente células capaces de expresión génica inducible, animales transgénicos que comprenden tales células y secuencias de nucleótidos y proteínas que comprenden proteínas de fusión reguladoras.

10

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

En la técnica se conocen diversos procedimientos para la expresión controlada de una secuencia de nucleótidos recombinante de interés en una célula. Por ejemplo, No y col. (1996) Proc. Natl Acad. Sci. USA, 93:3346-3351, describen un sistema de expresión génico inducible que utiliza un transactivador quimérico que consiste en el receptor nuclear de ecdisona fusionado con el dominio de transactivación de VP16. En presencia del inductor, este transactivador quimérico se une a secuencias de reconocimiento en la dirección 5' de un promotor y estimula la transcripción de una secuencia de nucleótidos de interés. En ausencia del inductor, la expresión de la secuencia de nucleótidos de interés se reduce y es dependiente del nivel basal de transcripción de la secuencia de nucleótidos del promotor de interés. Gossen y col. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551, describen un sistema para regular la expresión de una secuencia de nucleótidos de interés basada en una proteína quimérica, tTA, que consiste en la proteína represora TetR fusionada con el dominio de transactivación de VP16. Similar al sistema de ecdisona, las secuencias de ADN que especifican el sitio de unión a ADN de TetR se insertan en la dirección 5' del gen promotor de forma que la unión de la proteína de fusión TetR-VP16 estimule la transcripción del promotor y la expresión de la secuencia de nucleótidos de interés. También se han desarrollado otros sistemas elegidos como diana para sitios de unión a ADN específicos proximales a un promotor mínimo para la regulación elegida como diana de la transcripción que utiliza el dominio de transactivación de VP16, que incluyen GAL4-VP16 (Sadowski y col. (1988) Nature 335:563-564), LexA-VP16 (Brent y col. (1985) Cell 40:729-736) y Lael-VP16 (Labow y col. (1990) Mol. Cell. Biol. 10:3342-3356). Otros sistemas basados en TetR se describen en Deuschle y col. (1995) Mol. Cell. Biol. 15:1907-1914 y Yao y col. (1998) Hum. Gene Ther. 13:1939-1950. El documento WO01/30843 desvela proteínas de fusión como reguladores dependientes de ligando en células eucariotas.

15

20

25

30

35

Los problemas resultantes de la expresión defectuosa relacionada con el uso de un promotor mínimo han conducido a sistemas que usan fusiones de los dominios de unión a esteroide de los receptores nucleares de glucocorticoides o estrógenos (véanse, por ejemplo, Mattioni y col. (1994) Methods Cell Biol. 43:335-352; Louvion y col. (1993) Gene 131:129-134; Iida y col. (1996) J. Virol. 70: 6054-6059.

**BREVE RESUMEN DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a un sistema de expresión génico inducible estrechamente regulado adecuado para la producción a gran escala de una molécula recombinante de interés en una célula eucariota. Los componentes del sistema de la presente invención incluyen una proteína de fusión que tiene un dominio de bloqueo de la transcripción y un dominio de unión a ligando; un operador que se une al dominio de bloqueo de la transcripción de la proteína de fusión para inhibir la transcripción de una secuencia de nucleótidos; y un promotor que está bajo el control del operador. Si se desea inhibir la expresión de la secuencia de nucleótidos de interés, el sistema incluye un ligando que puede unirse al dominio de unión a ligando de la proteína de fusión, de forma que la proteína de fusión se estabiliza. Si se desea que la secuencia de nucleótidos de interés se exprese, el ligando se elimina, que produce desestabilización y degradación de la proteína de fusión. Por consiguiente, en ausencia del ligando relacionado, la proteína de fusión se elimina del operador, y la inhibición del operador del promotor que controla la expresión de la secuencia de nucleótidos de interés se elimina, permitiendo así que se exprese la secuencia de nucleótidos de interés.

40

45

50

55

La invención proporciona un procedimiento de inducción de la expresión de una secuencia de nucleótidos de interés en una célula eucariota, que comprende:

(a) proporcionar una célula eucariota que comprende

(i) una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión reguladora (RPR), en la que la proteína de fusión consiste en

60

(1) un dominio de bloqueo de la transcripción bacteriano o de bacteriófago que puede inhibir la expresión de la secuencia de nucleótidos de interés, y

(2) un dominio de unión a ligando que comprende un dominio de unión a ligando de receptor de estrógeno humano que tiene las mutaciones G400V, M543A y L544A, que se une a tamoxifeno;

65

(ii) un promotor operativamente ligado a la secuencia de nucleótidos de interés y controlado por un

operador bacteriano o de bacteriófago que puede unirse al dominio de bloqueo de la transcripción bacteriano o de bacteriófago y bloquear la transcripción del promotor;

- 5 (b) cultivar la célula de etapa (a) a una densidad deseada en presencia de tamoxifeno que se une al dominio de unión a ligando de la proteína de fusión, inhibiéndose la expresión de la secuencia de nucleótidos de interés; y  
(c) eliminar el tamoxifeno de la presencia de la célula, induciéndose la expresión de la secuencia de nucleótidos de interés.

10 La invención también proporciona una secuencia de nucleótidos aislada que codifica una proteína de fusión reguladora, en la que la proteína de fusión consiste en

- 15 (1) un dominio de bloqueo de la transcripción bacteriano o de bacteriófago que puede unirse a un operador bacteriano o de bacteriófago, en la que el operador está operativamente ligado a un promotor que puede accionar la expresión de una secuencia de nucleótidos de interés, y en la que la unión del dominio de bloqueo al operador puede inhibir la expresión de la secuencia de nucleótidos de interés, y  
(2) un dominio de unión a ligando de un receptor de estrógeno humano que tiene las mutaciones G400V, M543A y L544A que se une tamoxifeno,  
20 en la que en presencia de tamoxifeno estabiliza la proteína de fusión.

La invención también proporciona una proteína de fusión reguladora codificada por la secuencia de nucleótidos de la invención.

25 La invención también proporciona una célula eucariota capaz de expresión inducible de una secuencia de nucleótidos de interés, que comprende

- (a) una secuencia de nucleótidos de interés operativamente ligada a un promotor que puede accionar la expresión de la secuencia de nucleótidos de interés;  
(b) un operador bacteriano o de bacteriófago operativamente ligado a un promotor; y  
30 (c) una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión reguladora, en la que la proteína de fusión consiste en:  
(1) un dominio de bloqueo de la transcripción bacteriano o de bacteriófago que puede unirse al operador e inhibir la expresión de la secuencia de nucleótidos de interés, y  
35 (2) un dominio de unión a ligando de un receptor de estrógeno humano que tiene las mutaciones G400V, M543A y L544A, que se une tamoxifeno;

40 en la que en presencia de tamoxifeno que se une al dominio de unión a ligando de la proteína de fusión inhibe la expresión de la secuencia de nucleótidos de interés, y en la que eliminación de tamoxifeno produce expresión inducida del nucleótido de interés.

La invención también proporciona un animal transgénico no humano que comprende la célula de la invención.

45 El dominio de bloqueo de la transcripción es una proteína que puede unirse a ADN y bloquear la transcripción del promotor adyacente. En realizaciones más específicas, el dominio de bloqueo de la transcripción está seleccionado del grupo que consiste en TetR, LexA, LacI, TrpR, Arc y LambdaCI.

Puede usarse una variedad de células eucariotas en el procedimiento de la invención, que incluyen sin limitación, una célula de levadura, tal como *Pichia pastoris*, o una célula de mamífero, tal como una célula COS, CHO, 293, BHK o NSO.

50 La presente invención puede usarse ampliamente en la transcripción de una secuencia de nucleótidos de interés, y el producto de interés puede ser el producto de transcripción, por ejemplo, un ARNm o ARN catalíticamente activo, o un producto en la dirección 3' resultante de la secuencia de nucleótidos transcrita de interés, por ejemplo, una proteína o fragmento de proteína, que incluye sin limitación una hormona, un receptor o fragmento de receptor, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, un péptido o proteína biológicamente activa, una enzima, una proteína represora o una proteína de unión a ADN.

## 60 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Fig. 1 representa la estructura de pTE313, diseñado para la expresión de TetR-ER<sub>LBD</sub>T2 a partir de un promotor del CMV.

65 La Fig. 2 representa la estructura de pTE158, diseñado para la expresión de FcγRI humano a partir de un promotor del CMV que está regulado por el represor de tetraciclina.

La Fig. 3 muestra una idea general de las dos estrategias usadas para aislar clones CHO K1 que expresaron el gen hFc $\gamma$ RI regulado por TetR-ER<sub>LBD</sub>T2 RFP.

La Fig. 4 muestra histogramas de citometría de flujo del clon de CHO K1-FcR/pTE313 D124 cultivado en presencia o ausencia de OHT, o en presencia de OHT y Dox, teñido con FITC-Fc.

La Fig. 5 es un diagrama esquemático de la proteína de fusión Arc2-ER<sub>LBD</sub>T2.

La Fig. 6 es un diagrama esquemático del promotor híbrido CMV-MIE/AO (SEC ID N°: 7) que tiene operadores arc en tándem inmediatamente en la dirección 3' del promotor/potenciador de CMV-MIE (caja TATA).

La Fig. 7 muestra histogramas de citometría de flujo del clon de CHO K1-FcR/pTE534 C17 cultivado en presencia o ausencia de OHT, teñido con FITC-Fc.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Antes de describir los presentes procedimientos debe entenderse que la presente invención no se limita a procedimientos particulares y condiciones experimentales descritas, ya que tales procedimientos y condiciones pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento es con el fin de solo describir realizaciones particulares, y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención se limitará solo a las reivindicaciones adjuntas.

Como se usa en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular “un”, “una”, “el” y “la” incluyen referencias en plural, a menos que el contexto dicte claramente de otro modo. Así, por ejemplo, referencias a “un procedimiento” incluyen uno o más procedimientos y/o etapas del tipo descrito en el presente documento y/o que serán evidentes para aquellos expertos en la materia tras la lectura de esta divulgación, etc.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque cualquier procedimiento y material similar o equivalente a aquellos descritos en el presente documento puede usarse en la práctica o prueba de la presente invención, ahora se describen los procedimientos preferidos y materiales.

### Descripción general

La presente invención se basa en parte en el concepto de que la expresión génica en células eucariotas puede regularse estrechamente usando un promotor fuerte que está controlado por un operador que está a su vez regulado por una proteína de fusión reguladora (RFP). La RFP consiste esencialmente en un dominio de bloqueo de la transcripción y un dominio de unión a ligando que regula su actividad. En presencia del ligando relacionado para el dominio de unión a ligando, la RFP se une al operador previniendo así la transcripción del GOI. Cuando se retira el ligando relacionado, la RFP se desestabiliza y continúa la transcripción de la secuencia de nucleótidos de interés.

El sistema regulador descrito en el presente documento proporciona ventajas específicas que combinan un control estrechamente regulado de la expresión de una secuencia de nucleótidos de interés con el aislamiento de líneas celulares que pueden expresar a alto nivel la secuencia de nucleótidos de interés adecuada para producción a gran escala. El término “estrechamente regulado” indica que en presencia de un ligando que se une al dominio de unión a ligando de la proteína de fusión de la invención, la transcripción de la secuencia de nucleótidos de interés se reduce sustancialmente, por ejemplo, se logra al menos una disminución de 20 veces en la transcripción en presencia del ligando con respecto al nivel de transcripción observado en ausencia del ligando. En realizaciones más específicas, el procedimiento de la invención logra al menos una disminución de 50 veces en la transcripción en presencia de ligando. En realizaciones incluso más específicas, el procedimiento de la invención consigue una disminución de 100 veces o mayor en la transcripción en presencia de ligando. Ejemplos del grado de control de la transcripción logrado mediante los procedimientos de la invención se observan en las Figs. 4 y 7. El grado de regulación de la transcripción logrado mediante el procedimiento de la invención también puede establecerse como una diferencia en la expresión de la secuencia de nucleótidos de interés en ausencia del ligando que es al menos 20 veces mayor, preferentemente al menos 50 veces mayor, más preferentemente al menos 100 veces mayor, que la expresión de la secuencia de nucleótidos de interés en presencia del ligando.

El aislamiento de líneas celulares que pueden expresar una secuencia de nucleótidos de interés a altos niveles requiere estrecha regulación, pero la inducción de la expresión de la secuencia de nucleótidos de interés se realiza preferentemente por eliminación de un inductor, en vez de la adición de uno, es de importancia comercial sustancial como medio de reducción del coste de producción con respecto a un sistema que requiere la adición de un ligando durante la producción a gran escala. La presente invención describe un sistema regulador que satisface estos requisitos.

### Secuencia de nucleótidos de interés

Los procedimientos de la invención pueden usarse ampliamente para controlar la transcripción de cualquier secuencia de nucleótidos de interés. El procedimiento de la invención puede usarse para producir una proteína deseada o fragmento de proteína, que incluye, por ejemplo, proteínas o péptidos de fusión y quiméricos. Además, el producto de interés puede ser un producto de transcripción, por ejemplo, un ARNm o ARN catalíticamente activo, o un producto en la dirección 3' resultante de la acción del producto de transcripción inicial.

Proteínas de interés pueden incluir, sin limitación, una hormona, un receptor o fragmento de receptor, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, un péptido o proteína biológicamente activa, una enzima, una proteína represora o una proteína de unión a ADN.

## Promotores

“Promotor” como se usa en el presente documento indica una secuencia de ADN suficiente para dirigir la transcripción de una secuencia de ADN con la que está operativamente ligado, es decir, ligado de tal forma que permita la transcripción de la secuencia de nucleótidos de interés cuando estén presentes las señales apropiadas. La expresión de una secuencia de nucleótidos de interés puede ponerse bajo el control de cualquier elemento promotor o potenciador conocido en la técnica.

Promotores útiles que pueden usarse en la invención incluyen, pero no se limitan a, la región del promotor temprano del SV40, el promotor contenido en la repetición terminal larga de 3' del virus del sarcoma de Rous, las secuencias reguladoras del gen de metalotioneína, promotor del citomegalovirus IE de ratón o humano (Gossen y col., (1995) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89:5547-5551); vectores de expresión en plantas que comprenden la región promotora de nopalina sintetasa, el promotor 35S ARN del virus del mosaico de la coliflor y el promotor de la enzima fotosintética ribulosa bifosfato carboxilasa; elementos promotores de levadura u otros hongos tales como el promotor de Gal 4, el promotor de ADC (alcohol deshidrogenasa), promotor de PGK (fosfoglicerol cinasa), promotor de fosfatasa alcalina y las siguientes regiones de control de la transcripción en animal, que presentan especificidad por tejido y se han utilizado en animales transgénicos: elastasa I; insulina; inmunoglobulina; virus del tumor mamario de ratón;  $\alpha$ -fetoproteína;  $\alpha$ 1-antitripsina;  $\beta$ -globina; y cadena ligera de miosina 2.

## Operadores

Como se usa en el presente documento, “operador” indica una secuencia de ADN que se introduce en o próxima a un gen de tal forma que el gen pueda regularse por la unión de la RFP al operador y, como resultado, prevenir o permitir la transcripción del GOI. Se han caracterizado bien varios operadores en células procariontas y bacteriófago (Neidhardt, ed. *Escherichia coli and Salmonella*; Cellular and Molecular Biology 2ª ed. Vol 2 ASM Press, Washington D.C. 1996). Éstos incluyen, pero no se limitan a, la región de operador del gen *LexA de E. coli*, que se une al péptido de LexA, y los operadores de lactosa y triptófano, que se unen a las proteínas represoras codificadas por los genes *Lacl* y *trpR* de *E. coli*. Éstos también incluyen los operadores de bacteriófago de  $P_R$  lambda y los genes *antImnt* del fago P22 que se unen a proteínas represoras codificadas por lambda *cl* y *arc* de P22. En una realización alternativa, cuando el dominio de bloqueo de la transcripción de RFP es una enzima de restricción, el operador es la secuencia de reconocimiento para esa enzima. Un experto en la materia reconocerá que el operador debe localizarse adyacente a o 3' con respecto al promotor de forma que pueda controlarse la transcripción por el promotor. Por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 5.972.650, que se incorpora por referencia en el presente documento, especifica que las secuencias de *tetO* están dentro de una distancia específica de la caja de TATA. En realizaciones específicas, el operador está colocado preferentemente inmediatamente en la dirección 3' del promotor. En otras realizaciones, el operador está colocado dentro de 10 pares de bases del promotor.

## Dominio de bloqueo de la transcripción

Como se describe en el presente documento, un dominio de bloqueo de la transcripción es cualquier dominio que pueda bloquear la transcripción como resultado de su interacción con un operador. Un dominio tal puede derivarse de bacterias, bacteriófagos o levadura e incluye, pero no se limita a, aquellos represores, o derivados de los mismos, cuya función depende de la unión a ligando, tales como TetR, LexA, Lacl y Arc. Alternativamente, el dominio de bloqueo de la transcripción puede derivarse de células de mamífero como se describe, por ejemplo, en Yin y col. 1995 J. Virol. 69:6209-6218, o células vegetales, como se describe, por ejemplo, en Wilde y col. 1994 Plant Mol. Biol. 24:38. El dominio de bloqueo de la transcripción también puede prepararse sintéticamente. Por ejemplo, el dominio de bloqueo de la transcripción puede ser una enzima de restricción que está mutada de forma que ya no pueda escindir ADN. En un caso tal, la secuencia de reconocimiento para esa enzima se usaría como operador.

## Dominio de unión a ligando

Aunque la capacidad de la proteína de fusión para interactuar con el operador está controlada por el dominio de bloqueo de la transcripción, la actividad de la proteína de fusión está regulada por el dominio de unión a ligando. El dominio de unión a ligando puede derivarse de cualquier polipéptido que, cuando se une a su ligando relacionado, convierte el polipéptido en funcional, que incluye, por ejemplo, estabilizar el polipéptido. Se indica que el dominio de unión a ligando incluye dominios de unión a ligando que se producen naturalmente, además de derivados

funcionales de los mismos. Como se usa en el presente documento, "ligando relacionado" incluye los ligandos que se producen naturalmente que se unen a los dominios de unión a ligando, además de derivados funcionales de los mismos. Ejemplos de tales dominios de unión a ligando incluyen, pero no se limitan a, los dominios de unión a ligando de receptores esteroides, receptores glucocorticoides, receptores retinoides y receptores tiroideos (Eilers y col. (1989) *Nature* 340:66-68; Picard y col. (1988) *Cell* 54:1073-1080). Los Ejemplos 1-3 ilustran una realización de la invención, en la que el dominio de bloqueo de la transcripción de la proteína de fusión es TetR y el dominio de unión a ligando es el dominio de unión a ligando de receptores de estrógenos con mutaciones en T2 (ER<sub>LBD</sub>T2; Feil y col. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237:752-757). Cuando las secuencias de TetO se colocaron en la dirección 3' y proximales al promotor de CMV-MIE fuerte, la transcripción de la secuencia de nucleótidos de interés (en este caso hFc $\gamma$ RI) del promotor CMV-MIE/TetO se bloqueó en presencia de tamoxifeno y se desbloqueó por eliminación de tamoxifeno.

### Metodologías de selección de células

Los procedimientos de la invención producen células que tienen una alta tasa de producción para una secuencia de nucleótidos de interés. Además de los procedimientos descritos en la sección experimental más adelante, puede usarse una variedad de procedimientos de selección conocidos en la técnica. En una realización preferida, el procedimiento de selección es la metodología "FASTR" descrita en USSN 20020168702 publicado el 14 de noviembre de 2002, incorporado en el presente documento específicamente por referencia. La metodología FASTR es un procedimiento de cribado de alta resolución para el rápido aislamiento de células que secretan una proteína de fusión específica para citocinas de la invención, por cribado directo de la proteína de fusión.

### Animales transgénicos

La presente invención también contempla la creación de mamíferos transgénicos no humanos que expresan las proteínas de fusión de la invención. Por ejemplo, puede desearse regular la expresión de secuencias de nucleótidos de interés en un mamífero no humano. Un gen que codifica las proteínas de fusión de la invención puede integrarse en el genoma de un mamífero no humano de manera que se regule la expresión de una secuencia de nucleótidos de interés cuyo promotor se manipuló para ser sensible a la proteína de fusión. Además, pueden ser útiles animales transgénicos no humanos como fuente de una secuencia de nucleótidos de interés.

Un animal transgénico no humano puede producirse introduciendo una construcción de ácidos nucleicos en los pronúcleos masculinos de un ovocito fecundado, por ejemplo, por microinyección, infección retroviral, y permitiendo que el ovocito se desarrolle en un animal de crianza hembra pseudopreñada. Cualquiera de las secuencias reguladoras u otras secuencias útiles en vectores de expresión pueden formar parte de la secuencia transgénica. Una secuencia(s) reguladora(s) específica(s) para tejido puede estar operativamente ligada al transgén para dirigir la expresión del transgén a células particulares.

### Kits

En el presente documento se describe un kit que comprende uno o más recipientes llenos de al menos una proteína de fusión de la invención. Opcionalmente asociados a tal(es) recipiente(s) puede estar un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso y venta de productos farmacéuticos o productos biológicos, aviso que refleja (a) aprobación por la agencia de fabricación, uso o venta para administración humana, (b) indicaciones para su uso, o ambas.

### Realizaciones específicas

El Ejemplo 1 describe la construcción de los plásmidos pTE313, pTE084 y pTE158. pTE313 se diseñó para la expresión de alto nivel de una proteína de fusión reguladora TetR-ER<sub>LBD</sub>T2. Contiene un primer casete de expresión independiente que es el gen de fusión de TetR-ER<sub>LBD</sub>T2 accionado por el promotor del CMV-MIE, y el segundo casete independiente que es el gen de resistencia a blasticidina accionado por el promotor del SV40 (Fig. 1). pTE084 se diseñó para la expresión de alto nivel de hFc $\gamma$ RI, el receptor de alta afinidad de la superficie celular para el dominio de Fc de IgG humana. pTE158 se generó colocando dos operadores de TetR en tándem inmediatamente en la dirección 3' del promotor/potenciador del CMV-MIE en pTE084 (Fig. 2). Se generaron células CHO K1 que expresan el gen hFc $\gamma$ RI regulado por TetR-ER<sub>LBD</sub>T2 RFP después de la transfección con pTE313 y se identificaron como se describe en el Ejemplo 2.

Se emplearon dos estrategias para aislar clones que expresaron el gen hFc $\gamma$ RI regulado por TetR-ER<sub>LBD</sub>T2 RFP después de la transfección con pTE313 (Fig. 3). Ambas estrategias empezaron a partir del mismo conjunto de células obtenidas después de la introducción de TetR-ER<sub>LBD</sub>T2 RFP en células CHO K1-FcR y aislamiento (Ejemplo 3). Estos resultados muestran claramente que la expresión de un gen recombinante puede regularse estrechamente por TetR-ER<sub>LBD</sub>T2 y la inducción de la expresión puede lograrse por tanto la adición de doxiciclina en presencia de tamoxifeno como la eliminación de tamoxifeno (Fig. 4). La inducción de la expresión de una secuencia de nucleótidos de interés por eliminación de una molécula pequeña del medio de cultivo, conseguido fácilmente por dilución o intercambio de medio, proporciona un medio rentable para inducir la expresión a gran escala. Además,

estos datos muestran que la estrecha regulación de la expresión puede lograrse por la proteína de fusión reguladora TetR-ER<sub>LBD</sub>T2.

Se generaron células CHO K1 que expresan hFc $\gamma$ RI accionadas por el promotor del CMV-MIE/ArcO2 como se describe en los Ejemplos 4 y 5. Líneas celulares inducibles reguladas por Arc-ER<sub>LBD</sub>T2 se seleccionaron similarmente a las estrategias mostradas en la Fig. 3, y mostraron estrecha regulación en respuesta a la presencia de OHT en el medio de crecimiento (Ejemplo 6 y Fig. 7).

## EJEMPLOS

El siguiente ejemplo se propone de manera que se proporcione a aquellos expertos habituales en la materia una divulgación y descripción de cómo hacer y usar los procedimientos y composiciones de la invención, y no pretende limitar el alcance de lo que los inventores consideran como su invención. Se han hecho esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero debe contarse con algunos errores experimentales y desviaciones. A menos que se indique lo contrario, partes son partes en peso, peso molecular es peso molecular promedio, temperatura es en grados centígrados, y la presión es atmosférica o próxima a atmosférica.

### Ejemplo 1. Construcción de pTE313, pTE084 y pTE158

pTE313 se construyó ligando un fragmento de EcoR I de 975 pb (romo) de pTA-ER-LBD-T2 que codifica el dominio de unión a ligando de receptor de estrógeno humano con mutaciones T2 (ER<sub>LBD</sub>T2) (Feil, y col. 1997 Biochem Biophys Res Commun 237:752-757) en el sitio EcoR I (romo, en la región de ligador inmediatamente siguiente al extremo C de TetR) de pDNAc6/TR (nº de cat. de Invitrogen V-1025-20). Las mutaciones de T2 G400V, M543A y L544A confieren especificidad por la unión al análogo de estradiol tamoxifeno. La apropiada orientación del fragmento que codifica ER<sub>LBD</sub>T2 en plásmidos deseables resultantes de la ligación se confirmó por determinación de secuencias de ADN. Esta construcción produjo un gen que codifica una proteína de fusión que consiste en los aminoácidos M1 a S207 de TetR (acceso de Genbank AAF75608) fusionados con aminoácidos N304 a V595 del receptor de estrógeno (acceso de Genbank P03372). La proteína quimérica codificada por este gen también tiene las mutaciones en T2 G400V, M543A y L544A en el receptor de estrógeno. El plásmido pTE313 contiene un casete que es el gen de fusión TetR-ER<sub>LBD</sub>T2 accionado por el promotor CMV-MIE, y un segundo casete que es el gen de resistencia a blasticidina accionado por el promotor SV40 (Fig. 1).

pTE084 se construyó ligando el fragmento Xba I de 1.436 pb de pCAE100 que codifica Fc $\gamma$ RI humana (número de acceso de GenBank M21091) en el sitio Xba I de pRG821, un vector que codifica el gen neomicina fosfotransferasa II (*npt*) que confiere resistencia a G418. La orientación de hFc $\gamma$ RI en plásmidos deseables resultantes de la ligación se examinó por mapeo de restricción con Not I, Pst I, Eco RI y Stu I. Un fragmento de ADN que codifica dos operadores de TetR en tándem se colocó inmediatamente en la dirección 3' del promotor/potenciador del CMV-MIE en pTE084 para generar pTE158 (Fig. 2). En este plásmido, la transcripción de hFc $\gamma$ RI del promotor del CMV-MIE se reguló por TetR o TetR-ER<sub>LBD</sub>T2.

### Ejemplo 2. Construcción de un derivado de CHO K1 que expresa hFc $\gamma$ RI accionado por CMV-MIE/TetO

Células CHO K1 (3 x 10<sup>6</sup> células) se transfectaron con pTE158 usando Lipofectamine™ (Life Technologies; Rockville, MD) siguiendo las sugerencias del fabricante. Las células se colocaron en el medio de cultivo (10% de suero bovino fetal, 90% de Ham's F-12, L-glutamina 2 mM; todos los reactivos fueron de Life Technologies, Rockville, MD) que contenía 500 ug/ml de G418 (Life Technologies) durante 12 días. Las células resistentes a G418 se tripsinaron, se reunieron y se tiñeron con fragmento Fc de IgG humana conjugada con FITC (FITC-hFc; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Brevemente, las células se cultivaron en placas de cultivo de 10 cm, se lavaron una vez con solución salina tamponada con fosfato (PBS) de Dulbecco sin cloruro de calcio y cloruro de magnesio (Life Technologies). Se añadieron dos mililitros de tripsina al 0,25% (Life Technologies) a cada placa y se incubaron a 37 °C durante 4-5 min. Las placas se giraron hasta que las células se desprendieron de la placa. Inmediatamente se añadieron cuatro mililitros de medio de cultivo a cada placa de las células desprendidas. Las células se recogieron entonces por centrifugación a 1.000 x g durante 4 minutos, luego se resuspendieron en 4 ml de 2 ug/ml de FITC-hFc diluido en medio de cultivo. Las células se colocaron entonces sobre un agitador de plataforma y se tiñeron durante una hora a temperatura ambiente. Para eliminar el FITC-hFc sin unir, las células se lavaron dos veces con 8 ml de PBS. Las células lavadas que pueden unirse a FITC-hFc se midieron por citometría de flujo en un citómetro Moflo™ (Cytomation; Fort Collins, CO). FITC-hFc no tiñó células CHO K1 parentales no transfectadas, pero dio lugar a una distribución de la fluorescencia en el conjunto transfectado con pTE158 resistente a G418. El conjunto total de células fluorescentes de la población resistente a G418 se recogió por citometría de flujo, se expandió, luego se analizó por citometría de flujo para la expresión de hFc $\gamma$ RI. Las células que poseyeron la mayor fluorescencia del 15% en esta población se aislaron, se reunieron y se expandieron dando una población de células resistentes a G418 que expresó hFc $\gamma$ RI a altos niveles. Esta población de células se llamó CHO K1-FcR y se usó para aislar un clon que expresó el gen hFc $\gamma$ RI regulado por TetR-ER<sub>LBD</sub>T2 RFP después de la transfección con pTE313.

**Ejemplo 3. Construcción de líneas celulares CHO K1 con expresión de hFc $\gamma$ RI regulada por TetR-ER<sub>LBD</sub>T2.**

Se transfectaron células CHO K1-FcR ( $2 \times 10^6$  células) con pTE313 usando Lipofectamine™. Las células transfectadas se seleccionaron con 500 ug/ml de G418 y 10 ug/ml de blasticidina durante 14 días para seleccionar ambos plásmidos, pTE158 y pTE313. Dos días antes del análisis por citometría de flujo, las células se incubaron en medio de cultivo que contenía tamoxifeno 200 nM (OHT) para estabilizar la actividad de TetR-ER<sub>LBD</sub>T2 y reprimir la expresión de hFc $\gamma$ RI. Las células se tiñeron con FITC-hFc y aquellas células que poseían la menor fluorescencia del 2%, que indica represión de la expresión de Fc $\gamma$ RI, se recogieron dando el conjunto A1. Entonces este conjunto se usó como fuente de células para las dos estrategias explicadas brevemente en la Fig. 3.

Los clones que expresaron hFc $\gamma$ RI regulados por TetR-ER<sub>LBD</sub>T2 se aislaron manipulando la actividad de TetR-ER<sub>LBD</sub>T2 por la presencia o ausencia de doxiciclina (Dox). Una estrategia implicó el aislamiento de células que expresan altos niveles de hFc $\gamma$ RI en presencia de OHT y Dox, seguido de aislamiento de células que no se expresan en presencia de OHT sin Dox. Alternativamente, las células que expresan bajos niveles de hFc $\gamma$ RI en presencia de OHT sin Dox se aislaron primero, luego se aislaron células de alta expresión de este conjunto por la inducción con Dox en presencia de OHT. Ambas estrategias utilizaron una serie de aislamientos celulares bajo condiciones inductoras y represoras alternas, y un aislamiento final de células individuales que expresaron altos niveles de hFc $\gamma$ RI en ausencia de tanto OHT como Dox (Fig. 3).

El conjunto A1 se expandió durante 7 días en presencia de OHT 200 nM, luego se repartió en dos placas; una placa contuvo medio con 1 ug/ml de Dox y la otra no. Las células se incubaron durante tres días, luego se tiñeron con FITC-hFc para detectar la presencia de hFc $\gamma$ RI. El 60% superior de células positivas para hFc $\gamma$ RI del cultivo inducido con 1 ug/ml de Dox se aisló dando el conjunto B11, y las células con la menor fluorescencia del 30% se aislaron de células cultivadas en medio sin Dox dando el conjunto B12. El conjunto B11 se cultivó en tamoxifeno 200 nM sin Dox y las células con la menor fluorescencia del 1% se recogieron dando el conjunto C11. El conjunto B12 se cultivó en OHT 200 nM y 1 ug/ml de Dox, y el 1% superior de las células positivas para hFc $\gamma$ RI se recogió como un conjunto dando el conjunto C12. Tanto el conjunto C11 como conjunto C12 se expandieron luego en ausencia de tanto OHT como Dox. Las células que expresaron los mayores niveles de hFc $\gamma$ RI (1% superior) en ausencia de OHT y Dox se clasificaron luego sobre placas de 96 pocillos a una célula por pocillo. Estas células deben tener baja expresión no inducida de hFc $\gamma$ RI y altos niveles de hFc $\gamma$ RI cuando se induce por la eliminación de OHT como consecuencia de alternar el aislamiento de expresión de hFc $\gamma$ RI inducida o reprimida.

Después de la expansión, diez clones individuales se caracterizaron para la inducción de hFc $\gamma$ RI, por retirada de OHT o adición de 1 ug/ml de Dox, por inmunotinción con FITC-hFc y análisis por citometría de flujo. Los análisis de un clon (D124 del conjunto C12) no mostró nivel detectable de hFc $\gamma$ RI cuando OHT estuvo presente sin Dox, mientras que se observaron altos niveles de expresión de hFc $\gamma$ RI en ausencia de OHT y Dox. Además, la adición de Dox a 1 ug/ml para cultivar células en presencia de OHT también produjo altos niveles de expresión de hFc $\gamma$ RI. Fue indistinguible el nivel de expresión de hFc $\gamma$ RI en este clon que resultó de la inducción por tanto eliminación de OHT como de 1 ug/ml de doxiciclina, en presencia de OHT (Fig. 4).

**Ejemplo 4. Construcción de pTE528, pTE529 y pTE534**

El gen represor Arc del fago P22 codifica un represor transcripcional de 53 aminoácidos (M1 a A53 codificado por los nucleótidos 38.336 a 38.494 de ADN genómico del fago P22 (acceso de GenBank NC002371)). La represión de la transcripción mediada por Arc implica la adición secuencial de dímeros a medios sitios del operador. Se mostró previamente que un dímero monocatenario que consistía en dos proteínas Arc conectadas por un ligador de 15 aminoácidos tenía mayor afinidad por ADN del operador arc que el represor natural (Robinson y col. (1996) Biochemistry 35:109-116). Para aprovechar la mayor afinidad del dímero monocatenario por el ADN de operador, se diseñó un ADN sintético que codificó este dímero de Arc monocatenario fusionado con una secuencia de la marca His que consistía en 6 residuos de histidina. Este fragmento de ADN de XhoI/NotI sintético de 444 pb se clonó en pUC119 dando pUC119-Arc2-His6 (Blue Heron Technology Inc.). El gen dímero Arc2 se escindió entonces de este plásmido y se clonó en los sitios Xho1 y Not1 de pRG985, de forma que la expresión del gen Arc2 dependió del promotor de Ubc/intrón de  $\beta$ -globina, dando pTE528.

La proteína de fusión Arc2-ER<sub>LBD</sub>T2 (Fig. 5) se construyó ligando un fragmento BamH I de 3361 pb de pTE502, que contiene ER<sub>LBD</sub>T2 humano que codifica ADN como se ha descrito anteriormente, en los sitios BamH I de pTE528 dando pTE529. La proteína de fusión Arc2-ER<sub>LBD</sub>T2 resultante tuvo el mismo ligador de 11 aminoácidos (AYSGSRELIRL) (SEC ID N°: 1) entre el gen Arc2 y el gen ER<sub>LBD</sub>T2 como entre TetR y ER<sub>LBD</sub>T2 en TetR-ER<sub>LBD</sub>T2 (SEC ID N°: 3).

Para cambiar los operadores de Tet en el promotor del CMV-MIE/TO a operadores Arc, codificados por los pares de bases 38.273 a 38.293 en el genoma del fago P22 (acceso de Genbank NC002371), pTE158 se usó como molde para amplificar un fragmento de ADN por PCR con el siguiente conjunto de cebadores (5'-GAGTATTTA CCGTAAACTGCCACTT-3' (SEC ID N°: 4) y 5' GAGAGATCTGAGTCGACATAGTA-

GAGTGCTTCTATCATGAATAGTAGAGTGCTTCTATCATGAGCTCTGCTTATATAGAC CTCCA-3') (SEC ID N°: 5). El producto de PCR, que codifica operadores Arc en tándem, se digirió con NdeI y Sall y se clonó en los mismos sitios en pTE158. El promotor híbrido del CMV-MIE/AO tiene dos operadores arc en tándem inmediatamente en la dirección 3' del promotor/potenciador del CMV-MIE (Fig. 6) (SEC ID N°: 6). Por consiguiente, el represor transcripcional Arc2-ER<sub>LBD</sub>T2 regulará la transcripción de hFc $\gamma$ RI del promotor del CMV-MIE/AO en pTE534.

#### **Ejemplo 5. Construcción de un derivado de CHO K1 que expresa hFc $\gamma$ RI accionado por el promotor del CMV-MIE/ArcO2.**

Se transfectaron células CHO K1 ( $2 \times 10^6$ ) con pTE534 usando Lipofectamine™ como se ha descrito anteriormente. Las células se colocaron en el medio de cultivo (10% de suero bovino fetal, 90% de Ham's F-12, L-glutamina 2 mM; todos los reactivos fueron de Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) que contenía 400  $\mu$ g/ml de G418 (Invitrogen Life Technologies) durante 12 días. Las células resistentes a G418 se tripsinaron, se reunieron y se tiñeron con 2  $\mu$ g/ml de fragmento Fc de IgG humana conjugada con FITC (FITC-hFc) como se ha descrito anteriormente. FITC-hFc no tiñó células CHO K1 parentales no transfectadas. Células que expresaron hFc $\gamma$ RI se unieron a FITC-hFc y se aislaron basándose en su fluorescencia por citometría de flujo en un citómetro Moflo™. Las células con la mayor fluorescencia del 3% en esta población se aislaron, se reunieron y se expandieron. Este conjunto positivo para hFc $\gamma$ RI se enriqueció repitiendo la tinción celular superficial con FITC-hFc y clasificando el 30% de células más fluorescentes superiores en la población dando B. Las células en el conjunto B que estuvieron entre el 20% superior que expresa hFc $\gamma$ RI se aislaron dando el conjunto C. El conjunto C2 (CHOK1/pTE534) se usó para generar líneas celulares inducibles reguladas por Arc-ER<sub>LBD</sub>T2.

#### **Ejemplo 6. Construcción de líneas celulares CHO K1 con expresión de hFc $\gamma$ RI dependiente de Arc-ER<sub>LBD</sub>T2.**

Se transfectaron células CHO K1/pTE534 ( $2 \times 10^6$ /placa) con tanto pRG985, un vector vacío como pTE529 usando Lipofectamine™. Las células transfectadas se seleccionaron con 400  $\mu$ g/ml de G418 y 10  $\mu$ g/ml de puomicina en ausencia de OHT durante 14 días. Las células se tiñeron con FITC-hFc como se ha descrito anteriormente y se analizaron por citometría de flujo. Las células transfectadas con pRG985 fueron similares a células parentales y tuvieron perfiles de tinción de hFc $\gamma$ RI similares tanto si se cultivaron como si no en presencia de OHT antes del análisis. A diferencia, la expresión de hFc $\gamma$ RI en células CHO K1/pTE534 transfectadas con pTE529 muestra una marcada respuesta a la presencia de OHT en el medio de crecimiento. En ausencia de OHT en el medio de crecimiento, la mayoría de G418 y células resistentes a puomicina fueron positivas para la expresión de hFc $\gamma$ RI, y el 30% superior de células positivas para hFc $\gamma$ RI se clasificaron como un conjunto. Este conjunto se expandió en presencia de OHT durante 10 días, se tiñó para la expresión de hFc $\gamma$ RI y se analizó por citometría de flujo. Más del 70% de las células en este conjunto no expresaron hFc $\gamma$ RI en presencia de OHT, y aquellas células que expresan el 30% inferior se clasificaron como un conjunto. Entonces, estas células se expandieron en ausencia de OHT en el medio. Las células que expresaron los mayores niveles de hFc $\gamma$ RI (1% superior) en ausencia de OHT se clasificaron en una placa de 96 pocillos a una célula por pocillo.

Los clones que muestran estrecha regulación en respuesta a la presencia de OHT en el medio se caracterizaron adicionalmente por citometría de flujo. La regulación dependiente de OHT de la expresión de hFc $\gamma$ RI en estos clones se confirmó por inmunotinción con FITC-hFc seguido de análisis de citometría de flujo. No se observó nivel detectable de hFc $\gamma$ RI en un clon (C17) cuando OHT estuvo presente en el medio, mientras que el crecimiento en ausencia de expresión de OHT indujo hFc $\gamma$ RI en estos clones (Fig. 7).

#### **LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.

<120> Sistema de expresión en eucariotas inducible  
<130> REG 850A-WO

<140> PCT/US03/16676  
<141> 2003-05-28

<150> 60/384,004  
<151> 2002-05-29

<160> 6

<170> Fast SEQ for Windows Version 4.0

<210> 1  
<211> 11  
<212> PRT

ES 2 439 874 T3

<213> homo sapiens  
<400> 1

5 Ala Tyr Ser Gly Ser Arg Glu Leu Ile Arg Leu  
1 5 10

<210> 2  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> homo sapiens

10 <400> 2  
15 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Thr Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
1 5 10 15

<210> 3  
<211> 446  
<212> PRT  
<213> homo sapiens

20 <400> 3  
25 Met Lys Gly Met Ser Lys Met Pro Gln Phe Asn Leu Arg Trp Pro Arg  
1 5 10 15  
Glu Val Leu Asp Leu Val Arg Lys Val Ala Glu Glu Asn Gly Arg Ser  
20 25 30  
Val Asn Ser Glu Ile Tyr Gln Arg Val Met Glu Ser Phe Lys Lys Glu  
30 35 40 45  
Gly Arg Ile Gly Ala Gly Gly Gly Ser Gly Gly Thr Gly Gly Gly  
50 55 60  
Ser Gly Gly Gly Met Lys Gly Met Ser Lys Met Pro Gln Phe Asn Leu  
65 70 75 80  
35 Arg Trp Pro Arg Glu Val Leu Asp Leu Val Arg Lys Val Ala Glu Glu  
85 90 95

40  
45  
50  
55  
60  
65

ES 2 439 874 T3

Asn Gly Arg Ser Val Asn Ser Glu Ile Tyr Gln Arg Val Met Glu Ser  
 100 105 110  
 5 Phe Lys Lys Glu Gly Arg Ile Gly Ala Ala Tyr Ser Gly Ser Arg Glu  
 115 120 125  
 Leu Ile Arg Leu Ser Ala Gly Asp Met Arg Ala Ala Asn Leu Trp Pro  
 130 135 140  
 10 Ser Pro Leu Met Ile Lys Arg Ser Lys Lys Asn Ser Leu Ala Leu Ser  
 145 150 155 160  
 Leu Thr Ala Asp Gln Met Val Ser Ala Leu Leu Asp Ala Glu Pro Pro  
 165 170 175  
 15 Ile Leu Tyr Ser Glu Tyr Asp Pro Thr Arg Pro Phe Ser Glu Ala Ser  
 180 185 190  
 Met Met Gly Leu Leu Thr Asn Leu Ala Asp Arg Glu Leu Val His Met  
 195 200 205  
 Ile Asn Trp Ala Lys Arg Val Pro Gly Phe Val Asp Leu Thr Leu His  
 210 215 220  
 20 Asp Gln Val His Leu Leu Glu Cys Ala Trp Leu Glu Ile Leu Met Ile  
 225 230 235 240  
 Gly Leu Val Trp Arg Ser Met Glu His Pro Val Lys Leu Leu Phe Ala  
 245 250 255  
 25 Pro Asn Leu Leu Leu Asp Arg Asn Gln Gly Lys Cys Val Glu Gly Met  
 260 265 270  
 Val Glu Ile Phe Asp Met Leu Leu Ala Thr Ser Ser Arg Phe Arg Met  
 275 280 285  
 Met Asn Leu Gln Gly Glu Glu Phe Val Cys Leu Lys Ser Ile Ile Leu  
 290 295 300  
 30 Leu Asn Ser Gly Val Tyr Thr Phe Leu Ser Ser Thr Leu Lys Ser Leu  
 305 310 315 320  
 Glu Glu Lys Asp His Ile His Arg Val Leu Asp Lys Ile Thr Asp Thr  
 325 330 335  
 35 Leu Ile His Leu Met Ala Lys Ala Gly Leu Thr Leu Gln Gln Gln His  
 340 345 350  
 Gln Arg Leu Ala Gln Leu Leu Leu Ile Leu Ser His Ile Arg His Met  
 355 360 365  
 Ser Asn Lys Gly Met Glu His Leu Tyr Ser Met Lys Cys Lys Asn Val  
 370 375 380  
 40 Val Pro Leu Tyr Asp Leu Leu Leu Glu Ala Ala Asp Ala His Arg Leu  
 385 390 395 400  
 His Ala Pro Thr Ser Arg Gly Gly Ala Ser Val Glu Glu Thr Asp Gln  
 405 410 415  
 45 Ser His Leu Ala Thr Ala Gly Ser Thr Ser Ser His Ser Leu Gln Lys  
 420 425 430  
 Tyr Tyr Ile Thr Gly Glu Ala Glu Gly Phe Pro Ala Thr Val  
 435 440 445

50 <210> 4  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> homo sapiens

55 <400> 4  
 gagtatttac ggtaaactgc ccactt 26

60 <210> 5  
 <211> 86  
 <212> ADN  
 <213> homo sapiens

<400> 5

65 gagagatctg agtcgacata gttagagtgt tctatcatga atagtagagt gcttctatca 60  
 tgagctctgc ttatatagac ctccca 86

ES 2 439 874 T3

<210> 6  
<211> 116  
<212> DNA  
<213> homo sapiens

5

<400> 6

tataagcaga gctcatgata gaatcactct actattcatg atagaagcac tctactatat 60  
attcgtctcg agtactatct tagtgagatg ataagtacta tcttcgtgag atgata 116

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de inducción de la expresión de una secuencia de nucleótidos de interés en una célula eucariota, que comprende:
- 5 (a) proporcionar una célula eucariota que comprende
- (i) una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión reguladora (RPR), en la que la proteína de fusión consiste en
- 10 (1) un dominio de bloqueo de la transcripción bacteriano o de bacteriófago que puede inhibir la expresión de la secuencia de nucleótidos de interés, y
- (2) un dominio de unión a ligando que comprende un dominio de unión a ligando de receptor de estrógeno humano que tiene las mutaciones G400V, M543A y L544A, que se une a tamoxifeno;
- 15 (ii) un promotor operativamente ligado a la secuencia de nucleótidos de interés y controlado por un operador bacteriano o de bacteriófago que puede unirse al dominio de bloqueo de la transcripción bacteriano o de bacteriófago y bloquear la transcripción del promotor;
- 20 (b) cultivar la célula de la etapa (a) a una densidad deseada en presencia de tamoxifeno que se une al dominio de unión a ligando de la proteína de fusión, inhibiéndose la expresión de la secuencia de nucleótidos de interés; y
- (c) eliminar el tamoxifeno de la presencia de la célula, induciéndose la expresión de la secuencia de nucleótidos de interés.
- 25 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el dominio de bloqueo de la transcripción es aminoácidos M1 a S207 del represor tet y el dominio de bloqueo de la transcripción está fusionado con aminoácidos N304 a V595 del receptor de estrógeno que tiene las mutaciones G400V, M543A y L544A.
- 30 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el dominio de bloqueo de la transcripción se deriva de una proteína de bloqueo de la transcripción bacteriana seleccionada del grupo que consiste en TetR, LexA, LacI, TrpR, Arc y LambdaCI.
- 35 4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el dominio de bloqueo de la transcripción es un dímero de represor Arc que comprende monómeros Arc de P22 conectados por un ligador de GGGSGGGTGGGSGGG (SEC ID N°: 2), y en el que el dominio de bloqueo de la transcripción está ligado al dominio de unión a ligando de receptor de estrógeno humano por un ligador de AYSGSRELIRL (SEC ID N°: 1).
- 40 5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la secuencia de nucleótidos codifica una proteína de fusión que consiste en SEC ID N°: 3.
- 45 6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el operador es un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción mutada que puede unirse a, pero no escindir, ADN y el dominio de bloqueo de la transcripción es una enzima de restricción mutada que puede unirse a, pero no escindir, ADN.
- 50 7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que el dominio de bloqueo de la transcripción es una enzima NotI mutada.
8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el promotor operativamente ligado a la secuencia de nucleótidos de interés se deriva del CMV, SV40, virus del sarcoma de Rous, metalotioneína, nopalina sintetasa, virus del mosaico de la coliflor 35S ARN, ribulosa bifosfato carboxilasa, Gal4, alcohol deshidrogenasa, fosfoglicerol cinasa, fosfatasa alcalina, elastasa I; insulina; inmunoglobulina; virus del tumor mamario de ratón; albúmina;  $\alpha$ -fetoproteína;  $\alpha$ 1-antitripsina;  $\beta$ -globina; y cadena ligera de miosina 2.
- 55 9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el promotor es CMV-MIE.
10. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la célula eucariota está seleccionada del grupo que consiste en una célula COS, CHO, 293, BHK o NSO.
- 60 11. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el operador es TetO o ArcO.
12. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el operador está colocado inmediatamente en la dirección 3' del promotor.
- 65 13. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el operador está colocado dentro de 10 pares de bases del promotor.

14. Una secuencia de nucleótidos aislada que codifica una proteína de fusión reguladora, en la que la proteína de fusión consiste en

- 5 (1) un dominio de bloqueo de la transcripción bacteriano o de bacteriófago que puede unirse a un operador bacteriano o de bacteriófago, en el que el operador está operativamente ligado a un promotor que puede accionar la expresión de una secuencia de nucleótidos de interés, y en el que la unión del dominio de bloqueo al operador puede inhibir la expresión de la secuencia de nucleótidos de interés, y
- 10 (2) un dominio de unión a ligando de un receptor de estrógeno humano que tiene las mutaciones G400V, M543A y L544A que se une a tamoxifeno, en la que en presencia de tamoxifeno se estabiliza la proteína de fusión.

15. Una proteína de fusión reguladora codificada por la secuencia de nucleótidos de la reivindicación 14.

16. Una célula eucariota capaz de expresión inducible de una secuencia de nucleótidos de interés, que comprende

- 15 (a) una secuencia de nucleótidos de interés operativamente ligada a un promotor que puede accionar la expresión de la secuencia de nucleótidos de interés;
- (b) un operador bacteriano o de bacteriófago operativamente ligado a un promotor; y
- 20 (c) una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión reguladora, en la que la proteína de fusión consiste en:

- (1) un dominio de bloqueo de la transcripción bacteriano o de bacteriófago que puede unirse al operador e inhibir la expresión de la secuencia de nucleótidos de interés, y
- 25 (2) un dominio de unión a ligando de un receptor de estrógeno humano que tiene las mutaciones G400V, M543A y L544A, que se une tamoxifeno; en la que en presencia de tamoxifeno que se une al dominio de unión a ligando de la proteína de fusión se inhibe la expresión de la secuencia de nucleótidos de interés, y en la que la eliminación de tamoxifeno produce expresión inducida del nucleótido de interés.

30 17. Un animal transgénico no humano que comprende la célula de la reivindicación 16.

35

40

45

50

55

60

65

FIG 1.

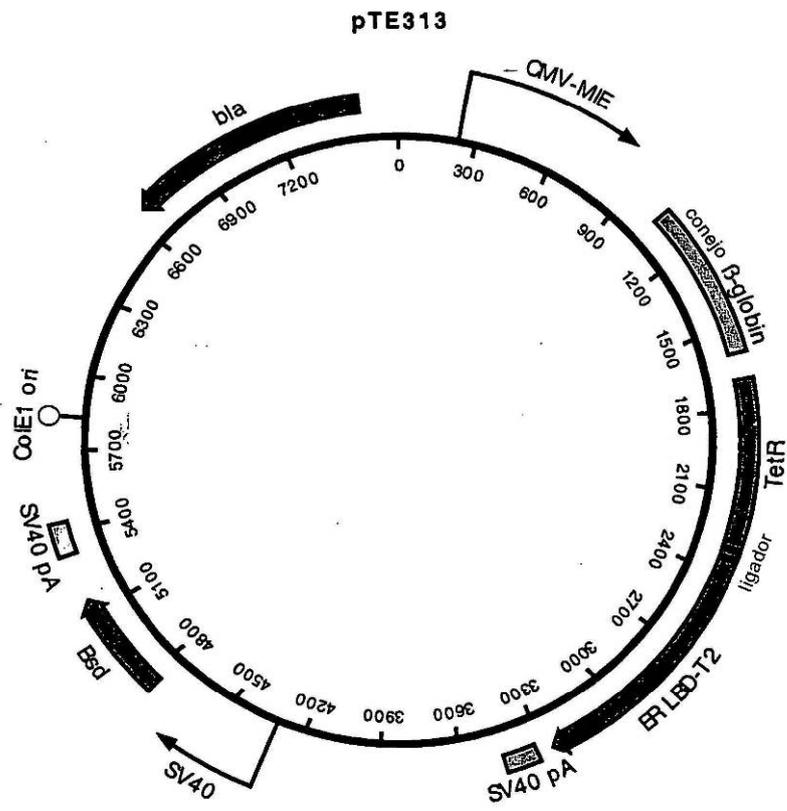


FIG. 2.

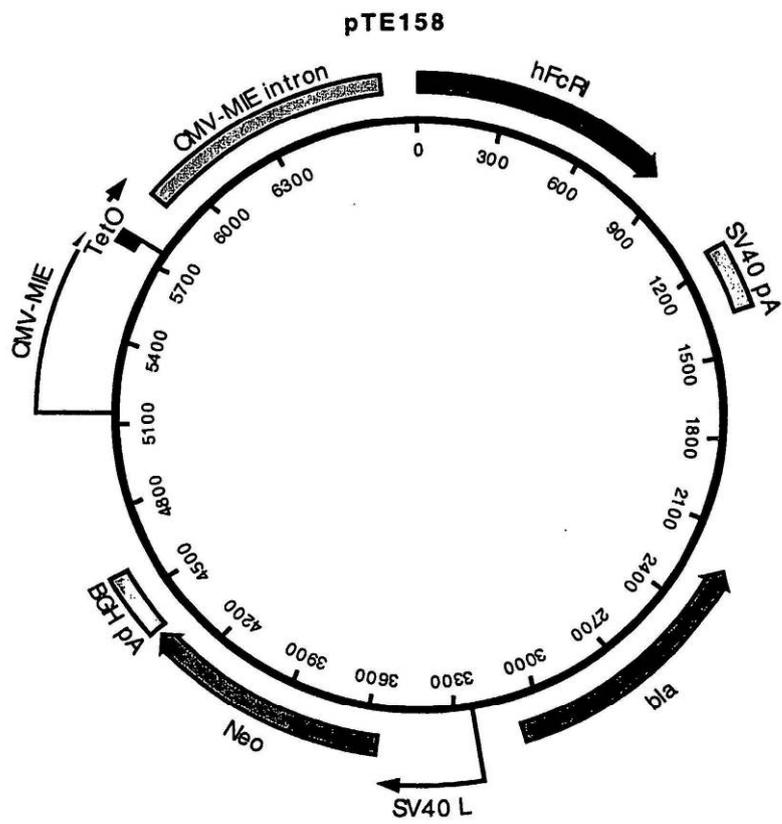


FIG. 3

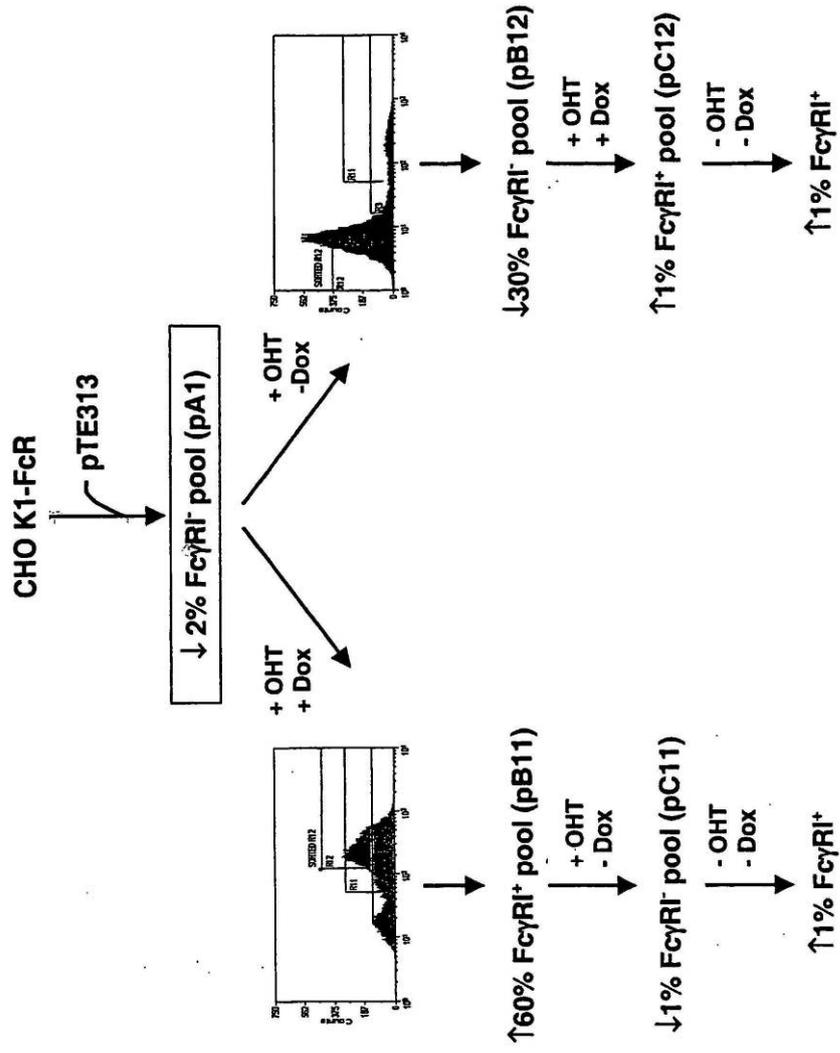


FIG. 4.

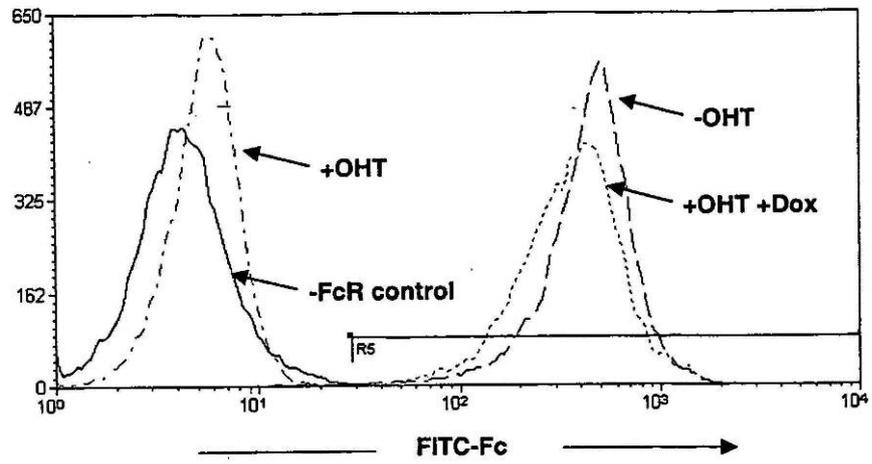


FIG 5.

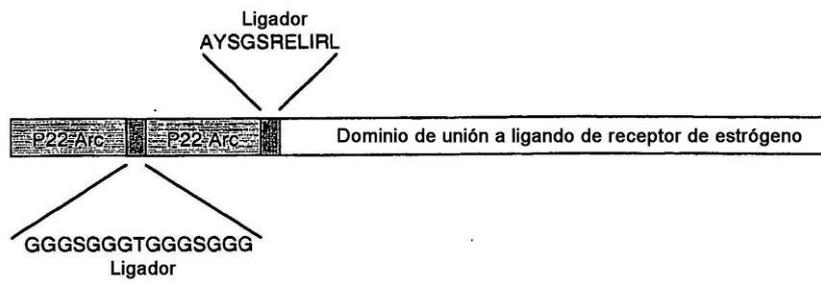




FIG. 7.

