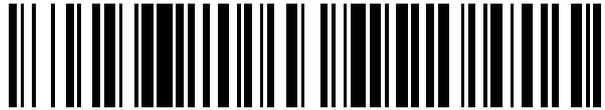


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 730**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/435** (2006.01)

**C12N 15/79** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2009 E 09761784 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2015 EP 2307543**

54 Título: **Sistema mejorado de expresión de proteína**

30 Prioridad:

**12.06.2008 EP 08158168**  
**16.06.2008 US 61959 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**21.08.2015**

73 Titular/es:

**EXPRES2ION BIOTECHNOLOGIES APS (100.0%)**  
**Agern Allé 1**  
**2970 Hørsholm, DK**

72 Inventor/es:

**DYRING, CHARLOTTE;**  
**DE JONGH, WILLEM ADRIAAN;**  
**RASMUSSEN, PETER BIRK y**  
**LYKKEGAARD, HELENE**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 543 730 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**

Sistema mejorado de expresión de proteína

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere al campo de la ingeniería genética y la biología molecular. En particular, la presente invención se refiere a nuevos polinucleótidos de ADN promotores y a su uso como herramienta para la expresión mejorada de proteínas en células huésped, notablemente en *Drosophila melanogaster*. Además, la presente invención se refiere a vectores que contienen el polinucleótido y también al uso de éstos en expresión recombinante de polipéptidos, en particular expresión heteróloga de proteínas, tales como enzimas industriales o proteínas para uso farmacéutico incluyendo proteínas eucariotas (por ejemplo, de mamífero, tal como humanas, pero también de protozoos o helmintos) y virales. La invención es particularmente relevante en el campo de la expresión de proteínas donde el producto expresado se secreta de células huésped recombinantes, especialmente si estas células huésped son células de insecto.

**Antecedentes de la invención**

15 Los sistemas de producción de proteínas, en que los polipéptidos o proteínas de interés se producen en organismos o células recombinantes, son el eje central de la biotecnología comercial. A los primeros sistemas, basados en expresión bacteriana en huéspedes tales como *E. coli*, se les han unido los sistemas basados en huéspedes eucariotas, en particular células de mamífero en cultivo, células de insecto tanto en cultivo como en forma de insectos completos, y mamíferos transgénicos tales como ovejas y cabras.

20 Los sistemas de cultivo de células procariotas son fáciles de mantener y baratos de manejar. Sin embargo, las células procariotas no tienen capacidad de modificación post-traduccional de proteínas eucariotas. Además, muchas proteínas se pliegan de forma incorrecta, lo que requiere procedimientos específicos para replegarlas, que aumenta los costes de producción.

25 Se han descrito sistemas de cultivo de células eucariotas para varias aplicaciones. Por ejemplo, las células de mamífero tienen capacidad de modificación post-traduccional, y generalmente producen proteínas que se pliegan correctamente y son solubles. Las desventajas principales de los sistemas de células de mamífero incluyen la necesidad de instalaciones de cultivo especializadas y caras, el riesgo de infección, que puede conducir a pérdida del cultivo completo, y el riesgo de contaminar el producto final con proteínas de mamífero potencialmente peligrosas.

30 También se usan células de insecto para la expresión de polipéptidos. El sistema de expresión más extendido usado en células de insecto se basa en vectores de baculovirus. Un vector de expresión de baculovirus se construye reemplazando el gen de la polihedrina de baculovirus, que codifica una proteína estructural principal del baculovirus, con un gen heterólogo, bajo el control del promotor nativo fuerte de la polihedrina. Las células huésped de insecto cultivadas se infectan con el virus recombinante, y la proteína producida de ese modo puede recuperarse de las propias células o del medio de cultivo si se emplean señales de secreción adecuadas. Estos sistemas también sufren, sin embargo, de problemas asociados con la reproducibilidad del nivel y calidad de expresión, la infección del cultivo, y pueden requerir instalaciones de cultivo especializadas. Además, las reservas de baculovirus, que para la producción de ciertas proteínas pueden tener que prepararse en condiciones de GMP, no siempre son estables con el paso del tiempo.

40 Los promotores adecuados usados en células S2 de *Drosophila melanogaster* para la expresión de proteínas también incluyen el promotor pMT y el P2ZOp2F (promotor OPIE2).

Chung y col. *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 10, Nº 12, 1992 se refiere a la caracterización de elementos reguladores positivos y negativos en el promotor distal de Actina5C.

45 Angelichio y col. *Nucleic Acids Research*, Vol. 19, Nº 18 5037-5043, 1991 se refiere a una comparación de varios promotores y señales de poliadenilación para su uso en expresión de genes heterólogos en células cultivadas de *Drosophila*.

Un objeto de la presente invención es proporcionar una expresión y/o secreción más eficaz en células huésped, notablemente en *Drosophila melanogaster*. Un objeto adicional es proporcionar polinucleótidos y vectores que faciliten esta expresión y secreción eficaces.

**Sumario de la invención**

50 En un aspecto amplio, la presente invención se refiere a polinucleótidos de ADN promotores, adecuados para su uso en la expresión heteróloga de un polipéptido de interés. En otro aspecto amplio, la presente invención se refiere a un polinucleótido de ADN aislado, un llamado vector de expresión, que comprende dichos polinucleótidos de ADN promotores adecuados para la expresión y producción de cantidades relativamente altas de una proteína de interés, tal como proteínas terapéuticamente eficaces o enzimas industriales.

Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un polinucleótido de ADN aislado adecuado para la expresión heteróloga de un polipéptido de interés en una célula de insecto, comprendiendo dicho polinucleótido de ADN

5 un polinucleótido de ADN promotor que comprende una secuencia funcional de nucleótidos con una identidad de secuencia de al menos el 80% con la SEC ID N° 68, restos 7-586, teniendo dicha secuencia funcional de nucleótidos actividad promotora en una célula S2 de *Drosophila*, en el que la secuencia comprende una secuencia con una identidad de secuencia de al menos el 80% con la SEC ID N° 37 y con actividad promotora en una célula S2 de *Drosophila*.

10 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una célula que comprende el polinucleótido aislado de la invención.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de un polipéptido de interés codificado por un polinucleótido, comprendiendo el procedimiento las etapas de

- 15 (a) obtener una secuencia polinucleotídica que codifica el polipéptido de interés;
- (b) insertar la secuencia polinucleotídica que codifica el polipéptido de interés en el polinucleótido aislado de la invención.
- (c) transformar una célula huésped con el polinucleótido obtenido en la etapa (b);
- (d) permitir la expresión del polinucleótido obtenido en la etapa (b) para producir el polipéptido; y (e) obtener el polipéptido a partir de la misma.

#### Breve descripción de las figuras

20 Fig. 1: Nivel normalizado de expresión de proteínas en comparación con el promotor pOPIE2 en el vector p2ZOP2F para diferentes transfecciones de un promotor Actina5C mutante para transformaciones estables y transitorias. (b)..(d) se refiere a transfecciones diferentes usando el plásmido pHP11 que contiene el promotor de Actina5C mutante.

25 Fig. 2: Nivel de expresión del promotor de HSP70 de longitud completa y truncado durante la expresión transitoria. Se usó pOPIE2 como control en el experimento.

30 Fig. 3: Nivel de producción de RANKL para líneas celulares estables usando seis diferentes promotores para dirigir la expresión de proteínas. Éstos incluyen tres versiones del promotor de Actina5C mutado (el promotor de longitud completa, (2) una versión truncada (vector pHP17) y (3) la versión de truncamiento más corta de 612 pb), dos versiones del promotor de HSP70 (el promotor de HSP70 truncado y el promotor central de HSP70) y el promotor pOPIE2 como control.

Fig. 4: Niveles normalizados de expresión conseguidos durante la transfección transitoria. Éstos incluyen tres versiones del promotor de Actina5C mutado (el promotor de longitud completa, (2) una versión truncada (vector pHP17) y (3) la versión de truncamiento más corta de 612 pb), el promotor de HSP70 truncado y el promotor pOPIE2 como control.

35 Fig. 5: Niveles de expresión en transfección transitoria de pOPIE2 y los promotores central de Actina5C y central de HSP70.

La Fig. 6 ilustra un vector adecuado, el vector pHP15c\_su(hw), de acuerdo con la invención

La Fig. 7 ilustra un vector adecuado, el vector pHP15c, de acuerdo con la invención.

40 Fig. 8: Comparación de los niveles de expresión del promotor híbrido central de Actina-HSP70 y el promotor truncado de Actina 5c (llamado Promotor p1\_var 2 en el gráfico). Experimentos duplicados de expresión transitoria. (Véase la tabla A3 para los datos sin procesar).

45 Fig. 9: Efecto de añadir el intrón o dos regiones de unión a matriz flanqueantes al vector pHP34s-híbrido. Los experimentos se realizaron como experimentos triplicados en matraz de agitación usando líneas celulares policlonales estables preparadas a partir de transfecciones triplicadas independientes. (Véase la tabla A2 para los datos sin procesar).

Fig. 10: Mapas de vector.

(A) Mapa de vector para el vector pHP34s-híbrido que contiene una región codificante de RANKL.

50 (B) El vector pHP34s original que contiene el promotor truncado de actina 5c. El promotor híbrido consiste en la parte cadena arriba del promotor truncado de actina 5c (menos el promotor central de Actina 5c), y el promotor central de HSP70.

Fig. 11: Mapa de vector para pHP34s-híbrido-hSAR-FR que contiene RANKL. Las regiones de unión a matriz hSAR o HSP70 se insertaron en orientación directa o inversa, flanqueando el casete de expresión. Los elementos hSAR también se insertaron en las mismas posiciones en las otras tres posibles orientaciones (inversa - inversa; inversa - directa, directa - directa).

5 Fig. 12: Mapa de vector para pHP34s-híbrido.i que contiene una secuencia codificante para la proteína RANKL. La "i" indica la inserción de un intrón cadena arriba del codón de inicio ATG. El intrón se indica como "intrn" en el mapa de vector.

10 Fig. 13: Nivel de expresión de RANKL de pHP34s-híbrido (llamado: híbrido) y pHP34s-híbrido.i (que contiene el intrón, llamado: Híbrido\_ARN+), en comparación con dos vectores disponibles en el mercado. (Véase la tabla A1 para los datos RAW).

15 Fig. 14: pHP34s-híbrido con LIC posibilitado para la expresión extracelular con marca His C-terminal usando la secuencia señal BIP. El gen *SacB* confiere sensibilidad a sacarosa a células de *E. coli*. El gen *SacB* debe retirarse durante la clonación LIC por digestión de restricción y remplazarse con el gen de interés. Si el gen *SacB* no se reemplaza, actuará como marcador de contra-selección para eliminar las colonias de fondo (incorrectas). Los sitios LIC se indican como 5' LIC y LIC3- CTHF. Este vector particular tiene la secuencia expuesta en la SEC ID N° 69. Las SEC ID N° 69-73 muestran vectores similares donde está posibilitada la marca His N- o C- terminal con o sin un sitio de proteasa TEV, para permitir la expresión intra- o extracelular.

### Descripción detallada de la invención

20 Como ha analizado anteriormente, los inventores de la presente invención han encontrado promotores altamente eficaces particulares así como elementos reguladores y su combinación adecuada para la expresión de alto nivel de proteínas heterólogas en células de insecto.

25 Una "expresión heteróloga" como se usa en el presente documento se refiere a la expresión de un polipéptido no expresado y secretado normalmente por la célula huésped usada para expresar ese polipéptido particular. La expresión "polinucleótido de ADN promotor" como se usa en el presente documento significa una secuencia de nucleótidos que proporciona a una célula las secuencias reguladoras para la expresión de una secuencia codificante unida de forma funcional a la misma. En general, una secuencia codificante está localizada 3' a una secuencia promotora. El polinucleótido de ADN promotor puede consistir en elementos proximales y más distales cadena arriba así como otros fragmentos o elementos funcionales, a menudo mencionados los últimos elementos como potenciadores.

30 Como se usa en el presente documento la expresiones "fragmento funcional", "elementos" y "potenciadores" se refieren a secuencias de ADN y partes del promotor, que pueden estimular la actividad promotora y pueden ser un elemento innato del promotor o un elemento heterólogo insertado para potenciar el nivel o especificidad tisular de un promotor. Los especialistas en la técnica entenderán que diferentes promotores pueden dirigir la expresión de un gen en diferentes tejidos o tipos celulares, o en diferentes fases del desarrollo, o en respuesta a diferentes condiciones ambientales. Un promotor no regulado que permite la transcripción continua de su gen asociado a menudo se menciona como "promotor constitutivo".

35 Salvo que se indique de otro modo la expresión "identidad de secuencia" para ácidos nucleicos, como se usa en el presente documento, se refiere a la identidad de secuencia calculada como  $(n_{ref} - n_{dif}) \cdot 100 / n_{ref}$ , en la que  $n_{dif}$  es la cantidad total de restos no idénticos en las dos secuencias cuando se alinean y en la que  $n_{ref}$  es la cantidad de restos en una de las secuencias. Por tanto, la secuencia de ADN agtcagtc tendrá una identidad de secuencia del 75% con la secuencia aatcaatc ( $n_{dif}=2$  y  $n_{ref}=8$ ).

40 En algunas realizaciones, la identidad de secuencia se determina por procedimientos convencionales, por ejemplo, Smith y Waterman, 1981, Adv. Appl. Math. 2:482, por el procedimiento de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444, usando el algoritmo CLUSTAL W de Thompson y col., 1994, Nucleic Acids Res 22:467380, por implementaciones informáticas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group). También puede usarse el algoritmo BLAST (Altschul y col., 1990, Mol. Biol. 215:403-10) para el cual puede obtenerse el software a través del National Center for Biotechnology Information [www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)). Cuando se usa cualquiera de los algoritmos mencionados anteriormente, se usan los parámetros por defecto para longitud de "ventana", penalización por hueco, etc.

45 Una "secuencia quimérica de nucleótidos" como se usa en el presente documento se refiere a una secuencia de nucleótidos que consiste en una primera secuencia de nucleótidos obtenida de una primera secuencia original de nucleótidos fusionada con una segunda secuencia de nucleótidos obtenida de una segunda secuencia original de nucleótidos, en que la primera y segunda secuencias originales no están fusionadas normalmente entre sí en la misma secuencia.

55 Cuando se indica que un primer polinucleótido muestra un "nivel de expresión de proteínas" mejorado/mayor en comparación con un segundo polinucleótido, en el presente documento se entiende que el primer polinucleótido

proporciona una cantidad mayor de producto de expresión proteica recuperable que el segundo polinucleótido cuando se transforma o cultiva una célula de referencia (típicamente una célula de insecto, tal como una célula S2 de *Drosophila*) con los polinucleótidos para obtener la expresión de los polinucleótidos en condiciones idénticas.

5 Una "célula S2" se refiere a una célula de la línea celular embrionaria Schneider-2 de *Drosophila melanogaster*, que está disponible, *i.a.* en DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstraße 7 B, 38124 Braunschweig, Alemania con el número de depósito DSMZ ACC 130 y en la American Type Culture Collection (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, EEUU, con el número de depósito CRL-1963.

En algunas realizaciones el polinucleótido de ADN promotor de acuerdo con la invención comprende una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en:

10 una secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 37, o SEC ID N° 68 con o sin secuencias flanqueantes de sitio de restricción en cualquiera de los extremos.

15 En algunas realizaciones el polinucleótido de ADN promotor comprende una secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 37. En algunas realizaciones el polinucleótido de ADN promotor comprende una secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 68, que carece opcionalmente de los restos 1 o 1-2 o 1-3 o 1-4 o 1-5 o 1-6 y/o que carece opcionalmente de los restos 587-592 o 588-592 o 589-592 o 590-592 o 591-592 o 592.

En algunas realizaciones el polinucleótido de ADN promotor de acuerdo con la invención comprende una secuencia funcional de nucleótidos con una identidad de secuencia de al menos el 80% con una secuencia cualquiera de la SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, SEC ID N° 6, SEC ID N° 33, SEC ID N° 36, SEC ID N° 37 o SEC ID N° 68 teniendo dicha secuencia funcional de nucleótidos actividad promotora en una célula S2 de *Drosophila*.

20 En algunas realizaciones el polinucleótido de ADN promotor de acuerdo con la invención comprende una secuencia con una identidad de secuencia de al menos el 80% con la secuencia de la SEC ID N° 37. En algunas realizaciones el polinucleótido de ADN promotor de acuerdo con la invención comprende una secuencia con una identidad de secuencia de al menos el 80% con la secuencia de la SEC ID N° 68. En realizaciones específicas, la identidad de secuencia en cada uno de estos casos es de al menos el 85%, tal como de al menos el 90%, tal como de al menos el 95%, tal como de al menos el 98%.

En el presente documento se desvela un polinucleótido de ADN promotor que comprende un fragmento funcional de al menos 80 nucleótidos contiguos de una secuencia cualquiera de la SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, SEC ID N° 6, SEC ID N° 33, SEC ID N° 36, SEC ID N° 37, o SEC ID N° 68.

30 En el presente documento se desvela un polinucleótido de ADN promotor que comprende un fragmento funcional de al menos 80 nucleótidos contiguos de una secuencia cualquiera de la SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, SEC ID N° 6, SEC ID N° 33, SEC ID N° 36, o SEC ID N° 37, o SEC ID N° 68 teniendo dicho fragmento funcional actividad promotora en una célula S2 de *Drosophila*.

El polinucleótido de ADN promotor de acuerdo con la invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

35 En algunas realizaciones el polinucleótido de ADN promotor de acuerdo con la invención comprende un fragmento funcional de al menos 80 nucleótidos contiguos de la secuencia de la SEC ID N° 3. En algunas realizaciones el polinucleótido de ADN promotor de acuerdo con la invención comprende un fragmento funcional de al menos 80 nucleótidos contiguos de la secuencia de la SEC ID N° 4. En algunas realizaciones el polinucleótido de ADN promotor de acuerdo con la invención comprende un fragmento funcional de al menos 80 nucleótidos contiguos de la secuencia de la SEC ID N° 5. En algunas realizaciones el polinucleótido de ADN promotor de acuerdo con la invención comprende un fragmento funcional de al menos 80 nucleótidos contiguos de la secuencia de la SEC ID N° 6. En algunas realizaciones el polinucleótido de ADN promotor de acuerdo con la invención comprende un fragmento funcional de al menos 80 nucleótidos contiguos de la secuencia de la SEC ID N° 33. En algunas realizaciones el polinucleótido de ADN promotor de acuerdo con la invención comprende un fragmento funcional de al menos 80 nucleótidos contiguos de la secuencia de la SEC ID N° 68.

45 En el presente documento se desvela un polinucleótido de ADN promotor que comprende una secuencia con una identidad de secuencia de al menos el 80% con el fragmento funcional de al menos 80 nucleótidos contiguos de una secuencia cualquiera de la SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, SEC ID N° 6, SEC ID N° 33, SEC ID N° 36, SEC ID N° 37 o SEC ID N° 68.

50 En el presente documento se desvela un polinucleótido de ADN promotor que comprende una secuencia funcional de nucleótidos con una identidad de secuencia de al menos el 80% con dicho fragmento funcional de al menos 6 nucleótidos contiguos de una secuencia cualquiera de la SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, SEC ID N° 6, SEC ID N° 33, SEC ID N° 36, SEC ID N° 37 o SEC ID N° 68, teniendo dicha secuencia funcional de nucleótidos actividad promotora en una célula S2 de *Drosophila*.

55 En algunas realizaciones el polinucleótido de ADN promotor de acuerdo con la invención comprende una secuencia con una identidad de secuencia de al menos el 80% con el fragmento funcional de al menos 80 nucleótidos

contiguos de la secuencia de la SEC ID N° 3. En algunas realizaciones el polinucleótido de ADN promotor de acuerdo con la invención comprende una secuencia con una identidad de secuencia de al menos el 80% con el fragmento funcional de al menos 80 nucleótidos contiguos de la secuencia de la SEC ID N° 4. En algunas realizaciones el polinucleótido de ADN promotor de acuerdo con la invención comprende una secuencia con una identidad de secuencia de al menos el 80% con el fragmento funcional de al menos 80 nucleótidos contiguos de la secuencia de la SEC ID N° 5. En algunas realizaciones el polinucleótido de ADN promotor de acuerdo con la invención comprende una secuencia con una identidad de secuencia de al menos el 80% con el fragmento funcional de al menos 80 nucleótidos contiguos de la secuencia de la SEC ID N° 6. En algunas realizaciones el polinucleótido de ADN promotor de acuerdo con la invención comprende una secuencia con una identidad de secuencia de al menos el 80% con el fragmento funcional de al menos 80 nucleótidos contiguos de la secuencia de la SEC ID N° 33. En algunas realizaciones el polinucleótido de ADN promotor de acuerdo con la invención comprende una secuencia con una identidad de secuencia de al menos el 80% con el fragmento funcional de al menos 80 nucleótidos contiguos de la secuencia de la SEC ID N° 37. En algunas realizaciones el polinucleótido de ADN promotor de acuerdo con la invención comprende una secuencia con una identidad de secuencia de al menos el 80% con el fragmento funcional de al menos 80 nucleótidos contiguos de la secuencia de la SEC ID N° 68.

En el presente documento se desvela un polinucleótido de ADN promotor que comprende una secuencia química que comprende dos o más secuencias seleccionadas entre el siguiente grupo

una secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, SEC ID N° 6, SEC ID N° 33, SEC ID N° 36, o SEC ID N° 37;

una secuencia con una identidad de secuencia de al menos el 80% con una secuencia cualquiera de la SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, SEC ID N° 6, SEC ID N° 33, SEC ID N° 36, o SEC ID N° 37;

un fragmento funcional de al menos 80 nucleótidos contiguos de una secuencia cualquiera de la SEC ID N° 1, SEC ID N° 2, SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, SEC ID N° 6, SEC ID N° 33, SEC ID N° 36, o SEC ID N° 37;

una secuencia con una identidad de secuencia de al menos el 80% con un fragmento funcional de al menos 80 nucleótidos contiguos de una secuencia cualquiera de la SEC ID N° 1, SEC ID N° 2, SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, SEC ID N° 6, SEC ID N° 33, SEC ID N° 36, o SEC ID N° 37.

Un ejemplo de dicha secuencia química es la secuencia promotora híbrida expuesta en la SEC ID N° 68.

En el presente documento se desvela un polinucleótido de ADN promotor que comprende una secuencia química de nucleótidos que comprende dos o más secuencias seleccionadas entre

(i) una secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 1, SEC ID N° 2, SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, SEC ID N° 6, SEC ID N° 33, SEC ID N° 36, o SEC ID N° 37;

(ii) una secuencia funcional de nucleótidos con una identidad de secuencia de al menos el 80% con una secuencia cualquiera de (i) y que tiene actividad promotora en una célula S2 de Drosophila;

(iii) un nucleótido que es un fragmento funcional de al menos 80 nucleótidos contiguos de una secuencia cualquiera de (i) o (ii), teniendo dicho fragmento funcional actividad promotora en una célula S2 de Drosophila; y

(iv) una secuencia funcional de nucleótidos con una identidad de secuencia de al menos el 80% con dicho fragmento funcional de (iii) y que tiene actividad promotora en una célula S2 de Drosophila.

El polinucleótido de ADN promotor puede comprender una secuencia química de nucleótidos como se define en (vi) anterior.

En algunos aspectos el fragmento funcional de al menos 80 nucleótidos contiguos es de al menos 81, tal como al menos 82, tal como al menos 83, tal como al menos 84, tal como al menos 85, tal como al menos 86, tal como al menos 87, tal como al menos 88, tal como al menos 89, tal como al menos 90, tal como al menos 91, tal como al menos 92, tal como al menos 93, tal como al menos 94, tal como al menos 95, tal como al menos 96, tal como al menos 97, tal como al menos 98, tal como al menos 99, tal como al menos 100, tal como al menos 101, tal como al menos 102, tal como al menos 103, tal como al menos 104, tal como al menos 105, tal como al menos 106, tal como al menos 107, tal como al menos 108, tal como al menos 109, tal como al menos 110, tal como al menos 111, tal como al menos 112, tal como al menos 113, tal como al menos 114, tal como al menos 115, tal como al menos 116, tal como al menos 117, tal como al menos 118, tal como al menos 119, tal como al menos 120, tal como al menos 121, tal como al menos 122, tal como al menos 123, tal como al menos 124, tal como al menos 125, tal como al menos 126, tal como al menos 127, tal como al menos 128, tal como al menos 129, tal como al menos 130, tal como al menos 131, tal como al menos 132, tal como al menos 133, tal como al menos 134, tal como al menos 135, tal como al menos 136, tal como al menos 137, tal como al menos 138, tal como al menos 139, tal como al menos 140, tal como al menos 141, tal como al menos 142, tal como al menos 143, tal como al menos 144, tal como al menos 145, tal como al menos 146, tal como al menos 147, tal como al menos 148, tal como al menos 149, tal como al









como no más de 238, tal como no más de 237, tal como no más de 236, tal como no más de 235, tal como no más de 234, tal como no más de 233, tal como no más de 232, tal como no más de 231, tal como no más de 230, tal como no más de 229, tal como no más de 228, tal como no más de 227, tal como no más de 226, tal como no más de 225, tal como no más de 224, tal como no más de 223, tal como no más de 222, tal como no más de 221, tal como no más de 220, tal como no más de 219, tal como no más de 218, tal como no más de 217, tal como no más de 216, tal como no más de 215, tal como no más de 214, tal como no más de 213, tal como no más de 212, tal como no más de 211, tal como no más de 210, tal como no más de 209, tal como no más de 208, tal como no más de 207, tal como no más de 206, tal como no más de 205, tal como no más de 204, tal como no más de 203, tal como no más de 202, tal como no más de 201, tal como no más de 200, tal como no más de 199, tal como no más de 198, tal como no más de 197, tal como no más de 196, tal como no más de 195, tal como no más de 194, tal como no más de 193, tal como no más de 192, tal como no más de 191, tal como no más de 190, tal como no más de 189, tal como no más de 188, tal como no más de 187, tal como no más de 186, tal como no más de 185, tal como no más de 184, tal como no más de 183, tal como no más de 182, tal como no más de 181, tal como no más de 180, tal como no más de 179, tal como no más de 178, tal como no más de 177, tal como no más de 176, tal como no más de 175, tal como no más de 174, tal como no más de 173, tal como no más de 172, tal como no más de 171, tal como no más de 170, tal como no más de 169, tal como no más de 168, tal como no más de 167, tal como no más de 166, tal como no más de 165, tal como no más de 164, tal como no más de 163, tal como no más de 162, tal como no más de 161, tal como no más de 160, tal como no más de 159, tal como no más de 158, tal como no más de 157, tal como no más de 156, tal como no más de 155, tal como no más de 154, tal como no más de 153, tal como no más de 152, tal como no más de 151, tal como no más de 150, tal como no más de 149, tal como no más de 148, tal como no más de 147, tal como no más de 146, tal como no más de 145, tal como no más de 144, tal como no más de 143, tal como no más de 142, tal como no más de 141, tal como no más de 140, tal como no más de 139, tal como no más de 138, tal como no más de 137, tal como no más de 136, tal como no más de 135, tal como no más de 134, tal como no más de 133, tal como no más de 132, tal como no más de 131, tal como no más de 130, tal como no más de 129, tal como no más de 128, tal como no más de 127, tal como no más de 126, tal como no más de 125, tal como no más de 124, tal como no más de 123, tal como no más de 122, tal como no más de 121, tal como no más de 120, tal como no más de 119, tal como no más de 118, tal como no más de 117, tal como no más de 116, tal como no más de 115, tal como no más de 114, tal como no más de 113, tal como no más de 112, tal como no más de 111, tal como no más de 110, tal como no más de 109, tal como no más de 108, tal como no más de 107, tal como no más de 106, tal como no más de 105, tal como no más de 104, tal como no más de 103, tal como no más de 102, tal como no más de 101, tal como no más de 100, tal como no más de 99, tal como no más de 98, tal como no más de 97, tal como no más de 96, tal como no más de 95, tal como no más de 94, tal como no más de 93, tal como no más de 92, tal como no más de 91, tal como no más de 90, tal como no más de 89, tal como no más de 88, tal como no más de 87, tal como no más de 86, tal como no más de 85, tal como no más de 84, tal como no más de 83, tal como no más de 82, tal como no más de 81, tal como no más de 80.

En algunas realizaciones el polinucleótido de ADN promotor de acuerdo con la invención muestra un nivel aumentado de expresión de proteínas en comparación con el nivel de expresión de proteínas de uno cualquiera de los polinucleótidos de ADN promotores que tienen la secuencia de la SEC ID N° 1 o SEC ID N° 4.

En algunas realizaciones el aumento en el nivel de expresión de proteínas es de aproximadamente el 50 por ciento hasta aproximadamente el 300 por ciento respecto al nivel de expresión de proteínas de uno cualquiera de los polinucleótidos de ADN promotores que tienen la secuencia de la SEC ID N° 1 o SEC ID N° 4, o al promotor pOPIE2. En algunas realizaciones el aumento en el nivel de expresión de proteínas es de más del 300 por ciento respecto al nivel de expresión de proteínas de uno cualquiera de los polinucleótidos de ADN promotores que tienen la secuencia de la SEC ID N° 1 o SEC ID N° 4, o al promotor pOPIE2.

En algunas realizaciones el aumento en el nivel de expresión de proteínas es de 2 veces a 10 veces respecto al nivel de expresión de proteínas de uno cualquiera de los polinucleótidos de ADN promotores que tienen la secuencia de la SEC ID N° 1 o SEC ID N° 4, o al promotor pOPIE2.

En algunas realizaciones el aumento en el nivel de expresión de proteínas es de 10 veces a 100, tal como de 20 a 80, tal como de 20 a 40 veces respecto al nivel de expresión de proteínas de uno cualquiera de los polinucleótidos de ADN promotores que tienen la secuencia de la SEC ID N° 1 o SEC ID N° 4, o al promotor pOPIE2.

Debe entenderse que el aumento en la actividad se mide y compara con la referencia en condiciones iguales y convencionales.

En algunas realizaciones el polinucleótido de ADN aislado de acuerdo con la invención comprende adicionalmente un marcador de selección, tal como un marcado de selección seleccionado entre el grupo que consiste en un marcador de selección de Zeocina, un marcador de selección de Neomicina, un marcador de selección de Higromicina, un marcador de selección de Puromicina, y un marcador de selección de Blastidicina.

En algunas realizaciones el polinucleótido de ADN aislado de acuerdo con la invención comprende adicionalmente un promotor bacteriano, tal como el promotor bacteriano de pKANR, tal como un fragmento funcional del promotor de Kanamicina.

- En algunas realizaciones el polinucleótido de ADN aislado de acuerdo con la invención comprende adicionalmente un segundo polinucleótido de ADN promotor adecuado para dirigir la expresión del marcador de selección en una célula de insecto. En algunas realizaciones este segundo promotor se selecciona entre el grupo que consiste en
- 5 (i) una secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 1, SEC ID N° 2, SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, SEC ID N° 6, SEC ID N° 33, SEC ID N° 36, SEC ID N° 37, o una secuencia de nucleótidos que comprende los restos 7-586 de la SEC ID N° 68;
- (ii) una secuencia de nucleótidos con una identidad de secuencia de al menos el 80% con una secuencia cualquiera de (i) y que tiene actividad promotora en una célula S2 de *Drosophila*;
- 10 (iii) un nucleótido que es un fragmento funcional de al menos 6 nucleótidos contiguos de una secuencia cualquiera de (i) o (ii), teniendo dicho fragmento funcional actividad promotora en una célula S2 de *Drosophila*;
- (iv) una secuencia de nucleótidos con una identidad de secuencia de al menos el 80% con dicho fragmento funcional de (iii) y que tiene actividad promotora en una célula S2 de *Drosophila*;
- (v) una primera secuencia química de nucleótidos que comprende dos o más secuencias de una secuencia cualquiera de (i), (ii), (iii) y (iv), y
- 15 (vi) una segunda secuencia química de nucleótidos que tiene actividad promotora en una célula S2 de *Drosophila*, que comprende al menos 6 nucleótidos y que incluye tramos de nucleótidos consecutivos de al menos 2 secuencias de nucleótidos de (iii) y/o (iv), donde cada uno de dichos tramos consecutivos en solitario no tiene actividad promotora en una célula S2 de *Drosophila*.
- 20 En algunas realizaciones el polinucleótido de ADN aislado de acuerdo con la invención comprende adicionalmente uno o más elementos ubicuos de apertura de la cromatina cadena arriba y/o cadena abajo respecto al sitio de clonación múltiple.
- En algunas realizaciones el polinucleótido de ADN aislado de acuerdo con la invención comprende adicionalmente al menos un elemento de aislamiento transcripcional, tal como la secuencia Su(Hw) o Gypsy (GSu(Hw)). (Mol Cell Biol. 1997 abril; 17(4): 2202-2206.)
- 25 En algunas realizaciones el polinucleótido de ADN aislado de acuerdo con la invención comprende adicionalmente una secuencia codificante de dihidrofolato reductasa (dhfr) adecuada para la selección en células de insecto.
- En algunas realizaciones el polinucleótido de ADN aislado de acuerdo con la invención comprende adicionalmente al menos una secuencia señal de poliadenilación tal como la secuencia señal poliA de SV40 y/o una señal poliA de OPIE2.
- 30 En algunas realizaciones el polinucleótido de ADN aislado de acuerdo con la invención comprende adicionalmente un origen de *E. coli*.
- En algunas realizaciones el polinucleótido de ADN aislado de acuerdo con la invención comprende adicionalmente al menos una secuencia polinucleotídica señal de exportación de proteínas, tal como una seleccionada de la lista que consiste en BIP y CPY.
- 35 En algunas realizaciones el polinucleótido de ADN aislado de acuerdo con la invención está esencialmente libre de ADN viral.
- En algunas realizaciones el polinucleótido de ADN aislado de acuerdo con la invención comprende adicionalmente al menos una secuencia de marca HIS. En algunas realizaciones la marca HIS es una marca HIS N-terminal. En algunas realizaciones la secuencia de marca HIS es de acuerdo con la siguiente secuencia:
- 40 atgaaacaccaacaccaacatcaacatcaacatcaacatcaa (SEC ID N° 38)
- En algunas realizaciones el polinucleótido de ADN aislado de acuerdo con la invención comprende adicionalmente un sitio de clonación múltiple cadena abajo del polinucleótido de ADN promotor para la inserción del gen codificante de un polipéptido de interés en el polinucleótido de ADN aislado.
- 45 En algunas realizaciones el polinucleótido de ADN aislado de acuerdo con la invención comprende adicionalmente al menos un elemento de 72 pb de SV40. En algunas realizaciones el polinucleótido de ADN aislado de acuerdo con la invención comprende adicionalmente dos elementos de 72 pb de SV40. En algunas realizaciones el polinucleótido de ADN aislado de acuerdo con la invención comprende adicionalmente al menos un elemento de 72 pb de SV40 cadena arriba del promotor y al menos un elemento de 72 pb de SV40 cadena abajo del promotor.
- 50 En algunas realizaciones el polinucleótido de ADN aislado de acuerdo con la invención comprende adicionalmente al menos un elemento PRE del virus de la Hepatitis B. En algunas realizaciones el elemento PRE del virus de la Hepatitis B es de acuerdo con la SEC ID N° 40, tal como los nucleótidos 10 a 574 de la SEC ID N° 40.

En algunas realizaciones el polinucleótido de ADN aislado de acuerdo con la invención comprende adicionalmente al menos un elemento de control de amplificación.

En algunas realizaciones el polinucleótido de ADN aislado de acuerdo con la invención comprende adicionalmente al menos un elemento Ori-beta.

- 5 En algunas realizaciones el polinucleótido de ADN aislado de acuerdo con la invención comprende adicionalmente al menos un elemento de región de unión a matriz (MAR).

En algunas realizaciones la secuencia polinucleotídica de ADN promotor de acuerdo con la invención controla la expresión de un gen u otra secuencia de ADN a la cual está unida.

- 10 En algunas realizaciones el polinucleótido de ADN aislado de acuerdo con la invención comprende adicionalmente al menos una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido heterólogo a la secuencia polinucleotídica de ADN promotor.

En algunas realizaciones el polinucleótido de ADN aislado de acuerdo con la invención es un vector de clonación.

En algunas realizaciones el polinucleótido de ADN aislado de acuerdo con la invención es un vector de expresión.

- 15 Un aspecto se refiere a una célula que comprende el polinucleótido de ADN aislado de acuerdo con la invención. En algunas realizaciones la célula es una célula de insecto. En algunas realizaciones la célula es una célula de *Drosophila melanogaster*. En algunas realizaciones la célula es una célula S2 de *Drosophila melanogaster*.

En algunas realizaciones la célula que comprende el polinucleótido de ADN aislado de acuerdo con la invención se transfecta de forma estable con dicho polinucleótido de ADN aislado.

- 20 Como se usa en el presente documento "transfectada de forma estable" se refiere a una célula que se ha transfectado con un polinucleótido de ADN de acuerdo con la invención para producir líneas permanentes de células cultivadas con un nuevo gen insertado en su genoma. Habitualmente esto se hace uniendo el gen deseado con un gen "de selección", es decir, un gen que confiere resistencia a un antibiótico (como Zeocina). Tras poner el antibiótico en el medio de cultivo, solamente sobrevivirán aquellas células que incorporan el gen de resistencia, y esencialmente todas ellas habrán sido también capaces de incorporar el polinucleótido de ADN de acuerdo con la invención.

Un "vector de clonación" significa un ADN plasmídico que puede usarse para insertar un fragmento de ADN de interés en una célula huésped, normalmente para producir múltiples copias del fragmento y por tanto del vector.

- 30 "Vector de expresión" significa un ADN plasmídico o viral que contiene señales reguladoras necesarias para la síntesis de ARNm derivado de secuencias génicas, que pueden insertarse en el vector. Las secuencias génicas son, por ejemplo, un polinucleótido quimérico como se ha definido anteriormente.

- 35 Una "secuencia de poliadenilación" como se usa en el presente documento se refiere a una secuencia de ADN que cuando se transcribe se reconoce por el huésped de expresión para añadir restos de poliadenosina al ARNm transcrito. Se une de forma funcional al extremo 3' del ADN que codifica el polipéptido a expresar. Las secuencias adecuadas de poliadenilación incluyen la cola poliA de OPIE2 y la cola poliA tardía de SV40 como se describe en Angelichio y col. 1991, Comparison of several promoters and polyadenylation signals for use in heterologous gene expression in cultured *Drosophila* cells, Nucleic Acids Research, Vol. 19, N° 18 5037-5043.

- 40 Un "marcador de selección" como se usa en el presente documento se refiere a un elemento genético presente en un vector de expresión que, cuando se expresa, proporciona una indicación de transformación satisfactoria de la célula huésped. Por ejemplo, el marcador de selección puede proporcionar a la célula huésped transformada resistencia a un antibiótico (un marcador de tipo dominante) o la capacidad de metabolizar un nutriente particular (un tipo auxotrófico de marcador de selección, es decir, un marcador que "cura" una deficiencia en el huésped). Típicamente, el marcador de selección está bajo el control de un promotor que está separado del promotor que controla la expresión del gen a expresarse por el vector.

- 45 La expresión "unido de forma funcional" se refiere a la asociación de una secuencia de ácido nucleico en un único fragmento de ácido nucleico de modo que la función de uno esté afectada por el otro. Por ejemplo, un promotor está unido de forma funcional a una secuencia codificante cuando es capaz de afectar a la expresión de esa secuencia codificante (es decir, que la secuencia codificante está bajo el control transcripcional del promotor).

- 50 El término "expresión", como se usa en el presente documento, se refiere al proceso biológico completo en una célula huésped que se presenta desde la transcripción y la acumulación estable de ARNm derivado del polinucleótido de ADN aislado de la invención (donde éste comprende adicionalmente una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido) a través de la posterior traducción del ARNm en un producto polipeptídico y finalmente hasta las modificaciones post-traduccionales del producto polipeptídico realizadas por la célula huésped. "Sobre-expresión" se refiere a la producción de un producto génico en células transformadas que excede los niveles de producción en células no transformadas normales.

5 Como se usa en el presente documento "secuencia polinucleotídica señal de exportación de proteínas" se refiere a una secuencia que dirige o facilita la translocación de una proteína expresada a través de la membrana de la célula huésped de expresión. Una "secuencia polinucleotídica señal de exportación de proteínas" puede estar presente en el extremo N-terminal de un polipéptido precursor (un pre-péptido o pre-pro-péptido) para dirigir su translocación a través de una membrana. Típicamente, un polipéptido precursor se procesa por escisión de la secuencia señal para generar un péptido maduro o un pro-péptido. Si el producto de eliminación por escisión del péptido señal es un propéptido, el péptido maduro será el producto de las posteriores modificaciones post-traduccionales que implican eliminación adicional de aminoácidos.

10 Otra "secuencia polinucleotídica señal de exportación de proteínas" adecuada dentro de esta definición incluye la secuencia señal BiP de *Drosophila* para la secreción y CPY.

La proteína BiP de *Drosophila* codifica una proteína chaperona de unión a inmunoglobulina. Esa señal de secreción dirige de forma eficaz altos niveles de BiP en la vía de secreción de células S2 (véase Kirkpatrick, R.B. y col. (1995) J. Biol. Chem. 270: 19800-19805).

15 Las expresiones "elemento ubicuo de abertura de la cromatina" o "UCOE" como se usan en el presente documento se refieren a una secuencia de ADN que abre la cromatina o mantiene la cromatina en un estado abierto y facilita la expresión reproducible de un gen unido de forma funcional en células.

20 Las expresiones "región de unión a matriz" o "MAR" o "región de unión a armazón/matriz" como se usan en el presente documento se refieren a una secuencia de nucleótidos en el ADN de cromosomas eucariotas donde se une la matriz nuclear. Las MAR median la organización estructural de la cromatina dentro del núcleo. Estos elementos constituyen puntos de anclaje del ADN para el armazón de cromatina y sirven para organizar la cromatina en dominios estructurales. Estudios sobre genes individuales condujeron a la conclusión de que la organización dinámica y compleja de la cromatina mediada por elementos S/MAR desempeña un papel importante en la regulación de la expresión génica.

25 Las expresiones "elemento de control de amplificación" o "Ace" como se usan en el presente documento se refieren a un elemento, que está implicado en el inicio de la amplificación del ADN desde el origen de replicación. Los análisis de delección de construcciones transgénicas derivadas del tercer grupo de cromosomas han identificado un elemento de control de amplificación de 320 pb (ACE3) necesario para la amplificación. Por tanto, dentro de esta definición se incluye el elemento ACE3 de *D. melanogaster*. Se incluyen dentro de esta definición también las regiones potenciadoras de la amplificación (AER).

30 Las expresiones "elemento Ori-beta" u "oriB" como se usan en el presente documento se refieren a un origen de replicación. El origen de replicación (también llamado el origen de la replicación) es una secuencia particular en una genoma o plásmido en que se inicia la replicación. Ésta puede ser replicación de ADN en organismos vivos tales como procariontes y eucariotas, o replicación de ARN en virus de ARN, tales como virus de ARN bicatenario. La replicación del ADN puede proceder desde este punto de forma bidireccional o unidireccional. El origen de replicación se une al complejo de pre-replicación, un complejo proteico que reconoce, desenrolla, y comienza a copiar el ADN. Un "elemento Ori-beta" específico dentro de esta definición es el elemento Ori-beta de *D. melanogaster*.

40 Para los requisitos de secuencia para elementos ACE3 y ori-B funcionales véase Hongjun Zhang y John Tower, 2004, Sequence requirements for function of the *Drosophila* chorion gene locus ACE3 replicator and ori-b origin elements, Development 131, 2089-2099, 2004 y Carminati y col. 1992, The *Drosophila* ACE3 Chorion Element Autonomously Induces Amplification, MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, Mayo 1992, pág. 2444-2453.

#### Efecto del elemento de 72 pb de SV40 sobre vacunas de ADN

45 La importación nuclear en células que no están en división tales como células musculares es uno de los problemas de los sistemas de suministro génico no viral. Esto puede provocar síntesis disminuida del antígeno que provocará posteriormente una mala presentación del antígeno. Se ha identificado una repetición de 72 pb de la región potenciadora de SV40 que potencia el transporte nuclear de ADN no viral en células que no están en división. La región potenciadora tiene varios sitios de unión a factores de transcripción. En cuanto el plásmido entra en el citoplasma, se une por varios factores de transcripción permitiendo por tanto que el ADN no viral se transfiera rápidamente al núcleo proporcionando la señal de localización nuclear (Exp Cell Res. 1999, 253, 713). También se observó potenciación en la expresión génica usando el vector que contenía el elemento potenciador de SV40 inyectado en músculo murino por electroporación (Gene Ther., 2001, 8, 494).

55 La expresión "elementos de 72 pb de SV40" como se usa en el presente documento se refiere a la repetición de 72 pb de la región potenciadora de SV40 que potencia el transporte nuclear de ADN no viral en células que no están en división. En realizaciones particulares los "elementos de 72 pb de SV40" se refieren a un elemento con la siguiente secuencia ATGCTTTGCATACTTCTGCCTGCTGGGGAGCCTGGGGACTTTCCACACCCTAACTGACACACATTCCA CAGCTGGTT correspondiente del nucleótido nº 10 al nucleótido nº 86 de la SEC ID Nº 39. En realizaciones particulares los "elementos de 72 pb de SV40" se refieren a un elemento con la secuencia de la SEC ID Nº 39.

Elemento PRE del virus de la Hepatitis B (SEC ID N° 40)

5 Algunos ARNm eucariotas o virales contienen secuencias inhibitoras que evitan que se transporten fuera del núcleo al citoplasma donde pueden traducirse. Los transcritos del virus S de la Hepatitis B contienen una región, conocida como el elemento regulador post-transcripcional (PRE) que funciona en cis para activar su transporte. Este elemento puede sustituir parcialmente el elemento de respuesta a Rev (RRE) del virus de la inmunodeficiencia humana. Se ha demostrado que añadir este elemento o elementos con función similar en la región no traducida 3' del gen que codifica el antígeno (tal como Gag de VIH-1) puede aumentar el nivel de expresión del antígeno y mejorar las respuestas inmunes.

10 La expresión "secuencia de aislamiento", como se usa en el presente documento se refiere a secuencias de ADN que afectan a las interacciones entre promotores y potenciadores/silenciadores y funcionan como barreras para dispersar cromatina represora. Se incluye dentro de esta definición la secuencia de aislamiento (su(Hw)) descrita en Lu L, Tower J, 1997, A transcriptional insulator element, the su(Hw) binding site, protects a chromosomal DNA replication origin from position effects, Mol Cell Biol. Abril; 17(4): 2202-2206. Entre la diversidad de secuencias con una función aislante presentes en el genoma de *Drosophila melanogaster*, puede usarse el aislante bien estudiado y quizá más fuerte que consiste en sitios de unión reiterados para la proteína Su(Hw), encontrado por primera vez en el retrotransposón *gypsy*. El aislante Su(Hw) es un modulador versátil de interacciones reguladoras, que bloquea más de una veintena de diferentes potenciadores. Recientemente, se ha descubierto un aislante dependiente de Su(Hw) endógeno pero estructuralmente distinto entre los genes *yellow* y *achaete*.

20 La expresión "clonación independiente de ligamiento" o "LIC" se usa en el presente documento de acuerdo con la definición de Robert E. Novy, Keith W. Yaeger y Kristin M. Kolb en el artículo "Efficient Directional Cloning of PCR Products" (<http://www.emdbiosciences.com/docs/NDIS/inno05-002.pdf>), la clonación independiente de ligamiento (LIC) puede describirse del siguiente modo: "Se desarrolló clonación independiente de ligamiento (LIC) para la clonación direccional de productos de PCR sin digestión con enzimas de restricción o reacciones de ligamiento. Se crean vectores LIC tratando una estructura linealizada con ADN polimerasa T4 en presencia de solamente un dNTP. La actividad exonucleasa 3' a 5' de la ADN polimerasa T4 retira nucleótidos hasta que encuentra un resto correspondiente al único dNTP presente en la mezcla de reacción. En este punto, la actividad polimerasa 5' a 3' de la enzima contrarresta la actividad exonucleasa para evitar de forma eficaz la escisión adicional. Se diseñan secuencias plasmídicas adyacentes al sitio de linealización para producir proyecciones monocatenarias específicas no complementarias de 13 o 14 bases en el vector LIC. Se crean productos de PCR con proyecciones complementarias construyendo extensiones 5' apropiadas en los cebadores. El producto de PCR se purifica para retirar los dNTP (y el plásmido original si se usó como molde) y después se trata con ADN polimerasa T4 en presencia del dNTP apropiado para generar las proyecciones específicas compatibles con el vector. El vector LIC hibridado y el inserto se transforman en células competentes de *E. coli*. La formación de enlaces covalentes en las uniones del inserto y el vector sucede dentro de la célula para producir plásmido circular."

35 Puede encontrarse una descripción detallada de la metodología LIC en Nick S. Berrow y col. 2007 "A versatile ligation-independent cloning method suitable for high-throughput expression screening applications", Nucleic Acids Research.

Se proporcionan varias realizaciones específicas de vectores con LIC posibilitado de la presente invención en las SEC ID N° 69-73.

40 En una realización específica, el polinucleótido de ADN aislado de acuerdo con la invención consiste en los siguientes elementos:

1. Marcador de selección de insecto, con un promotor de insecto que dirige la expresión, tal como el promotor truncado de Actina5C de *D. melanogaster* o el promotor de HSP70 con una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la SEC ID N° 5, SEC ID N° 6, o SEC ID N° 2;
- 45 2. Promotor bacteriano, tal como el promotor bacteriano de pKANR;
3. Marcador de selección de Zeocina con cola poliA de SV40;
4. Origen de *E. coli*;
5. Promotor híbrido de Actina5C de 612 pb de *Drosophila melanogaster* con una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la SEC ID N° 6, en el que partes o toda la secuencia central de actina (tal como los nucleótidos 478 a 572 de la SEC ID N° 6) se ha remplazado con el promotor central de HSP70 con una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la SEC ID N° 1, SEC ID N° 2, SEC ID N° 37, o un fragmento de las mismas para dirigir la expresión de proteínas;
- 50 6. Secuencia señal de exportación de proteínas BIP;
7. Sitio de clonación múltiple; y

8. Cola poliA de OPIE2.

Un polinucleótido de ADN de interés consiste en los siguientes elementos:

- 5 1. Marcador de selección de insecto, con un promotor de insecto que dirige la expresión, tal como el promotor truncado de Actina5C de *D. melanogaster* o el promotor de HSP70 con una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la SEC ID N° 5, SEC ID N° 6, o SEC ID N° 2;
2. Promotor bacteriano, tal como el promotor bacteriano de pKANR;
3. Marcador de selección de Zeocina con cola poliA de SV40;
4. Origen de *E.coli*;
- 10 5. Promotor de Actina5C de 457 pb de *Drosophila melanogaster* con una secuencia de nucleótidos de acuerdo con los nucleótidos 2076-2532 de la SEC ID N° 3;
6. Secuencia señal de exportación de proteínas BIP;
7. Sitio de clonación múltiple; y
8. Cola poliA de OPIE2.

Un polinucleótido de ADN de interés consiste en los siguientes elementos:

- 15 1. Marcador de selección de insecto, con un promotor de insecto que dirige la expresión, tal como el promotor truncado de Actina5C de *D. melanogaster* o el promotor de HSP70 con una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la SEC ID N° 5, SEC ID N° 6, o SEC ID N° 2;
2. Promotor bacteriano, tal como el promotor bacteriano de pKANR;
3. Marcador de selección de Zeocina con cola poliA de SV40;
- 20 4. Origen de *E.coli*;
5. Promotor híbrido de Actina5C de 457 pb de *Drosophila melanogaster* con una secuencia de nucleótidos de acuerdo con los nucleótidos 2076-2532 de la SEC ID N° 3, en el que partes o toda la secuencia central de actina (tal como los nucleótidos 2392 a 2487 de la SEC ID N° 3) se ha remplazado con el promotor central de HSP70 con una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la SEC ID N° 1, SEC ID N° 2, SEC ID N° 37, o un fragmento de las mismas para dirigir la expresión de proteínas;
- 25 6. Secuencia señal de exportación de proteínas BIP;
7. Sitio de clonación múltiple; y
8. Cola poliA de OPIE2.

Un polinucleótido de ADN de interés adicional consiste en los siguientes elementos:

- 30 1. Marcador de selección de insecto, con un promotor de insecto que dirige la expresión, tal como el promotor truncado de Actina5C de *D. melanogaster* o el promotor de HSP70 con una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la SEC ID N° 5, SEC ID N° 6, o SEC ID N° 2;
2. Promotor bacteriano, tal como el promotor bacteriano de pKANR;
3. Marcador de selección de Zeocina con cola poliA de SV40;
- 35 4. Origen de *E.coli*;
5. Promotor central de HSP70 con una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la SEC ID N° 1, SEC ID N° 2, SEC ID N° 37, o un fragmento de las mismas para dirigir la expresión de proteínas y uno o más fragmentos funcionales del promotor de Actina5C (elementos reguladores de Actina5c) en cis respecto al promotor central de HSP70;
- 40 6. Secuencia señal de exportación de proteínas BIP;
7. Sitio de clonación múltiple; y
8. Cola poliA de OPIE2.

## ES 2 543 730 T3

En algunas realizaciones específicas, se intercambiarán los siguientes elementos en el polinucleótido de ADN aislado de acuerdo con la invención:

1. Puede colocarse elementos Su(Hw) delante o después del casete de expresión (promotor de expresión, gen de interés y cola poliA); y/o
- 5 2. El marcador de selección de Zeocina puede remplazarse en los vectores de expresión por:
  - a. Marcador de selección de Neomicina, o
  - b. Marcador de selección de Blastidina, o
  - c. Marcador de selección de higromicina, o,
  - d. Marcador de selección de puromicina; y
- 10 3. La construcción de expresión se preparará con y sin la marca HIS.

Un vector de interés puede consistir en:

1. Marcador bacteriano de selección, con un promotor bacteriano
  - a. promotor bacteriano de pKANR
  - b. marcador de selección de Zeocina (ZeoR y/o KanR)
- 15 2. Marcador de selección de insecto, con un promotor de insecto que dirige la expresión
  - a. Promotor truncado de Actina5C de *Drosophila melanogaster* o promotor de HSP70
  - b. Marcador de selección de Zeocina con cola poliA de SV40
3. Origen de *E.coli*
4. Promotores truncado de Actina5C de *Drosophila melanogaster* o HSP70 para dirigir la expresión de proteínas
- 20 5. Secuencia señal de exportación de proteínas BIP
6. Marca HIS
7. Sitio de clonación múltiple
8. Cola poliA de OPIE2
- 25 Debe entenderse a partir de lo anterior que los elementos individuales pueden colocarse en cualquier orden dado. Por consiguiente, el promotor de insecto y el promotor bacteriano puede colocarse directamente uno después del otro. Además, la secuencia marcadora de selección puede usarse tanto por el promotor bacteriano como por el promotor de la célula de insecto.

### *Mejoras generales del vector*

- 30 Pueden añadirse los siguientes elementos al vector de expresión para aumentar el nivel de expresión.
  1. Elementos ubicuos de abertura de la cromatina cadena arriba y abajo del casete de expresión del gen de interés; y/o
  2. Pre-elemento, y elemento de 72 pb de SV40; y/o
  3. MAR (regiones de unión a matriz); y/o
  - 35 4. ACE3 y ori-Beta de *D. melanogaster*; y/o
  5. Elemento de aislamiento transcripcional, el sitio de unión a su(Hw) (Mol Cell Biol. 1997 abril; 17(4): 2202-2206.); y/o
  6. Elemento CPY para remplazar BIP (si se encuentra CPY funcional en S2); y/o
  7. Puede insertarse *dhfr* para la selección en células de insecto; y/o
  - 40 8. Puede insertarse casete separado de resistencia a kanamicina o ampicilina para selección bacteriana; y/o

9. Se reemplaza la cola poliA de OPIE2 con la cola poliA tardía de SV40 y/o

10. Se introduce un intrón cadena abajo del promotor para dirigir la expresión de proteínas y/o

11. Puede incluirse un casete de clonación independiente de ligamiento.

5 Se desvela en el presente documento una secuencia polinucleotídica que hibrida en condiciones de rigurosidad moderada con una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en:

(i) una secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 1, SEC ID N° 2, SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, SEC ID N° 6, SEC ID N° 33, SEC ID N° 36, o SEC ID N° 37, o SEC ID N° 58;

(ii) una secuencia de nucleótidos con una identidad de secuencia de al menos el 80% con una secuencia cualquiera de (i);

10 (iii) un fragmento funcional de al menos 6 nucleótidos contiguos de una secuencia cualquiera de (i) o (ii);

(iv) una secuencia de nucleótidos con una identidad de secuencia de al menos el 80% con el fragmento funcional de al menos 6 nucleótidos de (iii);

(v) una secuencia quimérica de nucleótidos que comprende dos o más secuencias de una secuencia cualquiera de (i), (ii), (iii) y (iv).

15 La expresión "rigurosidad moderada" como se usa en el presente documento se refiere a condiciones de hibridación de polinucleótidos en aproximadamente 50% de formamida, SSC 6x a aproximadamente 42°C y condiciones de lavado de aproximadamente 60°C, SSC 0,5x, SDS al 0,1%.

Procedimientos de la invención para la expresión de proteínas

20 Otro aspecto de la presente invención se refiere a la expresión y recuperación de polipéptidos a partir de células huésped.

Como se ha detallado anteriormente, este aspecto de la invención generalmente utiliza el hallazgo de que un polinucleótido de ADN promotor de la invención proporciona rendimientos mejorados cuando está expresando polipéptidos secretados.

25 El presente inventor ha demostrado recientemente que este rendimiento mejorado (sobre, por ejemplo, la construcción que utiliza el promotor pOPIE2) es una consecuencia de los niveles mejorados de expresión así como de secreción. Como se ha mencionado anteriormente, el procedimiento de acuerdo con la invención comprende las etapas de

(a) obtener una secuencia polinucleotídica que codifica el polipéptido de interés;

30 (b) insertar dicha secuencia polinucleotídica que codifica el polipéptido de interés en el polinucleótido de ADN aislado de la invención;

(c) transformar una célula huésped con el polinucleótido obtenido en la etapa (b);

(d) permitir la expresión de dicho polinucleótido obtenido en la etapa (b) para producir el polipéptido; y

(e) obtener el polipéptido a partir de la misma.

35 Los procedimientos para la transformación variarán de acuerdo con la elección de la célula huésped, pero típicamente se usa transfección mediante acetato de litio (Okazaki y col. Nucleic acid Res. 18: 6485-6489, 1990, incorporado por referencia en el presente documento) o electroporación en levaduras, mientras que puede usarse tanto transfección como transducción (es decir, transferencia de material genético mediante un vector viral) en células de organismos multicelulares. Se describen procedimientos adecuados para la transfección en células S2 de *Drosophila melanogaster* en Park J.H.; Kim H.Y.; Han K.H.; Chung I.S, Optimization of transfection conditions for expression of green fluorescent protein in *Drosophila melanogaster* S2 cells - a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. Enzyme and Microbial Technology, Volumen 25, Número 7, Octubre 1999, pág. 558-563(6)

40 Pueden encontrarse contenidos más generales sobre transformación y cultivo de células transformadas (levaduras o superiores) en Sambrook J y col., "Molecular Cloning: A laboratory Manual", 3ª edición.

45 Los contenidos proporcionados anteriormente respecto a la elección del promotor, los péptidos señal funcionales de secreción, la elección del formato de vectores, la elección de células huésped, el uso de marcadores de selección, y el uso de elementos de estabilización, se aplican mutatis mutandis al procedimiento de la invención. La única diferencia en estos contenidos y los contenidos pertenecientes al procedimiento de la invención es la composición precisa de la secuencia codificante en el vector, ya que el procedimiento de la invención no depende de la presencia

de un polinucleótido quimérico como se define en el presente documento. Se prefiere, sin embargo, que el vector de expresión usado en el procedimiento de la invención sea un vector de expresión de la invención.

5 En algunas realizaciones, el procedimiento de la invención comprende la etapa adicional de someter el polipéptido obtenido en la etapa (c) a modificación post-traducciona - esto implica tanto modificaciones post-traduccionales que se realizan por la célula huésped (y consecuentemente hechas antes de la recuperación del polipéptido) como modificaciones hechas in vitro después de la recuperación del polipéptido.

La etapa (a) del procedimiento de la invención normalmente comprende las etapas de introducir el vector en la célula huésped y posteriormente seleccionar los transformantes que expresan un gen marcador de selección presente en el vector. Los genes marcadores de selección útiles se han detallado anteriormente.

10 La invención se ilustrará mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

### Ejemplo 1

#### Abreviaturas

Tabla 1:

ATCC	The American Type Culture Collection
CEP	Células, protocolo experimental
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
FBS	Suero bovino fetal
LAF	Flujo laminar de aire
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
T25	Matraz de cultivo tisular, 25 cm <sup>2</sup>
T75	Matraz de cultivo tisular, 75 cm <sup>2</sup>
V	Volumen
Wt	Tipo silvestre
Pb	Par de bases
SOE-PCR	Con corte y ajuste por extensión de solapamiento
ON	Durante una noche
LB	Caldo Lauria
ADN	Ácido desoxirribonucleico
E.coli	Escherichia coli

## 15 MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

### *Línea celular*

Se obtuvieron células S2 de *Drosophila* de la ATCC (CRL-1963, lote n° 3225543)

20 Se resucitó un vial de células S2 de *Drosophila* de la ATCC y se expandió en matraces de cultivo tisular. Cuando el número de células excedió de 10<sup>8</sup> células, se estableció un blanco celular que consistía en veinte viales que contenían 2x10<sup>7</sup> células S2 de *Drosophila* en 1 ml de medio de congelación (Excell420 + FBS al 50% + DMSO al 10%) y se almacenó a -80°C.

### *Construcción de plásmidos*

Materias primas (Tabla 2):

Nombre	Propósito	Fuente comercial
NcoI	Enzima de restricción	New England Biolab
HindIII	Enzima de restricción	New England Biolab
XbaI	Enzima de restricción	New England Biolab
NotI	Enzima de restricción	New England Biolab

EcoRI	Enzima de restricción	New England Biolab
XmnI	Enzima de restricción	New England Biolab
SphI	Enzima de restricción	New England Biolab
NheI	Enzima de restricción	New England Biolab
SpeI	Enzima de restricción	New England Biolab
SAP	Fosfatasa alcalina de camarón	New England Biolab
ADN ligasa T4	Ligasa	New England Biolab
Polimerasa PfuUltra II	Para PCR de fragmentos de construcción	Stratagene
Oligos	Para amplificación por PCR	DNA Technology
dNTP	Para PCR	New England Biolab
BigDye Versión 1	Kit de secuencia	Applied Biosystem
Agarosa SeaKem GTG	Geles de agarosa para electroforesis	New England Biolab
SyberSafe	Tinción de geles de agarosa	Invitrogen
Extracción de gel Qiaquick	Recuperar fragmentos de ADN de los geles	Qiagen
Tampón TE	Tampón de almacenamiento para ADN	Qiagen
Tampón TBE	Tampón de electroforesis	Life Technologies
Kit Charge Switch Plasmid Er Mini	Purificación de plásmidos	Invitrogen
Termociclador	PCR, ligamiento, secuenciación	Biometra
ABI PRISM 310	Analizador de secuencia	Applied Biosystem
Zeocina	Antibiótico	InVitrogen
DH10B	Cepa huésped para amplificación de plásmidos	LifeTechnologies

**Vectores obtenidos de forma comercial (Tabla 3):**

Vector	Promotor	Resistencia a antibiótico	Fuente comercial
p2Zop2F	pOPIE2	Zeocina	RCT
pAc5.1/V5-HisA	pAc5.1 (Actina5C)	Ampicilina para <i>E. coli</i> , sin marcador para S2	Invitrogen
pCoHygro		Higromicina	Invitrogen
pMT/V5.His	pMT	Ampicilina para <i>E. coli</i> , sin marcador para S2	Invitrogen

**Vectores creados en este estudio (Tabla 4) (Todos los vectores confieren resistencia a Zeocina)**

Nombre	Cepa no huésped	Número de plásmido	Longitud	Característica principal
p2ZOp2F-NheI	MR#3070	P2260	2779	Vector comercial con promotor pOPIE2 y un sitio de corte por NheI insertado
pHP10	MR#3071	P2261	2310	Promotor central de Actina5C
pHP11	MR#3072	P2262	4742	Promotor mutante de longitud completa de Actina5C
pHP12	MR#3073	P2263	2503	Promotor truncado de Hsp70
pHP12-Afl II	MR#3097	P2287	2506	Sitio de corte añadido para pHP12

pHP13	MR#3074	P2264	2676	Promotor genómico de longitud completa de HSP70
pHP14	MR#3075	P2265	4509	NA
pHP15a	MR#3080	P2270	2040	Intercambio de promotores pOPIE2 y EM7 delante de ZeoR para el promotor bacteriano de HSP70 y pTRC
pHP15b	MR#3081	P2271	2233	Intercambio de promotores pOPIE2 y EM7 delante de ZeoR para el promotor bacteriano central de Actina5C y TRC
pHP15c	MR#3082	P2272	2073	Intercambio de promotores pOPIE2 y EM7 delante de ZeoR para el promotor bacteriano central de Actina5C y KanR
pHP16	MR#3084	P2274	2309	Promotor central de HSP70
pHP17	MR#3086	P2276	3687	Promotor truncado de actina5c_2
pHP18	MR#3087	P2277	2830	Promotor truncado de actina5c_3, 612 pb
pHP18-Afl II	MR#3098	P2288	2833	Sitio de corte añadido para pHP18

Para este estudio se usó la proteína modelo, ligando de RANK (RANK-L, o RANKL). Esta proteína se insertó después de la secuencia señal de BIP, en el sitio de clonación múltiple, en cada uno de los vectores ensayados.

- 5 La secuencia de pKanR usada de acuerdo con los presentes ejemplos:  
**AAGGGATTTTGGTCATGAACAATAAACTGTCTGCTTACATAAACAGTAATACAAGGGGTGTT**  
 CATAGTATAATACGACTCACTATAGGAGGGCC (SEC ID N° 63, secuencia en negrita el promotor KanaR, secuencia restante el promotor EM7).

Construcción de vectores para S2

- 10 **pZOp2F-NheI (p2260, cepa MR#3070)**. El vector se creó con sitio NheI cadena abajo de SV40 usando el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange de Stratagene, para vectores de clonación con diferentes promotores

El QuickChange se preparó con los cebadores 975 y 976 usando p1205 como molde. El producto de PCR se trató con DpnI durante una hora a 37°C y se transformó en células DH10B, se sembró en placas de agar LB que contenían 0,75 ug/ml de Zeocina y se incubaron ON.

El plásmido se ha secuenciado completamente usando los cebadores 590

- 15 **pHP11 (p2263, cepa MR#3073)** se construyó por amplificación por PCR de una etapa. La PCR se preparó con los cebadores 980 y 979 usando p805 (pAc5.1/V5-HisA) como molde. El fragmento resultante era de 2540 pb, que contenía el promotor de Actina 5C. El fragmento de PCR se digirió con las endonucleasas de restricción NheI y HindIII y se clonó en p2260 digerido con NheI y HindIII y tratado con SAP. Se ligó durante una noche en un termociclador. El producto de ligamiento se transformó en células DH10B, se sembró en placas de agar LB que contenían 0,75 ug/ml de Zeocina y se incubaron ON.

En el plásmido resultante, se ha secuenciado completamente el inserto usando los cebadores 590, 981, 986 y 917.

El vector **pHP12 (p2263, cepa MR#3073)** se construyó por amplificación por PCR de una etapa. La PCR se preparó con los cebadores 981 y 982 usando p2546 como molde. El fragmento resultante era de 299 pb, que contenía el promotor de Hsp70 de Hsp70-pFast-Bac que se obtuvo del ADN genómico de células S2.

- 25 El fragmento de PCR se digirió con las endonucleasas de restricción NheI y HindIII y se clonó en p2260 digerido con NheI y HindIII y tratado con SAP. Se ligó durante una noche en un termociclador. El producto de ligamiento se transformó en células DH10B, se sembró en placas de agar LB que contenían 0,75 ug/ml de Zeocina y se incubaron ON.

En el plásmido resultante, se ha secuenciado completamente el inserto usando los cebadores 590, 981, 986 y 917.

- 30 **pHP13 (p2264, cepa MR#3074)** se construyó por amplificación por PCR de una etapa. La PCR se preparó con los cebadores 983 y 984 usando p2546 como molde. El fragmento resultante era de 473 pb, que contenía el promotor de longitud completa de Hsp70 de Hsp70-pFast-Bac que se obtuvo del ADN genómico de células S2.

El fragmento de PCR se digirió con las endonucleasas de restricción NheI y HindIII y se clonó en p2260 digerido con NheI y HindIII y tratado con SAP. Se ligó durante una noche en un termociclador. El producto de ligamiento se

transformó en células DH10B, se sembró en placas de agar LB que contenían 0,75 ug/ml de Zeocina y se incubaron ON.

En el plásmido resultante, se ha secuenciado completamente el inserto usando los cebadores 590, 984 y 917.

#### **Cambio del promotor OpIE2 y EM7 cadena arriba del gen ZeoR en vectores**

##### **5 pHP15a (p2270, cepa MR#3080)**

El vector contenía el promotor ptrc en lugar del promotor EM7 y el promotor de Actina 5C en lugar de OpIE2 todos cadena arriba del gen ZeoR.

La construcción se construyó por SOE-PCR. El primer fragmento de PCR1 se preparó con los cebadores 4007 y 4009 usando p2263 como molde. El producto resultante de PCR tiene el tamaño de 234 pb.

10 El segundo fragmento de PCR2 se preparó con los cebadores 4008 y 4000 usando p2263 como molde. El fragmento tiene el tamaño de 1134 pb.

La SOE-PCR se preparó mezclando los productos de PCR1 y PCR2. Finalmente el fragmento se amplifica usando los cebadores 4000 y 4009.

15 El fragmento resultante era de 1433 pb y se digirió con las endonucleasas de restricción EcoRI y NcoI y se clonó en p2263 digerido con EcoRI y NcoI y tratado con SAP. Se ligó durante una noche en un termociclador. El producto de ligamiento se transformó en células DH10B, se sembró en placas de agar LB que contenían 0,75 ug/ml de Zeocina y se incubaron ON.

En el plásmido resultante, se ha secuenciado completamente el inserto usando los cebadores 1892, 2232, 2233, 2234, 2235, 2236, 2007, 4000, 4002, 4007 y 4009.

##### **20 pHP15b (p2271, cepa MR#3081)**

El vector es casi como pHP15a pero contiene el promotor de Hsp70 en lugar del promotor de Actina 5C cadena arriba del gen ZeoR. Se construyó por amplificación por PCR de una etapa. La PCR se preparó con los cebadores 4001 y 4002 usando p2270 como molde. El fragmento resultante era de 290 pb, que contenía el promotor de actina 5c.

25 El fragmento de PCR se digirió con las endonucleasas de restricción XmnI y SphI y se clonó en p2270 digerido con XmnI y SphI y tratado con SAP. Se ligó durante una noche en un termociclador. El producto de ligamiento se transformó en células DH10B, se sembró en placas de agar LB que contenían 0,75 ug/ml de Zeocina y se incubaron ON.

En el plásmido resultante, se ha secuenciado completamente el inserto usando los cebadores 2007, 4000 y 4001.

30 **pHP15c (p2272, cepa MR#3082)** que contiene la secuencia promotora cadena arriba para KanaR en lugar del promotor EM7 cadena arriba del gen ZeoR.

La construcción se construyó por SOE-PCR. El primer fragmento de PCR1 se preparó con los cebadores 4003 y 4009 usando p2270 como molde. El producto resultante de PCR tiene el tamaño de 296 pb.

35 El segundo fragmento de PCR2 se preparó con los cebadores 4004 y 2007 usando p2270 como molde. El fragmento tiene el tamaño de 189 pb.

La SOE-PCR se preparó mezclando los productos de PCR1 y PCR2. Finalmente el fragmento se amplifica usando los cebadores 4009 y 2007.

40 El fragmento resultante de 450 pb se digirió con las endonucleasas de restricción SphI y NcoI y se clonó en p2270 digerido con SphI y NcoI y tratado con SAP. Se ligó durante una noche en un termociclador. El producto de ligamiento se transformó en células DH10B, se sembró en placas de agar LB que contenían 0,75 ug/ml de Zeocina y se incubaron ON.

En el plásmido resultante, se ha secuenciado completamente el inserto usando los cebadores 2007 y 4003.

#### **Construcción del promotor truncado de Actina 5c a partir de pHP11**

**pHP17 (p2276, cepa MR#3086)** que contiene la secuencia truncada del promotor de Actina 5c de 1486 pb.

45 El vector p2262 se digirió con las endonucleasas de restricción SphI y NheI y el vector se ligó de nuevo con el uso de Klenow. El producto de ligamiento se transformó en células DH10B, se sembró en placas de agar LB que contenían 0,75 ug/ml de Zeocina y se incubaron ON.

## ES 2 543 730 T3

Se exploraron las colonias por PCR de colonias usando los cebadores 590 y 980. Los insertos correctos presentan un fragmento de ADN que tiene el tamaño de 1510 pb.

En el plásmido resultante, se ha secuenciado completamente el inserto usando los cebadores 590, 917, 990, 992, 993, 994, 995 y 2509.

5 **pHP18 (p2277, MR#3087)** que contiene la secuencia truncada del promotor de Actina 5c de 612 pb.

El vector p2262 se digirió con las endonucleasas de restricción SpeI y NheI y el vector se ligó de nuevo con el uso de Klenow. El producto de ligamiento se transformó en células DH10B, se sembró en placas de agar LB que contenían 0,75 ug/ml de Zeocina y se incubaron ON.

10 Se exploraron las colonias por PCR de colonias usando los cebadores 590 y 980. Los insertos correctos presentan un fragmento de ADN que tiene el tamaño de 660 pb.

En el plásmido resultante, se ha secuenciado completamente el inserto usando los cebadores 590, 917, 993, 995 y 2509.

15 **pHP12-Afl II (p2287, cepa MR#3097)** El vector se construyó por SOE-PCR. El primer fragmento de PCR1 se preparó con los cebadores 987 y 4036 usando p2263 como molde. El producto resultante de PCR tiene el tamaño de 217 pb.

El segundo fragmento de PCR2 se preparó con los cebadores 4035 y 986 usando p22630 como molde. El fragmento tiene el tamaño de 190 pb.

La SOE-PCR se preparó mezclando los productos de PCR1 y PCR2. Finalmente el fragmento se amplifica usando los cebadores 986 y 987.

20 El fragmento resultante de 362 pb se digirió con las endonucleasas de restricción NheI y HindIII y se clonó en p2263 digerido con NheI y HindIII y tratado con SAP. Se ligó durante una noche en un termociclador. El producto de ligamiento se transformó en células DH10B, se sembró en placas de agar LB que contenían 0,75 ug/ml de Zeocina y se incubaron ON.

En el plásmido resultante, se ha secuenciado completamente el inserto usando el cebador 982.

25 **Clonación de vectores híbridos con el promotor central de actina5c y central de Hsp70.**

**pHP18-Afl II (p2288, cepa MR#3098)** El vector se construyó por SOE-PCR. El primer fragmento de PCR1 se preparó con los cebadores 987 y 4038 usando p2277 como molde. El segundo fragmento de PCR2 se preparó con los cebadores 4037 y 986 usando p2277 como molde. El fragmento tiene el tamaño de 224 pb.

30 La SOE-PCR se preparó mezclando los productos de PCR1 y PCR2. Finalmente el fragmento se amplifica usando los cebadores 986 y 987.

El fragmento resultante de 689 pb se digirió con las endonucleasas de restricción NheI y HindIII y se clonó en p2277 digerido con NheI y HindIII y tratado con SAP. Se ligó durante una noche en un termociclador. El producto de ligamiento se transformó en células DH10B, se sembró en placas de agar LB que contenían 0,75 ug/ml de Zeocina y se incubaron ON.

35 En el plásmido resultante, se ha secuenciado completamente el inserto usando el cebador 980.

**pHP19** vector híbrido de central de actina5c, que contiene el promotor central de Actina5C y la secuencia promotora de Hsp70 cadena arriba del promotor central de Hsp70.

40 El vector p2288 se digirió con las endonucleasas de restricción AflII y HindIII, el producto resultante tiene el tamaño de 178 pb y el fragmento se clona en p2287 digerido con AflII y HindIII. Se ligó durante una noche en un termociclador. El producto de ligamiento se transformó en células DH10B, se sembró en placas de agar LB que contenían 0,75 ug/ml de Zeocina y se incubaron ON.

Se exploraron las colonias por PCR de colonias usando los cebadores 4000 y 917. Los insertos correctos presentan un fragmento de ADN del tamaño esperado. En el plásmido resultante, se ha secuenciado completamente el inserto usando los cebadores 980 y 917.

45 **pHP20** híbrido-central de Hsp70, que contiene el promotor central de Hsp70 y la secuencia promotora de Actina5C cadena arriba del promotor central de Actina5c.

50 El vector p2287 se digirió con las endonucleasas de restricción AflII y HindIII, el producto resultante tiene el tamaño de 144 pb y se clona en p2288 digerido con AflII y HindIII. Se ligó durante una noche en un termociclador. El producto de ligamiento se transformó en células DH10B, se sembró en placas de agar LB que contenían 0,75 ug/ml de Zeocina y se incubaron ON.

## ES 2 543 730 T3

Se exploraron las colonias por PCR de colonias usando los cebadores 993 y 901. Los insertos correctos presentan un fragmento de ADN que tiene el tamaño de 478 pb. En el plásmido resultante, se ha secuenciado completamente el inserto usando los cebadores 986 y 917.

### *Cultivo y mantenimiento de líneas celulares*

#### 5 Materiales

Crioviales, 1,8 ml: Nunc cat.nº 377267

Excell420: SAFC cat.nº 14420

Suero bovino fetal, FBS, 500 ml: Life Technologies cat.nº 10099-141

Matraces de agitación, 250 ml con tapón ventilado de 0,2 µm: Corning cat.nº 431144 (Volumen de trabajo: 25-70 ml)

10 Matraces de agitación, 1000 ml con tapón ventilado de 0,2 µm: Corning cat.nº 431147 (Volumen de trabajo: 100-225ml)

Matraces de cultivo tisular, 25 cm<sup>2</sup>: Greiner cat.nº 690160 (Volumen de trabajo: 4-8 ml)

Matraces de cultivo tisular, 75 cm<sup>2</sup>: Greiner cat.nº 658170

#### Inicio del cultivo celular a partir de reservas congeladas

15 1. Se retira uno (o más) vial(es) del nitrógeno líquido y se coloca en un baño de agua a 23°C. Se descongela rápidamente con agitación suave hasta que las células están casi descongeladas. Se retira el(los) vial(es) del baño de agua. Cada vial contiene células 4E7 en 1 ml de medio de congelación (40% de Excell420 + 50% de FBS + 10% de DMSO)

20 2. Se descontamina rápidamente el exterior del vial tratando con etanol al 70% y se transfiere suavemente la suspensión celular a un tubo de centrifuga que contiene 7 ml de medio a 23°C (Excell420 + FBS al 10%) y se centrifuga a 330xg durante 2 minutos

3. Se descarta el medio para retirar el DMSO, se resuspenden las células en 5 ml de medio a 23°C (Excell420 + FBS al 10%) y se transfiere la suspensión a un T25

25 4. Se incuba a 23°C hasta que las células alcanzan una densidad de 6E6-9E6 células/ml. Esto lleva 2-4 días. Se inspeccionan y cuentan las células diariamente mediante el uso de un contador celular y se anota la concentración y viabilidad de las células. La viabilidad típicamente aumentará hasta el 80-90% en 3-4 días.

#### Expansión de las células en matraces T

30 1. Se transfiere el cultivo celular del T25 a un T75 y se añaden 10 ml de medio a 23°C (Excell420 + FBS al 10%). Se incuba a 23°C hasta que las células alcanzan una densidad de 6E6-9E6 células/ml. Esto lleva 2-4 días. Se inspeccionan y cuentan las células diariamente mediante el uso de un contador celular y se anota la concentración y viabilidad de las células. La viabilidad típicamente será >90%.

35 2. Se transfiere el cultivo celular del T75 a dos T75 y se añaden 10 ml de medio a 23°C (Excell420 + FBS al 10%) a cada uno de ellos. Se incuban a 23°C hasta que las células alcanzan una densidad celular de 6E6-9E6 células/ml. Esto lleva 2-4 días. Se inspeccionan y cuentan las células diariamente mediante el uso de un contador celular y se anota la concentración y viabilidad de las células. La viabilidad típicamente será >90%.

40 3. Se transfiere el cultivo celular de los dos T75 a un matraz de agitación desechable de 250 ml y se añaden 25 ml de medio a 23°C (Excell420). Se incuban las células a 110 rpm y 23°C hasta que las células alcanzan una densidad de 1,5E7-2E7 células/ml. Esto lleva 3-4 días. Se inspeccionan y cuentan las células desde el día 2 post-transferencia mediante el uso de un contador celular y se anota la concentración y viabilidad de las células. La viabilidad típicamente será >90%.

#### Expansión de las células en matraces de agitación

45 1. Se transfiere el cultivo celular del R250 a un tubo de centrifuga y se centrifugan las células a 330xg durante 5 minutos. Se resuspenden las células en medio fresco (Excell420) hasta una densidad celular de 8E6 células/ml en un matraz de agitación apropiado. Se incuban a 110 rpm y 23°C hasta que las células alcanzan una densidad de 2,5E7-3,5E7 células/ml. Esto lleva 3-4 días. Se inspeccionan y cuentan las células desde el día 2 post-transferencia mediante el uso de un contador celular y se anota la concentración y viabilidad de las células. La viabilidad típicamente será >90%.

2. Se expande el cultivo celular en matraces de agitación de 1000 ml hasta que se obtiene una cantidad total de células de 8,5E9 células: Cada 3-4 días, las células se dividen por centrifugación y se resuspenden hasta

## ES 2 543 730 T3

una densidad celular de 8E6 células/ml en medio fresco (Excell420) en nuevos matraces de agitación. Las células deben usarse para la preparación del banco maestro de células dos días después del último subcultivo.

### Preparación de un banco de células

- 5 1. Se inspeccionan y cuentan las células mediante el uso de un contador celular y se anota la concentración y viabilidad de las células. La viabilidad típicamente será >90%. Se transfiere la suspensión celular correspondiente a 8E9 células a un tubo de centrifuga y se centrifuga a 330xg durante 5 minutos. Se resuspenden las células en 200 ml de medio de congelación a 4°C (40% de Excell420, 50% de FBS y 10% de DMSO) y se reparten rápidamente alícuotas de 1 ml de suspensión celular en cada criovial.
- 10 2. Se transfieren los crioviales a criocajas Mr. Frosty de 4°C y se colocan las cajas en un congelador a -80°C.
3. Se transfieren los crioviales después de 6 a 48 horas a nitrógeno líquido para su almacenamiento. (Volumen de trabajo: 12-25 ml).

### *Transfección de células*

- 15 Se usan células de un cultivo en crecimiento mantenido como se ha estipulado anteriormente, que se ha diluido o resuspendido después de centrifugación uno a dos días antes de la transfección. La viabilidad debe ser > 90%.
1. Se transfiere la suspensión celular correspondiente a aprox. 3,2E7 células por transfección a un tubo de centrifuga y se centrifuga a aprox. 125xg durante aprox. tres minutos.
- 20 2. Se resuspende en aprox. 4 ml de medio a aprox. 23°C por transfección y se transfieren 4 ml de suspensión celular a cada T25.
3. Se transfieren aprox. 6,3 ug de cada ADN a tubos eppendorf individuales.
4. Se añade tampón EC a cada tubo eppendorf que contiene ADN para dar un volumen final de 150 ul.
5. Se mezcla el ADN y el tampón EC pipeteando arriba y abajo un par de veces.
6. Se añaden 50 ul de potenciador a los tubos eppendorf que contienen ADN y tampón EC.
- 25 7. Se agita con vórtice la mezcla de ADN durante 1 segundo.
8. Se incuba a 20-25°C durante dos-cinco minutos.
9. Se añaden 140 ul de Effectene a los tubos eppendorf que contienen la mezcla de ADN.
10. Se mezcla pipeteando arriba y abajo cinco veces.
11. Se incuba a 20-25°C durante cinco-diez minutos.
- 30 12. Se añaden 1,5 ml de medio a los tubos y se mezclan pipeteando arriba y abajo un par de veces.
13. Cuidadosamente se deja que la mezcla de ADN caiga hasta la suspensión celular en el T25 y se inclinan cuidadosamente los matraces hacia delante y hacia atrás.
14. Se incuban a aprox. 23°C.

- 35 Se describen otros procedimientos adecuados para la transfección en células S2 de *Drosophila melanogaster* en Park J.H.; Kim H.Y.; Han K.H.; Chung I.S. Optimization of transfection conditions for expression of green fluorescent protein in *Drosophila melanogaster* S2 cells - a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. Enzyme and Microbial Technology, Volumen 25, Número 7, Octubre 1999, pág. 558-563(6).

- 40 El reactivo de transfección Effectene es una formulación lipídica no liposómica que tiene citotoxicidad mínima por transfección en presencia de suero y tiene alta eficacia de transfección. El reactivo Effectene se usa junto con el potenciador y el tampón de condensación de ADN (tampón EC) para conseguir altas eficacias de transfección.

### *Transfecciones transitorias*

Después de la transfección se deja que las células crezcan y produzcan a 23°C durante 2 a 4 días antes de tomar una muestra para la determinación de la cantidad de células, la proteína de interés y las proteínas totales. No debe añadirse agente de selección durante las transfecciones transitorias.

- 45 *Preparación de líneas celulares estables*

Después de la transfección se deja que las células crezcan durante 1 a 2 días antes de añadir 1,5 mg/ml de Zeocina (u otro agente de selección apropiado a concentración apropiada). Las células después se expanden en matraces T y matraces de agitación como se ha descrito anteriormente (Expansión de las células en matraces T; Expansión de las células en matraces de agitación). Después de 2 a 4 semanas estarán presentes solamente las células resistentes al marcador de selección, a causa de la integración del marcador de resistencia en el genoma, y la línea celular puede considerarse estable. El agente de selección en este punto puede dejarse fuera de las etapas adicionales de cultivo o propagación, y las células pueden congelarse como se ha descrito anteriormente.

#### Análisis

Se usó ELISA para analizar la proteína modelo (ligando de RANK) usada en este estudio. Se usó el análisis de proteínas totales de Bradford para determinar la concentración de proteínas totales.

#### Resultados

Se ha creado una gama de vectores con niveles potenciados de expresión de proteínas. Hay 3 clases principales de vector de expresión NN2: La primera clase comprende vectores con diferentes variantes del promotor de actina5C que dirige la expresión de proteínas; la segunda clase se refiere a vectores que emplean el promotor de HSP70, mientras que la tercera implica promotores híbridos de actina5C/HSP70.

Se investigó un promotor mutante de Actina5c (véanse las mutaciones en la sección de alineamiento de secuencias) para determinar su nivel de expresión de proteínas (vector pHP11). Se descubrió que el promotor mutante de Actina5C provocaba un nivel de expresión uniformemente mayor en comparación con pOPIE2 (véase la Fig. 1).

También se ensayaron dos versiones del promotor de HSP70 de S2 de *Drosophila melanogaster*. El primer promotor era el promotor de longitud completa de HSP70 (457 pb, vector pHP 13), mientras que el segundo era una versión truncada de HSP70 (59 pb a 342 pb, véase la sección de secuencias, vector pHP12). Se descubrió que la versión truncada tenía niveles de expresión de proteínas hasta cinco veces mayores en comparación con el promotor de longitud completa (véase la figura 2). También se observó que el promotor truncado de HSP70 se expresaba a alto nivel en líneas celulares estables así como transitorias (véanse las figuras 3 y 4).

El promotor mutante de Actina5C y el promotor truncado de HSP70 se estudiaron adicionalmente a través de truncamiento. Los resultados de expresión de proteínas para líneas celulares tanto transitorias como estables pueden observarse en la figura 3 y 4.

Se consiguió un aumento de 3 a 9 veces en la expresión de proteínas sobre el promotor pOPIE2 para las variantes de promotor de Actina5C y HSP70 en las líneas celulares estables (figura 3). Además, se consiguió un aumento en el nivel promedio de expresión sobre el promotor de longitud completa de Actina5c usando el promotor truncado más corto de Actina5C (Actina5C\_3, vector pHP18), aunque serán necesarios más experimentos para confirmar si tiene expresión significativamente mayor. Sin embargo, también puede observarse esta tendencia para transfecciones transitorias (véase la figura 4). El mayor nivel de expresión se observó para el promotor de HSP70, aunque la secuencia promotora central de HSP70 condujo a un nivel de expresión significativamente reducido en comparación con pOPIE2 así como el promotor truncado de HSP70. El nivel de expresión del promotor truncado de HSP70, aunque siembre mayor que pOPIE2, fue altamente variable de una transfección a otra. Se espera que optimizando la transfección para esta construcción se reduzca la variación en las diferentes líneas celulares policlonales estables. Sin embargo, las líneas policlonales estables, una vez establecidas, no mostraron variación significativa en la expresión con el tiempo. Las líneas celulares policlonales estables resultantes después de la transfección deben, por lo tanto, explorarse antes de su uso para encontrar las combinaciones policlonales de mejor expresión.

Los niveles de expresión de proteínas se aumentaron de 4 a 12 veces en transformaciones transitorias en comparación con el promotor pOPIE2. El promotor truncado más corto de Actina5C (vector pHP18) tuvo el nivel de expresión uniforme más alto en transfecciones transitorias.

Se compararon los promotores centrales de Actina5C (vector pHP10) y HSP70 (vector pHP16) con pOPIE2 para obtener perspectivas adicionales en sus propiedades relativas. El nivel de expresión del promotor central de HSP70 es significativamente mayor que el promotor central de Actina5C, aunque ambos promotores son significativamente más débiles que el promotor pOPIE2 que se usó como control interno. (Figura 5)

El promotor central de Actina5C se usó para expresar el gen de resistencia a zeocina ZeoR junto con el promotor bacteriano de KanR (vector pHP15c). Esto permite el uso de Zeocina como marcador de selección en células tanto de *E. coli* como S2 de insecto. Además, el promotor central de Actina5C es significativamente más débil que el promotor pOPIE2 usado para expresar el marcador de resistencia a zeocina en p2ZO2F. Esto conduce a una disminución de 2 veces en la resistencia al antibiótico después de la transfección en comparación con células transfectadas con el plásmido p2ZO2F, que conduce a 2 veces menos Zeocina (0,75 mg/ml frente a 1,5 mg/ml) a usar cuando se seleccionan células estables.

Además, se incluyeron diferentes marcadores de selección para permitir mayor flexibilidad en la aplicación de los vectores. Se incluyen los siguiente marcadores: Zeocina, neomicina y blasticidina.

#### Alto nivel de expresión conseguido por un promotor mutante o truncado de Actina5C

5 Se comparó el nivel de expresión de un promotor mutante de Actina5C con el promotor pOPIE2 disponible en el mercado, y se descubrió que era significativamente mayor (véase la figura 1). Se consiguieron aumentos adicionales en el nivel de producción de proteínas por truncamiento del promotor de Actina5C a 612 pb a partir del de 2532 pb de longitud completa (SEC ID N° 3). El promotor truncado tubo una producción de proteínas 5 veces aumentada para líneas celulares estables en comparación con el vector p2ZO<sub>p2F</sub> disponible en el mercado que contenía el promotor pOPIE2. Además, los niveles de expresión transitoria aumentaron hasta 12 veces en comparación con el nivel de expresión obtenido con el vector p2ZO<sub>p2F</sub>. (véase la figura 3 y 4)

#### Efecto del truncamiento del promotor genómico de HSP70

15 En células S2 de *Drosophila melanogaster*, los mecanismos reguladores no solamente conducen a la inducción de HSP70 de choque térmico, sino que también evita la expresión a temperaturas normales (Feder y col. 1992, Genes Dev. Agosto;6(8):1402-13). Sorprendentemente, el promotor truncado de HSP70 mostró el mayor nivel de expresión en líneas celulares transfectadas de forma estable en comparación con los promotores de Actina5C y pOPIE2 (véase la figura 3). Sin embargo, se retiraron 58 pb desde el extremo cadena arriba del promotor genómico de longitud completa y 114 pb desde el extremo cadena abajo del promotor, durante la clonación para crear el promotor truncado. Parece probable que este truncamiento provoque directamente el alto nivel de expresión desregulada (constitutiva) observado. En la figura 2 se contrasta el alto nivel de expresión constitutiva del promotor truncado de HSP70 con el bajo nivel de expresión del promotor de longitud completa en transfecciones transitorias. Esto indica una mitigación de la represión del promotor.

#### Reducción de la concentración requerida de Zeocina durante selección de líneas celulares estables

25 El uso del nivel de expresión significativamente debilitado (en comparación con los promotores de longitud completa y pOPIE2) del promotor central de Actina5C junto con el promotor bacterianos de KanR provoca una sensibilidad aumentada a Zeocina de las líneas celulares transfectadas (2 veces). Una resistencia inferior podría ayudar a seleccionar eventos de integración multicopia superior para compensar el escaso nivel de expresión del marcador de resistencia ZeoR, lo que conduce a un mayor nivel de expresión de proteínas del gen de interés. La capacidad de seleccionar eventos de integración génica de alto número de copias usando menos Zeocina cuando se preparan líneas celulares estables sería una ventaja en sí misma, ya que la Zeocina es un mutágeno y podría tener efectos adversos e inesperados sobre las células.

#### Expresión aumentada a través de promotores híbridos de Actina5C/HSP70

35 En los experimentos analizados anteriormente, se descubrió que el promotor truncado de HSP70 conducía al mayor nivel de expresión en líneas celulares estables (Fig. 3). Sin embargo, el mayor nivel de expresión durante transfecciones transitorias se consiguió usando el promotor truncado más corto de Actina5C (Actina5C\_3) (Fig. 4). Además, se descubrió que el promotor central de HSP70 tenía un nivel de expresión 4 veces mayor en comparación con el promotor central de Actina5C durante transfección transitoria (Fig. 5).

40 Por lo tanto se decidió preparar promotores híbridos, donde se intercambiaran el promotor central de Actina5C y HSP70 en los promotores truncado de Actina5C y truncado de HSP70, respectivamente. Se creyó que esto conduce a un aumento significativo en el nivel de expresión en el promotor híbrido de Actina5C-central de HSP70 en comparación con el promotor original de Actina5C.

#### Construcción de vectores

Se solicitó el ADN para el vector pHP34s de forma sintética en GeneART, Alemania (SEC ID N° 58). Todos los vectores creados a partir de pHP34s se prepararon usando el ADN sintético solicitado en

GeneART, Alemania y los cebadores solicitados en DNA-technology, Dinamarca.

45 La secuencia codificante del promotor híbrido se creó en el plásmido pHP34s-Híbrido, por PCR de la secuencia codificante del promotor central de HSP70 a partir del ADN del promotor sintético de HSP70 (SEC ID N° 37) solicitado en GeneART (cebadores de PCR: GCGAACTTAAGAGCGCCGGAGTATAAATAG (SEC ID N° 64) y CCAAGCTTCTGCAGATTGTTTAGCTTG (SEC ID N° 65). Después se hizo una segunda PCR para obtener el promotor de Actina 5c cadena arriba del promotor (cebadores: GGTTTGTCCTCAACTCATCAATGTAT (SEC ID N° 66) y TATACTCCGGCGCTCTTAAGTTCGCTCGCGTTCAAACCTTTACC (SEC ID N° 67)) a partir de pHP34s, y se fusionaron los dos fragmentos de PCR usando PCR.

50 El producto de PCR fusionado resultante después se digirió con *SpeI* y *HindIII*, y se ligó en el vector pHP34s digerido con *SpeI* y *HindIII* de acuerdo con procedimientos convencionales de biología molecular. El ADN también puede solicitarse de forma sintética para el promotor híbrido y clonarse usando *SpeI* y *HindIII* en pHP34s-Híbrido.

El intrón (sintético, SEC ID N° 60)) se solicitó en GeneART y se insertó por GeneART en el vector pHP34s-Híbrido entre los sitios de restricción *SacI* y *EcoRI* para crear el vector pHP34s-Híbrido.i.

5 La región de unión a matriz de HSP70 o elemento hSAR (SEC ID N° 59), se insertó en pHP34s-Híbrido en dos posiciones que flanquean el casete de expresión. El elemento hSAR se solicitó como una secuencia sintética en GeneART con sitios *SpeI* y *NarI* flanqueantes en cada lado. El vector pHP34s-híbrido y el vector GeneART que contiene hSAR se digirieron con *NarI*, los fragmentos deseados se purificaron en gel y se ligaron para producir dos vectores, pHP34s-Híbrido-hSAR-F o -R (-F o -R indicaba orientación directa o inversa), con el elemento hSAR insertado en ambas orientaciones. Cada uno de estos dos vectores y el vector GeneART que contiene hSAR se digirieron después con *SpeI*, los fragmentos deseados se purificaron en gel y se ligaron para crear cuatro vectores. Los cuatro vectores contienen dos elementos hSAR en las cuatro orientaciones posibles.

10 Los vectores mencionados anteriormente y las secuencias codificantes de ADN de proteína modelo RANKL (variante hRP1.12-RA) y las secuencias codificantes de ADN de proteína modelo HA solicitadas de forma sintética se digirieron con *EcoRI* y *NotI*, los fragmentos deseados se purificaron en gel y se ligaron (por ejemplo RANKL con uno de los vectores o HA con uno de los vectores) para producir los vectores mencionados anteriormente con el ADN que codifica RANKL o HA insertado. Los vectores resultantes se llamaron con el nombre de hRP1.12-RA-vector o el nombre de HA-vector, por ejemplo: hRP1.12-RA, pHP34s-Híbrido.

15 Creación de vectores pMT/V5.HIS.A y pAC5.1 que contienen RANKL y HA (de gripe aviar H5N1). Los vectores se obtuvieron de Invitrogen, se digirieron con *EcoRI* y *NotI*, los fragmentos deseados se purificaron en gel y se ligaron con RANKL o HA sintéticos digeridos con *EcoRI* y *NotI* y purificados en gel como se ha descrito anteriormente, para producir los vectores pMT/V5 y pAC5.1 con el ADN que codifica RANKL insertado.

20 Se creó un vector del marcador de resistencia a kanamicina/Geneticina(G418) y se llamó pHP34s-Híbrido-KanR. El vector se creó insertando el ADN sintético solicitado en geneART que codifica el gen de KanR/NeoR (optimizado para la expresión en células de *E.coli* y S2) y el promotor de *E. coli* en el vector pHP34s-Híbrido. El vector y el inserto se digirieron con *XmnI* y *Sall*, el vector lineal y los fragmentos que contienen kanR se purificaron en gel y se ligaron de acuerdo con procedimientos convencionales.

25 El mapa de vector para hRP1.12-RA-pHP34s-Híbrido, pHP34s, pHP34s-híbrido-hSAR-FR, y pHP34s-híbrido.i se muestran en las Fig. 10-12.

#### Transfección

30 Para los experimentos de comparación se usaron los dos vectores de Invitrogen (pMT/V5.HIS.A y pAC5.1). Estos dos vectores no contienen un marcador de selección, y por lo tanto se co-transfectaron con un vector que confiere resistencia a higromicina también obtenido de Invitrogen (pCoHygro). La transfección se realizó de acuerdo con el mismo protocolo que para los vectores derivados de pHP34s, pero se añadió el vector de resistencia a higromicina para los vectores pMT/V5.HIS.A y pAC5.1 a una proporción de 10:1 (10 veces más vector de expresión que vector de resistencia a higromicina).

35 Los vectores restantes se transfectaron de acuerdo con el procedimiento convencional detallado anteriormente.

#### Preparación de líneas celulares estables

Las células resistentes a higromicina se hicieron estables de acuerdo con el mismo procedimiento descrito para las células resistentes a Zeocina anteriores, excepto que se añadieron 600 ug/ml de Higromicina al medio en lugar de 1500 ug/ml de Zeocina.

40 El vector que confiere resistencia a kanamicina/Geneticina (G418) se transfectó de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente, pero la selección se hizo usando entre 1200 y 1500 ug/ml de G418 en células S2 o con concentración convencional de Kanamicina para células de *E. coli*.

#### Ensayo de expresión

##### *Inducción con CdCl<sub>2</sub>.*

45 El vector pMT/V5.HIS.A tiene un promotor inducible por cadmio de modo que para el ensayo de comparación de expresión las células se indujeron con CdCl<sub>2</sub>. Las células se cultivaron en matraces de agitación durante 2-3 días y después se indujeron usando 1 ul de reserva por 1 ml de medio (Reserva: CdCl<sub>2</sub> 1 mM Sigma C-2544 lote 13H0424: 183 mg en 1000 ml de H<sub>2</sub>O). Se permitió que las células produjeran proteína durante tres a cuatro días adicionales antes de tomar muestras para el análisis.

50 Los vectores restantes tienen promotores constitutivos y por tanto no hizo falta inducirlos. Se tomaron muestras después de 3-4 días de cultivo y producción.

Los experimentos se realizaron por duplicado o triplicado (véanse los siguientes datos sin procesar) en matraces de agitación.

Resultados

El intercambio del promotor central débil del promotor de actina 5c con el promotor central más fuerte de HSP70 condujo a un aumento del 50% en la expresión sobre el promotor truncado de Actina 5c (véase la Fig. 8).

5 También se ensayó el efecto de un nuevo elemento, un intrón, específicamente el intrón descrito en el artículo Zieler H., Huynh CQ. "Intron-dependent stimulation of marker gene expression in cultured insect cells", *Insect Mol Biol.* 2002 1, 87-95. La secuencia de ADN de este intrón se expone en la SEC ID N° 60, donde está flanqueada por dos sitios de restricción. De modo que, de acuerdo con la invención, la inclusión de un promotor tal como la SEC ID N° 60 entre la secuencia de ácido nucleico del promotor y la secuencia codificante para una proteína de interés puede aumentar significativamente los niveles de expresión aumentados obtenidos por la presente invención:

10 La Fig. 9 demuestra el efecto de añadir el intrón o dos regiones flanqueantes de unión a matriz al vector del promotor híbrido.

15 La Figura 9 demuestra que la adición de un intrón aumentaba la expresión de la proteína modelo en un 22% y la adición de dos regiones flanqueantes de unión a matriz potenciaba la expresión en un 46% en comparación con el vector del promotor híbrido original. Se esperaba que la combinación del intrón y las regiones de unión a matriz en un vector potenciara adicionalmente la expresión.

Finalmente, la Fig. 13 demuestra que los vectores de la invención proporcionan rendimientos de expresión significativamente mayores que 2 vectores disponibles en el mercado.

Para concluir, se obtuvo un nivel de expresión aumentado significativo usando los vectores desarrollados en este trabajo en comparación con los vectores disponibles en el mercado.

20 La funcionalidad del vector también se mejoró añadiendo un segundo marcador de selección, kanamicina/geneticina (G418). Esto permite la co-transfección de dos vectores que expresan diferentes proteínas en una célula. También permite la transformación consecutiva con los marcadores de resistencia a Zeocina y después resistencia a kanamicina (en cualquier orden).

**Tabla A1**  
**Experimento de comparación entre los vectores pHP34s-Híbrido y comerciales para RANKL y HA**

Descripción	Proteína	Selección con antibiótico	Inducir*	Recuento celular	Transitoria (mg/l)	Recuento celular	Estable (mg/l)	Proteína	Recuento celular	Transitoria (mg/l)	Recuento celular	Estable (mg/l)
pHP34s-Híbrido.i	RANKL	Zeocina (1500 ug/ml)	-	2,9/90	5,7	45/95	87	HA	2,8/96	0,4	46/90	57
pHP34s*Híbrido.i	RANKL	Zeocina (1500 ug/ml)	-	3,1/91	6,7	49/96	92	HA	2,5/95	0,5	44/90	54
pHP34s-Híbrido.i	RANKL	Zeocina (1500 ug/ml)	-	3,2/92	7,1	43/95	96	HA	2,9/96	0,6	46/90	55
pHP34s-Híbrido	RANKL	Zeocina (1500 ug/ml)	-	3,4/93	3,6	48/95	74	HA	2,4/95	1,5	45/90	50
pHP34s-Híbrido	RANKL	Zeocina (1500 ug/ml)	-	3,2/93	3,3	53/96	73	HA	2,9/96	1,4	45/90	53
pHP34s-Híbrido	RANKL	Zeocina (1500 ug/ml)	-	3,1/92	5,1	54/96	73	HA	2,7/96	0,7	49/90	51
pAc5.1/V5	RANKL	Higromicina (600 ug/ml)	-	3,3/90	0,9	49/96	3,8	HA	30/96	0,2	43/93	5
pAc5.1/V5	RANKL	Higromicina (600 ug/ml)	-	3,4/91	0,9	45/96	3,8	HA	2,7/96	0,2	43/93	5
pAc5.1A/5	RANKL	Higromicina (600 ug/ml)	-	3,2/91	1	49/96	3,8	HA	2,7/95	0,2	41/95	5
pMT/V5.His.A	RANKL	Higromicina (600 ug/ml)	Sí	3,4/91	0,3	49/92	1,6	HA	2,6/96	0,4	45/92	26
pMT/V5.His.A	RANKL	Higromicina (600 ug/ml)	Sí	3,4/90	0,3	49/93	1,7	HA	2,5/95	0,4	43/93	30
pMT/V5.His.A	RANKL	Higromicina (600 ug/ml)	Sí	3,2/91	0,4	49/92	1,7	HA	2,5/95	0,3	42/92	31

\* Inducir usando CdCl2 \* HA de gripe aviar H5N1 " El recuento celular se muestra como (E6 células/ml) / viabilidad de las células (%)

Tabla A2

Ensayo de la expresión de RANKL en pHP34s-Híbrido que contiene hSAR

Descripción	Proteína	Selección con antibiótico	Recuento celular	Transitoria (mg/l)	Recuento celular	Exp. relativa Nivel
pHP34s-Híbrido.i	RANKL	Zeocina (1500 ug/ml)	2,1E6	4,9	41/93	1,2
pHP34s-Híbrido.i	RANKL	Zeocina (1500 ug/ml)	2,1E6	5,4	40/92	1,2
pHP34s-Híbrido	RANKL	Zeocina (1500 ug/ml)	2,1E6	1,2	45/93	1,0
pHP34s-Híbrido	RANKL	Zeocina (1500 ug/ml)	2,1E6	1,6	48/93	1,0
pHP34s-Híbrido-hSAR-FF	RANKL	Zeocina (1500 ug/ml)	2,1E6	1,4	45/92	1,4
pHP34s-Híbrido-hSAR-FR	RANKL	Zeocina (1500 ug/ml)	2,1E6	1,2	49/92	1,5
pHP34s-Híbrido-hSAR-RF	RANKL	Zeocina (1500 ug/ml)	2,1E6	1,4	51/91	1,3
pHP34s-Híbrido-hSAR-RR	RANKL	Zeocina (1500 ug/ml)	2,1E6	1,1	49/92	1,4

Tabla A3

Promotor	Proteína	Transitoria (nivel de exp. relativa)
Híbrido-central HSP70	RANKL	1,53
Híbrido-central HSP70	RANKL	1,44
Truncado Actina 5C	RANKL	1,07
Truncado Actina 5C	RANKL	1,00

5 LISTA DE SECUENCIAS:

SEC ID N° 1: pHP 16. Promotor de longitud completa de HSP70 (la secuencia en negrita corresponde a la SEC ID N° 2)

CTAGAATCCCAAACAAACTGGTTATTGTGGTAGGTCATTTGTTGGCAGAAAGAAAAC**TCGAGAAAT**  
**TTCTCTGGCCGTTATTTCGTTATTCTCTCTTTTCTTTTGGGTCTCTCCCTCTCTGCACTAATGCT**  
**CTCTCACTCTGTACACAGTAAACGGCATACTGCTCTCGTTGGTTCGAGAGAGCGCGCCTCGA**  
**ATGTTTCGCGAAAAGAGCGCCGGAGTATAAATAGAGGCGCTTCGTCTACGGAGCGACAATTCA**  
**ATTCAAACAAGCAAAGTGAACACGTCGCTAAGCGAAAGCTAAGCAAATAAACAAGCGCAGCT**  
**GAACAAGCTAAACAATCTGCAGTAAAGTGCAAGTTAAAGTGAATCAATTAAGTAACCAGCAACC**  
**AAGTAAATCAACTGCAACTACTGAAATCTGCCAAGAAGTAATTATTGAATACAAGAAGAGAACTCTGAA**  
**TA**

10 SEC ID N° 2: pHP12 Promotor truncado de HSP70 (la secuencia en negrita corresponde al PROMOTOR CENTRAL DE HSP70 (SEC ID N° 37)

CTCGAGAAATTTCTCTGGCCGTTATTTCGTTATTCTCTCTTTTCTTTTGGGTCTCTCCCTCTCTGCACTA  
 ATGCTCTCTCACTCTGTACACAGTAAACGGCATACTGCTCTCGTTGGTTCGAGAGAGCGCGCCTCGA  
 ATGTTTCGCGAAAAGAGCGCCGGAGTATAAATAGAGGCGCTTCGTCTACGGAGCGACAATTCAA  
**TTCAAACAAGCAAAGTGAACACGTCGCTAAGCGAAAGCTAAGCAAATAAACAAGCGCAGCTGAA**  
**CAAGCTAAACAATCTGCAG**

SEC ID N° 3: pHP11b promotor mutante de Actina5C de Nhel-HindIII

GCTAGCTAAAAAATCATGAATGGCATCAACTCTGAATCAAATCTTTGCAGATGCACCTACTTCTCAT  
 TTCCACTGTACATCATTTCAGATCTCGCTGCCTGTTATGTGGCCACAAACCAAGACACGTTTTA  
 TGGCCATTAAAGCTGGCTGATCGTCGCCAAACACCAAATACATAATGAATATGTACACATTCGAGAAA  
 GAAGCGATCAAAGAAGCGTCTTCGGGCGGAGTAGGAGAATGCGGAGGAGAAGGAGAACGAGCTGAT  
 CTAGTATCTCTCCACAATCCAATGCCAACTGACCAACTGGCCATATTCGGAGCAATTTGAAGCCAATTT  
 CCATCGCCTGGCGATCGCTCCATTCTTGGCTATATGTTTTACCGTTACCGGGGCCATTTTCAAAGA  
 CTCGTCGGCAAGATAAGATTGTGTCACTCGCTGTCTCTTTCATTTGTCGAAGAATGCTGAGGAATTC  
 GCGATGACGTCGGCGAGTATTTGAAGAATGAGAATAATTTGATTTATACGAAAATCAGTTAGTGGA  
 ATTTTCTACAAAACATGTTATCTATAGATAATTTGTTGCAAATATGTTGACTATGACAAAGATTGTA  
 TGTATATACCTTAATGTATTCTCATTTCCTATGTATTTATAATGGCAATGATGATACTGATGATTTTT  
 AAGATGATGCCAGACCAAAGGCTTGAATTTCTGCGTCTTTGCCGAACGCAGTGCATGTGCAATTGT  
 TGTTTTTGGAAATATTCAATTTTCGGACTGTCCGCTTTGATTTGAGTTTCTTGGCTTATCAAAGCAA  
 AGTAAAGCCAAAAAGCGAGATGGCAATACCAAATGCGGCCAAAACGGTAGTGGAAAGGAAAGGGGTG  
 CGGGCAGCGGAAGGAAGGGTGGGGCGGGGCTGGCGGGTCTGTGGCTGGGCGGACGTCACC  
 GACGTTGGAGCCACTCTTTGACCATGTGTGCGTGTGTATTATTCTGCTCGCCACTCGCCGTT  
 GTTTTTTCTTTTTATGCTGCGTCTCTAGCGCCATCTCGCTTACGCATGCTCAACGCACCGCATGT  
 TGCCGTTCTTTATGCGTCAATTTGGCTCGAAATAGGCAATTTAAACAAGATTAGTCAACGAA  
 AACGCTAAAATAAATAAGTCTACAATATGGTTACTTATTGCCATGTGTGTGCAGCCAACGATAGCAACA  
 AAAGCAACAACACAGGTGGCTTTCCCTCTTTCATTTTTGTTTGAAGCCGCGTGCAGCAAGACGGC  
 ACGACCGGCAAACGCAATTACGCTGACAAAGAGCAGACGAAGTTTTGGCGAAAACATCAAGGCGCC  
 TGATACGAATGCATTTGCAATAACAATTGCGATATTTAATATTGTTTATGAAGCTGTTGACTTCAAAC  
 ACACAAAAAATAAAACAAATTTTGAAGAGAATTAGGAATCGGACGCTTATCGTTAGGGTAA  
 CAACAAGAAATGCTTACTGAGTCACAGCCTCTGGAAAACGCGCAAGCCAGAGAGAGAGAAAAA  
 GAGGGAGAGCAGCTTAGACCGCATGTGCTTGTGTGTGAGGCGTCTCTCTCTCGTCTCTGTTGCGCAA  
 ACGCATAGACTGCACTGAAAAATCGATTACCTATTTTTATGAATGAATATTTGCACTATTACTATTCA  
 AAATTAAGATAGCAATCACATTCAATAGCCAAATACTATACCACCTGAGCGATGCAACGAAATGAT  
 CAATTTGAGCAAAAATGCTGCATATTTAGGACGGCATCATTATAGAAATGCTTCTTGTGTACTTTT  
 CTCGCTGTCGAGCTGTTTCGCGTTATTGTTAAAACCGGCTTAAGTTAGGTGTGTTTTCTACGACTA  
 GTGAATGCCCTACTAGAAGATGTGTGTTGCACAAAATGTCCCTGGAATAACCAATTTGAAGTGCAGAT  
 AGCAGTAAACGTAAGCTAATATGAATATATTTAACTGTAATGTTTTAATATCGCTGGACATTACTAATA  
 AACCCACTATAAACACATGTACATATGTATGTTTTGGCATACAATGAGTAGTTGGGGAAAAAATGTGTA  
 AAAGCACCGTGACCATCACAGCATAAAGATAACCAGCTGAAGTATCGAATATGAGTAACCCCAAATT  
 GAATCACATGCCGCAACTGATAGGACCCATGGAAGTACACTCTTCATGGCGATATACAAGACACACAC  
 AAGCACGAACCCAGTTGCGGAGGAAATTCCTCGTAAATGAAAACCCAATCGGCGAACAAATTCATAC  
 CCATATATGGTAAAAGTTTTGAACGCGACTTGAGAGCGGAGAGCATTGCGGCTGATAAGGTTTTAGCG

CTAAGCGGGCTTTATAAAACGGGCTGCGGGACCAGTTTTCATATCACTACCGTTTGAGTTCTTGTGCT  
 GTGTGGATACTCTCCCGACACAAAGCCGCTCCATCAGCCAGCAGTCGTCTAATCCAGAGACAAGCTT

SEC ID N° 4: p805 promotor de Actina5C (Secuencia de pAc5.1 invitrogen)

GATACTTCTAAAAAAATCATGAATGGCATCAACTCTGAATCAAATCTTTGCAGATGCACCTACTTCTC  
 ATTTCCACTGTACATCATTTTTCCAGATCTCGCTGCCTGTTATGTGGCCACAAAACCAAGACACGTTT  
 TATGGCCATTAAGCTGGCTGATCGTCGCCAAACACCAAATACATATCAATATGTACATTCGAGAAAGA  
 AGCGATCAAAGAAGCGTCTTCGGGCGAGTAGGAGAATGCGGAGGAGAAGGAGAACGAGCTGATCTA  
 GTATCTCTCCACAATCCAATGCCAACTGACCAACTGGCCATATTCGGAGCAATTTGAAGCCAATTTCCA  
 TCGCTGGCGATCGCTCCATTCTTGGCTATATGTTTTTACCCTTCCCGGGGCCATTTTCAAAGACTCG  
 TCGGTAAGATAAGATTGTGTCACTCGCTGTCTCTCTTCAATTTGTGGAAGAATGCTGAGGAATTTGCGA  
 TGACGTGCGCGAGTATTTTGAAGAATGAGAATAAATTTGATTTATACGAAAATCAGTTAGTGAATTTT  
 CTACAAAAACATGTTATCTATAGATAATTTTGTGCAAAATATGTTGACTATGACAAAAGATTGTATGTAT  
 ATACCTTTAATGTATTCTCATTTTCTTATGTATTTATAATGGCAATGATGATACTGATGATATTTAAGAT  
 GATGCCAGACCACAGGCTGATTTCTGCGTCTTTTGCCGAACGCAGTGCATGTGCGGTTGTTGTTTTT  
 GGAATAGTTTCAATTTTCGGACTGTCCGCTTTGATTTCAAGTTTCTTGGCTTATTCAAAAAGCAAAGTAA  
 AGCCAAAAAAGCGAGATGGCAATACCAATGCGGCAAAACGGTAGTGGAAAGGAAAGGGGTGCGGGG  
 CAGCGGAAGGAAGGGTGGGGCGGGGCGTGGCGGGGTCTGTGGCTGGGCGCGACGTCACCGACGTT  
 GGAGCCACTCCTTTGACCATGTGTGCGTGTGTGATTTTCGTGTCTCGCCACTCGCCGTTGTTTTT  
 TCTTTTTATCTCGCTCTCTAGCGCCATCTCGTACGCATGCTCAACGCAACCGCATGTTGCCGTGTCT  
 TTATGCGTCAATTTGGCTCGAAATAGGCAATTTTAAACAAGATTAGTCAACGAAAACGCTAAAATA  
 AATAAGTCTACAATATGGTTACTTATTGCCATGTGTGTGCGAGCAACGATAGCAACAAAAGCAACAACA  
 CAGTGGCTTTCCCTCTTTCACTTTTTGTTCGAAGCGCGTGCAGCAAGACGGCACGACCGGCAACG  
 CAATTACGTGACAAAGAGCAGACGAAGTTTTGCGCAAAAACATCAAGGCGCCTGATACGAATGCAT  
 TTGCAATAACAATTGCGATATTTAATATTGTTTATGAAGCTGTTGACTTCAAAAACACAAAAA  
 AAAAAACAATTTTGAAGAGAAATTAGGAATCGGACAGCTTATCGTTACGGGCTAACAGCACACCG  
 AGACGAAATAGCTTACCTGACGTACAGCCTCTGGAAGAAGTCCCGCCAAGCAGAGAGAGAGAGAAA  
 AAGAGGGAGAGCAGCTTAGACCGCATGTGCTTGTGTGTGAGGCGTCTCTCTCTCGTCTCCTGTTTGC  
 GCAACGCATAGACTGCACTGAGAAAATCGATTACCTATTTTTATGAATGAATATTTGCACTATTACTA  
 TTCAAAACTATTAAGATAGCAATCACATTCATAGCCAAATACTATACCACCTGAGCGATGCAACGAAA  
 TGATCAATTTGAGCAAAAATGCTGCATATTTAGGACGGCATCATTATAGAAATGCTTCTTGTGTGTAC  
 TTTTCTCTCGTCTGGCAGCTGTTTCGCCGTTATTGTTAAAACCGGCTAAGTTAGGTGTGTTTTCTACG  
 ACTAGTGATGCCCCACTAGAAAGATGTGTGTTGCACAAATGTCCCTGAATAACCAATTTGAAGTGCAG  
 ATAGCAGTAAACGTAAGCTAATATGAATATTTAACTGTAATGTTTTAATATCGCTGGACATTACTAA  
 TAAACCCACTATAAACACATGTACATATGTATGTTTTGGCATACAATGAGTAGTTGGGGAAAAAATGT  
 TAAAGCACCGTGAACATCACAGCATAAAGATAACCAGTGAAGTATCGAATAGAGTAAACCCCAAA  
 TTGAATCACATGCCCAACTGATAGGACCCATGGAAGTACACTTTCATGGCGATATAACAAGACAC  
 ACAAGCACGAACCCAGTTGCGGAGGAAATTTCCGTAATGAAAACCCAATCGGCGAACAAATTCAT  
 ACCCATATATGGTAAAAGTTTTGAACGCGACTTGAGAGCGGAGAGCATTGCGGCTGATAAGGTTTTAG  
 CGCTAAGCGGGCTTTATAAAACGGGCTGCGGGACCAGTTTTCATATCACTACCGTTTGAGTTCTTGTG  
 CTGTGTGGATACTCCTCCGACACAAAGCCGCTCCATCAGCCAGCAGTCTCTAATCCAGAGACCCCG  
 GAT

SEC ID N° 5: pHP17 Truncado Actina5C\_2, 1469 nt

GCATGCTCAACGCAACCGCATGTTGCCGTGTCTTTATGCGTCAATTTGGCTCGAAATAGGCAATTTT  
 AAACAAGATTAGTCAACGAAAACGCTAAAATAAATAAGTCTACAATATGGTTACTTATTGCCATGTGT  
 GTGCAGCCAACGATAGCAACAAAAGCAACAACACAGTGGCTTTCCCTCTTTCATTTTTGTTGCAAGC  
 GCGTGCAGCAAGACGGCACGACCGGCAAAACGCAATTCGCTGACAAAGAGCAGACGAAGTTTTGGC  
 CGAAAAACATCAAGGCGCCTGATACGAATGCATTTGCAATAACAATTCGATATTTAATATTGTTTATG  
 AAGCTGTTTGAATTTCAAAAACACAAAAAATAAAAACAATTTTGAAGAGAAATTAGGAATCG  
 GACAGCTTATCGTTACGGGCTAACAGCACACCGGAGACGAAATAGCTTACCTGACGTACAGCCTCTGG  
 AAGAACTGCCGCAAGCAGAGAGAGAGAGAAAAAGAGGGAGAGCAGCTTAGACCGCATGTGCTTGT  
 GTGTGAGGCGTCTCTCTCTTTCGTCTCCTGTTTGGCAGCAACGCATAGACTGCACTGAGAAAATCGATTA  
 CCTATTTTTATGAATGAATATTTGCACTATTACTATTTCAAACTATTAAGATAGCAATCACATTCATAG  
 CCAATACTATACCACCTGAGCGATGCAACGAAATGATCAATTTGAGCAAAAATGCTGCATATTTAGGA  
 CGGCATCATTATAGAAATGCTTCTTGTGTGTACTTTTCTCTCGTCTGGCAGCTGTTTCGCCGTTATTG  
 TAAAACCGGCTAAGTTAGGTGTGTTTTCTACGACTAGTGATGCCCCACTAGAAAGATGTGTGTTGCA  
 CAAATGTCCTGAATAACCAATTTGAAGTGCAGATAGCAGTAAACGTAAGCTAATATGAATATTTA

ACTGTAATGTTTTAATATCGCTGGACACTTAATAAACCCACTATAAACACATGTACATATGTATGTTT  
 TGGCATAACAATGAGTAGTTGGGGAAAAAATGTGTAAAGCACCCGTGACCATCACAGCATAAAGATAAC  
 CAGCTGAAGTATCGAATATGAGTAACCCCCAAATTGAATCACATGCCGCAACTGATAGGAACCCATGGA  
 AGTACACTCTTCATGGCGATATACAAGACACACACAAGCACGAACACCCAGTTGCGGAGGAAAATTCTC  
 CGTAAATGAAAACCCAATCGGCGAACAATTCATACCCATATATGGTAAAAGTTTTGAACGCGACTTGA  
 GAGCGGAGAGCATTGCGGCTGATAAGGTTTTAGCGCTAAGCGGGCTTTATAAACGGGCTGCGGGAC  
 CAGTTTTCATATCACTACCGTTTTGAGTCTTGTGCTGTGTGGATACTCCTCCCGACACAAAGCCGCTCC  
 ATCAGCCAGCAGTCGTCTAATCCAGAGAC

SEC ID N° 6: pHP18 Truncado Actina5C\_3, 612 nt

CTAGTGAATGCCOCTACTAGAAGATGTGTGTTGCACAAAATGTCCOCTGGAATAACCAATTTGAAGTGCA  
 GATAGCAGTAAACGTAAGCTAATATGAATATTTAACTGTAATGTTTTAATATCGCTGGACACTTA  
 AATAACCCACTATAAACACATGTACATATGTATGTTTTGGCATAACAATGAGTAGTTGGGGAAAAAATGT  
 GTAAAAGCACCCGTGACCATCACAGCATAAAGATAACCAGCTGAAGTATCGAATATGAGTAACCCCCAA  
 ATTGAATCACATGCCGCAACTGATAGGACCCATGGAAGTACACTCTTCATGGCGATATACAAGACACA  
 CACAAGCACGAACACCCAGTTGCGGAGGAAAATTCTCGTAAATGAAAACCCAATCGGCGAACAATTCA  
 TACCCATATATGGTAAAAGTTTTGAACGCGACTTGAAGAGCGGAGAGCATTGCGGCTGATAAGGTTTTA  
 GCGCTAAGCGGGCTTTATAAACGGGCTGCGGGACCGTTTTCATATCACTACCGTTTTGAGTCTTGT  
 GCTGTGTGGATACTCCTCCCGACACAAAGCCGCTCCATCAGCCAGCAGTCGTCTAATCCAGAGAC

SEC ID N° 7: pOPIE2

GTCATGATGATAAACAATGTATGGTGCTAATGTTGCTTCAACAACAATTCTGTTGAACTGTGTTTTCAT  
 GTTTGCCAAACAAGCACCTTTATACTCGGTGGCCTCCCCACCACCAACTTTTTTGCACTGCAAAAAACA  
 CGCTTTTGCAACGCGGGCCCATACATAGTACAACTCTACGTTTCGTAGACTATTTACATAAATAGTCT  
 ACACCGTTGTATACGCTCCAAATACACTACCACACATTTGAACCTTTTTGCAGTGCAAAAAAGTACGTGT  
 CGGCAGTACGTAGGCCCGCCTTATCGGGTCGCGTCTGTCAAGTACGAATCACATTATCGGACCGG  
 ACGAGTGTGCTTATCGTGACAGGACGCCAGCTTCTGTGTTGCTAACCAGCGCCGACGCAACTCC  
 TTATCGGAACAGGACGCGCCTCCATATCAGCCGCGCGTTATCTCATGCGCGTGACCGGACACGAGGC  
 GCCCGTCCCGCTTATCGCGCCTATAAATACAGCCCGCAACGATCTGGTAAACACAGTTGAACAGCATC  
 TGTT

5

SEC ID N° 8: Aislante Gypsy de (Pubmed: gi|12237306:1188-1574 vector de transformación de GFP Stinger)

TCACGTAATAAGTGTGCGTTGAATTTATTCGCAAAAAACATTGCATATTTTCGGCAAAGTAAAATTTTGT  
 GCATACCTTATCAAAAAATAAGTGTGCATACTTTTTAGAGAAACCAAATAATTTTTTATTGCATACCCG  
 TTTTAATAAAAATACATTGCATACCCCTTTTTAATAAAAAAATTGCATACTTTGACGAAACAAATTTTCG  
 TTGCATACCCAATAAAAAGATTATTATATTGCATACCCGTTTTTAATAAAAATACATTGCATACCCCTTTTTA  
 AAAAAAATATTGCATACGTTGACGAAACAAATTTTCGTTGCATACCCAATAAAAAGATTATTATATTGCA  
 TACCTTTTCTTGCCATACCATTTAGCCGATCAATT

Lista de cebadores

Nombre	Secuencia de oligo	SEC ID N°
2007	CGCTCAGTGAACGAAAACCTCAG	9
4003	AAGGGATTTTGGTCATGAACAATAAACTGTCTGCTTACATAAACAGTA ATACAAGGGGTGTTTCATAGTATAATACGACTCACTATAGGAGGGCCAC CATGGCCAAGTTGAC	10
4004	GCAGACAGTTTTATTGTTTCATGACCAAAATCCCTTGCAGAGATCCGAAT TAATTCG	11
4009	CACCCAGGCCAGGGTGTGTCCGGC	12
4032	GTTTTATTGTTTCATGACCAAAATCCC	13
4035	GCGCCTCGAATGTTTCGCGAACTTAAGAGCGCCGGAGTATAAATAG	14
4036	CTATTTATACTCCGGCGCTCTTAAGTTCGCGAACATTGAGGCGC	15
4037	GTAAAAGTTTTGAACGCGACTTAAGGAGAGCGGAGAGCATTGCGG	16
4038	CCGCAATGCTCTCCGCTCTCC1TAAGTCGCGTTCAAACTTTTAC	17

590	TTCACTGCATTCTAGTTGTGG	18
917	CTAAGATTTAGTCAGATATCG	19
975	CATCAATGTATCTTATCATGTCTGCTAGCGGATCATGATGATAAACAAT GT	20
976	ACATTGTTTATCATCATGATCCGCTAGCAGACATGATAAGATAACATTGA TG	21
979	TCTGCTAGCTAAAAAATCATGAATGGC	22
980	CCAAGCTTGTCTCTGGATTAGACGACTG	23
981	TGCTAGCCTCGAGAAATTTCTCTGGC	24
982	CCAAGCTTCTGCAGATTGTTTAGCTTG	25
986	AGAATTCAGCTGAGCTCGAGGGTACCAAGC	26
987	GGTTTGTCCAACTCATCAATGTAT	27
990	TTATTGCCATGTGTGTGCAG	28
992	CGATGCAACGAAATGATCAA	29
993	GGCTGATAAGGTTTTAGCGCTA	30
994	CAAATTATTTGAAAGAGAATTAG	31
995	GTTTAATATCGCTGGACATTAC	32

**SEC ID N° 33: secuencia del promotor de actina pAC5.1 (2516 pb):**

TAAAAAATCATGAATGGCATCAACTCTGAATCAAATCTTTGCAGATGCACCTACTTCTCATTCCACT  
 GTCACATCATTTTTCCAGATCTCGCTGCCTGTTATGTGGCCCAAAACCAAGACACGTTTTATGGCCAT  
 TAAAGCTGGCTGATCGTCGCCAAACACCAAATACATATCAATATGTACATTCGAGAAAGAAGCGATCA  
 AAGAAGCGTCTTCGGGCGAGTAGGAGAATGCGGAGGAGAAGGAGAACGAGCTGATCTAGTATCTCTC  
 CACAATCCAATGCCAACTGACCAACTGGCCATATTCGGAGCAATTTGAAGCCAATTTCCATCGCCTGG  
 CGATCGCTCCATTCTTGGCTATATGTTTTTACCGTTACCCGGGGCCATTTTCAAAGACTCGTCGGCAA  
 GATAAGATTGTGTCACCTCGCTGTCTCTCTTCAATTTGTGGAAGAAATGCTGAGGAATTTTCGCGATGACGTC  
 GCGAGTATTTTGAAGAATGAGAATAATTTGTATTTATACGAAAATCAGTTAGTGGAATTTTCTACAAA  
 AACATGTTATCTATAGATAATTTTGTGCAAAATATGTTGACTATGACAAAGATTGTATGTATATACCTT  
 TAATGTATTCTCATTCTTATGTATTTATAATGGCAATGATGATACTGATGATATTTAAGATGATGCC  
 AGACCAAAAGGCTTGAATTTCTGCGTCTTTGCGCAACGCAGTGCATGTGCAATTTGTTGTTTTGGAA  
 TATTCAATTTTCGGACTGTCCGCTTTGATTTTCAATTTCTTGGCTTATTCAAAAAGCAAAGTAAAGCCAAA  
 AAAGCGAGATGGCAATACCAAATGCGGCAAAACGGTAGTGGAAAGGAAAGGGGTGCGGGGCAGCGGA  
 AGGAAGGGTGGGGCGGGCGTGGCGGGGTCTGTGGCTGGGCGCGACGTCACCGACGTTGGAGCCA  
 CTCTTTGACCATGTGTGCGTGTGTGATTTATCGTGTCTCGCCACTCGCCGTTGTTTTTCTTTTA  
 TGCTGCGCTCTCTAGCGCCATCTCGCTTACGCATGCTCAACGCACCGCATGTTGCCGTTTCTTTTA  
 TGCGTCATTTGGCTCGAAATAGGCAATTTTAAACAAAGATTAGTCAACGAAAACGCTAAAATAAAT  
 AAGTCTACAATATGGTTACTTATTGCCATGTGTGTGCGAGCCAAACGATAGCAACAAAAGCAACAACACA  
 GGTGGCTTTCCCTCTTCACTTTTTGTTTGAAGCCGCGTGCAGCAAGACGGCACGACCGGCAACCG  
 CAATTACGCTGACAAAGAGCAGACGAAGTTTTGGCGAAAAACATCAAGGCGCCTGATACGAATGCATT  
 TGCAATAACAATTGCGATATTTAATATTGTTTATGAAGCTGTTGACTTCAAAACACACAAAAA  
 TAAAACAAATTTTGAAGAGAATTAGGAATCGGACGCTTATCGTTAGGGTAACAACAAGAAATGCTT  
 ACTGAGTCACAGCCTCTGGAAAACGCGCAAGCCAGAGAGAGAGAGAAAAAGAGGGAGAGCAGCT  
 TAGACCGCATGTGCTTGTGTGTGAGGCGTCTCTCTCTCTGTTGCGCAACGCATAGACTGCA  
 CTGAAAAATCGATTACCTATTTTTATGAATGAATATTTGCACTATTACTATTCAAACCTATTAAGATA  
 GCAATCACATTCAATAGCCAAATACTATACCACCTGAGCGATGCAACGAAATGATCAATTTGAGCAAAA  
 ATGCTGCATATTTAGGACGGCATCATTATAGAAATGCTTCTGCTGTGACTTTTCTCTCGTCTGGCAG  
 CTGTTTCGGCTTATTGTTAAAACCGGCTAAGTTAGGTGTGTTTTCTACGACTAGTGAATGCCCTACT

AGAAGATGTGTGTTGCACAAAATGTCCCTGGAATAACCAATTTGAAGTGCAGATAGCAGTAAACGTAA  
 GCTAATATGAATATTATTTAACTGTAATGTTTTAATATCGCTGGACATTAATAAAACCCACTATAAAC  
 ACATGTACATATGTATGTTTTGGCATACAATGAGTAGTTGGGGAAAAAATGTGTAAAAGCACCGTGAC  
 CATCACAGCATAAAGATAACCGACTGAAGTATCGAATATGAGTAACCCCAAATTGAATCACATGCCG  
 CAACTGATAGGACCCATGGAAGTAACTCTTCATGGCGATATACAAGACACACACAAGCACGAACACC  
 CAGTTGCGGAGGAAATTCCTCGTAAATGAAAACCCAATCGGCGAACAATTCATACCCATATATGGTAA  
 AAGTTTTGAACGCGACTTGAGAGCGGAGAGCATTGCGGCTGATAAGGTTTTAGCGCTAAGCGGGCTT  
 TATAAAACGGGCTGCGGGACCAGTTTTCATATCACTACCGTTTGAGTTCTTGTGCTGTGTGGATACTCC  
 TCCCGACACAAAGCCGCTCCATCAGCCAGCAGTCGTCTAATCCAGAGAC

SEC ID N° 34: vector pHP15c\_su(hw):

CATAGTATAATACGACTCACTATAGGAGGGCCACCATGGCCAAGTTGACCAGTGCCGTTCCGGTGCTC  
 ACCGCGCGCGACGTGCGCCGGAGCGGTGAGTTCTGGACCCGACCCGGCTCGGGTTCTCCCGGGACTTC  
 GTGGAGGACGACTTCGCCGGTGTGGTCCGGGACGACGTGACCCTGTTTCATCAGCGCGGTCCAGGAC  
 CAGGTGGTGCCGGACAACACCCTGGCCTGGGTGTGGGTGCGCGGCCTGGACGAGCTGTACGCCGAG  
 TGGTCCGGAGGTCGTGTCCACGAACTTCGGGGACGCTCCGGGGCCGGCCATGACCCGAGATCGGGGAG  
 CAGCCGTGGGGGCGGGAGTTCCGCCCTGCGCGACCCGGCCGGCAACTGCGTGCATTCGTGGCCGAG  
 GAGCAGGACTGACCGACGCCGACCAACACCCGCGGTCGGACGGCGGCCACGGGTCCAGGGGGG  
 TCGACTCGAAACTGTTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTTAC  
 AAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTC  
 TGCTAGCTCACGTAATAAGTGTGCGTTGAATTTATTCGCAAAAAACATTGCATATTTTCGGCAAAGTAAA  
 ATTTTGTGCATACCTTATCAAAAAATAAGTGTGCTGCATACTTTTTAGAGAAAACCAAATAATTTTTATTG  
 CATACCCGTTTTTAATAAAATACATTGCATACCCTCTTTTAATAAAAAATATTGCATACTTTGACGAAAC  
 AAATTTTCGTTGCATACCCAATAAAAAGATTATTATATTGCATACCCGTTTTTAATAAAATACATTGCATA  
 CCCTCTTTTAATAAAAAATATTGCATACGTTGACGAAACAAATTTTCGTTGCATACCCAATAAAAAGATTA  
 TTATATTGCATACCTTTTCTTGCCATACCATTAGCCGATCAATTCTCGAGAAATTTCTCTGGCCGTTAT  
 TCGTTATCTCTCTTTTTTTTTGGGTCTCTCCCTCTCTGCACTAATGCTCTCTCACTCTGTCAACAGT  
 AAACGGCATACTGCTCTCGTTGGTTCGAGAGAGCGCGCCTCGAATGTTGCGGAAAAGAGCGCCGGAG  
 TATAAATAGAGGGCGCTTCGTCTACGGAGCGACAATTCATTCAAACAAGCAAAGTGAACACGTCGCTA  
 AGCGAAAAGCTAAGCAAATAAACAAGCGCAGCTGAACAAGCTAAACAATCTGCAGAAGCTTGGTACCCT  
 CGAGCTCAGCTGAATTCCTGGATCCTCTAGACCGGTCATATGCGGCGCGGATCGATCGATATCTGACT  
 AAATCTTAGTTTGTATTGTATGTTTTAATAACAATATGTTTAAATATGTTTTAATAAATTTTATAA  
 AATAATTTCACTTTTTATTGTAACAACATTGTCCATTTACACACTCTTTCAAGCGCGTGGGACTCGATG  
 CTCTCACGTAATAAGTGTGCGTTGAATTTATTCGCAAAAAACATTGCATATTTTCGGCAAAGTAAAATTTT  
 GTTGCATACCTTATCAAAAAATAAGTGTGCTGCATACTTTTTAGAGAAAACCAAATAATTTTTTATTGCATAC  
 CCGTTTTTAATAAAATACATTGCATACCCTCTTTTAATAAAAAATATTGCATACTTTGACGAAACAAATTT  
 TCGTTGCATACCCAATAAAAAGATTATTATATTGCATACCCGTTTTTAATAAAATACATTGCATACCCTCT  
 TTTAATAAAAAATATTGCATACGTTGACGAAACAAATTTTCGTTGCATACCCAATAAAAAGATTATTATAT  
 TGCATACCTTTTCTTGCCATACCATTAGCCGATCAATTACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAG  
 AATCAGGGGATAACGCGAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAA  
 GGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAA  
 GTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGT  
 GCGCTCTCCTGTTCCGACCCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGG  
 CGCTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTGTTCCGTTCCGTTCCCAAGCTGGGCTGT  
 GTGCACGAACCCCGTTTCAAGCCGACCCGCTGCGCTTATCCGTAAGTACTCGTCTTGTAGTCCCAACCC  
 GGTAAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTA  
 GGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTAT  
 CTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCA  
 CCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAA  
 GATCCTTTGATCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGCA  
 TGCGCTAAGCGGGCTTTATAAAACGGGCTGCGGGACCAGTTTTCATATCACTACCGTTTGAGTTCTTG  
 TGCTGTGTGGATACTCCTCCCGACACCGAATTAATTCGGATCTCTGCAAGGGATTTTGGTTCATGAACA  
 ATAAAACTGTCTGCTTACATAAACAGTAATACAAGGGGTGTT

SEC ID N° 35: vector pHP15c:

CATAGTATAATACGACTCACTATAGGAGGGCCACCATGGCCAAGTTGACCAGTGCCGTTCCGGTGCTC

ACCGCGCGGACGTCGCCGGAGCGGTTCGACGTTCTGGACCGACCGGCTCGGGTTCTCCCGGGACTTC  
GTGGAGGACGACTTCGCCGGTGTGGTCCGGGACGACGTTGACCCTGTTTCATCAGCGCGGTCCAGGAC  
CAGGTGGTGGCGGACAACACCCTGGCCTGGGTGTGGGTGCGCGGCTGGACGAGCTGTACGCCGAG  
TGGTCCGAGGTCGTGTCCACGAACCTCCGGGACGCTCCGGGCCCGCATGACCGAGATCGGGCGAG  
CAGCGTGGGGGCGGGAGTTCGCCCTGCGCGACCCGGCCGCAACTGCGTGCACTTCGTGGCCGAG  
GAGCAGGACTGACCGACGCCGACCAACACCGCCGTCCGACGGCGGCCACGGGTCCCAGGGGGG  
TCGACCTCGAACTTGTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTAC  
AAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATSTATCTTATCATGTC  
TGCTAGCCTCGAGAAATTTCTCTGGCCGTTATTCGTTATTCTCTTTTTCTTTTTGGGTCTCTCCCTCTC  
TGCACTAATGCTCTCTCACTCTGTCAACAGTAAACGGCATACTGCTCTCGTTGGTTCGAGAGAGCGC  
GCCTCGAATGTTCCGAAAAGAGCGCCGGAGTATAAATAGAGGGCGCTTCGTTACGGAGCGACAATT  
CAATTCAAACAAGCAAAGTGAACACGTCGCTAAGCGAAAGCTAAGCAAATAACAAGCGCAGCTGAAC  
AAGCTAAACAATGTCAGAAGCTTGGTACCCTGAGCTCAGCTGAATTCGGATCCTCTAGACCCGGTC  
ATATGCGGCCCGGATCGATCGATATCTGACTAAACTTAGTTTGTATTGTCATGTTTTAATACAATAT  
GTTATGTTTAAATATGTTTTAATAAATTTTATAAATAATTTCAACTTTTATTGTAACAACATTGTCCATT  
TACACTCCTTTCAAGCGCGTGGGACTCGATGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAA  
TCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAG  
GCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCTTACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAG  
TCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCTTGGAAAGCTCCCTCGTG  
CGCTCTCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCCGGAAAGCGTGGC  
GCTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTG  
TGCACGAACCCCGGTTACGCCGACCGCTGCCGCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCG  
GTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAG  
GCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATC  
TGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCAC  
CGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAG  
ATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGCAT  
GCGCTAAGCGGGCTTTATAAACGGGCTGCGGGACCGATTTTTCATATCACTACCGTTTGGATTTCTGT  
GCTGTGTGGATACTCCTCCCGACACCGAATTAATTCGGATCTCTGCAAGGGATTTTGGTCATGAACAA  
TAAACTGTCTGCTTACATAAACAGTAATACAAGGGGTGTT

SEC ID N° 36: PROMOTOR CENTRAL DE ACTINA 5C DE PHP10 CORRESPONDIENTE A NT 478 A NT 572 DE LA SEC ID N° 6:

TAGCGCTAAGCGGGCTTTATAAACGGGCTGCGGGACCGATTTTCATATCACTACCGTTTGGATTTCT  
GTGCTGTGTGGATACTCCTCCCGACAC

5 SEC ID N° 37: PROMOTOR CENTRAL DE HSP70

GAGCGCCGGAGTATAAATAGAGGGCGCTTCGTTACGGAGCGACAATTCAATTCAAACAAGCAAAGTG  
AACACGTCGCTAAGCGAAAGCTA

SEC ID N° 38: Secuencia de marca HIS de acuerdo con la invención:  
ATGAAACACCAACCAACATCAACATCAACATCAACATCAA

SEC ID N° 39: Secuencia del elemento de 72 pb con sitios de restricción Xba1 y Not1 (en recuadro)

TGCTCTAGAAATGCTTTGCATACTTCTGCCTGCTGGGGAGCCTGGGGACTTTCCACACCCTAACTGACA  
CACATTCCACAGCTGGTTGCGGGCCGCTTTA

10

SEC ID N° 40: Secuencia PRE de HBV con sitios de restricción Xba1 y Not1 (en recuadro) (SEC ID 40):

TGCTCTAGACGTGGAACTTTGTGGCTCCTCTGCCGATCCATACTGCGGAACTCCTAGCCGCTTGTTT  
 TGCTCGCAGCCGGTCTGGAGCAAAGCTCATCGGAACTGACAATTCTGTCGTCTCTCGCGGAAATATA  
 CATCGTTTCCATGGCTGCTAGGCTGTACTGCCAACTGGATCCTTCGCGGGACGTCCTTTGTTTACGTC  
 CCGTCCGGCGCTGAATCCCGCGGACGACCCCTCGCGGGGCCGCTTGGGACTCTCTCGTCCCTTCTCC  
 GTCTGCCGTTCCAGCCGACCACGGGGCGCACCTCTCTTTACGCGGTCTCCCGTCTGTGCCTTCTCAT

CTGCCGGTCCGTGTGCACTTCGCTTCACCTCTGCACGTTGCATGGAGACCACCGTGAACGCCCATCAG  
 ATCCTGCCCAAGTCTTACATAAGAGGACTCTTGGACTCCAGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGC  
 CTACTTCAAAGACTGTGTGTTTAAAGGACTGGGAGGAGCTGGGGGAGGAGATTAGGTTAAAGGCTTT  
 GTATTAGGAGGCTGTATGCATAAATTGGTCTGCGGCCGCTTTA

Name	Oligo Sequence	SEQ ID NO:
1892	CCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTG	41
2232	GCCACCACTTCAAGAACTCT	42
2233	CACGAGGGAGCTTCCAGGGG	43
2234	GGAAAGAACATGTGAGCAA	44
2235	TTCGCTCCAAGCTGGGCTGT	45
2236	ACAAACCACCGCTGGTAGCG	46
901	GGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTC	47
983	CTGCTAGCCTAGAATCCCAAACAAACT	48
984	CCAAGCTTTATTGAGGTTCTCTTCTTGATTC	49
993	GGCTGATAAGGTTTTAGCGCTA	50
2509	CCCGAGCGAGAGGCCAACAAAGGCCAC	51
4000	GCGAAAGCTAAGCAAATAACAAGCG	52
4001	CCGGGGCATGCCTCGAGAAATTTCTCTGGCCG	53
4002	CCCGGGAATTAATTCGCTGCAGATTGTTAGCTTGTTGAG	54
4007	CCGTTTGAGTTCTTGTGCTGTGTGGATACTCCTCCCGACACCGAATTAA TTCGGATCTCTGCTTGACAATTAATCATCCGGCTCGTATAATGCATAGTA TAATACGACTCACTATAGG	55
4008	CCACACAGCACAAGAACTCAAACGGTAGTGATATGAAAACCTGGTCCCG CAGCCCGTTTTATAAAGCCCGCTTAGCGCATGCAAATCCCTTAACGTG AGTTTTCGTTCC	56
4009	CACCCAGGCCAGGGTGTGTCGGGC	57

**SEC ID N° 58: VECTOR PHP34S (CREADO A PARTIR DE ADN SINTÉTICO):**

AAAGATAACCAGCTGAAGTATCGAATATGAGTAACCCCCAAATTGAATCACATGCCGCAACTGATAGG  
 ACCCATGGAAGTACACTCTTCATGGCGATATACAAGACACACACAAGCACGAACACCCAGTTGCGGAG  
 GAAATTCCTCCGTAAATGAAAACCCAATCGGGCGAACCAATTCATACCCATATATGGTAAAAGTTTTGAACG  
 CGACTTAAGGAGAGCGGAGAGCATTGCGGCTGATAAGGTTTTAGCGCTAAGCGGGCTTTATAAAACG  
 GGCTGCGGGACCAGTTTTCATATCACTACCGTTTGAGTTCTTGCTGTGTGGATACTCCTCCCGACA  
 CAAAGCCGCTCCATCAGCCAGCAGTCGTCTAATCCAGAGACAAGCTTGTAACCTCGAGCTCAGCTGA  
 ATTCTGGATCCTCTAGACCGGTCATATGCGGCCGCGGATCGATCGATATCTGACTAAATCTTAGTTTGT  
 ATTGTCATGTTTTAATAACAATATGTTATGTTTTAAATATGTTTTAATAAATTTTATAAAATAATTTCAACTT  
 TTATTGTAACAACATTGTCCATTTACACACTCCTTTCAAGCGCGTGGGACTCGATGCTCGGCGCCACTC  
 AAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAATGTGAGCAAAAAGC  
 CAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTG  
 ACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCA  
 GGCGTTTTCCCTGGAAGCTCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGTTACCGGATACCTGT  
 CCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTG  
 TAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCCTGCGCCTTAT  
 CCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGT  
 AACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACG  
 GCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTT  
 GGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGAT  
 TACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGA  
 ACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGCATGCGCTAAGCGGGCTTTATAAAACGGGGCTGCGGGACCAG  
 TTTTCATATCACTACCGTTTGAAGTTCTTGCTGTGTGGATACTCCTCCCGACACCGAATTAATTCGGA  
 TCTCTGCAAGGGATTTTGGTCATGAACAATAAAACTGTCTGCTTACATAAACAGTAATACAAGGGGTGT  
 TCATAGTATAATACGACTCACTATAGGAGGGCCACCATGGCCAAGTTGACCAGTGCCGTTCCGGTGTCT  
 CACGCGCGCGACGTCGCGGAGCGGTGAGTTCTGGACCGACCGGCTCGGGTTCAGCCGGGACTT

CGTGGAGGACGACTTCGCGCGGTGTGGTCCGGGACGACGTGACCCTGTTTCATCAGCGCGGTCCAGGA  
 CCAGGTGGTGCCGGACAACACCCTGGCCTGGGTGTGGGTGCGCGGCCTGGACGAGCTGTACGCCGA  
 GTGGTCCGAGGTCGTGTCCACGAACCTCCGGGACGCTCCGGGCGGCCATGACCGAGATCGGCCGA  
 GCAGCCGTGGGGGCGGGAGTTCCGCCCTGCGCGACCCGGCCGCAACTGCGTGCACTTCGTGGCCGA  
 GGAGCAGGACTGACCGACGCCGACCAACACCCTGGTCCGACGGCGGCCACGGGTCCAGGGGG  
 GTCGACCTCGAAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCA  
 CAAATAAAGCATTTTTTCACTGCACTTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGT  
 CTTACGTAATAAGTGTGCGGCTAGCAGTCACTACTAGTGAATGCCCTACTAGAAGATGTGTGTTGC  
 ACAAAATGTCCTTGAATAACCAATTTGAAGTGACAGATAGCAGTAAACGTAAGCTAATATGAATATTAT  
 TAACTGTAATGTTTTAATATCGCTGGACATTAATAAAACCACTATAAACACATGTACATATGTATG  
 TTTTGGCATAACAATGAGTAGTTGGGGAAAAAATGTGTAAAAGCACCGTGACCATCACAGCAT

**SEC ID N° 59: SECUENCIA DE REGIÓN DE UNIÓN A MATRIZ (LLAMADA HSR EN MAPAS DE VECTOR):**

CTAGAATATTCGCTTTATTTTGGAAATTTCTTTATAAATACGGCTGCTTAAGTTAATTATGTTAGAGATA  
 ATCGAAGGTTTTGTTACGCGGATGTTGTCCGCCAGAAAGGCCTATGGAACCTTGACAAGATATTTCTTA  
 AAAATGATTTACATACTAACTTAAAAAAGCTATTTTATTAGATTAATACAGACAATTCATGCAGA  
 TGATTGTTAGTGTTTTTTATTTAAAAATTACGTAAAGTTTGTCAAGACTGTTGTTGTCAACTGTTTACACT  
 GTGAAATAAGTTGAATTTTTCGCTTTAAAGGTAATATGAAGGTTTCTTTGCTTAATTAACGCAATTTT  
 TTTATTCAATATAAACAATATTTTACTTATAAATCAAAAACAAATTAATAATATAACAAGA  
 AAATAAACAACAAATTTCAAGTTTGCACACTTTTGAGTCTATATATAAACGTTAGAAGATCACACAGATT  
 TACATATGTATGTACATATGTACTTATGCATGCAAAAAGCATATGCAAAAACCGTGTCTTTTATGAAAAC  
 AAAGTTAAATAAAGTTAAATACTAAGATATATGATTTTTGAATCTTTTTATTGCAGGAAGGGATATTGA  
 ACTACATACATATACATACATATGTATGTACTTGTACATTTGTAAGCGCGGTATTTACATTTAAAC  
 CAATTAATAATTTGTATAATCTGGGAGCTTTACAGATTTTGGGATGGTTACAACCTCAAAGGGGGCGTGG  
 CAATGTAATAAATACTGTTCTGGTTATAATGTGTACATATCTGTCTCAACTTTCTAAGGCATATGTAT  
 AAATACATACATAATATATGTATATGTATATGTACATACATATGTACATATGTAATATTTAATTTCAAT  
 GAATCTACGGCTATAAAAAAATAGGCTTGCCTCATTGACTGGAGCTATCCGCAATAAGCAACATATGTA  
 CATACATACATACATATGTAAAAAAGTAGCAACTAAATTTCTAATACATTTTCCG

5 **SEC ID N° 60: INTRÓN (LLAMADO INTRN EN MAPAS DE VECTOR) CON SITIOS DE DIGESTIÓN CON SACI Y ECORI (SUBRAYADOS) EN CUALQUIER EXTREMO:**

GAGCTCGTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAAGGAGACCAATAGAAACTGGGCTTGTGAGAC  
AGAGAAGACTCTTGCGTTTCTGATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTCCTTCTCCA  
CAGGAATTC

**SEC ID N° 61: SECUENCIA DE HA (HSN1 MODIFICADA VIETNAM) EN VECTORES (INSERTADA ENTRE  
SITIOS ECORI Y NOTI SUBRAYADOS):**

GAATTCGCCACCATGAAGCTGTGCATCCTGCTGGCCGTGGTGGCCTTCGTGGGCCTGAGCCTGGGCA  
TGAAGCACCACATCAGCACCAGCACCACATCAACACCAGGGTCCAGGTGCCAAGTTCGTGGCCGC  
TTGGACCCTGAAGGCCGCCGCCGATCAGATCTGCATTGGATACCACGCCAACACAGCACCAGCAG  
GTGGACACCATCATGGAGAAGAAGCTGACCGTGACCCACGCCCAGGACATTCTGGAGAAGAAGCACA  
ACGGCAAGCTGTGCGATCTGGATGGCGTGAAGCCCCTGATCCTGCGCGATTGCAGCGTGGCCGGCT  
GGCTGCTGGGCAACCCCATGTGCGATGAGTTCATCAACGTGCCCGAGTGGAGCTACATCGTGGAGAA  
GGCCAACCCCGTGAACGATCTGTGCTACCCCGCGCATTTCAACGATTACGAGGAGCTGAAGCACCTG  
CTGTCCCGCATCAACCACTTCGAGAAGATCCAGATCATCCCAAGAGCAGCTGTGCCAGCCACGAGG  
CTAGCCTGGGCGTGAGCAGCGCCTGCCCGTACCAGGGCAAGTCCAGCTTCTTCCGCAACGTGGTGTG  
GCTGCTCAAGAAGAAGCAGCACCTACCCACCATCAAGCGCAGCTACAACAACACCAACCAGGAGGAT  
CTGCTGGTGTGTGGGGCATCCACCACCCCAACGATGCCCGGAGCAGACCAAGCTGTACCAGAACC  
CCACCACCTACATCAGCGTGGGCACCTCCACCCTGAACCAGCGCCTGGTGCCTCGATTGCCACCCG  
CAGCAAGGTGAACGGCCAGTCGGGCCGCATGGAGTCTTTTGGACCATCCTGAAGCCCAACGACGCC  
ATCAACTTCGAGAGCAACGGCAACTTCATCGCCCCGAGTACGCCTACAAGATCGTGAAGAAGGGCG  
ATAGCACCATCATGAAGAGCGAGCTGGAGTACGGCAACTGCAACACCAAGTGCCAGACCCCATGGG  
CGCCATCAACAGCAGCATGCCCTTCCACAACATCCACCCCTGACCATCGGCGAGTGCCTCAAGTACG  
TGAAGAGCAACCGCCTGGTGTGCTGGCCACCGGCCTGCGCAACAGCCACAGCGCGAGCGCCGCCGCA

AGAAGCGGGCCTGTTCCGGCCATCGCCGGCTTCATCGAGGGCGGCTGGCAGGGCATGGTGGATG  
GCTGGTACGGCTACCACCACTCGAACGAGCAGGGCAGCGGCTACGCCGCCGATAAGGAGTCGACCC  
AGAAGGCCATCGATGGCGTGACCAACAAGGTGAACAGCATCATCGACAAGATGAACACCCAGTTCGA  
GGCCGTGGGCCGCGAGTTCAACAACCTGGAGCGCCGCATCGAGAACCTGAACAAGAAGATGGAGGA  
CGGCTTCTGGATGTGTGGACCTACAACGCCGAGCTGCTGGTGTGCTGATGGAGAACGAGCGCACCCCTG  
GATTTCCACGATAGCAACGTGAAGAACCTGTACGATAAGGTGCGCCTGCAGCTGCGCGATAACGCCA  
AGGAGCTGGGCAACGGCTGCTTCGAGTTTACCACAAGTGCAGACAACGAGTGCATGGAGAGCGTGC  
GCAACGGCACCTACGATTACCCCGAGTACAGCGAGGAGGCCCGCCTGAAGCGCGAGGAGATCAGCT  
CCGGCCGCTGGTGCCACGCGGCAGCCAGGCTCCGGCTACATCCCCGAGGCCCCACGCGATGGCC  
AGGCCTACGTGCGCAAGGATGGCGAGTGGGTGCTGCTGTCCACCTTCTGTAATAAGCGGGCCGC

5 **SEC ID N° 62: CASETE DE EXPRESIÓN DE KANAMICINA/GENETICINA (G418) INSERTADO ENTRE SITIOS  
XMMI Y SALI SUBRAYADOS:**

GAATTAATTCGGATCTCTGCAAGGGATTTTGGTCAATGAACAATAAACTGTCTGCTTACATAAACAGTA  
ATACAAGGGGTGTTTCATAGTATAATACGACTCACTATAGGAGGGCCACCATGAGCCACATCCAGCGCG  
AAACCAGCTGCAGCCGTCCGCGCCTGAACAGCAACATGGATGCCGATCTGTACGGCTACAAATGGGC  
CCGCGATAACGTGGGCCAGAGCGGCGCTACCATCTACCGCCTGTACGGCAAACCCGGATGCCCCGGA  
ACTGTTCTGAAACACGGCAAAGGCAGCGTGGCCAACGATGTGACCGATGAAATGGTGCCTGAAC  
TGGCTGACCGAGTTCATGCCGCTGCCGACCATCAACACTTCATCCGCAACCCCGGATGATGCCTGGCT  
GCTGACCACCGCCATTCCGGGCAAAACCGCCTTCCAGGTGCTGGAAGAATACCCGGATAGCGGGCGAA  
AACATCGTGGATGCCCTGGCCGTGTTCTGCGCCGCTGCACAGCATCCCGGTGTGCAACTGCCCGT  
TCAACAGCGATCGCGTGTCCGCTGGCTCAGGCCAGAGCCGATGAACAACCGGCTGGTGGATGC  
CAGCGATTTTCGATGATGAACGCAACGGCTGGCCGGTGAACAGGTGTGAAAGAGATGCACAAACTG  
CTGCCGTTTCAGCCCGATTCCGTTGGTGAACCGCGATTTCAGCTGGATAAACCCTGATCTTCGATGA  
GGGCAAACCTGATCGGCTGCATCGATGTGGGCCGCGTGGGCATTGCCGATCGCTACCAGGATCTGGCC  
ATCCTGTGAAACTGCCTGGGCGAGTTCAGCCCGAGCCTGCAGAAACGCTGTTCCAGAAGTACGGCA  
TCGATAACCCGGATATGAACAACCTGCAGTTCACCTGATGCTGGATGAGTCTTCTAATAAGTCGAC

**SEC ID N° 63: secuencia pKanR usada de acuerdo con los presentes ejemplos:**

AAGGGATTTTGGTCATGAACAATAAACTGTCTGCTTACATAAACAGTAATACAAGGGGTGTTTCATAGT  
ATAATACGACTCACTATAGGAGGGCC

**cebadores de PCR para construcciones pHP34s:**

GCGAACTTAAGAGCGCCGGAGTATAAATAG (SEC ID N° 64)

CCAAGCTTCTGCAGATTGTTTAGCTTG (SEC ID N° 65)

5 GTTTGTCCAACTCATCAATGTAT (SEC ID N° 66)

TATACTCCGGCGCTCTTAAGTTCGCTCGCGTTCAAACCTTTTACC (SEC ID N° 67)

**SEC ID N° 68: Secuencia de promotor híbrido (con sitios de restricción SpeI (cadena arriba) y HindIII (cadena abajo), ambos subrayados)**

ACTAGTGAATGCCCTACTAGAAGATGTGTGTTGCACAAAATGTCCCTGGAATAACCAATTTGAAGTGC  
AGATAGCAGTAAACGTAAGCTAATATGAATATTATTTAACTGTAATGTTTTAATATCGCTGGACATTACT  
AATAAACCCACTATAAACACATGTACATATGTATGTTTTGGCATAACAATGAGTAGTTGGGGAAAAAATG  
TGTA AAAAGCACCGTGACCATCACAGCATAAAGATAACCAGCTGAAGTATCGAATATGAGTAACCCCA  
AATTGAATCACATGCCGCAACTGATAGGACCCATGGAAGTACACTCTTCATGGCGATATACAAGACAC  
ACACAAGCACGAACACCCAGTTGCGGAGGAAATTCCTCCGTAATGAAAACCCAATCGGCGAACAATTC  
ATACCCATATATGGTAAAAGTTTTGAACGCGAGCGAACTTAAGAGCGCCGGAGTAATAATAGAGGCGC  
TTCGTCTACGGAGCGACAATTCAATTCAACAAGCAAAGTGAACACGTCGCTAAGCGAAAAGCTAAGCA  
AATAAACAAAGCGCAGCTGAACAAGCTAAACAATCTGCAGAAGCTT

10 **SEC ID N° 69: Secuencia pLIC-Ex-His1 (pHP34s-Híbrido con LIC posibilitado para expresión extracelular usando secuencia señal de BIP)**

CCTGTTCACTGACTCCCGCGGATCAAAAATGACGATTGACGGCATTACGTCTAACGATATTTACATGCT

TGGTTATGTTTCTAATTCTTTAACTGGCCCATACAAGCCGCTGAACAAAACCTGGCCTTGTGTTAAAAAT  
 GGATCTTGATCCTAACGATGTAACCTTTACTTACTCACACTTCGCTGTACCTCAAGCGAAAGGAAACAA  
 TGTCGTGATTACAAGCTATATGACAAAACAGAGGATTCTACGCAGACAAAACAATCAACGTTTGGCCTA  
 GCTTCTGCTGAACATCAAAGGCAAGAAAACATCTGTTGTCAAAGACAGCATCCTTGAACAAGGACAA  
 TTAACAGTTAACAAATAAAAAACGAAAAGAAAATGCCGATATCCTATTGGCATTGACGTCAGGTGGCA  
 CACCTGCAGAGAACCTCTACTTCCAATCGCACCATCATCACCACCATGATTACAAGGATGACGACGAT  
 AAGTGAGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGGCGCCGCGGATCGATCGATATCTGACTAA  
 ATCTTAGTTTGTATTGTCATGTTTTAATAACAATATGTTATGTTTAAATATGTTTTAATAAATTTTATAAAA  
 TAATTTCAACTTTTATTGTAACAACATTGTCCATTTACACACTCCTTTCAAGCGCTGGGACTCGATGCT  
 CGGCGCCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGT  
 GAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGGCTGGCGTTTTCATAGGCT  
 CCGCCCCCTGACGAGCATCACAATAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAAACCCGACAGGACTA  
 TAAAGATAACAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTAC  
 CGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATC  
 TCAGTTCGGTGTAGGTGTTCCGCTCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTTACGCCCCAGCCG  
 CTGCGCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAG  
 CAGCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTG  
 GCCTAACTACGGTCACTAGAAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCG  
 GAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGC  
 AAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGA  
 CGCTCAGTGGAAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGCATGCGCTAAGCGGGCTTTATAAAACGGGCT  
 GCGGGACCAGTTTTCATATCACTACCGTTTGAAGTCTTGTGCTGTGTGGATACTCCTCCCGACACCGA  
 ATTAATTCGGATCTCTGCAAGGGATTTTGGTCAATGAACAATAAACTGTCTGCTTACATAAACAGTAAT  
 ACAAGGGGTGTTTATAGTATAATACGACTCACTATAGGAGGGCCACCATGGCCAAGTTGACCAGTGCC  
 GTTCCGGTGTCTACCGCGCGGACGCTCGCCGGAGCGGTGAGTCTGGACCAGCCGGCTCGGGTTC  
 AGCCGGGACTTCGTGGAGGACGACTTCGCCGGTGTGGTCCGGGACGACGTGACCCTGTTTATCAGC  
 GCGGTCCAGGACCAGGTGGTGGCGGACAACACCCTGGCCTGGGTGTGGGTGCGCGGCCTGGACGA  
 GCTGTACGCCGAGTGGTCCGAGGTGCTGTCCACGAACTTCCGGGACGCCTCCGGGCCGCCATGAC  
 CGAGATCGGCGAGCAGCCGTGGGGCGGGAGTTCGCCCTGCGCGACCCCGGCAACTGCTGTC  
 ACTCGTGGCCGAGGAGCAGGACTGACCGGACCGGACCAACACCCGCGGTCCGACGGCGGCCACG  
 GGTCCAGGGGGTTCGACCTCGAAACTTGTATTGTCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGC  
 ATCACAATAATTCACAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATG  
 TATCTTATCATGTCTTACGTAATAAGTGTGCGGCTAGCAGTCAACTACTAGCAGTCAACACTTGGTCT  
 GACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCTTATCCATAGTT  
 GCCTGACTCCCCGCTGCTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAAT  
 GATACCGCGAGAACCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCC  
 GAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAG  
 AGTAAGTAGTTCCCGAGTTAATAGTTTGGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTAC  
 GCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCAATCAGCTCCGGTTCCTCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCC  
 ATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGT  
 GTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTTACTGTGATGCCATCCGTAAGATGCTTTTC  
 TGTGACTGGTGTGACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCC  
 CGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGT  
 TCTTCCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGC  
 ACCCAACTGATCTTACGATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAA  
 ATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATT  
 ATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAAC  
 AAATAGGGGTTCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTACTAGTGAATGCCCTACTAGAAGATGT  
 GTGTTGCACAAAATGTCCCTGGAATAACCAATTTGAAGTGACAGTAGCAGTAAACGTAAGCTAATATG  
 AATATTATTTAACTGTAATGTTTTAATATCGCTGGACATTAATAAAACCCACTATAAACACATGTACA  
 TATGTATGTTTTGGCATACAATGAGTAGTTGGGGAAAAAATGTGTAAGGACCCGTGACCATCACAGC  
 ATAAAGATAACCAGCTGAAGTATCGAATATGAGTAACCCCAAAATTTGAATCAGTCCGCGCACTGATA  
 GGACCCATGGAAGTACACTCTTATGGCGATATACAAGACACACACAAGCACGAACACCCAGTTGGC  
 GAGGAAATTCCTCGTAAATGAAAACCCAACTCGGCAAGCAATTCATACCCATATAGTAAAAGTTTGA  
 ACGGAGCGAACTTAAGAGCGCCGGAGTATAAATAGAGGCGCTTCTGCTACGGAGCGACAATTCAAT  
 TCAAAACAAGCAAAGTGAACACGTCGCTAAGCGAAAGCTAAGCAAATAAAACAAGCGCAGCTGAACAAG  
 CTAACAATCTGCAGAAGCTTGGTACCCTCGAGCTCAGCTGAATTCTGGATCCTCTAGAAATAATTTG  
 TTTAACCTTAAGAAGGAGATATACTCAAATGAAGCTGTGCATACTGCTGGCCGTCGTGGCCTTTGTT

GGCCTCTCGCTCGGGGAAGAGAAAAAGCTAAGCAGGTGTTCACTATTATTTAGTGAAATGAGATATT  
 ATGATATTTTCTGAATTGTGATTA AAAAGGCAACTTTATGCCCATGCAACAGAACTATAAAAAATACA  
 GAGAATGAAAAGAAACAGATAGATTTTTAGTTCTTTAGGCCCGTAGTCTGCAAATCCTTTTATGATTTT  
 CTATCAAACAAAAGAGGAAAATAGACCAGTTGCAATCCAAACGAGAGTCTAATAGAATGAGGTGCGAAA  
 AGTAAATCGCGCGGGTTTGTACTGATAAAGCAGGCCAAGACCTAAAATGTGTAAAGGGCAAAGTGTAT  
 ACTTTGGCGTCACCCCTTACATATTTTAGGTCTTTTTTATTGTGCGTAACTAACTTGCCATCTTCAAAC  
 AGGAGGGCTGGAAGAAGCAGACCCGCTAACACAGTACATAAAAAAGGAGACATGAACGATGAACATCA  
 AAAAGTTTGCAAAACAAGCAACAGTATTAACCTTTACTACCGCACTGCTGGCAGGAGGCGCAACTCAA  
 GCGTTTGCAGAAAGAAACGAACCAAAAGCCATATAAGGAAACATACGGCATTTCCTCATATTACACGCCA  
 TGATATGCTGCAAATCCCTGAACAGCAAAAAATGAAAAATATAAAGTTCTGAGTTTCGATTCGTCCAC  
 AATTA AAAATATCTCTTCTGCAAAAGCCCTGGACGTTTGGGACAGCTGGCCATTACAAAACACTGACG  
 GCACTGTCGCAAACATCACGGCTACCACATCGTCTTTGCATTAGCCGGAGATCCTAAAAATGCGGAT  
 GACACATCGATTTACATGTTCTATCAAAAAGTCGGCGAAACTTCTATTGACAGCTGGAAAAACGCTGG  
 CCGCGTCTTTAAAGACAGCGACAAATTCGATGCAAATGATTCTATCCTAAAAAGACCAAAACACAAGAA  
 GGTCAGGTTGAGCCACATTTACATCTGACGGAAAAATCCGTTTATTCTACACTGATTTCTCCGGTAAAC  
 ATTACGGCAAAACAACACTGACAACTGCACAAGTTAACGTATCAGCATCAGACAGCTCTTTGAACATCA  
 ACGGTGTAGAGGATTATAAATCAATCTTTGACGGTGACGGAAAAACGTATCAAAATGTACAGCAGTTC  
 ATCGATGAAGGCAACTACAGCTCAGGCGACAACCATACGCTGAGAGATCCTCACTACGTAGAAGATAA  
 AGGCCACAAATACTTAGTATTTGAAGCAAAACACTGGAAGTGAAGATGGCTACCAAGGCGAAGAATCTT  
 TATTTAAACAAAGCATACTATGGCAAAAGCACATCATTCTCCGTC AAGAAAGTCAAAAACCTTCTGCAA  
 GCGATAAAAAACGCACGGCTGAGTTAGCAAACGGCGCTCTCGGTATGATTGAGCTAAACGATGATTAC  
 AACTGAAAAAAGTGATGAAACCGCTGATTGCATCTAACACAGTAACAGATGAAATTGAACGCGCGAA  
 CGTCTTTAAAATGAACGGCAAATGGTA

SEC ID N° 70: Secuencia pLIC-His-Int (pHP34s-Híbrido con LIC posibilitado para expresión intracelular):

CTAGCAGTCAACACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGT  
 CTATTTGCTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCGTCTGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACC  
 ATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGAACCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAA  
 ACCAGCCAGCCGGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTAT  
 TAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTG  
 CTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGTTCCCAACGATCA  
 AGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGT  
 CAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCAT  
 GCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGC  
 GCGGACCGAGTTGCTCTTGCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAA  
 AGTGCTCATCATTGGAAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCA  
 GTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACCTGATCTTCAGCATCTTTACTTTACCCAGCGTTTCTGGGT  
 GAGCAAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACT  
 CATACTTCTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTT  
 GAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTACTAG  
 TGAATGCCCTACTAGAAGATGTGTGTTGCACAAAAATGTCCCTGGAATAACCAATTTGAAGTGCAGATA  
 GCAGTAAACGTAAGCTAATATGAATATTTAACTGTAATGTTTTAATATCGCTGGACATTAATAA  
 ACCCACTATAAACACATGTACATATGTATGTTTTGGCATAACAATGAGTAGTTGGGGAAAAAATGTGTAA  
 AAGCACCGTGACCATCACAGCATAAAGATAACCAGCTGAAGTATCGAATATGAGTAACCCCAAATTG  
 AATCACATGCCGCAACTGATAGGACCCATGGAAGTACACTCTTCATGGCGATATACAAGACACACACA  
 AGCACGAACACCCAGTTGCCGGAGGAAATCTCCGTAATGAAAACCAATCGGCGAACCAATTCATACC  
 CATATATGGTAAAAGTTTTGAACGCGAGCGAACTTAAGAGCGCCGGAGTATAAATAGAGGCGCTTCGT  
 CTACGGAGCGACAATTC AATTC AAACAAGCAAAGTGAACACGTCGCTAAGCGAAAGCTAAGCAAAATAA  
 ACAAGCGCAGCTGAACAAGCTAAACAATCTGCAGAAGCTTGGTACCCTCGAGCTCAGCTGAATCTGG  
 ATCCTCTAGAAATAATTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATCAAAATGCACCATCATCATCATTCT  
 TCTGGTGTAGATCTGGGTACCGAGAACCTGTACTTCCAATCCATGGAGACCGACGTCCACATATACCT  
 GCGTTCACTATTATTTAGTGAAATGAGATATTATGATATTTCTGAATTGTGATTA AAAAGGCAACTTT  
 ATGCCCATGCAACAGAACTATAAAAAATACAGAGAATGAAAAGAAACAGATAGATTTTTTAGTTCTTT  
 AGGCCCGTAGTCTGCAAATCCTTTTATGATTTTCTATCAAACAAAAGAGGAAAATAGACCAGTTGCAAT  
 CCAAACGAGAGTCTAATAGAATGAGGTGCAAAAGTAAATCGCGCGGGTTTGTACTGATAAAGCAGG  
 CAAGACCTAAAATGTGTAAAGGGCAAAGTGATACTTTGGCGTCACCCCTTACATATTTAGGTCTTTT

TTTATTGTGCGTAACTAACTTGCCATCTTCAAACAGGAGGGCTGGAAGAAGCAGACCGCTAACACAGT  
 ACATAAAAAAGGAGACATGAACGATGAACATCAAAAAGTTTGCAAAAACAAGCAACAGTATTAACCTTTA  
 CTACCGCACTGCTGGCAGGAGGGCGCAACTCAAGCGTTTGGCGAAAGAAACGAACCAAAGCCATATAA  
 GGAAACATACGGCATTTCATATTTACACGCCATGATATGCTGCAAATCCCTGAACAGCAAAAAAATG  
 AAAAAATAAAGTTTCTGAGTTCGATTCTGCCACAATTAATAATATCTCTTCTGCAAAAGGCCTGGACG  
 TTTGGGACAGCTGGCCATTACAAAACACTGACGGCACTGTGCGAAACTATCACGGCTACCCACATCGTC  
 TTTGCATTAGCCGGAGATCCTAAAAATGCGGATGACACATCGATTTACATGTTCTATCAAAAAGTCGGC  
 GAAACTTCTATTGACAGCTGGAAAAACGCTGGCCGCGTCTTTAAAGACAGCGACAAATTCGATGCAAA  
 TGATTCTATCCTAAAAGACCAAAACACAAGAATGGTCAGGTTTCAGCCACATTTACATCTGACGGAAAAAT  
 CCGTTTATTCTACACTGATTTCTCCGGTAAACATTACGGCAAAACAACACTGACAACTGCACAAGTTAA  
 CGTATCAGCATCAGACAGCTCTTTGAACATCAACGGTGTAGAGGATTATAAATCAATCTTTGACGGTG  
 ACGGAAAAACGATCAAAATGTACAGCAGTTCATCGATGAAGGCCAACTACAGCTCAGGGCACAACCAT  
 ACGCTGAGAGATCCTCACTACGTAGAAGATAAAGGCCACAAATACTTAGTATTTGAAGCAAACACTGG  
 AACTGAAGATGGTACCAAGGCGAAGAATCTTTATTTAACAAAGCATACTATGGCAAAAGCACAATCATT  
 CTCCGTCAAAGAAAGTCAAAAACCTTCTGCAAAGCGATAAAAAACGCACGGCTGAGTTAGCAAACGGCG  
 CTCTCGGTATGATTGAGCTAAACGATGATTACACACTGAAAAAAGTGATGAAACCGCTGATTGCATCTA  
 ACACAGTAACAGATGAAATTGAACGCGCGAACGCTCTTTAAAAATGAACGGCAAATGGTACCTGTTCACT  
 GACTCCCAGGATCAAAAATGACGATTGACGGCATTACGTCTAACGATATTTACATGCTTGGTTATGTT  
 TCTAATTTCTTTAACTGGCCATACAAGCCGCTGAACAAAACCTGGCCTTGTGTTAAAAATGGATCTTGAT  
 CCTAACGATGTAACCTTTACTTACTCACACTTCGCTGTACCTCAAGCGAAAGGAAACAATGTCGTGATT  
 ACAAGCTATATGACAAACAGAGGATTCTACGCAGACAAACAATCAACGTTTGGCCTAGCTTCTGCT  
 GAACATCAAAGGCAAGAAAAATCTGTTGTCAAAGACAGCATCCTTGAACAAGGACAATTAACAGTTA  
 ACAATAAAAAACGCAAAAGAAAAATGCCGATATCCTATTGGCATTGACGGTCTCCAGTAAAGGTGGATA  
 CGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGGCGCCGCGGATCGATCGATATCTGACTAAATCTTA  
 GTTTGTATTGTCATGTTTAATAACAATGTTATGTTTAAATATGTTTTAATAAATTTATAAAAATTTT  
 CAACTTTTATTGTAACAACATTGTCCATTTACACACTCCTTTTCAAGCGCGTGGGACTCGATGCTCGGGC  
 CCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCA  
 AAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCC  
 CCCCTGACGAGCATCAAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAG  
 ATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGAT  
 ACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGT  
 TCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGCTTACGCCGACCGCTGCG  
 CTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCC  
 ACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCTA  
 ACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGAAAA  
 AGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAACACCCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTGTTTGAAGCA  
 GCAGATTACGCGCAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTACGGGGTCTGACGCTC  
 AGTGGAACGAAAACCTACGTTAAGGGATTTTGCATGCGCTAAGCGGGCTTTATAAAACGGGCTGCGG  
 GACCAGTTTTCATATCACTACCGTTTGAGTTCCTGTGCTGTGTGGATACTCCTCCCGACACCGAATTA  
 TTCGGATCTCTGCAAGGGATTTTGGTCATGAACAATAAAACTGTCTGCTTACATAAACAGTAATACAAG  
 GGGTGTTCATAGTATAATACGACTCACTATAGGAGGGCCACCATGGCCAAGTTGACCAGTGCCGTTCC  
 GGTGCTCACCGCGCGGACGTCGCCGGAGCGGTGAGTTCGACCGACCGGCTCGGGTTCAGCCG  
 GGACTTCGTGGAGGACGACTTCGCCGCTGTGGTCCGGGACGACGTGACCTGTTTATCAGCGCGGT  
 CAGGACCAGGTGGTGCAGGACAACACCCCTGGCCTGGGTGTGGGTGCGCGGCCTGGACGAGCTGTAC  
 GCCGAGTGGTCCGAGGTCTGTCCACGAACTTCCGGGACGCTCCGGGCCCGCCATGACCGAGATC  
 GGCAGGAGCAGCCGTGGGGCGGGAGTTCGCCCTGCGCGACCCCGCCGCAACTGCGTGCATTCGTC  
 GCCGAGGAGCAGGACTGACCGACCCGACCAACACCCGCTCCGACGGCGGCCACGGGTCCAG  
 GGGGTCGACCTCGAAAACCTTGTATTGACGETTATAATGGTTTACAAATAAAGCAATAGCATCAAAAT  
 TTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATC  
 ATGTCTTACGTAATAAGTGTGCGGCTAGCAGTCAA

SEC ID N° 71: Secuencia pLIC-His-Ex (pHP34s-Híbrido con LIC posibilitado para expresión extracelular)

CTAGCAGTCAACACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGT  
 CTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACC  
 ATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGGAGAAACCGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAA  
 ACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTAT

TAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTGCGCAACGTTGTTGCCATTG  
 CTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCTCAACGATCA  
 AGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGT  
 CAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATCTCTTACTGTATC  
 GCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAAGTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGC  
 GGCAGCCGAGTTGCTCTTGGCCGCGTCAATACGGGATAATACCGGCCACATAGCAGAACTTTAAA  
 AGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCCTGTTGAGATCCA  
 GTTCGATGTAACCCACTCGTGACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTACCAGCGTTTCTGGGT  
 GAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACT  
 CATACTCTTCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTT  
 GAATGATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTACTAG  
 TGAATGCCCTACTAGAAGATGTGTGTTGCACAAAATGTCCCTGGAATAACCAATTTGAAGTGCAGATA  
 GCAGTAAACGTAAGCTAATATGAATATTTAACTGTAATGTTTTAATATCGCTGGACATTAATAAA  
 ACCCACTATAAACACATGTACATATGTATGTTTTGGCATACAATGAGTAGTTGGGGAAAAAATGTGTAA  
 AAGCACCGTGACCATCACAGCATAAAGATAACCAGCTGAAGTATCGAATATGAGTAACCCCCAAATTG  
 AATCAGATGCCGCAACTGATAGGACCCATGGAAGTACACTCTTCATGGCGATATACAAGACACACACA  
 AGCACGAACACCCAGTTGCGGAGGAAATCTCCGTAATGAAAACCAATCGGCGAACCAATTCATACC  
 CATATATGGTAAAAGTTTTGAACGCGAGCGAECTAAGAGCGCCGGAGTATAAATAGAGGCGCTTCGT  
 CTACGGAGCGACAATCAATTCAAAACAGCAAAGTGAACACGTCGCTAAGCGAAAGCTAAGCAAATAA  
 ACAAGCGCAGCTGAACAAGCTAAACAATCTGCAGAAGCTTGTACCCTCGAGCTCAGCTGAATTTCTGG  
 ATCCTCTAGAAATAATTTTGTAACTTTAAGAAGGAGATACAAAATGAAGCTGTGCATACTGCTGGC  
 CGTCGTGGCCTTTGTTGGCCTCTCGCTCGGGCACCATCATCATCATCATTCTTCTGGTGTAGATCTGG  
 GTACCGAGAACCTGTACTTCCAATCCATGGAGACCGACGTCCACATATACCTGCCGTTCACTATTATTT  
 AGTGAAATGAGATATTATGATATTTCTGAATTGTGATTA AAAAGGCAACTTTATGCCCATGCAACAGA  
 AACTATAAAAAATACAGAGAATGAAAAGAAACAGATAGATTTTTAGTTCITTAGGCCCTGAGTCTGCA  
 AATCCTTTTATGATTTTCTATCAAAACAAAAGAGGAAAATAGACCAGTTGCAATCCAAACGAGAGTCTAA  
 TAGAATGAGGTGCAAAAGTAAATCGCGCGGTTTTGTTACTGATAAAGCAGGCAAGACCTAAAATGTGT  
 AAAGGGCAAAGTGTATACTTTGGCGTCACCCCTTACATATTTAGGTCTTTTTTATTGTGCGTAACTAA  
 CTTGCCATCTTCAAAACAGGAGGGCTGGAAGAAGCAGACCGCTAACACAGTACATAAAAAAGGAGACA  
 TGAACGATGAACATCAAAAAGTTTTGCAAAACAAGCAACAGTATTAACCTTTACTACCGCACTGCTGGCA  
 GGAGGCGCAACTCAAGCGTTTGCGAAAGAAACGAACCAAAAGCCATATAAGGAAACATACGGCATT  
 CCCATATTACACGCTGATATGCTGCAATCCCTGAACAGCAAAAAAATGAAAAATATAAAGTCTCTG  
 AGTTCCGATTCGTCCACAATTA AAAATATCTCTTCTGCAAAAGCCCTGGACGTTTGGGACAGCTGGCCA  
 TTACAAAACACTGACGGCACTGTGCGAAAATATCACGGCTACCACATCGTCTTTGCATTAGCCGGAGA  
 TCCTAAAAATGCGGATGACACATCGATTTACATGTTCTATCAAAAAGTCGGCGAAACTTCTATTGACAG  
 CTGGAAAAACGCTGGCCGCGTCTTAAAGACAGCGACAAATTCGATGCAAATGATTCTATCCTAAAAG  
 ACCAAACACAAGAATGGTCAGGTTACGCCACATTTACATCTGACGGAAAAATCCGTTTATTCTACACTG  
 ATTTCTCCGGTAAACATTACGGCAAAACAACTGACAACCTGCACAAGTTAACGTATCAGCATCAGACA  
 GCTCTTTGAACATCAACGGTGTAGAGGATTATAAATCAATCTTTGACGGTGACGGAAAAACGTATCAA  
 AATGTACAGCAGTTCATCGATGAAGGCAACTACAGCTCAGGCGACAACCATAAGCTGAGAGATCCTCA  
 CTACGTAGAAGATAAAGGCCACAAATACTTAGTATTTGAAGCAAACTGGAAGTGAAGATGGCTACC  
 AAGGCGAAGAATCTTTATTTAACAAAGCATACTATGGCAAAAGCAGATCATTCTTCCGTCAAGAAAGTC  
 AAAAATCTTGCAAAGCGATAAAAAACGCACGGCTGAGTTAGCAAACGGCGCTCTCGGTATGATTGAG  
 CTA AACGATGATTACACACTGAAAAAAGTGTGAAACCGCTGATTGCATCTAACACAGTAACAGATGA  
 AATTGAACGCGCAACGCTTTTAAATGAACGGCAAAATGGTACCTGTTCACTGACTCCCGCGGATCAA  
 AAATGACGATTGACGGCATTACGTCTAACGATATTTACATGCTTGGTTATGTTTCTAATTTCTTAACTGG  
 CCCATACAAGCCGCTGAACAAAACCTGGCCTTGTGTTAAAAATGGATCTTGATCCTAACGATGTAACCTT  
 TACTTACTCACACTTCGCTGTACCTCAAGCGAAAGGAAACAATGTCGTGATTACAAGCTATATGACAAA  
 CAGAGGATTCTACGCAGACAAACAATCAACGTTTGCGCCTAGCTTCTGCTGAACATCAAAGGCAAGA  
 AAACATCTGTTGTCAAAGACAGCATCCTTGAACAAGGACAATTAACAGTTAACAAATAAAAAACGCAAAA  
 GAAAATGCCGATATCCTATTGGCATTGACGGTCTCCAGTAAAGGTGGATACGGATCCGAATTCGAGCT  
 CCGTCGACAAGCTTGGCGCCGCGGATCGATCGATATCTGACTAAATCTTAGTTTGTATTGTATGTTT  
 AATACAATATGTTATGTTTAAATATGTTTTAATAAATTTATAAAAATAATTTCAACTTTTATTGTAACAAC  
 ATTGTCCATTTACACACTCCTTTCAAGCGCGTGGGACTCGATGCTCGGCCCACTCAAAGGCGGTAAT  
 ACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAGGCC  
 AGGAACCGTAAAAAGGCCCGGTTGCTGGCGTTTTCCATAGGCTCCGCCCTTACTGACGAGCATCACA  
 AAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGCGTTTCCCCC  
 TGGAAGCTCCCTCGTGGCTCTCTGTTCCGACCCCTGCCGCTTACCAGGATACCTGTCCGCTTTCTCC

CTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTGCG  
 TCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGTTTACGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATC  
 GTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAG  
 CAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGA  
 AGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTG  
 ATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGTTTTTTTTTTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAA  
 AAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCA  
 CGTTAAGGGATTTTGCATGCGCTAAGCGGGCTTTATAAAACGGGCTGCGGGACCAGTTTTTCATATCAC  
 TACCGTTTGAGTCTTGTGCTGTGTGGATACTCCTCCCACACCGAATTAATTCGGATCTCTGCAAGG  
 GATTTTGGTCATGAACAATAAACTGTCTGCTTACATAAACAGTAATACAAGGGGTGTTTCATAGTATAA  
 TACGACTCACTATAGGAGGGCCACCATGGCCAAGTTGACCAAGTGCCGTTCCGGTGTCTCACCGCGCGC  
 GACGTCGCGCGGAGCGGTGAGTCTGGACCGACCGGCTCGGGTTCAGCCGGGACTTCGTGGAGGAC  
 GACTTCGCGCGGTGTGGTCCGGGACGACGTGACCCGTTCATCAGCGCGGTCCAGGACCAGGTGGTG  
 CCGGACAACAACCTGGCTGGGTGTGGGTGCGCGGCTGGACGAGCTGTACGCCAGTGGTCCGGAG  
 GTCGTGTCCACGAACCTCCGGGACGCTCCGGCCGGCCATGACCGAGATCGGCGAGCAGCCGTGG  
 GGGCGGGAGTTCGCCCTGCGCGACCCGCGCGCAACTGCGTGCACCTTCGTGGCCGAGGAGCAGGAC  
 TGACCGACGCGACCAACACCGCCGGTCCGACGCGCGGCCACGGTCCAGGGGGTCCGACCTCGA  
 AACTTGTATTATGACGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCAT  
 TTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTTCACGTAATA  
 AGTGTGCGGCTAGCAGTCAA

SEC ID N° 72: Secuencia pLIC-Int-His1 (pHP34s-Híbrido con LIC posibilitado para expresión intracelular):

CCTGTTCACTGACTCCCGCGGATCAAAAAATGACGATTGACGGCATTACGTCTAACGATATTTACATGCT  
 TGGTTATGTTTCTAATTTCTTAACTGGCCCATACAAGCCGCTGAACAAAACTGGCCTTGTGTTAAAAAT  
 GGATCTTGATCCTAACGATGTAACCTTTACTTACTCACACTTCGCTGTACCTCAAGCGAAAGGAAACAA  
 TGTCGTGATTACAAGCTATATGACAAACAGAGGATTCTACGCAGACAAACAATCAACGTTTTCGCGCTA  
 GCTTCTGCTGAACATCAAAGGCAAGAAAAATCTGTTGTCAAAGACAGCATCCTTGAACAAGGACAA  
 TTAACAGTTAACAAATAAAAAACGCAAAAGAAAAATGCCGATATCCTATTGGCATTGACGTGAGGTGGCA  
 CACTGCAGAGAACCTCTACTTCCAATCGCACCATCATCACCACCATGATTACAAGGATGACGACGAT  
 AAGTGAGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTCGGCCCGCGGATCGATCGATATCTGACTAA  
 ATCTTAGTTTGTATTGTCATGTTTTAATAACAATATGTTATGTTTAAATATGTTTTAATAAATTTTATAAAA  
 TAATTTCAACTTTTATTGTAACAACATTGTCCATTTACACACTCCTTTCAAGCGCGTGGGACTCGATGCT  
 CGGCGCCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGT  
 GAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTGTGGCGTTTTTCCATAGGCT  
 CCGCCCCCTGACGAGCATCAAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTA  
 TAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTAC  
 CGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGTTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATC  
 TCAGTTCGGTGTAGGTGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGTTTCAGCCCGACCG  
 CTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAG  
 CAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCCTGAAGTGGTG  
 GCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCG  
 GAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGC  
 AAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTACGGGGTCTGA  
 CGTTCAGTGGAAACGAAAACTCAGTTAAGGGATTTTGCATGCGCTAAGCGGGCTTTATAAAACGGGCT  
 GCGGGACCAGTTTTCATATCACTACCGTTTGAGTCTTGTGCTGTGTGGATACTCCTCCCACACCGA  
 ATTAATTCGGATCTCTGCAAGGGATTTTGGTCATGAACAATAAACTGTCTGCTTACATAAACAGTAAT  
 ACAAGGGGTGTTTCATAGTATAATACGACTCACTATAGGAGGGCCACCATGGCCAAGTTGACCAGTGCC  
 GTTCCGGTGTCTACCGCGCGCGACGTCGCCGGAGCGGTGAGTCTGGACCGACCGGCTCGGGTTC  
 AGCCGGGACTTCGTGGAGGACGACTTCGCCGGTGTGGTCCGGGACGACGTGACCCTGTTTCATCAGC  
 GCGGTCCAGGACCAGGTGGTGCCGGACAACACCCCTGGCCTGGGTGTGGGTGCGCGGCTGGACGA  
 GCTGTACGCCGAGTGGTCCGAGGTCGTGTCCACGAACCTCCGGGACGCTCCGGGCGGCCATGAC  
 CGAGATCGGCGAGCAGCCGTGGGGGCGGGAGTTTCGCCCTGCGCGACCCGGCCGGCAACTGCGTGC  
 ACTTCGTGGCCGAGGAGCAGGACTGACCGACGCCGACCAACACCGCCGGTCCGACGGCGGCCACG  
 GGTCCAGGGGGTTCGACCTCGAACTTGTATTGACGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGC  
 ATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAACTCATCAATG  
 TATCTTATCATGTCTTCACGTAATAAGTGTGCGGCTAGCAGTCAACTACTAGCAGTCAACACTTGGTCT

GACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTT  
 GCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAAT  
 GATACCGCGAGAACCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCCAGCCAGCCGGAAGGGCC  
 GAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAG  
 AGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCACAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTAC  
 GCTCGTCTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCC  
 ATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCACT  
 GTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTTCTTTACTGTCTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTC  
 TGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCCGAGTTGCTCTTGGC  
 CGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAAGTGCTCATCATTGGAAAAAGT  
 TCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGC  
 ACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTACTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAAACAGGAAGGCAAA  
 ATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATT  
 AATAGGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAAC  
 AAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAAGTGCCACCTACTAGTGAATGCCCTACTAGAAGATGT  
 GTGTTGCACAAAATGTCCCTGGAATAACCAATTTGAAGTGCAGATAGCAGTAAACGTAAGCTAATATG  
 AATATTATTTAACTGTAATGTTTTAATATCGCTGGACATTACTAATAAACCCACTATAAACACATGTACA  
 TATGTATGTTTTGGCATAACAATGAGTAGTTGGGGAAAAAATGTGTAAGGCACCGTGACCATCACAGC  
 AATAAGATAACCAGCTGAAGTATCGAATATGAGTAAACCCCAAAATTGAATCACATGCCGCAACTGATA  
 GGACCCATGGAAGTACACTCTTCATGGCGATATACAAGACACACACAAGCACGAACACCCAGTTGCG  
 GAGGAAATTTCTCCGTAAATGAAAACCAATCGGCGAACCAATTCATACCCATATATGGTAAAAAGTTTTGA  
 ACGCGAGCGAACTTAAGAGCGCCGGAGTATAAATAGAGGGCGCTTCGTCTACGGAGCGACAATTCAT  
 TCAAACAAGCAAAGTGAACACGTCGCTAAGCGAAAGCTAAGCAAATAACAAGCGCAGCTGAACAAG  
 CTAACAATCTGCAGAAGCTTGGTACCCCTCGAGCTCAGCTGAATTTCTGGATCCTCTAGAAATAATTTTG  
 TTTAACCTTAAGAAGGAGATACAAAGCAGGTCGTTCACTATTTAGTGAATGAGATATTATGATAT  
 TTTCTGAATTGTGATTAATAAGGCAACTTTATGCCATGCAACAGAAACTATAAAAAATACAGAGAATG  
 AAAAGAAACAGATAGATTTTTAGTTCTTTAGGCCCGTAGTCTGCAAAATCCTTTTATGATTTTCTATCAA  
 ACAAAGAGGAAATAGACCAGTTGCAATCCAAACGAGAGTCTAATAGAATGAGGTGCAAAAAGTAAAT  
 CGCGCGGGTTTGTACTGATAAAGCAGGCAAGACCTAAAATGTGTAAAGGGCAAAGTGTATACTTTGG  
 CGTCAACCCCTTACATATTTTAGGTCTTTTTTATTGTGCGTAACTAACTTGCCATCTTCAAACAGGAGGG  
 CTGGAAGAAGCAGACCCGCTAACACAGTACATAAAAAAGGAGACATGAACGATGAACATCAAAAAGTTT  
 GCAAAACAAGCAACAGTATTAACCTTTACTACCGCACTGCTGGCAGGAGGGCGCAACTCAAGCGTTTGC  
 GAAAGAAACGAACCAAAAGCCATATAAGGAAACATACGGCATTTCATATTTACACGCCATGATATGC  
 TGCAAAATCCCTGAACAGCAAAAAAATGAAAAATATAAAGTTTCTGAGTTTCGATTTCGTCCACAATTA  
 ATATCTCTTCTGCAAAAGGCCTGGACGTTTGGGACAGCTGGCCATTACAAAACACTGACGGCACTGTC  
 GCAAACTATCACGGCTACCACATCGTCTTTGCATTAGCCGGAGATCCTAAAAATGCGGATGACACATC  
 GATTTACATGTTCTATCAAAAAGTCGGCGAAACTCTATTGACAGCTGGAAAAACGCTGGCCGCGTCT  
 TTAAGACAGCGACAAATTCGATGCAAAATGATTTCTAATAAAGACCAACACACAAGAAATGGTCAGGT  
 TCAGCCACATTTACATCTGACGGAAAAATCCGTTTATTCTACACTGATTTCTCCGGTAAACATTACGGC  
 AAACAACACTGACAACCTGCACAAGTTAACGTATCAGCATCAGACAGCTCTTTGAACATCAACGGTGT  
 AGAGGATTATAAATCAATCTTTGACGGTGACGGAAAAACGTATCAAATGTACAGCAGTTTCATCGATG  
 AAGGCAACTACAGCTCAGGCGACAACCATACGCTGAGAGATCCTCACTACGTAGAAGATAAAGGCCA  
 CAAATACTTAGTATTTGAAGCAAACTGGAAGTGAAGATGGCTACCAAGGCGAAGAATCTTTATTTAA  
 CAAAGCATACTATGGCAAAAGCACATCATTCTCCGTCAAGAAAGTCAAAAATCTTGCAAAAGCGATAA  
 AAAACGCACGGCTGAGTTAGCAAAACGGCGCTCTCGGTATGATTGAGCTAAACGATGATTACACACTGA  
 AAAAGTGATGAAACCGCTGATTGCATCTAACACAGTAAACAGATGAAATTGAACGCGCGAACGTCCTT  
 AAATGAACGGCAAATGGTA

SEC ID N° 73: Secuencia pLIC-TEV-Ex-His1 (pHP34s-Híbrido con LIC posibilitado para expresión extracelular)

TTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGC  
 ACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTA  
 AGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGATGTAGGGC  
 GTGCTACAGAGTTCTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGC  
 GCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCCGCG  
 TGGTAGCGGTGGTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTAACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATC  
 CTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGCATGCG

CTAAGCGGGCTTTATAAAACGGGCTGCGGGACCAGTTTTTCATATCACTACCGTTTGAGTTCCTGTGCT  
 GTGTGGATACTCCTCCCACACCGAATTAATTCGGATCTCTGCAAGGGATTTTGGTCATGAACAATAA  
 AACTGTCTGCTTACATAAACAGTAATACAAGGGGTGTTTCATAGTATAATACGACTCACTATAGGAGGG  
 CCACCATGGCCAAGTTGACCACTGCCGTTCCGGTGCACCCGCGCGGACGTCGCCGGAGCGGTCC  
 AGTTCGACCGACCGGCTCGGGTTCAGCCGGGACTTCGTGGAGGACGACTTCGCCGGTGTGGTCC  
 GGGACGACGTGACCTGTTTCATCAGCGCGGTCCAGGACCAGGTGGTGCCGGACAACACCCTGGCCT  
 GGGTGTGGGTGCGCGGCTGGACGAGCTGTACGCCGAGTGGTCGGAGGTCGTGTCCACGAACCTCC  
 GGGACGCTCCGGCCGGCCATGACCGAGATCGGCGAGCAGCCGTGGGGGCGGGAGTTCGCCCTG  
 CCGGACCCCGGCCGCAACTGCGTGCCTTCGTGGCCGAGGAGCAGGACTGACCGACGCCGACCAAC  
 ACCGCCGGTCCGACGGCCGGCCACGGGTCCAGGGGGGTGACCTCGAAACTTGTTTATTGCAGCTT  
 ATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAATTTCAAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAG  
 TTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTTCACGTAATAAGTGTGCGGCTAGCAGTC  
 AACTAGCAGTCAACACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCT  
 GTCTATTTGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTA  
 CCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGAACCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAAT  
 AAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCT  
 ATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATT  
 GCTACAGGCATCGTGGTGCACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATC  
 AAGCCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATGTTG  
 TCAGAAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCA  
 TGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGC  
 GCGGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAA  
 AGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCA  
 GTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAATGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGT  
 GAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACT  
 CATACTCTTCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGCTCATGAGCGGATACATATTT  
 GAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTACTAG  
 TGAATGCCCTACTAGAAGATGTGTGTTGCACAAAATGTCCCTGGAATAACCAATTTGAAGTGCAGATA  
 GCAGTAAACGTAAGCTAATATGAATATTATTTAACTGTAATGTTTTAATATCGCTGGACATTAATAAA  
 ACCCACTATAAACACATGTACATATGTATGTTTTGGCATACAATGAGTAGTTGGGGAAAAAATGTGTAA  
 AAGCACCGTGACCATCACAGCATAAAGATAACCAGCTGAAGTATCGAATATGAGTAAACCCCAAAATTG  
 AATCACATGCCGCAACTGATAGGACCCATGAAAGTGAACACGCTTCATGGCGATATACAAGACACACA  
 AGCACGAACACCCAGTTGCGGAGGAAATCTCCGTAATGAAAACCAATCGGCGAACAATTCATACC  
 CATATATGGTAAAAGTTTTGAACGCGAGCGAACTTAAGAGCGCCGGAGTATAAATAGAGGCGCTTCGT  
 CTACGGAGCGACAATTCATTCAAACAAGCAAAGTGAACACGTCGCTAAGCGAAAGCTAAGCAAATAA  
 ACAAGCGCAGCTGAACAAGCTAAACAATCTGCAGAAGCTTGGTACCCTCGAGCTCAGCTGAATCTGG  
 ATCCTCTAGAAATAATTTGTTTAACTTAAGAAGGAGATATACTCAAAATGAAGCTGTGCATACTGCT  
 GGCCGTCGTGGCCTTTGTTGGCCTCTCGCTCGGGGAAAATTTGATTTTCAATGCAGGTGTTCACTA  
 TTATTTAGTGAATGAGATATTATGATATTTCTGAATTGTGATTAATAAAGGCAACTTTATGCCCATGCA  
 ACAGAAACTATAAAAAATACAGAGAATGAAAAGAAACAGATAGATTTTTAGTTCCTTAGGCCCGTAGT  
 CTGCAAATCCTTTTATGATTTTCTATCAAAACAAAAGAGGAAAATAGACCAGTTGCAATCCAAACGAGAG  
 TCTAATAGAATGAGGTCGAAAAGTAAATCGCGCGGGTTTTGTTACTGATAAAGCAGGCAAGACCTAAAA  
 TGTGTAAAGGGCAAAGTGTATACTTTGGCGTCACCCCTTACATATTTTAGGTCTTTTTTTATTGTGCGTA  
 ACTAATTGCCATCTTCAAACAGGAGGGCTGGAAGAAGCAGACCCTAACACAGTACATAAAAAAGGA  
 GACATGAACGATGAACATCAAAAAGTTTGCAAAAACAAGCAACAGTATTAACCTTTACTACCGCACTGCT  
 GGCAGGAGGCGCAACTCAAGCGTTTGCAAAAGAAACGAACCAAAAAGCCATATAAGGAAACATACGGC  
 ATTTCCCATATTACACGCCATGATATGCTGCAATCCCTGAACAGCAAAAAAATGAAAAATATAAAGTT  
 CCTGAGTTCGATTCGTCCACAATTAATAATATCTCTTCTGCAAAAGGCCCTGGACGTTTGGGACAGCTG  
 GCCATTACAAAACACTGACGGCACTGTGCAAACTATCACGGCTACCACATCGTCTTTGCATTAGCCG  
 GAGATCCTAAAAATGCGGATGACACATCGATTTACATGTTCTATCAAAAAGTCGGCGAAACTTCTATTG  
 ACAGCTGGAAAAACGCTGGCCCGCTCTTTAAAGACAGOGACAAATTCGATGCAAATGATTCTATCCTA  
 AAAGACCAAAACAAGAATGGTCAGGTTGAGCCACATTTACATCTGACGGAAAAATCCGTTTATTCTAC  
 ACTGATTTCTCCGGTAAACATTACGGCAAACAAAACACTGACAACCTGCACAAGTTAACGTATCAGCATCA  
 GACAGCTCTTTGAACATCAACGGTGTAGAGGATTATAAATCAATCTTTGACGGTGACGGAAAAACGTA  
 TCAAAATGTACAGCAGTTTCATCGATGAAGGCAACTACAGCTCAGGCGACAACCATACGCTGAGAGATC  
 CTCACTACGTAGAAGATAAAGGCCACAAATACTTAGTATTTGAAGCAAACACTGGAACCTGAAGATGGC  
 TACCAAGGCGAAGAATCTTTATTTAACAAAGCATACTATGGCAAAAGCACATCATTCTTCCGTCAAGAA  
 AGTCAAAAACCTCTGCAAAGCGATAAAAAACGCACGGCTGAGTTAGCAAACGGCGCTCTCGGTATGAT

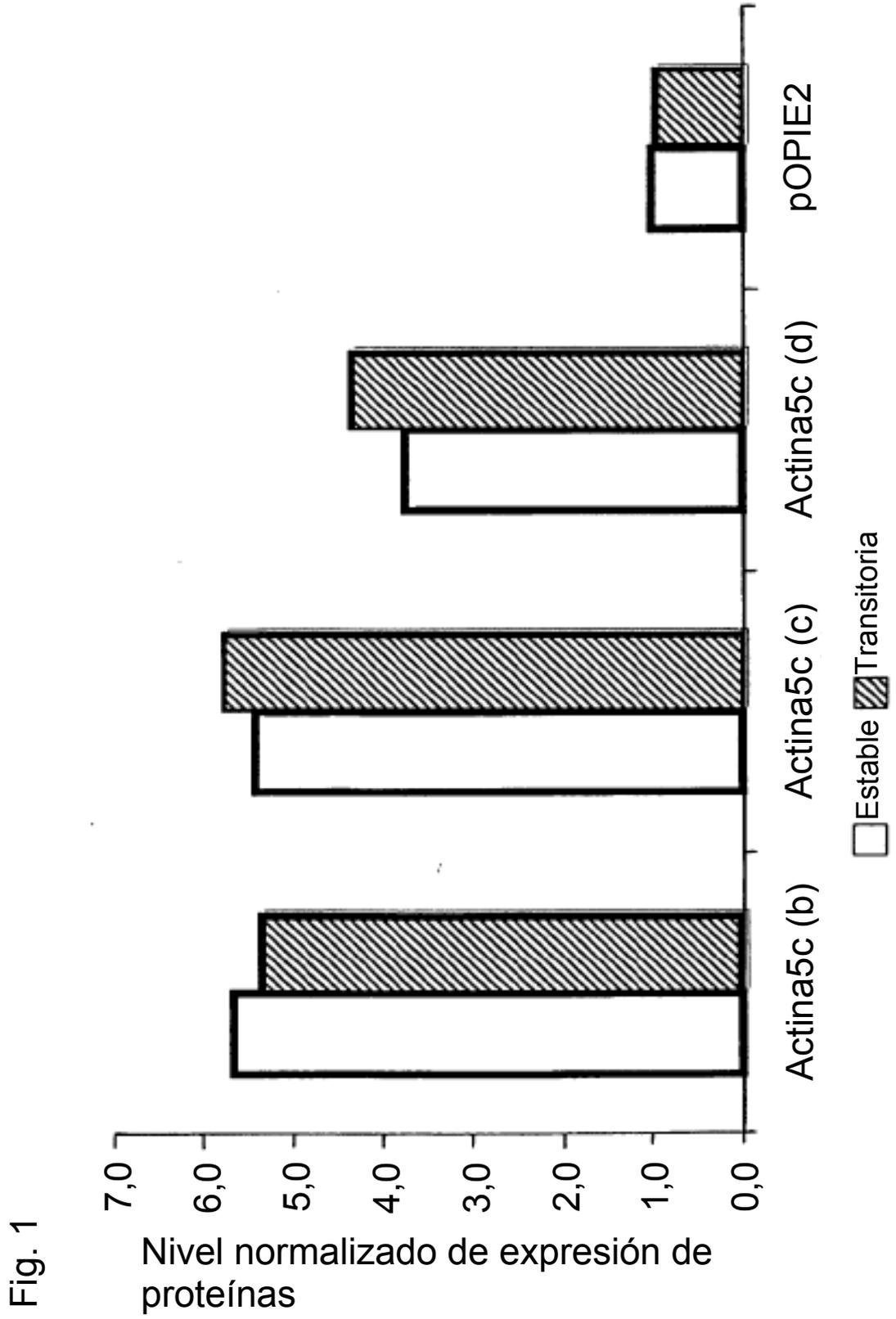
TGAGCTAAACGATGATTACACACTGAAAAAAGTGATGAAACCGCTGATTGCATCTAACACAGTAACAG  
ATGAAATTGAACGCGCGAACGTCTTTAAAATGAACGGCAAATGGTACCTGTTCACTGACTCCCGCGGA  
TCAAAAATGACGATTGACGGCATTACGTCTAACGATATTTACATGCTTGGTTATGTTTCTAATTCITTA  
CTGGCCCATACAAGCCGCTGAACAAAACCTGGCCTTGTGTTAAAAATGGATCTTGATCCTAACGATGTA  
ACCTTTACTTACTCACACTTCGCTGTACCTCAAGCGAAAGGAAACAATGTCGTGATTACAAGCTATATG  
ACAAACAGAGGATTCTACGCAGACAAACAATCAACGTTTGCGCCTAGCTTCCTGCTGAACATCAAAGG  
CAAGAAAACATCTGTTGTCAAAGACAGCATCCTTGAACAAGGACAATTAACAGTTAACAAATAAAAACG  
CAAAGAAAATGCCGATATCCTATTGGCATTGACGTCAGGTGGCACACCTGCAGAGAACCTCTACTTC  
CAATCGCACCATCATCACCACCATGATTACAAGGATGACGACGATAAGTGAGGATCCGAATTCGAGCT  
CCGTCGACAAGCTTGCGGCCGCGGATCGATCGATATCTGACTAAATCTTAGTTTGTATTGTCATGTTTT  
AATACAATATGTTATGTTTAAATATGTTTTAATAAATTTTATAAAAATAATTTCAACTTTTATTGTAACAAC  
ATTGTCCATTTACACACTCCTTTCAAGCGCGTGGGACTCGATGCTCGGCGCCACTCAAAGGCGGTAAT  
ACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCC  
AGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACA  
AAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTTCCCC  
TGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCC  
CTTCGGGAAGCGTGGCGCT

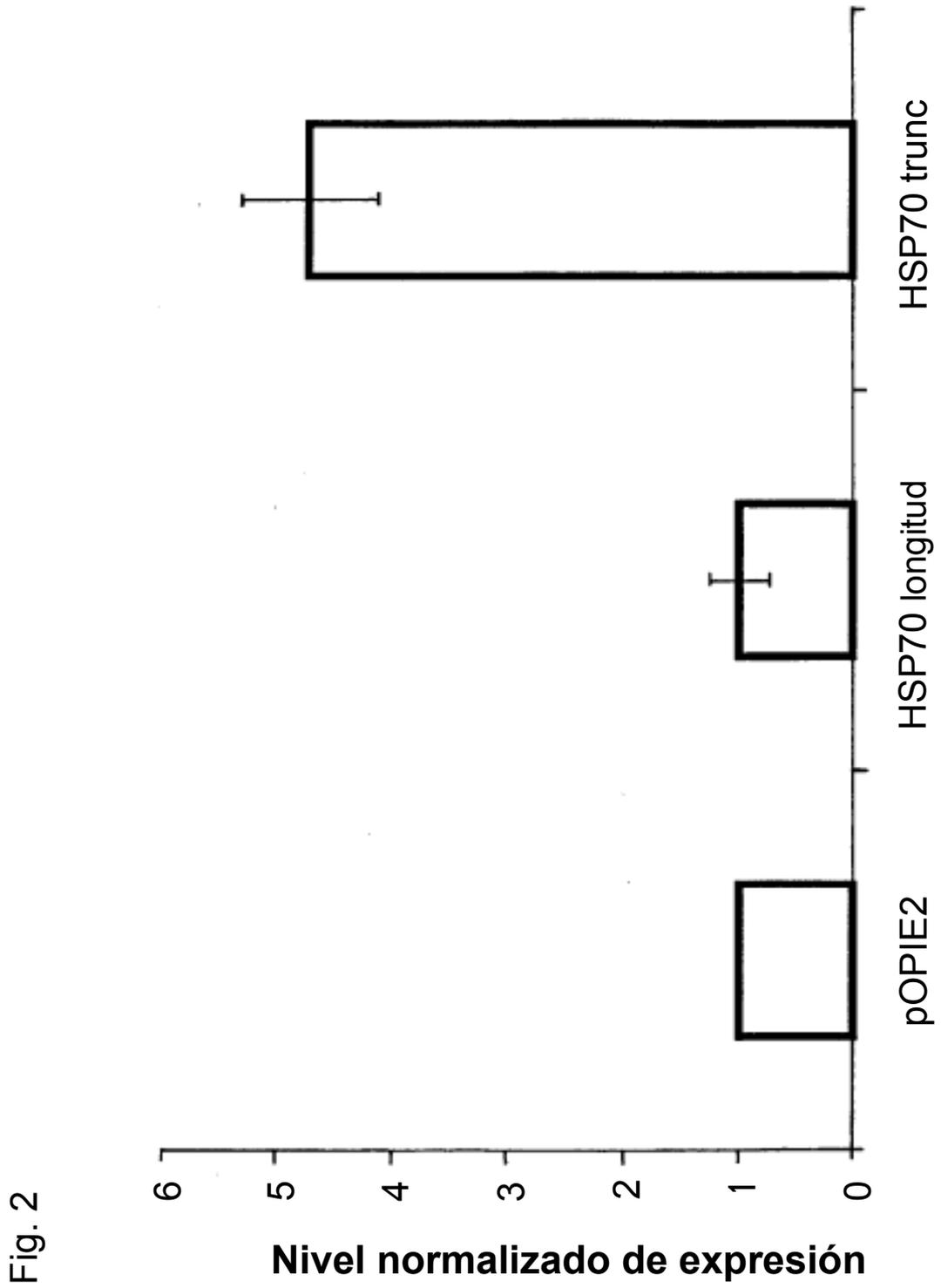
**REIVINDICACIONES**

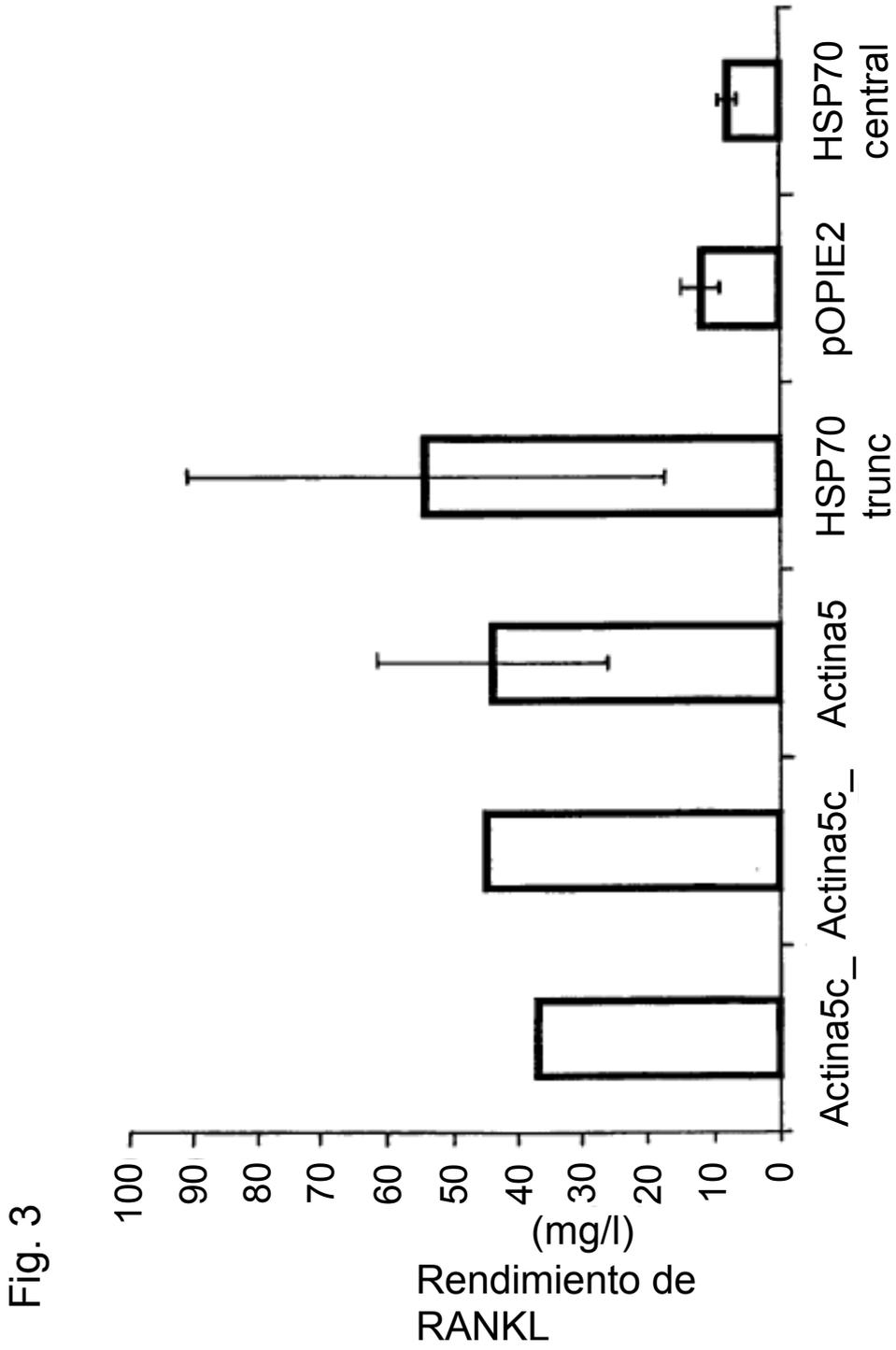
- 5 1. Un polinucleótido de ADN aislado adecuado para la expresión heteróloga de un polipéptido de interés en una célula de insecto, comprendiendo dicho polinucleótido de ADN un polinucleótido de ADN promotor que comprende una secuencia funcional de nucleótidos con una identidad de secuencia de al menos el 80% con la SEC ID N° 68, restos 7-586, teniendo dicha secuencia funcional de nucleótidos actividad promotora en una célula S2 de *Drosophila*, en el que la secuencia comprende una secuencia con una identidad de secuencia de al menos el 80% con la SEC ID N° 37 y con actividad promotora en una célula S2 de *Drosophila*.
- 10 2. El polinucleótido de ADN aislado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho polinucleótido de ADN promotor comprende una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 37 y la SEC ID N° 68 con o sin secuencias flanqueantes de sitio de restricción en cualquiera de los extremos.
- 15 3. El polinucleótido de ADN aislado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho polinucleótido de ADN promotor comprende un nucleótido que es un fragmento funcional de al menos 80 nucleótidos contiguos de la SEC ID N° 37 o la SEC ID N° 68, teniendo dicho fragmento funcional actividad promotora en una célula S2 de *Drosophila*.
- 20 4. El polinucleótido de ADN aislado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la identidad de secuencia con la SEC ID N° 37 o la SEC ID N° 68 es de al menos el 85%, tal como al menos el 90%, tal como al menos el 95%, y tal como al menos el 98%.
- 25 5. El polinucleótido de ADN aislado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende la SEC ID N° 68, restos 7-586.
- 30 6. El polinucleótido de ADN aislado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que dicho polinucleótido de ADN promotor muestra un nivel de expresión de proteínas aumentado en comparación con el nivel de expresión de proteínas de uno cualquiera de los polinucleótidos de ADN promotores que tienen la secuencia de la SEC ID N° 1 o la SEC ID N° 4.
- 35 7. El polinucleótido de ADN aislado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende adicionalmente
  - a) un marcador de selección, tal como un marcador de selección seleccionado entre el grupo que consiste en un marcador de selección de Zeocina, un marcador de selección de Neomicina, un marcador de selección de Higromicina, un marcador de selección de Puomicina, y un marcador de selección de Blasticidina, y/o
  - 40 b) un promotor bacteriano, tal como el promotor bacteriano pKANR, y/o
  - c) un segundo polinucleótido de ADN promotor adecuado para dirigir la expresión del marcador de selección en una célula de insecto, y/o
  - d) al menos un elemento ubicuo de abertura de la cromatina cadena arriba y/o cadena abajo respecto a un sitio de clonación múltiple, y/o
  - 45 e) al menos un elemento de aislamiento transcripcional, tal como la secuencia de aislamiento Gypsy (gsu(Hw)), y/o
  - f) una secuencia codificante de dihidrofolato reductasa (dhfr) adecuada para la selección en células de insecto, y/o
  - 50 g) al menos una secuencia señal de poliadenilación tal como la secuencia poliA de SV40 y/o una señal poliA de OPIE2, y/o
  - h) un origen de replicación de *E.coli*, y/o
  - i) al menos una secuencia polinucleotídica señal de exportación de proteínas, tal como una seleccionada entre la lista que consiste en BIP y CPY, y/o
  - 55 j) al menos una secuencia de marca HIS, y/o
  - 60 k) un sitio de clonación múltiple cadena abajo de dicho polinucleótido de ADN promotor para la inserción de un gen que codifica un polipéptido de interés en dicho polinucleótido de ADN aislado, y/o
  - l) al menos un elemento de 72 pb de SV40, y/o
  - m) al menos un elemento de control de amplificación, y/o
  - n) al menos un elemento Ori-beta, y/o

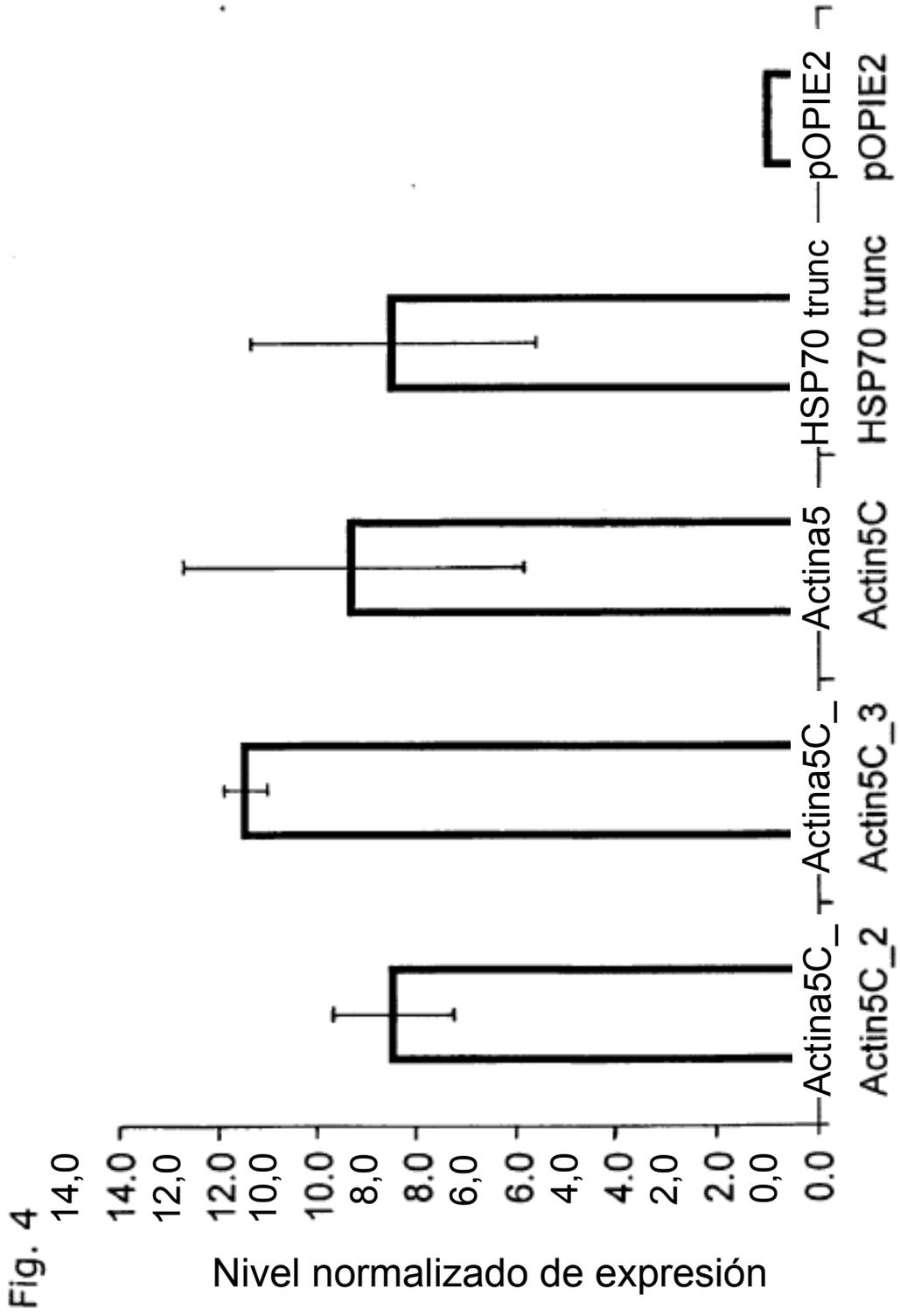
- o) al menos un elemento de región de unión a matriz (MAR), y/o
- p) al menos un elemento PRE del virus de la Hepatitis B, tal como un elemento PRE del virus de la Hepatitis B de acuerdo con la SEC ID N° 40, tal como los nucleótidos 10 a 574 de la SEC ID N° 40, y/o
- 5 q) al menos un intrón, tal como el intrón mostrado en la SEC ID N° 60 incluyendo o excluyendo los sitios de restricción flanqueantes, cadena abajo de la secuencia polinucleotídica de ADN promotor y cadena arriba de un sitio de clonación múltiple, y/o
- r) al menos una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido heterólogo a dicha secuencia polinucleotídica de ADN promotor.
- 10 8. El polinucleótido de ADN aislado de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicho segundo promotor definido en la opción c) es seleccionado entre el grupo que consiste en
- (i) una secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 1, SEC ID N° 2, SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, SEC ID N° 6, SEC ID N° 33, SEC ID N° 36, SEC ID N° 37, o una secuencia de nucleótidos que comprende los restos 7-586 de la SEC ID N° 68;
- 15 (ii) una secuencia funcional de nucleótidos con una identidad de secuencia de al menos el 80% con una secuencia cualquiera de (i) y que tiene actividad promotora en una célula S2 de *Drosophila*;
- (iii) un nucleótido que es un fragmento funcional de al menos 80 nucleótidos contiguos de una secuencia cualquiera de (i) o (ii), teniendo dicho fragmento funcional actividad promotora en una célula S2 de *Drosophila*;
- 20 (iv) una secuencia funcional de nucleótidos con una identidad de secuencia de al menos el 80% con dicho fragmento funcional de (iii) y que tiene actividad promotora en una célula S2 de *Drosophila*;
- (v) una primera secuencia quimérica de nucleótidos que comprende dos o más secuencias de una secuencia cualquiera de (i), (ii), (iii) y (iv), y
- 25 (vi) una segunda secuencia quimérica de nucleótidos que tiene actividad promotora en una célula S2 de *Drosophila*, que comprende al menos 80 nucleótidos y que incluye tramos de nucleótidos consecutivos de al menos 2 secuencias de nucleótidos de (iii) y/o (iv), en el que cada uno de dichos tramos consecutivos en solitario no tiene actividad promotora en una célula S2 de *Drosophila*.
9. El polinucleótido de ADN aislado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que está esencialmente libre de ADN viral.
- 30 10. El polinucleótido de ADN aislado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que la secuencia polinucleotídica de ADN promotor controla la expresión de un gen u otra secuencia de ADN a la cual está unida.
11. El polinucleótido de ADN aislado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que está adaptado para clonación independiente de ligamiento (LIC).
- 35 12. El polinucleótido de ADN aislado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho polinucleótido de ADN promotor comprende una secuencia quimérica en la que la secuencia de nucleótidos SEC ID N° 36, que está contenida en una secuencia de nucleótidos que comprende la SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, SEC ID N° 6 o SEC ID N° 33, está remplazada por la secuencia de nucleótidos SEC ID N° 37
- 40 13. Una célula que comprende el polinucleótido de ADN aislado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, tal como una célula que está transfectada de forma estable con dicho polinucleótido de ADN aislado.
14. La célula de acuerdo con la reivindicación 13, que es una célula de insecto, tal como una célula de *Drosophila melanogaster*.
- 45 15. Un procedimiento para la producción de un polipéptido de interés codificado por un polinucleótido, comprendiendo el procedimiento las etapas de
- (a) obtener una secuencia polinucleotídica que codifica el polipéptido de interés;
- (b) insertar dicha secuencia polinucleotídica que codifica el polipéptido de interés en el polinucleótido de ADN aislado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12;
- (c) transformar una célula huésped con el polinucleótido obtenido en la etapa (b);

- (d) permitir la expresión de dicho polinucleótido obtenido en la etapa (b) para producir el polipéptido; y
- (e) obtener el polipéptido a partir de la misma.









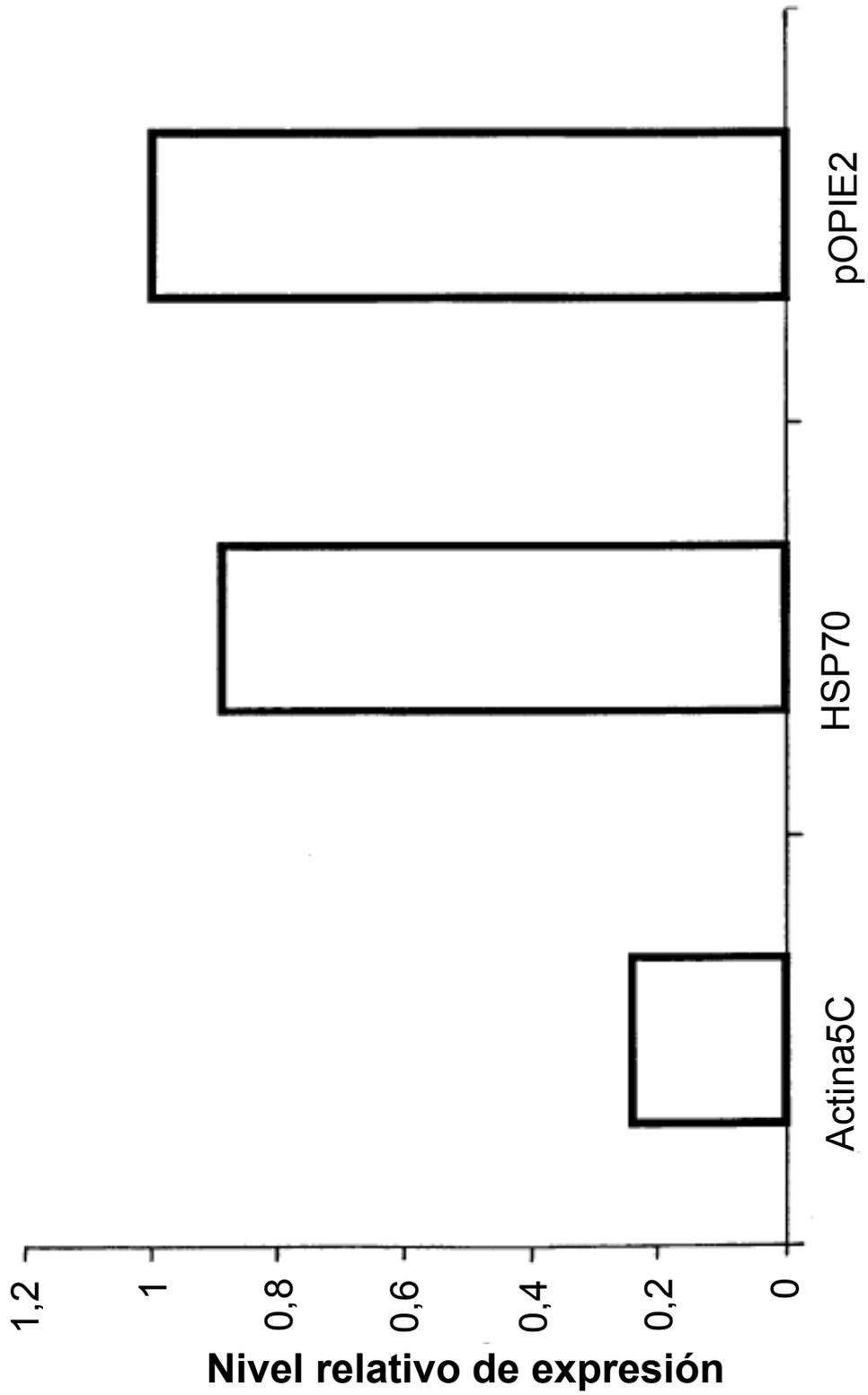


Fig. 5

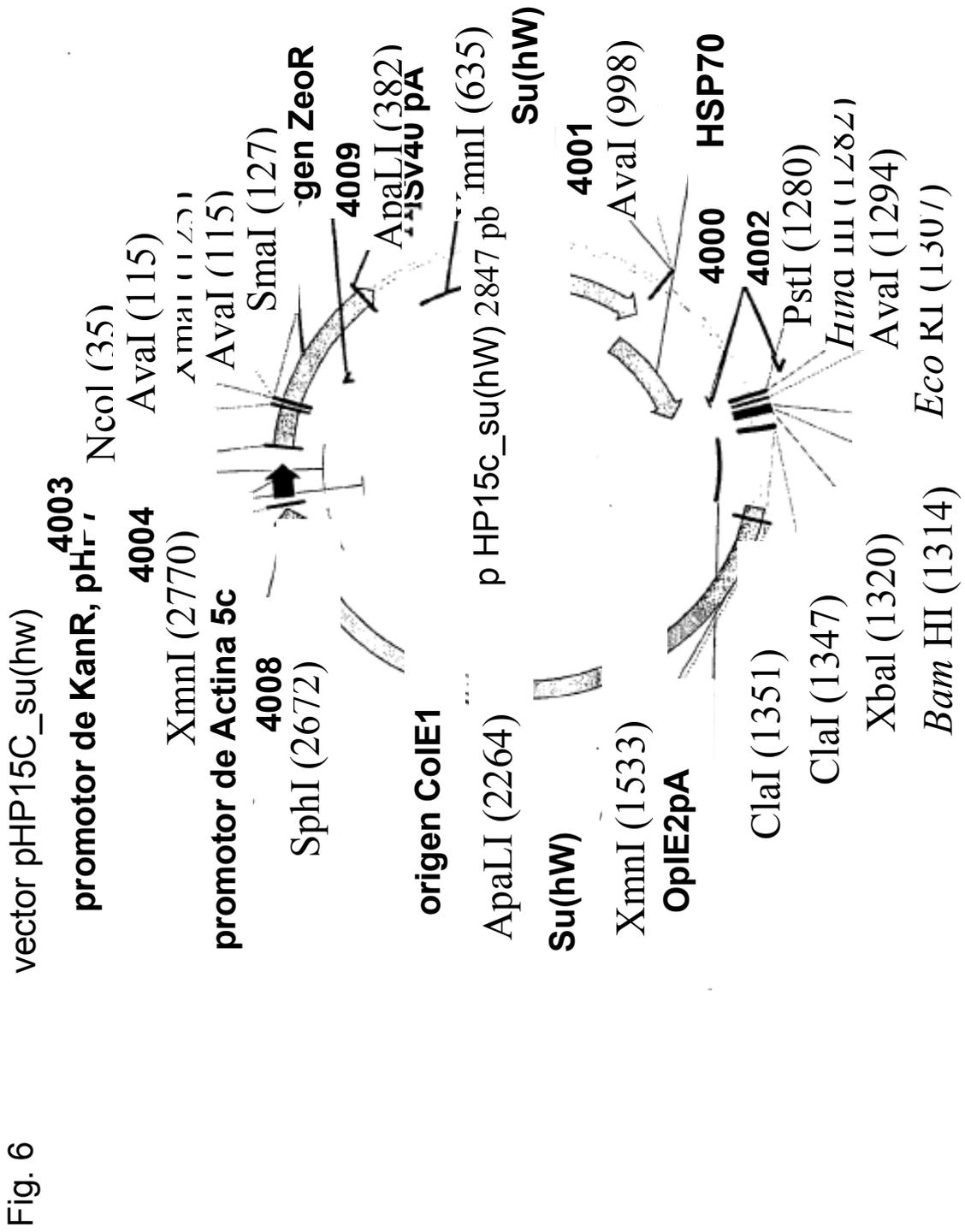
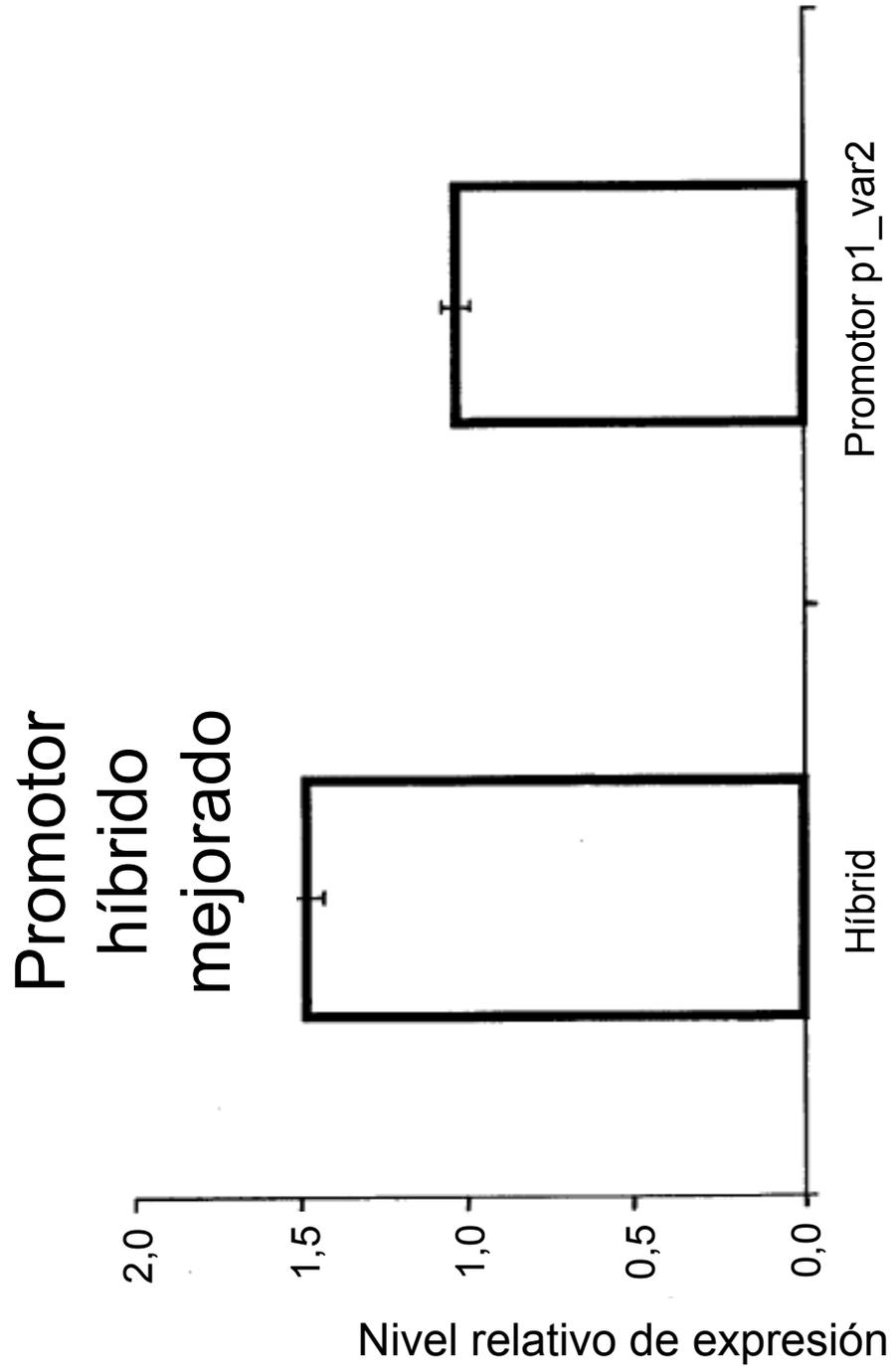
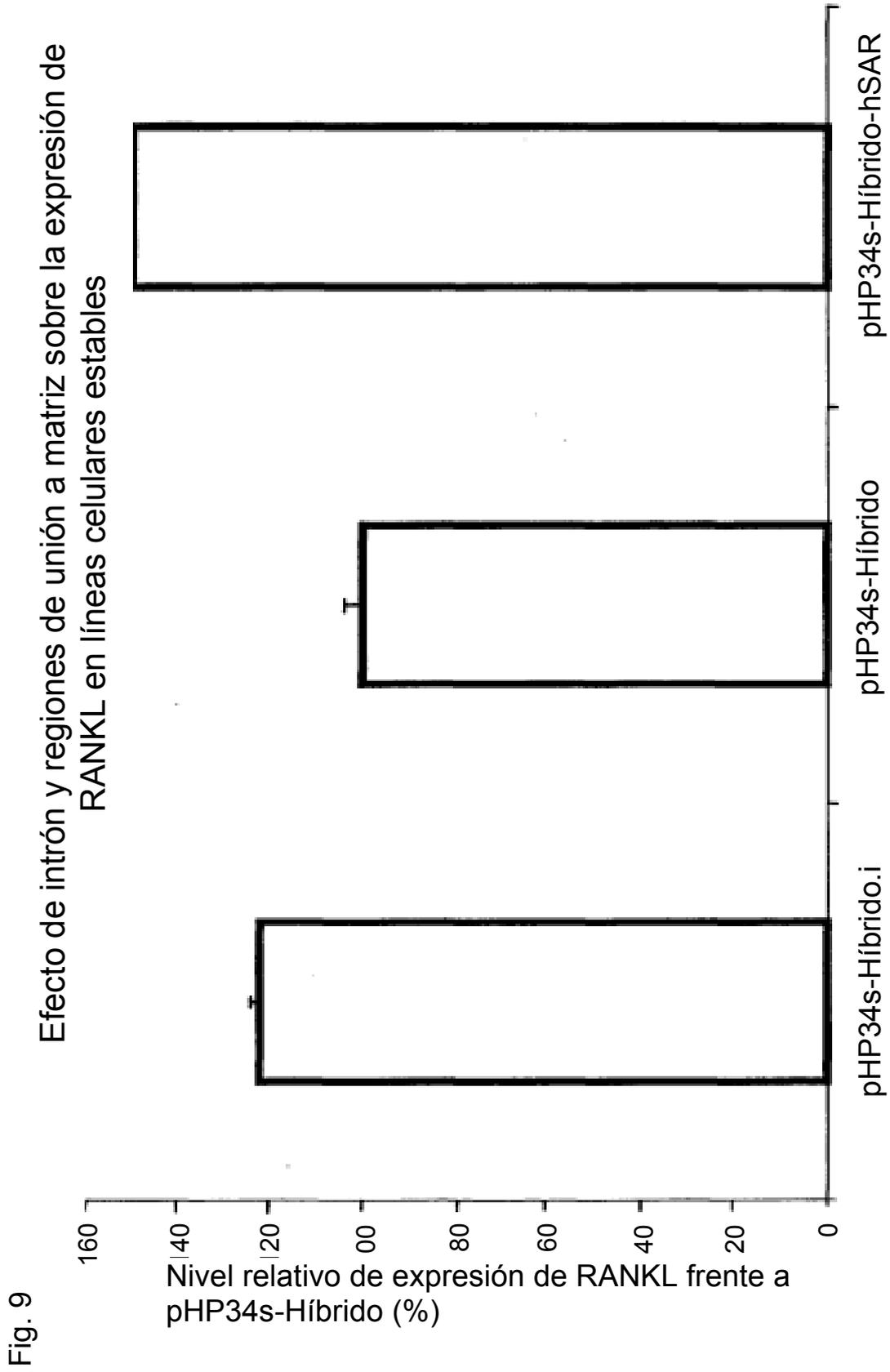




Fig. 8





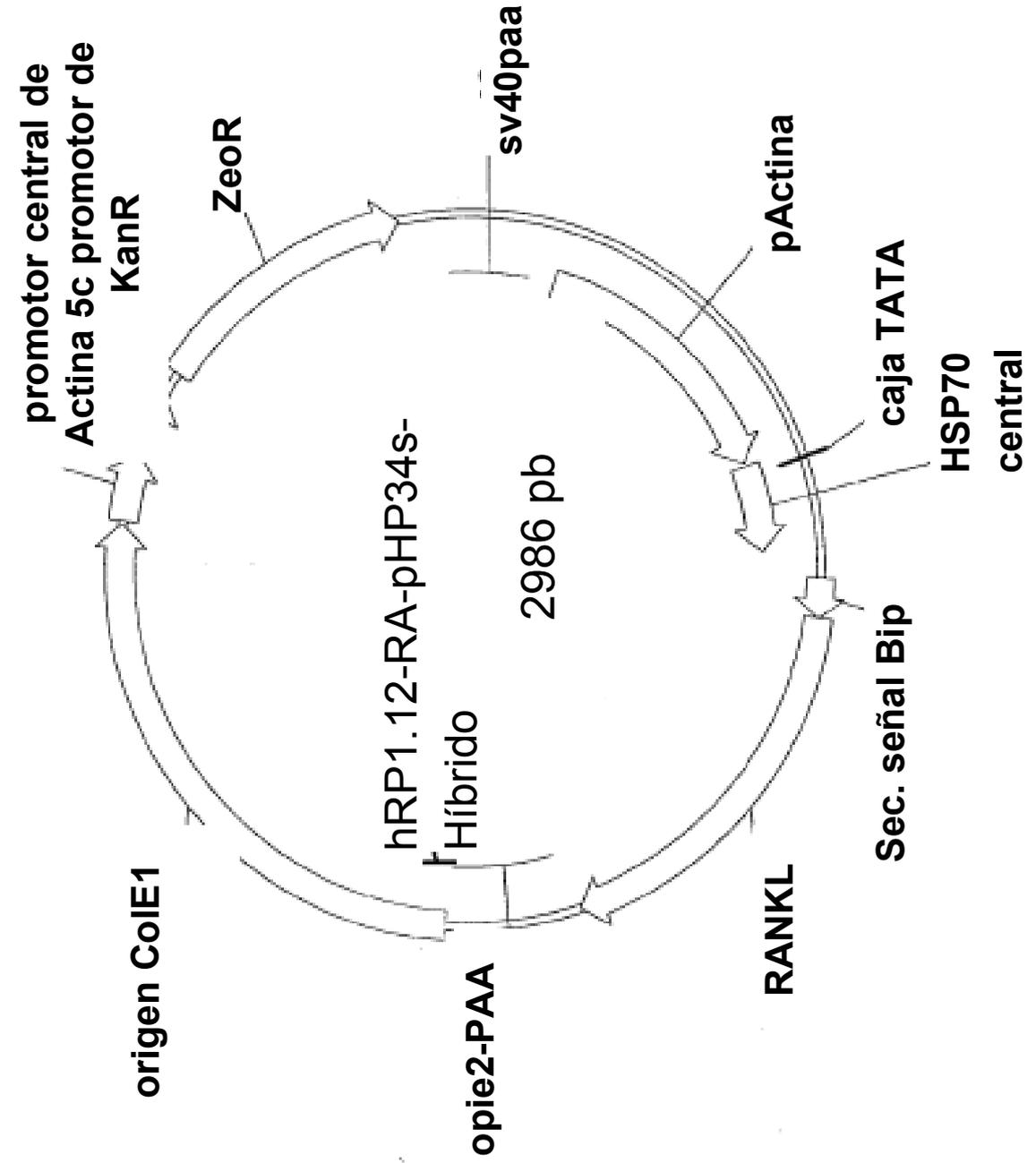


Fig. 10A

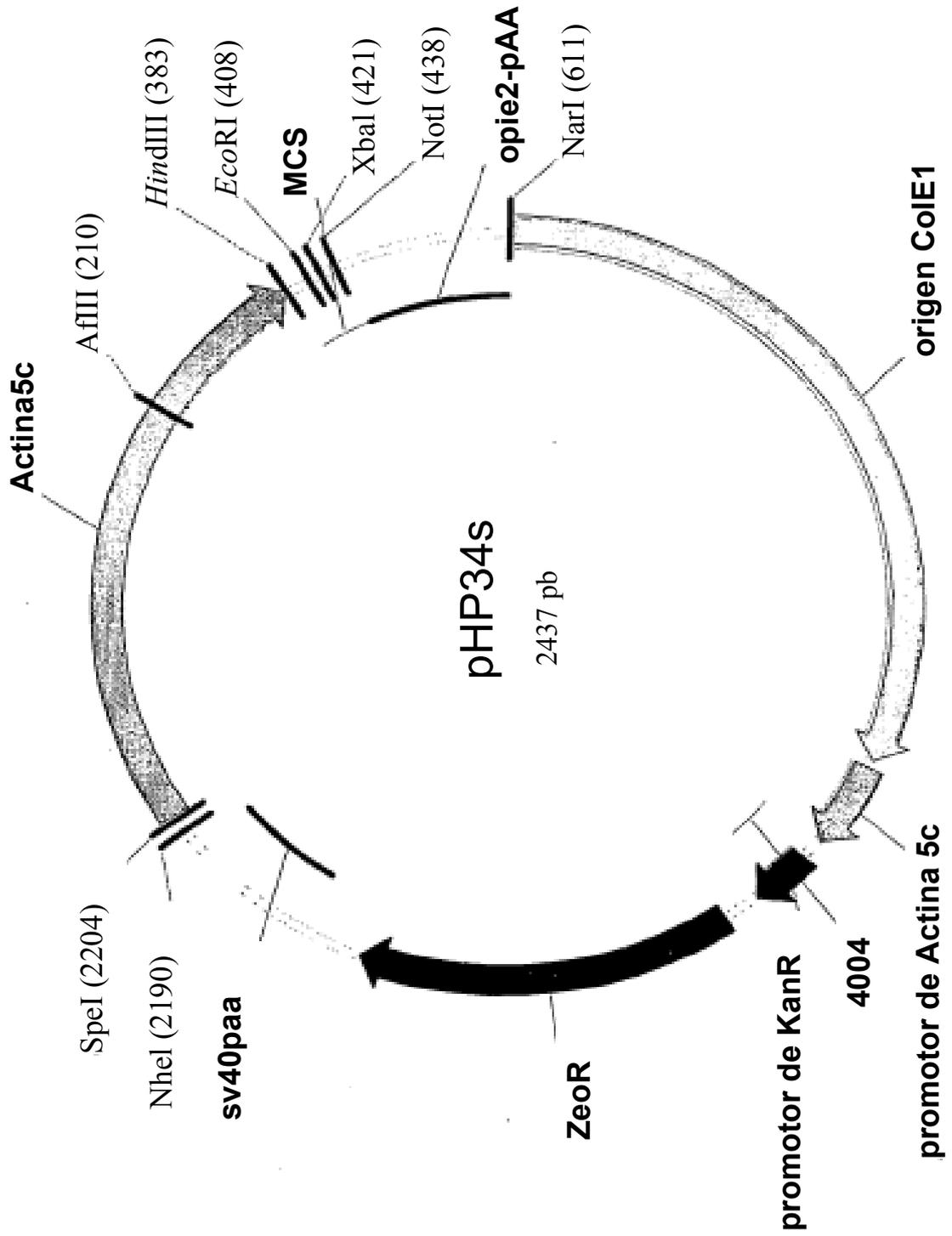
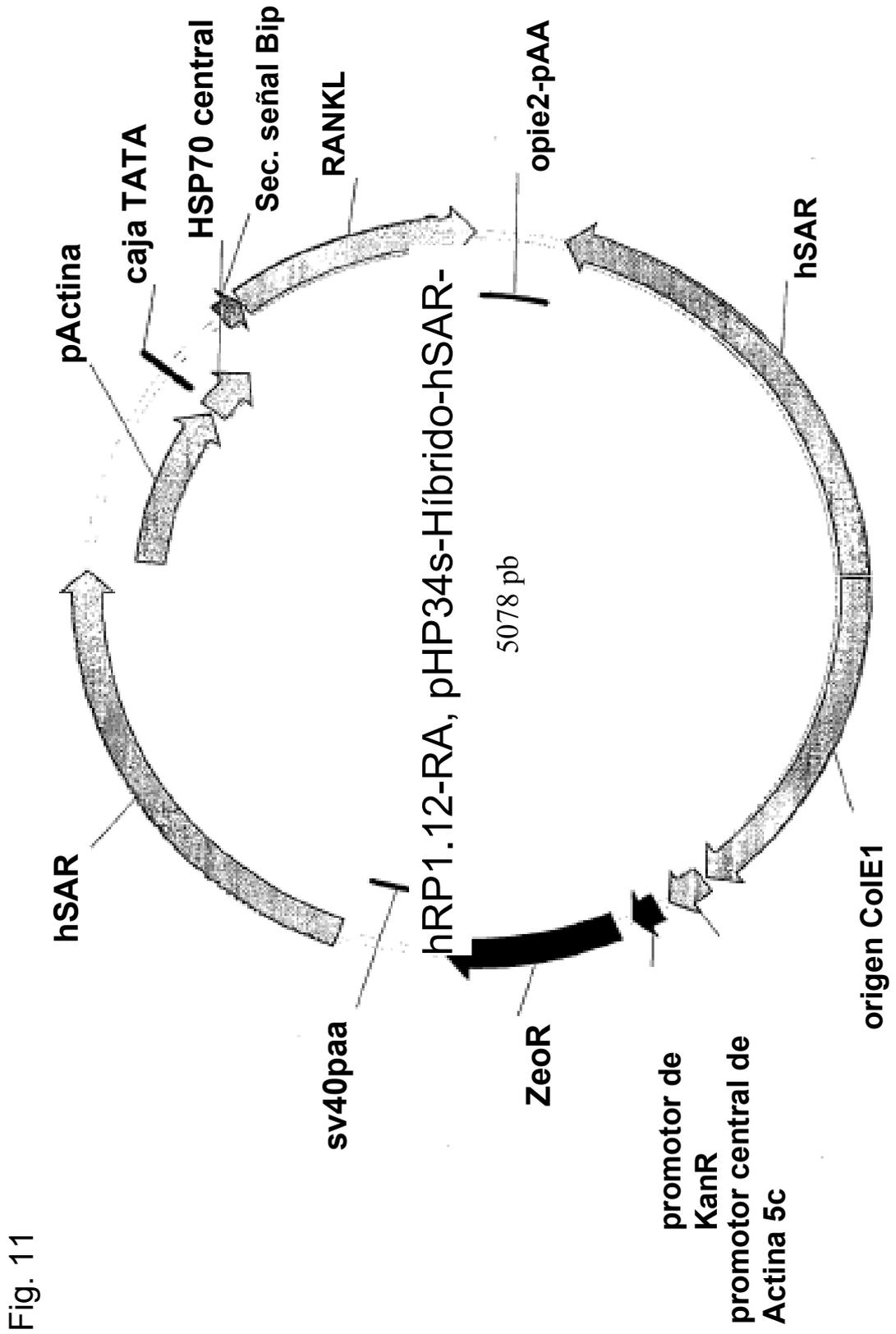


Fig. 10B



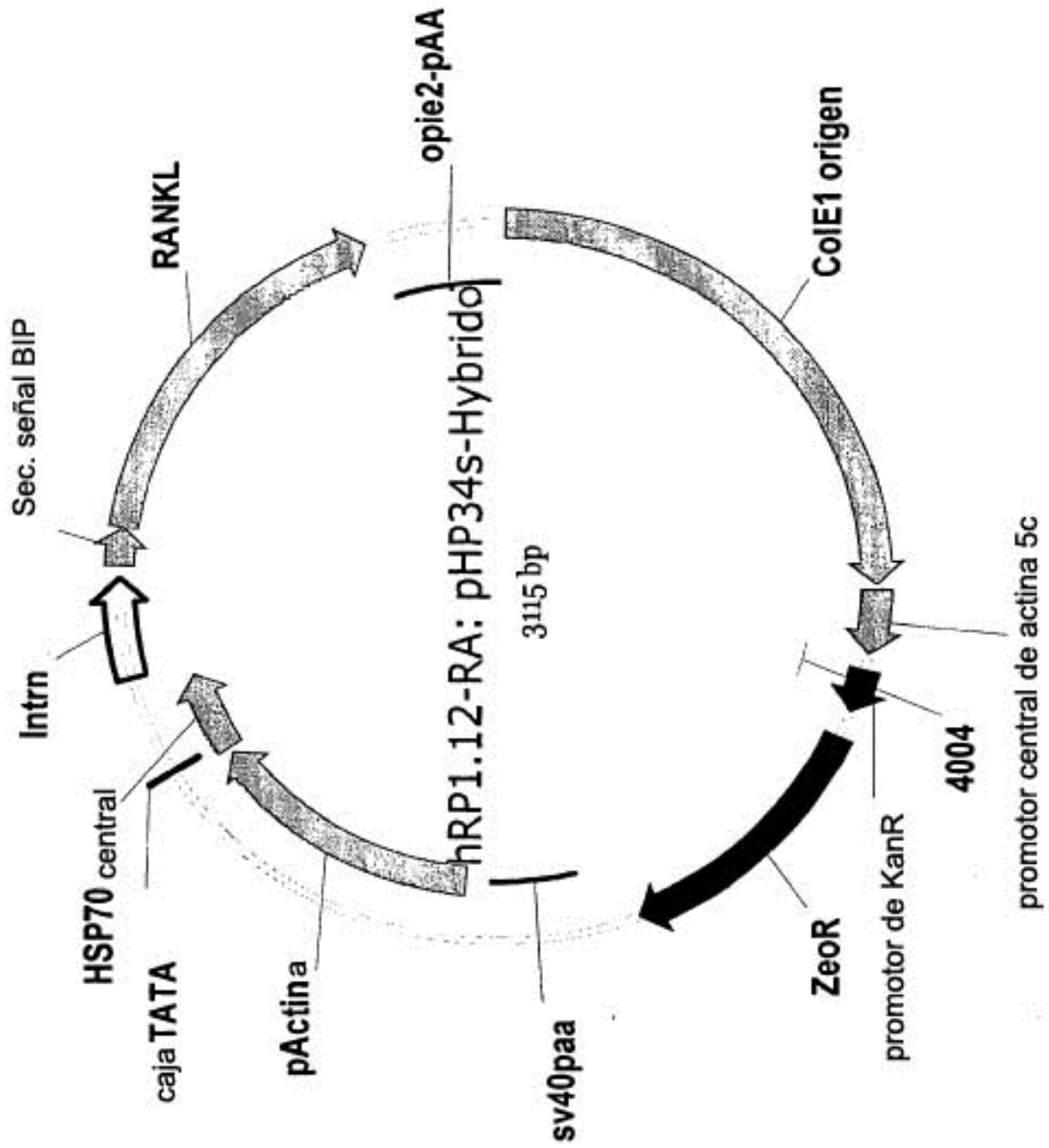
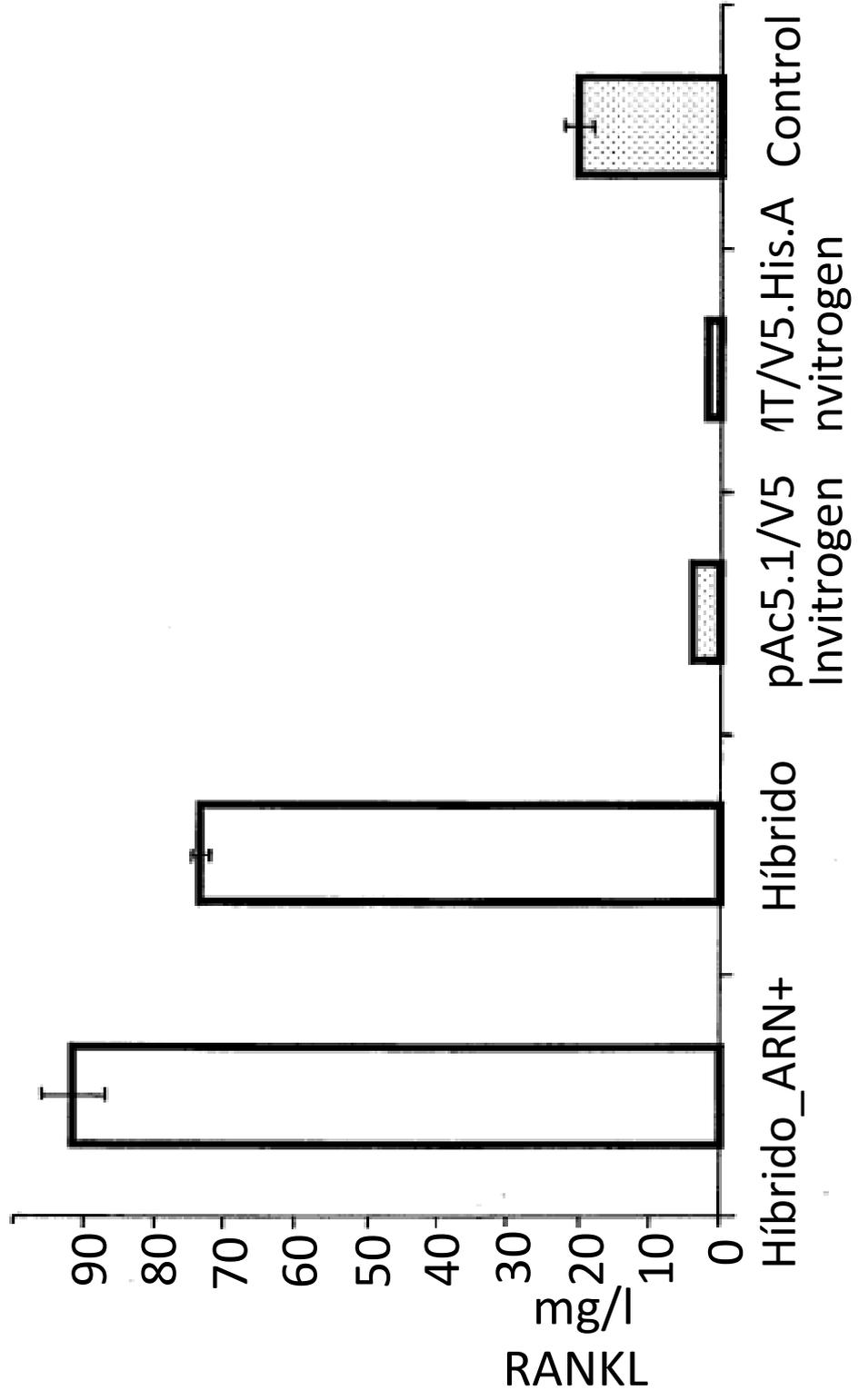


Fig. 12

Fig. 13



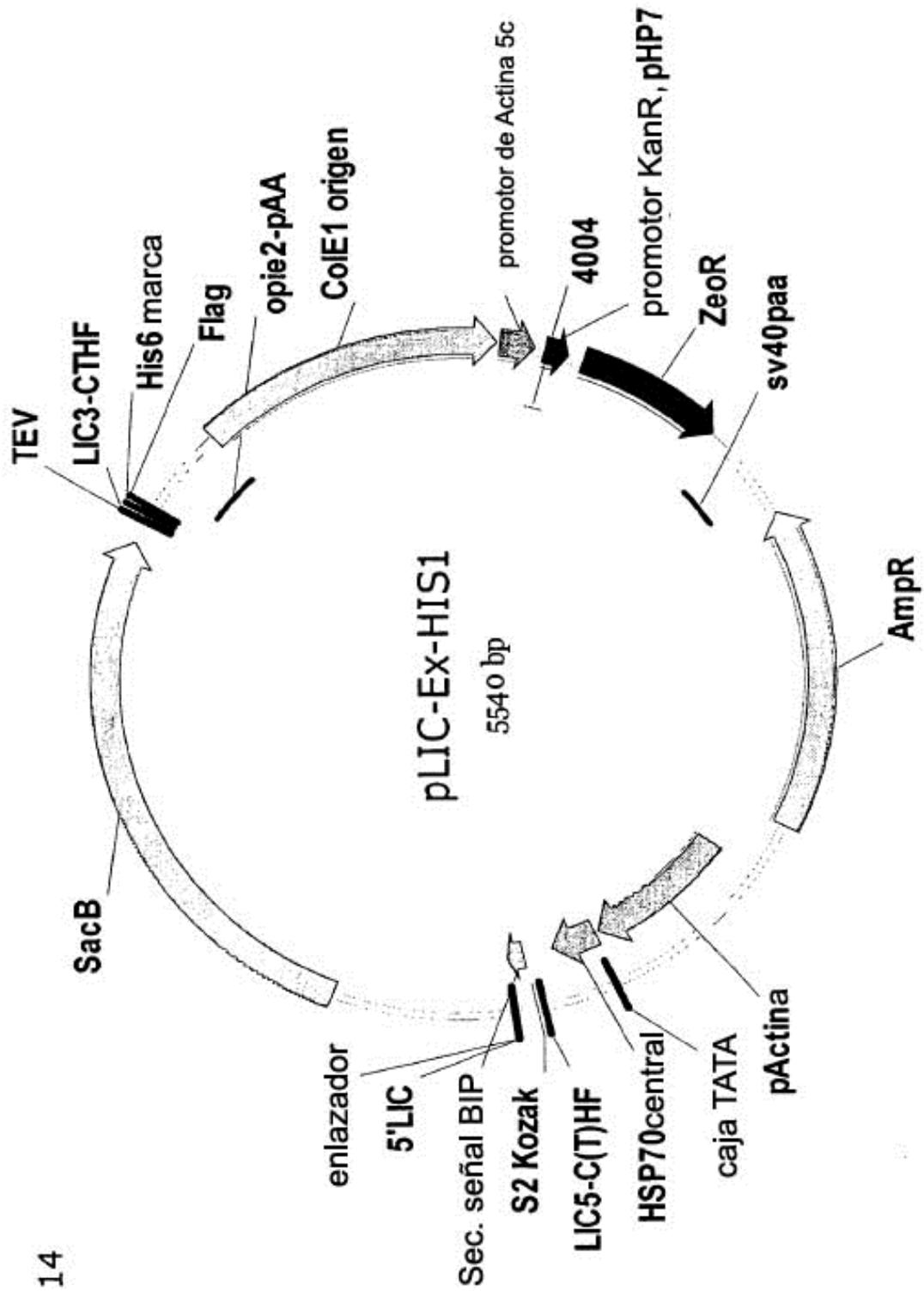


Fig. 14