

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 493**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2004** **E 10186322 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018** **EP 2332972**

54 Título: **Nuevos promotores de la beta-actina y rpS21, y sus usos**

30 Prioridad:

24.06.2003 US 480768 P

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

26.04.2018

73 Titular/es:

GENZYME CORPORATION (100.0%)
500 Kendall Street
Cambridge, MA 02142, US

72 Inventor/es:

ESTES, SCOTT D. y
ZHANG, WEIQUN

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 665 493 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

Nuevos promotores de la beta-actina y rpS21, y sus usos

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere a elementos génicos reguladores, tales como promotores, y a sus usos, por ejemplo para la expresión de proteínas. Más específicamente, esta invención se refiere a promotores de β -actina y del gen de la proteína ribosómica S21.

Antecedentes de la invención

10 Cada gen eucariota contiene elementos reguladores que conduce la transcripción de ese gen. Tales elementos reguladores incluyen promotores, que están típicamente situados inmediatamente en dirección 5' de la secuencia codificante de un gen. Los promotores regulan la transcripción al proporcionar sitios de unión para factores de transcripción, que son una parte de la maquinaria de transcripción. Los promotores se usan habitualmente para expresar proteínas en cultivo celular e *in vivo*. Muchos promotores se conocen y se usan para la expresión de proteínas en diversos sistemas de expresión. Los ejemplos de promotores incluyen el promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV), repeticiones terminales largas de genoma grande del genoma del virus de sarcoma de Rous (RSV), el promotor del virus 40 del simio (SV40), el promotor del gen de interferón, el promotor de metalotioneína, y el promotor de timidina cinasa y otros, por ejemplo como se describe en Fernandez et al. (1999) Gene Expression Systems, Academic Press. Sin embargo, todavía existe la necesidad en la técnica de proporcionar promotores que sean capaces de generar niveles elevados de expresión y/o de sostener la expresión durante un período prolongado de tiempo.

20 La β -actina es una proteína estructural y se expresa habitualmente en todas las especies, desde protozoos a eucariotas, incluyendo seres humanos. Los promotores de β -actina humanos y de pollo se han descrito previamente. El promotor de β -actina, en general, muestra una actividad más ubicua que el promotor de CMV que se usa ampliamente (Xu et al. (2001) Gene 272: 149-156). Se mostró que el promotor de β -actina de pollo exhibe una actividad mayor que los promotores virales de CMV y SV40, pero solamente cuando está enlazado a una secuencia potenciadora de CMV (Xu et al., más arriba).

25 La proteína ribosómica S21 (rpS21) está asociada con la subunidad 40S del ribosoma. El promotor del gen de rpS21 humano se identificó previamente (nº de acceso GenBank® AJ250907). De forma similar a la mayoría de los promotores génicos ribosómicos, carece de elementos de transcripción convencionales tales como la caja TATA y la secuencia CAAT (Smirnova et al. (2000) Bioorg. Khim. 26 (5): 392-396).

30 El número de acceso EMBL AL663027 es la secuencia de ADN completa de ratón del clon RP23-16P3 en el cromosoma 2.

35 El número de acceso EMBL AZ994459 es la secuencia de ADN del clon genómico de *Mus musculus* de la colección UUGC2M de plásmidos de 10kb de ratón 2M0279L21R.

Torok et al. "Down-regulation of RpS21, a putative translation initiation factor interacting with P40, produces viable minute imagos and larval lethality with overgrown hematopoietic organs and imaginal discs" (1999) Mol Cell Bio. 19(3):2308-2321 muestra un alineamiento de aminoácidos de seis proteínas RpS21 en la Figura 6.

40 SUMARIO DE LA INVENCION

La presente descripción proporciona nuevos promotores de β -actina que tienen un nivel bajo de homología de secuencia con promotores de β -actina previamente conocidos (tales como, por ejemplo, humano y de pollo). La presente descripción proporciona además nuevos promotores de rpS21 que tienen un bajo nivel de homología de secuencia con promotores de rpS21 previamente conocidos (tales como, por ejemplo, humano y ratón).

45 La presente descripción se basa, en parte, en el descubrimiento y aislamiento de promotores de β -actina y de rpS21 a partir de la estirpe celular de ovario de hámster chino (CHO). Esta presente descripción se basa además, en parte, en la observación de que el promotor de β -actina de hámster tiene una actividad significativamente mayor que el promotor de CMV. La invención se basa además, en parte, en la observación de que el promotor de rpS21 es al menos tan activo como el promotor de β -actina de hámster cuando se usa para expresar ciertos genes. La presente descripción proporciona secuencias nucleotídicas para estos promotores, e incluye variantes de las secuencias nucleotídicas que tienen actividad promotora. En algunos casos, un promotor de β -actina de la presente descripción deriva de un roedor, por ejemplo hámster, rata, y ratón. El promotor de rpS21 deriva típicamente de un hámster.

55 La presente descripción proporciona además vectores que comprenden un promotor de β -actina o un promotor de rpS21 de la presente descripción ligado operablemente a un ácido nucleico heterólogo. En ciertos casos, un vector de la presente descripción comprende un promotor que está ligado operablemente a un ácido nucleico heterólogo

que codifica un producto de expresión heterólogo tal como, por ejemplo, una proteína terapéutica o un fragmento de la misma. En casos ilustrativos, el producto de expresión es esfingomielinasa ácida (ASM), α -glucosidasa (GAA), o activador de plasminógeno tisular (tPA).

5 La invención también proporciona células hospedantes transfectadas con un vector de la invención. En realizaciones ilustrativas, la célula hospedante es una célula de mamífero tal como, por ejemplo, CHO, HEK, y BHK.

También se proporcionan métodos para producir una proteína. Los métodos para producir una proteína incluyen, por ejemplo, cultivar una célula transfectada con un vector que comprende un promotor de β -actina y/o un promotor de rpS21 de la presente descripción ligado operablemente a un ácido nucleico heterólogo que codifica una proteína, y recuperar la proteína. En algunos casos, el producto de expresión heterólogo es una proteína secretora, que se recupera del medio. En casos ilustrativos, la proteína es ASM, GAA, o tPA.

10

En base a la descripción contenida aquí, la presente invención proporciona un promotor de Rps21 aislado que tiene la secuencia nucleotídica expuesta en SEC ID NO: 39, o una variante de la misma que tiene actividad promotora, en el que la identidad de la variante y de la SEC ID NO: 39 es de al menos 95% a lo largo de toda la longitud de la SEC ID NO: 39.

15 En las reivindicaciones anejas se exponen otros aspectos y otras realizaciones de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1A muestra un alineamiento entre porciones de secuencias nucleotídicas de un promotor de β -actina de hámster (SEC ID NO: 1) y un promotor de β -actina de rata (SEC ID NO: 2), demostrando una identidad de 79% entre nucleótido (nt) 487 a nt 893 de SEC ID NO: 1 y nt 1 a nt 417 de SEC ID NO: 2. El promotor de β -actina de rata (SEC ID NO: 2) tiene una identidad de 67% a lo largo de toda la longitud del promotor de β -actina de hámster (SEC ID NO: 1).

20

La Figura 1B muestra un alineamiento entre porciones de secuencias nucleotídicas de un promotor de β -actina de hámster (SEC ID NO: 1) y un promotor de β -actina de rata (SEC ID NO: 2), demostrando una identidad de 83% entre nt 1047 a nt 3006 de SEC ID NO: 1 y nt 546 a nt 2493 de SEC ID NO: 2.

25 La Figura 2A muestra un alineamiento entre porciones de secuencias nucleotídicas de un promotor de β -actina de hámster (SEC ID NO:1) y un promotor de β -actina de ratón (SEC ID NO:3), demostrando una identidad de 84% entre nt 33 a nt 487 de SEC ID NO:1 y nt 1 a nt 449 de SEC ID NO:3. La secuencia del promotor de β -actina de ratón (SEC ID NO:3) tiene una identidad de 80% a lo largo de toda la longitud de la secuencia del promotor de β -actina de hámster de SEC ID NO:1.

30 La Figura 2B muestra un alineamiento entre porciones de secuencias nucleotídicas de un promotor de β -actina de hámster (SEC ID NO:1) y un promotor de β -actina de ratón (SEC ID NO:3), demostrando una identidad de 83% entre nt 996 a nt 3006 de SEC ID NO:1 y nt 921 a nt 2953 de SEC ID NO:1.

35 La Figura 3 muestra un alineamiento entre porciones de secuencias nucleotídicas de un promotor de β -actina de hámster (SEC ID NO:1) y un promotor de β -actina de hámster (nº de acceso de Genbank® U20114; SEC ID NO:4), demostrando una identidad de 98% entre nt 1775 a nt 3006 de SEC ID NO:1 y nt 1 a nt 1232 de SEC ID NO:4. La secuencia del gen de β -actina de ratón tiene una identidad de 40% a lo largo de toda la longitud de la secuencia del promotor de β -actina de hámster de SEC ID NO:1.

40 La Figura 4 muestra un alineamiento entre porciones de secuencias nucleotídicas de promotor de β -actina de hámster (SEC ID NO:1) y un promotor de β -actina humano previamente conocido (nº de acceso GenBank® gi28337; SEC ID NO:5), demostrando una identidad de 94% entre nt 113 a nt 148 de SEC ID NO:1 y nt 38 a nt 73 de SEC ID NO:5, una identidad de 83% entre nt 362 a nt 433 de SEC ID NO:1 y nt 303 a nt 374 de SEC ID NO:5, una identidad de 90% entre nt 1728 a nt 1764 de SEC ID NO:1 y nt 1791 y nt 1830 de SEC ID NO:5, y una identidad de 91% entre nt 1797 a nt 1966 de SEC ID NO:1 y nt 1840 a nt 2007 de SEC ID NO:5. La secuencia del promotor de β -actina humano (SEC ID NO:5) muestra una identidad de 10% a lo largo de toda la longitud de la secuencia del promotor de β -actina de hámster de SEC ID NO:1.

45

50 La Figura 5 muestra un alineamiento entre porciones de secuencias nucleotídicas de promotor de β -actina de hámster (SEC ID NO:1) y un promotor de β -actina de pollo previamente conocido (nº de acceso GenBank® gi2170437; SEC ID NO:6), demostrando una identidad de 83% entre nt 1878 a nt 1919 de SEC ID NO:1 y nt 186 a nt 227 de SEC ID NO:6. La secuencia del promotor de β -actina de pollo (SEC ID NO:6) muestra una identidad de 1% a lo largo de toda la longitud de la secuencia del promotor de β -actina de hámster de SEC ID NO:1.

La Figura 6A representa una transferencia Northern para galectina, ferritina, y β -actina en células CHO-K1. Los ARNm representativos se aislaron de células a 0, 4, 8, 10, y 15 horas después del tratamiento de las

células con actinomicina D.

La Figura 6B representa niveles de expresión de ARNm relativos para genes de galectina, ferritina, y β -actina. Los ARNm representativos se aislaron de células a 0, 4, 8, 10, y 15 horas después del tratamiento de células CHO-K1 con actinomicina D.

5 La Figura 7A representa potencias relativas del promotor según se mide en ensayos de transfección transitoria en células CHO-K1 para los siguientes promotores: CMV, EF-1 humano, GAPDH de hámster, rpS21 de hámster, y β -actina de hámster. Los promotores representativos se clonaron en dirección 5' de un gen de proteína fluorescente roja (RFP) en el plásmido pDsRED-1. La fluorescencia media se midió mediante FACS.

10 La Figura 7B representa potencias relativas del promotor según se mide en ensayos de transfección estable en células CHO-K1 para los siguientes promotores: CMV, EF-1 humano, GAPDH de hámster, rpS21 de hámster, y β -actina de hámster. Los promotores representativos se clonaron en dirección 5' de un gen de proteína fluorescente roja (RFP) en el plásmido pDsRED-1. La fluorescencia media se midió mediante FACS.

15 La Figura 8A representa la expresión de la proteína esfingomielinasa ácida (ASM) en medio procedente de tres conjuntos de células CHO-DXB11 transfectadas con un vector que contiene el ADNc de ASM operablemente ligado al promotor de CMV o al promotor de β -actina de hámster. La expresión de ASM se evaluó en un ensayo de actividad enzimática para ASM.

20 La Figura 8B representa la expresión de la proteína α -glucosidasa (GAA) en medio procedente de tres conjuntos de células CHO-DXB11 transfectadas con un vector que contiene el ADNc de GAA ligado operablemente al promotor de CMV o al promotor de β -actina de hámster. La expresión de GAA se evaluó en un ensayo de actividad enzimática para GAA.

La Figura 9 representa la expresión de la proteína tPA en medio procedente de conjuntos de células CHO-DXB11 transfectadas con un vector que contiene el ADNc de tPA ligado operablemente al promotor de β -actina de hámster. La expresión de tPA se evaluó usando ELISA.

25 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

A fin de que la presente invención se entienda más fácilmente, se definen en primer lugar ciertos términos. Las definiciones adicionales se exponen a lo largo de la descripción detallada.

30 El término "promotor" se refiere a un elemento regulador que dirige la transcripción de un ácido nucleico al que está ligado operablemente. Un promotor puede regular tanto la velocidad como eficiencia de la transcripción de un ácido nucleico ligado operablemente. Un promotor también puede estar ligado operablemente a otros elementos reguladores que potencian ("potenciadores") o reprimen ("represores") la transcripción de un ácido nucleico dependiente del promotor. La expresión "ligado operablemente" se refiere a un ácido nucleico colocado en una relación funcional con otro ácido nucleico. Un promotor está situado habitualmente 5' (es decir, en dirección 5') de un sitio de iniciación de la transcripción en el ácido nucleico. Un promotor, sin embargo, puede incluir secuencias 3' (es decir, en dirección 3') del sitio de iniciación de la transcripción. Un promotor también puede englobar regiones tanto 5' como 3' del sitio de iniciación de la transcripción del ácido nucleico ligado operablemente.

40 La expresión "actividad promotora" se refiere a la capacidad de un promotor para iniciar la transcripción de un ácido nucleico al que está ligado operablemente. La actividad promotora se puede medir usando procedimientos conocidos en la técnica o como se describe en los Ejemplos. Por ejemplo, la actividad promotora se puede medir como una cantidad de ARNm transcrito usando, por ejemplo, transferencia Northern o reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Como alternativa, la actividad promotora se puede medir como una cantidad de producto proteico traducido, por ejemplo mediante transferencia Western, ELISA, ensayos colorimétricos tales como, por ejemplo, el ensayo de Bradford (Bradford (1976) Anal. Biochem., 72:248), y diversos ensayos de actividad, incluyendo ensayos del gen informador y otros procedimientos conocidos en la técnica o como se describe en los Ejemplos.

45 El término "vector" se refiere a ácido desoxirribonucleico, ácido ribonucleico, o un análogo de ácido nucleico, vírico o no vírico, procariota o eucariota, que es capaz de portar otro ácido nucleico. Un vector puede portar un ácido nucleico en una célula, denominada "célula hospedante", de manera que todo o una parte del ácido nucleico se transcribe o se expresa. Como alternativa, un vector se puede usar en un ensayo de transcripción in vitro. Los vectores se ensamblan frecuentemente como compuestos de elementos derivados de diferentes genes víricos, bacterianos, o de mamíferos. Los vectores contienen diversas secuencias codificantes y no codificantes que incluyen secuencias que codifican marcadores seleccionables (por ejemplo, un gen de resistencia a antibiótico), secuencias que facilitan su propagación en bacterias, o una o más unidades de transcripción que se expresan solamente en ciertos tipos de células. Por ejemplo, los vectores de expresión en mamíferos contienen a menudo tanto secuencias procariotas que facilitan la propagación del vector en bacterias como una o más unidades de transcripción eucariotas que se expresan solamente en células eucariotas. Se apreciará por los expertos en la técnica que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula

hospedante a transformar, del nivel de expresión de proteína deseado, etc.

Los vectores incluyen, por ejemplo, plásmidos, fagómidos, y vectores víricos. Los vectores que tienen un promotor existente se pueden modificar mediante técnicas de ADN recombinante estándar conocidas en la técnica para sustituir el promotor por cualquiera de las secuencias promotoras expuestas en SEC ID NOs:1, 2, 3, o 39, o una variante de las mismas. En general, los vectores adecuados pueden escogerse de aquellos que están comercialmente disponibles, o se pueden construir usando técnicas de ADN recombinante estándar conocidas en la técnica. (Véase, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual: 2nd edition, Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Los términos “transformación” y “transfección” se refieren a la introducción intracelular de un ácido nucleico. Un ácido nucleico se puede introducir en una planta o en una célula de animal o en una célula procariota o eucariota mediante un número de métodos conocidos en la técnica o descritos aquí.

El término “aislado” se refiere a un ácido desoxirribonucleico, un ácido ribonucleico, o un análogo de ácido nucleico que tiene una secuencia polinucleotídica que está separada de otras secuencias de ácido nucleico de tal manera que no aparece de forma natural. Un ácido nucleico aislado engloba ácidos nucleicos que se pueden sintetizar parcial o totalmente de manera química o recombinante y/o se pueden purificar mediante técnicas conocidas en la técnica.

El término “variante”, con referencia a una secuencia promotora, se refiere a una secuencia nucleotídica que es sustancialmente idéntica a lo largo de toda la longitud a la secuencia promotora o a su hebra complementaria a lo largo de toda la longitud de la misma, con la condición de que la variante tenga actividad promotora.

Las variantes de promotores de β -actina pueden tener la misma longitud que las secuencias nucleotídicas de de SEC ID NOs:1, 2, o 3, o más corta, en tanto que tengan una longitud de al menos 1250 nucleótidos. Las variantes de los promotores de rpS21 pueden tener la misma longitud que la secuencia nucleotídica de SEC ID NO:39, o más corta, en tanto que tengan actividad promotora. Las variantes del promotor de β -actina pueden ser de origen natural, por ejemplo promotores de β -actina de origen natural aislados de especies distintas de ser humano y de pollo, o se pueden generar artificialmente. La identidad entre el promotor de β -actina de hámster expuesto en SEC ID NO:1 y una variante del mismo, cuando se alinean óptimamente, es al menos 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% a lo largo de toda la secuencia de SEC ID NO:1 desde nt 1 hasta nt 3007. De forma similar, la identidad entre el promotor de β -actina de rata expuesto en SEC ID NO:2 y una variante del mismo es al menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% a lo largo de toda la secuencia de SEC ID NO:2 desde nt 1 hasta nt 2493. La identidad entre el promotor de β -actina de ratón de SEC ID NO:3 y una variante del mismo es al menos 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% a lo largo de toda la longitud de SEC ID NO:3 desde nt 1 hasta nt 2953. De forma similar, la identidad entre el promotor de rpS21 de hámster expuesto en SEC ID NO:39 y una variante del mismo, cuando se alinean óptimamente, puede ser al menos 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% a lo largo de toda la longitud de SEC ID NO:39 desde nt 1 hasta nt 1958.

Las variantes de promotores de β -actina pueden incluir, por ejemplo, ortólogos de los promotores de β -actina en otras especies, incluyendo roedores y otros mamíferos, pero excluyendo promotores de β -actina de ser humano y de pollo y sus variantes conocidas. Las variantes de los promotores de la presente descripción, incluida la presente invención, también se pueden encontrar en otras especies de roedores, tales como, por ejemplo, cobaya, marmota, rata almizclera, jerbo, ardilla, ardilla rayada, perro de las praderas, castor, puerco espín, y topillo.

Los términos “variantes” engloban además fragmentos de uno cualquiera o más de los promotores de la presente descripción, incluida la presente invención que tienen actividad promotora. Las variantes de los promotores de β -actina tienen al menos 1250 nucleótidos de longitud. Las variantes de los promotores de β -actina de la presente descripción se pueden obtener, por ejemplo, mediante truncamientos de 5' del promotor de β -actina de hámster expuesto en SEC ID NO:1. En algunos casos, las variantes del promotor de β -actina incluyen secuencias de nt 50 a nt 3000, de nt 100 a nt 3000, de nt 150 a nt 3000, de nt 200 a nt 3000, de nt 250 a nt 3000, de nt 500 a nt 3000, de nt 1000 a nt 3000, o de nt 1500 a nt 3000 de SEC ID NO:1. En otros casos, las variantes del promotor de β -actina se pueden obtener mediante truncamientos de 5' de la secuencia expuesta en SEC ID NO:2, e incluyen, por ejemplo, de nt 50 a nt 2490, de nt 100 a nt 2490, de nt 150 a nt 2490, de nt 200 a nt 2490, de nt 250 a nt 2490, de nt 500 a nt 2490, o de nt 1000 a nt 2490 de SEC ID NO:2. Las variantes del promotor de β -actina también se pueden obtener mediante truncamientos de 5' de la secuencia expuesta en SEC ID NO:3, e incluyen, por ejemplo, de nt 50 a nt 2950, de nt 100 a nt 2950, de nt 150 a nt 2950, de nt 200 a nt 2950, de nt 250 a nt 2950, de nt 500 a nt 2950, de nt 1000 a nt 2950, o de nt 1500 a nt 2950 de SEC ID NO:3. Los fragmentos más largos del promotor de β -actina de hámster se pueden obtener, por ejemplo, mediante truncamientos de 5' de la secuencia nucleotídica del promotor de hámster más larga expuesta en SEC ID NO:7. Tales variantes incluyen, por ejemplo, secuencias de nt 50 a nt 3668, de nt 100 a nt 3668, de nt 150 a nt 3668, de nt 200 a nt 3668, de nt 250 a nt 3668, de nt 500 a nt 3668, o de nt 600 a nt 3668.

Las variantes de promotores de rpS21 se pueden obtener mediante truncamientos de 5' y/o truncamientos de 3' de la secuencia expuesta en SEC ID NO:39. Tales variantes incluyen, por ejemplo, secuencias de nt 50 a nt 1958, de nt 100 a nt 1958, de nt 150 a nt 1958, de nt 200 a nt 1958, de nt 250 a nt 1958, de nt 500 a nt 1958, de nt 1000 a nt 1958, de nt 1 a nt 1900, de nt 1 a nt 1850, de nt 1 a nt 1800, de nt 1 a nt 1750, de nt 1 a 1700, de nt 1 a nt 1600, o de nt 1 a nt 1500.

En ciertos casos, un promotor de β -actina de la presente descripción comprende un tramo contiguo de al menos 1250, 1500, 1550, 1600, 1650, 1700, 1750, 1800, 1850, 1900, 1950, 2000, 2500, o 3000 nucleótidos de SEC ID NOs: 1, 2, o 3. Tales tramos contiguos de SEC ID NOs: 1, 2, y 3 también pueden contener una mutación (inserción o supresión) en tanto que la secuencia mutante retenga al menos cierta funcionalidad de la secuencia original y la capacidad para hibridarse a las secuencias respectivas de SEC ID NOs: 1, 2, o 3 en condiciones de restricción baja, media o alta. Un tramo contiguo de un promotor de β -actina se puede obtener mediante truncamientos de 5' de cualquiera de las secuencias expuestas en SEC ID NO: 1, 2, 3, o 7 o sus variantes como se describe anteriormente.

En otros casos, un promotor de rpS21 de la presente descripción comprende un tramo contiguo de al menos 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1850, o 1900 nucleótidos de SEC ID NO: 39.

Las variantes del promotor de β -actina de la presente descripción incluyen además secuencias nucleotídicas que se hibridan a toda la longitud de las secuencias del promotor de β -actina mostradas en SEC ID NOs: 1, 2, o 3, o sus complementos, y que tienen como máximo 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45% de desemparejamientos de pares de bases. Las variantes del promotor de rpS21 de la presente descripción incluyen secuencias nucleotídicas que se hibridan a toda la longitud de la secuencia del promotor de rpS21 mostrada en SEC ID NO:39, o su complemento, y que tienen como máximo 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 45, 50, 55, 60% de desemparejamientos de pares de bases. El porcentaje de desemparejamientos de pares de bases se puede determinar mediante técnicas estándar conocidas en la técnica, o como se describe aquí. El término "heterólogo", cuando se usa con referencia a un ácido nucleico, significa un ácido nucleico distinto del ácido nucleico al que está ligado operablemente un promotor en un genoma de origen natural. Por ejemplo, el término "heterólogo" se refiere a cualquier ácido nucleico distinto del gen de β -actina de hámster cuando tal ácido nucleico está ligado operablemente a un promotor de β -actina de hámster. Igualmente, el término "heterólogo" se refiere a cualquier ácido nucleico distinto del gen de β -actina de rata cuando tal ácido nucleico está ligado operablemente a un promotor de β -actina de rata. De forma similar, el término "heterólogo" se refiere a cualquier ácido nucleico cuando tal ácido nucleico está ligado operablemente al promotor de β -actina de ratón. De forma análoga, este término también se refiere a cualquier ácido nucleico distinto del gen de rpS21 de hámster cuando tal ácido nucleico está ligado operablemente a un promotor de rpS21 de hámster.

El término "transgénico" se refiere a cualquier animal que contiene células manipuladas genéticamente en las que un promotor de la invención ya no está ligado operablemente al mismo ácido nucleico como en un genoma de origen natural. El término "transgénico" engloba, por ejemplo, un animal que contiene células con un promotor de la invención o una variante del mismo integrado en el cromosoma del animal. El término "transgénico" también engloba un animal que contiene células con una secuencia de ADN que se replica extracromosómicamente que comprende un promotor de la invención o una variante del mismo. El animal transgénico puede ser un mamífero, tal como un roedor o un ser humano.

Esta invención se basa, en parte, en el descubrimiento y aislamiento de nuevos promotores para los genes de β -actina y de rpS21. Específicamente, esta presente descripción presenta promotores de β -actina de roedor, incluyendo, pero sin limitarse a, hámster, rata y ratón, y el promotor de rpS21 de hámster. Esta invención se basa en el descubrimiento y demostración de que los promotores de β -actina de la presente descripción tienen actividad promotora que es mayor que la actividad del promotor de CMV, como se describe en los Ejemplos. La invención se basa además en el descubrimiento de que el promotor de rpS21 de hámster es al menos tan activo como el promotor de β -actina de hámster cuando se usa para expresar ciertos genes.

La presente descripción proporciona secuencias nucleotídicas para promotores de β -actina de roedor, incluyendo hámster, rata y ratón, y métodos de uso de las mismas. La presente descripción proporciona además métodos para la identificación y aislamiento de variantes de promotores de la invención, incluyendo homólogos y fragmentos de promotores que tienen actividad promotora. Adicionalmente, la invención proporciona una secuencia nucleotídica para el promotor de rpS21 de hámster, y métodos de uso de la misma.

En los experimentos que conducen a la presente invención, un clon genómico para el promotor de β -actina de hámster se aisló a partir de células CHO tras su identificación como un promotor activo mediante una técnica denominada Análisis en Serie de Expresión Génica o "SAGE" (Valculesco et al. (1995) Science, 270: 484-487 y Valculesco et al. (1987) Cell, 88: 243-251). La técnica de SAGE se puede usar para la obtención del perfil de transcripción de todo el genoma. El promotor de β -actina se identificó como uno de los promotores más activos en células CHO usando SAGE. Esto condujo a la clonación del promotor para β -actina en células CHO. Se usó un enfoque similar para el aislamiento del promotor de rpS21 de hámster a partir de células CHO. Este enfoque se puede usar para la obtención del perfil de transcripción de otros genoma para confirmar que los promotores de β -

actina o promotor de rpS21 correspondientes son activos en otro genoma. Tal promotor se puede clonar usando técnicas estándar conocidas en la técnica, o aquellas descritas aquí. Las variantes de promotores de la presente descripción se pueden identificar mediante hibridación a una o más de las secuencias promotoras expuestas en SEC ID NOs: 1, 2, 3, o 39. Es bien conocido que la temperatura de fusión (T_m) de un ácido nucleico bicatenario disminuye 1-1,5°C cada 1% de disminución de la homología (véase, por ejemplo, Bonner et al. (1973) J. Mol. Biol., 81: 123). Por lo tanto, los homólogos de las especies se pueden identificar, por ejemplo, hibridando una secuencia nucleotídica putativa con una secuencia nucleotídica de SEC ID NOs: 1, 2, 3, o 39, o una variante de la misma, y comparando la temperatura de fusión de tal híbrido con la temperatura de fusión de un híbrido que comprende una secuencia nucleotídica de SEC ID NOs: 1, 2, 3, o 39, o una variante de la misma, y una secuencia nucleotídica complementaria. El número de desemparejamientos de pares de bases se puede calcular entonces para el híbrido de ensayo. Por lo tanto, una menor diferencia entre las temperaturas de fusión del híbrido de ensayo y un híbrido que contiene un homólogo putativo de una cualquiera de las secuencias en SEC ID NOs: 1, 2,3, o 39, indicará una mayor homología entre la secuencia nucleotídica putativa y una secuencia promotora de la presente descripción. Por ejemplo, las variantes en otras especies de roedores, tales como cobaya, marmota, rata almizclera, jerbo, ardilla rayada, perro de las praderas, castor, puerco espín, y topillo, pueden exhibir una mayor homología con promotores de la presente descripción y sus variantes.

Se sabe que una variedad de factores afectan a la eficiencia de hibridación de dos hebras de secuencia nucleotídica. Estos pueden incluir, por ejemplo, la longitud de la secuencia nucleotídica, la concentración de sal y el contenido de G/C de las secuencias. Por ejemplo, para la hibridación de fragmentos largos de ADN, Howley et al. (1979) J. Biol. Chem., 254: 4876, determinaron que la temperatura de fusión a la que 50% de un ADN se hibrida a una hebra complementaria se define mediante:

$$T_m = 81,5 + 16,6 \log M + 41 (\%G + \%C) - 500/L - 0,62F$$

en la que

M es la concentración molar de cationes monovalentes;

(%G + %C) es la fracción respectiva de nucleótidos G y C en las secuencias;

L es la longitud del ADN híbrido; y

F es la concentración molar de formamida.

Las condiciones de hibridación apropiadas se pueden seleccionar por los expertos en la técnica con una experimentación mínima, como se ejemplifica en Ausubel et al. (1995) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, secciones 2, 4, y 6. Adicionalmente, las condiciones restrictivas se describen en Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Press, capítulos 7, 9, y 11.

Un ejemplo no limitante de condiciones de hibridación de baja restricción es como sigue. Los filtros que contienen ADN se pretratan durante 6 h a 40°C en una disolución que contiene 35% de formamida, 5 x SSC, 50 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM de EDTA, 0,1% de PVP, 0,1% de Ficoll™, 1% de BSA, y 500 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado. Las hibridaciones se llevan a cabo en la misma disolución con las siguientes modificaciones: se usa 0,02% de PVP, 0,02% de Ficoll™, 0,2% de BSA, 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón, 10% (peso/vol) de sulfato de dextrano, y 5-20 x 10⁶ sonda marcada con ³²P. Los filtros se incuban en mezcla de hibridación durante 18-20 h a 40°C, y después se lavan durante 1,5 horas a 55°C en una disolución que contiene 2 x SSC, 25 mM de Tris-HCl (pH 7,4), 5 mM de EDTA, y 0,1% de SDS. La disolución de lavado se sustituye por disolución reciente y se incuba durante 1,5 horas adicionales a 60°C. Los filtros se secaron y se expusieron para autorradiografía. Se pueden usar otras condiciones de baja restricción bien conocidas en la técnica (por ejemplo, como se emplean para hibridaciones de entre especies).

Un ejemplo no limitante de condiciones de hibridación de restricción elevada es como sigue. La prehibridación de filtros que contienen ADN se lleva a cabo durante 8 h toda la noche a 65°C en tampón que contiene 6 x SSC, 50 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM de EDTA, 0,02% de PVP, 0,02% de Ficoll™, 0,02% de BSA, y 500 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado. Los filtros se hibridan durante 48 horas a 65°C en la mezcla de prehibridación que contiene 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y 5-20 x 10⁶ cpm de sonda marcada con ³²P. El lavado de los filtros se realiza a 37°C durante 1 hora en una disolución que contiene 2 x SSC, 0,01% de PVP, 0,01% de Ficoll™, y 0,01% de BSA. Esto fue seguido de un lavado en 0,1 x SSC a 50°C durante 45 minutos.

Un ejemplo no limitante de condiciones de hibridación de restricción moderada incluye prelavar los filtros en 5 x SSC, 0,5% de SDS, 1,0 mM de EDTA, pH 8,0; hibridar en 50% de formamida, 6 x SSC a 42°C; y lavar los filtros en 0,5 x SSC, 0,1% de SDS a 60°C.

Las variantes de los promotores de la presente descripción también se pueden identificar mediante el porcentaje de identidad entre secuencias nucleotídicas para variantes putativas y las secuencias expuestas en SEC ID NOs: 1, 2, 3, o 39, o sus hebras complementarias. El porcentaje de identidad se puede determinar, por ejemplo, mediante inspección visual o usando diversos programas de ordenador conocidos en la técnica, o como se describe en los

- Ejemplos. Por ejemplo, el porcentaje de identidad de dos secuencias nucleotídicas se puede determinar comparando la información de secuencia usando el programa de ordenador GAP descrito por Devereux et al. (1984) Nucl. Acids. Res., 12: 387 y disponible en la University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWGCG). El porcentaje de identidad también se puede determinar alineando dos secuencias nucleotídicas usando el programa BLAST® (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) como se describe por Tatusova et al. (1999) FEMS Microbiol. Lett., 174: 247. Por ejemplo, para alineamientos de secuencias nucleotídicas usando el programa BLAST®, los ajustes por defecto son los siguientes: el premio para emparejamiento es 2, la penalización para desemparejamiento es -2, las penalizaciones de apertura de salto y de extensión de salto son 5 y 2 respectivamente, el valor de *X-dropoff* del salto es 50, el valor esperado es 10, el tamaño de palabra es 11, y el filtro está OFF.
- Los promotores de la presente descripción identificados mediante identidad de secuencia incluyen, por ejemplo, secuencias expuestas en SEC ID NOs: 2 y 3 para promotores de β -actina de rata y de ratón, que muestran 67% y 80% de identidad, respectivamente, con nt 1 a nt 3007 de la secuencia del promotor de β -actina de hámster expuesta en SEC ID NO:1. Se pueden identificar fácilmente variantes adicionales usando las diversas técnicas descritas aquí y aquellas conocidas en la técnica.
- El porcentaje de identidad entre el promotor de β -actina de hámster (SEC ID NO:1) y promotores de β -actina conocidos se puede determinar como se describe. Por ejemplo, cuando SEC ID NO:1 se compara con el promotor de β -actina humano (SEC ID NO:5) usando el alineamiento de secuencias BLAST® con parámetros por defecto, exhibe solamente alrededor de una identidad de 10% a lo largo de toda la longitud de SEC ID NO:1. De forma similar, cuando SEC ID NO:1 se compara con el promotor de β -actina de pollo (SEC ID NO:6), exhibe solamente alrededor de 1% de identidad a lo largo de toda la longitud de SEC ID NO:1. Debido a tales niveles bajos de homología, los promotores de β -actina humano y de pollo no se consideran variantes de la secuencia del promotor de β -actina de hámster de SEC ID NO:1. Además, la porción de 3' de SEC ID NO:1 muestra homología significativa con la porción de 5' de la secuencia del gen de β -actina de hámster (nº de acceso de GenBank® U20114; SEC ID NO:4). En particular, los primeros 1232 nucleótidos de SEC ID NO:4 muestran una identidad de 98% con la porción de 3' de SEC ID NO:1, como se representa en la Figura 3. Esta identidad está en la región del primer intrón en el gen de β -actina de hámster. En conjunto, SEC ID NO:4 muestra solamente 40% de identidad a lo largo de toda la longitud de SEC ID NO:1. Además, no se ha descrito actividad promotora para SEC ID NO:4, o fragmentos de la misma.
- Usando el alineamiento de secuencias BLAST® con parámetros por defecto, no se detectó homología entre el promotor de rpS21 humano previamente conocido (nt 1-2344 de nº de acceso GenBank® AJ250907) y nt 1 a 1958 de promotor de rpS21 de hámster de SEC ID NO:39. Se detecta un nivel muy bajo de homología entre el promotor de rpS21 de hámster de SEC ID NO:39 y ADN genómico de ratón que abarca el gen de rpS21 de ratón (nº de acceso GenBank® NT_039212). Hay dos regiones de homología en las secuencias de ratón. La primera va de nt 1775 a nt 1945 de SEC ID NO:39 (137 de 172 nts coinciden). La segunda va de nt 580 a nt 851 de SEC ID NO:39 (208 de 274 nts coinciden). Estas dos regiones de homología están separadas por 923 nts en la secuencia de hámster (SEC ID NO:39) y por 1745 nts en la secuencia genómica de ratón (NT_039212).
- En consecuencia, en algunas realizaciones, un promotor aislado o una variante del mismo que tiene actividad promotora comprende la secuencia o secuencias nucleotídicas como se exponen desde nt 1775 a nt 1945 de SEC ID No: 39, y/o de nt 580 a nt 851 de SEC ID NO: 39. Opcionalmente, tal promotor o variante comprende además toda o una porción de SEC ID NO:39 como se expone desde nt 852 a nt 1774.
- Las secuencias nucleotídicas expuestas en SEC ID NOs: 1, 2, 3, o 39, o sus variantes, se pueden usar como sondas para identificar bibliotecas genómicas para el aislamiento de secuencias genómicas que se hibridan a una o más de las secuencias expuestas en SEC ID NOs: 1, 2, 3, o 39, o sus variantes.
- Un promotor, según la invención, o una variante del mismo, está ligado operablemente a un ácido nucleico heterólogo que lo expresa. El promotor se puede usar solo o en combinación con otros elementos reguladores tales como, por ejemplo, potenciadores y represores. Como alternativa, tal promotor se puede integrar en el genoma de una célula hospedante o de un animal, para expresar de ese modo un gen endógeno en el hospedante. Un promotor según la invención se puede usar en un vector para la expresión de ácidos nucleicos heterólogos. En ciertas realizaciones, el ácido nucleico heterólogo codifica una proteína terapéutica. Los ejemplos de proteínas terapéuticas incluyen, pero no se limitan a, α -glucosidasa, esfingomielinasa ácida, insulina, activador de plasminógeno tisular, hormona estimulante de la tiroides, eritropoyetina, glucocerebrosidasa, α -galactosidasa, y diversos anticuerpos. Los ejemplos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos que se unen a miembros de la familia de TGF- β , tales como, por ejemplo, TGF- β -1, 2, y 3.
- Esta invención proporciona además vectores que comprenden un promotor de la invención o una variante del mismo que tiene actividad promotora. En algunas realizaciones, los vectores de la invención incluyen un sitio de enzima de restricción adecuado en dirección 3' del promotor, para la inserción del ácido nucleico heterólogo. Tal sitio de enzima de restricción puede incluir un sitio de restricción para una única enzima de restricción, o puede incluir sitios de restricción para una variedad de enzimas de restricción a fin de facilitar la inserción de muchos ácidos nucleicos heterólogos diferentes. Un vector según la invención también puede contener una secuencia de poliadenilación en

dirección 3' del sitio para insertar un ácido nucleico heterólogo. Los vectores que comprenden promotores de la invención también pueden contener elementos de ADN procariotas para la replicación bacteriana, y un marcador de selección por antibióticos para el crecimiento y selección del vector en células bacterianas, y elementos de ADN adicionales que controlan el procesamiento de transcritos, tales como, por ejemplo, señales de terminación. Los vectores pueden contener además secuencias de ADN para dirigir la secreción de una proteína fuera de las células hospedantes.

En ciertas realizaciones, un vector que contiene una secuencia promotora de la invención es un vector bicistrónico. Se diseñan vectores bicistrónicos de manera que dos ácidos nucleicos se puedan transcribir para producir un único transcrito. Tal transcrito contiene habitualmente una primera porción que es traducida en una proteína, y una segunda porción traducida en una segunda proteína. Una proteína puede ser una proteína de interés, tal como una proteína terapéutica, y una segunda proteína se puede usar como un marcador seleccionable. Los vectores bicistrónicos contienen habitualmente un promotor y un sitio interno de entrada al ribosoma o IRES situado entre dos ácidos nucleicos. Esto permite la transcripción de los dos ácidos nucleicos como un único ARNm bicistrónico. De esta manera, se puede construir un vector que incluye un promotor de β -actina de la presente descripción, o una variante del mismo, y un IRES entre dos ácidos nucleicos heterólogos. Un vector bicistrónico que contiene un promotor de β -actina de la presente descripción, o una variante del mismo, se puede usar para expresar una proteína terapéutica tal como, por ejemplo, esfingomielinasa ácida o α -glucosidasa, junto con un gen informador.

La presente descripción proporciona además ensayos para identificar aquellas variantes de promotores de β -actina y de rpS21 de la presente descripción que tienen actividad promotora. Por ejemplo, un promotor de la invención o variante del mismo se inserta en un vector adecuado en dirección 5' de un gen informador, y la expresión del gen informador se usa como un determinante de la actividad promotora. Por ejemplo, para la identificación de variantes de promotores de la invención que tienen actividad promotora, tal variante se clona en dirección 5' de un gen informador. Un gen informador puede codificar una enzima que cataliza una reacción que produce una señal visualmente detectable. Los ejemplos de tales genes informadores incluyen β -galactosidasa y luciferasa. Los ejemplos de otros genes informadores incluyen fosfatasa alcalina, nopalina sintasa, octopina sintasa, β -glucuronidasa, cloranfenicol acetiltransferasa. En los Ejemplos expuestos más abajo, un gen informador que codifica una proteína fluorescente roja (RFP) de *Discosoma striata* se usa para medir la actividad promotora. Los expertos en la técnica, sin embargo, pueden usar cualquier gen informador y técnica de ensayo adecuados para determinar la actividad promotora. La expresión de un gen informador a partir del promotor se puede evaluar en un sistema de expresión in vitro, o puede ser intracelular (por ejemplo, in vivo).

La invención proporciona además células hospedantes que se han transfectado con un vector de la invención que comprende un promotor ligado operablemente a un gen heterólogo. Tal célula hospedante puede ser una célula procariota o una célula eucariota. Las células hospedantes pueden ser células en cultivo, o pueden estar presentes en un animal no humano. Los ejemplos de células hospedantes en cultivo incluyen, pero no se limitan a, células HeLa, células CHO, NS0, células HEK, células BHK, NIH-3T3, células MDCK, y células COS. Las células hospedantes en cultivo se pueden hacer crecer en suspensión o en microportadores, como se describe en los Ejemplos.

Para introducir ácidos nucleicos de la invención en una célula hospedante, se pueden usar muchos métodos adecuados. Los vectores que comprenden secuencias promotoras de la invención se pueden introducir en células procariotas o eucariotas. Los ejemplos de técnicas que se pueden usar para la introducción de ácidos nucleicos en células eucariotas incluyen, por ejemplo, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediante DEAE-dextrano, electroporación, transfección mediada por liposomas, transducción usando vectores víricos, etc.

Para la producción de proteínas usando promotores de la invención, se pueden emplear muchos sistemas de expresión adecuados. Uno de tales sistemas de expresión emplea un gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) que se introduce en el vector que comprende un promotor de la invención o una variante del mismo ligado operablemente a un ácido nucleico heterólogo. Como alternativa, un vector de expresión que expresa DHFR se puede cotransfectar en la célula hospedante, si se usa para la expresión una célula deficiente en DHFR. Cuando se aplican concentraciones crecientes de metotrexato (MTX), un inhibidor competitivo de la enzima esencial DHFR, a las células transfectadas, solamente sobreviven las células con mayores niveles de expresión de DHFR. A medida que se incrementan adicionalmente los niveles de MTX, solamente sobreviven las células que amplifican el número de copias del gen de DHFR. De esta manera, incrementando el número de copias del vector que comprende el promotor, se puede lograr una mayor expresión del ácido nucleico heterólogo, conduciendo de ese modo a mayor producción de proteína. Un segundo sistema de expresión emplea un gen de glutamina sintetasa (GS) que se introduce en el vector que comprende un promotor de la invención o una variante del mismo ligado operablemente a un ácido nucleico heterólogo. La adición de un inhibidor competitivo de GS, por ejemplo metionina sulfoximina (MSX), se usa para incrementar el número de copias del vector que conduce a una mayor producción de proteína.

Cualquier sistema para la expresión de proteínas usando promotores de la invención, se puede usar cualquier sistema de expresión procariota o eucariota adecuado. Los ejemplos de sistemas de expresión incluyen, pero no se limitan a, sistemas de expresión vegetales, de baculovirus, de levadura, bacterianos, de *Drosophila*, de mamíferos, y sistemas de expresión libres de células. Los métodos estándar para introducir vectores de expresión en células de

mamíferos, bacterianas, de levadura, de insectos y vegetales se proporcionan, por ejemplo, por Ausubel (1995), más arriba.

5 En ciertas realizaciones, los promotores de la invención y sus variantes se usan en métodos de terapia génica. Por ejemplo, un promotor de la invención o una variante del mismo se clona en un vector de terapia génica vírico o no vírico de manera que esté ligado operablemente a un gen de interés. El promotor dirige la expresión del gen que codifica una proteína terapéutica cuando el vector se suministra a un sujeto, por ejemplo un paciente humano.

10 Los siguientes ejemplos proporcionan casos ilustrativos de la presente descripción, incluida la presente invención. Alguien de pericia normal en la técnica reconocerá las numerosas modificaciones y variaciones que se pueden llevar a cabo. Tales modificaciones y variaciones están englobadas dentro del alcance de la presente descripción. Los ejemplos no limitan de ningún modo la presente descripción.

EJEMPLOS

Lo siguiente describe materiales y métodos usados en los Ejemplos subsiguientes.

A. Cultivo de células CHO-K1

15 Las células CHO-K1 se obtuvieron de la American Type Culture Collection (Manassas, VA) (ATCC nº CRL-9618). Las células se cultivaron en cultivos de agitación de 250 ml que contienen 15 g/l de microportadores DE-52 (Whatman, Kent, UK) en medio de cultivo celular 925 suplementado con 10% de suero de ternera donante (DCS) (Invitrogen). Las células se mantuvieron a 37°C usando una capa de 20-40% de O₂ y 5% de CO₂, y se agitaron a aproximadamente 60 rpm durante seis días. Tras el crecimiento de las células en presencia de suero, los cultivos se sometieron a una renovación diaria del 80% (v/v) con medio 925 libre de suero. Las células se hicieron crecer en medio libre de suero durante 11 días antes de la extracción del ARN de las células. Para la determinación de la semivida del ARNm, se añadieron 7 mg/ml de actinomicina D a los cultivos en la fase libre de suero.

B. Extracción y análisis del ARN

25 El ARN se aisló de células CHO-K1 usando el kit RNAagents de Promega (Madison, WI). La expresión génica se analizó mediante transferencia Northern. Para el análisis de transferencia Northern, se separaron 5 µg de ARN mediante electroforesis en un gel desnaturalizante de glicoxal/dimetilsulfóxido usando un kit NorthernMax®-Gly (Ambion, Austin, TX). El ARN se transfirió subsiguientemente a membranas de nailon (Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania). Las transferencias se sondaron con las siguientes sondas génicas amplificadas mediante PCR: galectina (nº de acceso GenBank® M96676, nt 14-383); β-actina (nº de acceso Genbank® U20114, nt 238-381); EF-1 (nº de acceso GenBank® D00522, nt 7-192); rpS21 (nº de acceso GenBank® X79059, nt 68-340); ferritina (nº de acceso GenBank® M99692, nt 182-303) o un fragmento comercialmente disponible de glicerilaldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (Ambion, Austin, TX). Cada producto de PCR se radiomarcó mediante cebado aleatorio. Los cebadores de la PCR usados para la amplificación de cada uno de los genes se dan en la Tabla 1.

TABLA 1

Gen	Cebador	Secuencia	SEC ID NO:
β-actina	directo	GCTCTTTCTTCGCCGCTCC	8
β-actina	inverso	ACCACCCTCCAGCCTTCCC	9
EF-1	directo	GAACGCAGGTGTTGTGAAAA	10
EF-1	inverso	CTCGGCAGCCTCCTTCT	11
rpS21	directo	GTGGACCTGTACGTGC	12
rpS21	inverso	TTCTCACTTTTATTTATGAC	13
ferritina	directo	CGCCAGAACTACCACCAGGAC	14
ferritina	inverso	TTCAGAGCCACATCATCCCG	15
galectina	directo	TGGTCGCAAGCAACCTGAATC	16
galectina	inverso	TTGAAGTCACCGTCTGCCGC	17

35 C. Transfección de células CHO-K1

Para la transfección transitoria, se colocaron células CHO-K1 en placas de 6 pocillos en medio 925 con 10% de suero fetal bovino (FBS) (Invitrogen). Las células se hicieron crecer hasta 50-75% de confluencia antes de la transfección usando Lipofectamine™ (Invitrogen). El plásmido pDsRED-1 (Clontech, Palo Alto, CA) se cotransfectó con el plásmido pSV40-CD20, que codifica un marcador CD20 de la superficie celular usado para identificar células transfectadas. Este plásmido pDsRED-1 codifica una proteína fluorescente roja (RFP) de *Discosoma striata*, cuya expresión se puede detectar mediante FACS. Las transfecciones se llevaron a cabo según las instrucciones del fabricante. De forma breve, las células se incubaron con complejos de lípido-ADN durante 16 h en medio Opti-MEM™ libre de suero (Invitrogen). El medio se renovó con medio 925 con 10% de FBS, y las células se cosecharon 48 horas después de la transfección.

10 D. Análisis de clasificación celular activada por fluorescencia

Para el análisis de FACS, 1×10^6 células se tripsinizaron y se lavaron con PBS fría que contiene 2% de FBS. Las células se incubaron subsiguientemente con un anticuerpo anti-CD20 marcado con FITC (Pharmingen, San Diego, CA) durante 30 minutos en hielo. Las células se lavaron entonces con PBS fría que contiene 2% de FBS, y se resuspendieron en 1 ml de PBS frío/2% de FBS. El análisis de FACS se llevó a cabo usando FACSCalibur™ (BD Biosciences, San Diego, CA). Todos los sucesos positivos para CD20 se evaluaron en busca de la intensidad de fluorescencia media de la proteína fluorescente roja, para evaluar la potencia del promotor.

E. Ensayo de ASM

Se incubaron a 37°C medios de células transfectadas con un vector que codifica esfingomielinasa ácida (ASM) con el sustrato sintético 2-(N-hexadecanoilamino)-4-nitrofenilfosforilcloro (Calbiochem, San Diego, CA) a la concentración de 12,5 mM en acetato de sodio 250 mM, pH 5,5, que contiene acetato de cinc 0,1 mM, seroalbúmina bovina (BSA) 0,25 mg/ml, y Tween 20 al 0,15%. Las reacciones se detuvieron mediante adición de 0,2 M de glicina-NaOH que contiene 50% de etanol. La actividad o cantidad de ASM se midió mediante la cantidad de 2-(N-hexadecanoilamino)-4-nitrofenolato producida, usando un ensayo colorimétrico midiendo la densidad óptica a 415 nm.

25 F. Ensayo de GAA

Se incubaron a 37°C medios procedentes de células transfectadas con un vector que codifica α -glucosidasa (GAA) con el sustrato sintético p-nitrofenil-D- α -glucopiranosido (Sigma, St. Louis, MO) a una concentración de 40 mM en acetato de sodio 50 mM, pH 4,3, que contiene seroalbúmina bovina (BSA) al 0,1%. Las reacciones se detuvieron mediante adición de glicina 0,3 M, pH 10,6. La actividad o cantidad de GAA se midió mediante la cantidad de p-nitrofenilo producida, usando un ensayo colorimétrico midiendo la densidad óptica a 400 nm.

Ejemplo 1: Identificación del promotor de β -actina en células CHO-K1

Se usó el Análisis en Serie de Expresión Génica (SAGE) para analizar todo el perfil de transcripción de células CHO-K1 que se hicieron crecer en cultivo de agitación perfundido libre de suero.

La primera etapa en SAGE implicó la síntesis de ADN bicatenario a partir de ARNm aislado de células CHO-K1 usando técnicas estándar. El ADNc se escindió subsiguientemente con la endonucleasa de restricción NlaIII, también denominada una enzima de anclaje, que se espera que escinda la mayoría de los transcritos al menos una vez. La porción de 3' de cada ADNc escindido se aisló mediante unión a perlas de estreptavidina. El conjunto de ADNc se dividió entonces a la mitad y se ligó vía el anclaje del sitio de restricción a un ligador que contiene un sitio de endonucleasa de restricción de tipo II (por ejemplo, FokI). Las endonucleasas de restricción de tipo II escinden a una distancia definida hasta 20 pares de bases lejos de sus sitios de reconocimiento asimétricos. La enzima de tipo II se denomina típicamente una enzima etiquetadora. La escisión del producto de ligación con la enzima etiquetadora da como resultado la liberación de un ligador con trozos cortos del ADNc. Una combinación de las enzimas de anclaje y etiquetadoras produce una etiqueta de 10 pares de bases que es única para un gen.

Usando este enfoque, se representaron etiquetas de secuencias para cada gen mediante el sitio NlaIII mayoritariamente 3' seguido de una secuencia de 10 pb única. En los casos en los que las etiquetas no se pudieron asignar a genes conocidos, un ADNc de biblioteca de SAGE se amplificó mediante PCR usando la etiqueta de SAGE y un cebador directo M13 usado habitualmente (GTTTTCCAGTCACGAC, SEC ID NO:18). Los productos de la PCR se clonaron subsiguientemente en el vector pCR2.1 (Invitrogen) y se secuenciaron usando técnicas estándar. La identificación de los genes se basó en la homología de la secuencia de productos de PCR con secuencias conocidas en GenBank® (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank).

Se llevó a cabo un alineamiento de BLAST® (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) de secuencias nucleotídicas con sus contrapartes de ratón y/o rata para identificar el gen a partir del que se obtuvo la etiqueta. De las dieciséis etiquetas más abundantes identificadas en este análisis (Tabla 2), se identificó los genes para todas las etiquetas menos una. De los quince genes identificados, cinco tuvieron origen mitocondrial, y tres fueron elementos repetitivos nucleares. La aparición de múltiples copias de estos genes en cada célula fue la causa probable de su abundancia en el resultado de SAGE. Tales secuencias no se consideraron para una evaluación posterior.

TABLA 2

Abundancia	Etiqueta	Gen	SEC ID NO:	Identificado
38	CATGGAAGCAGAAT	Repetición Alu	19	J00052
33	CATGCAGGAGCTTC	COX I Mito	20	PCR
27	CATGGGGGAGCGTT	Proteína ribosómica S21	21	PCR
27	CATGGTACTGACAC	COX III Mito	22	PCR
20	CATGGCCTCCAAGG	GAPDH	23	X52123
20	CATGATAATACGTA	ATPasa 6 Mito	24	M14311
19	CATGCCTTTAATCC	Repetición B-1	25	PCR
18	CATGAATCGGAGGC	Citocromo B Mito	26	J01436
18	CATGAGGCAGACAG	EF-1	27	D00522
18	CATGGCGGCAGACG	Galectina (L-14)	28	M96676
16	CATGGTGGCTCACA	Repetición Alu	29	J00056
15	CATGTTGGCTGCCG	Cadena pesada de ferritina	30	M99692
14	CATGCCCTGTGCCG	Ninguna coincidencia	31	
13	CATGAGAGCGAAGT	Proteína ribosómica L41	32	X82550
13	CATGAGGAGGCCTA	NADH deshidrogenasa mitocondrial	33	PCR
12	CATGCCCTGAGTCC	β -Actina	34	AF014363

Usando este enfoque, los promotores de cuatro genes se identificaron como los más activos en células CHO-K1. Estos promotores fueron: β -actina, proteína ribosómica S21 (rpS21), factor de alargamiento 1 (EF-1), y gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Los niveles elevados de estos ARNm en células CHO-K1 podrían ser debido a la actividad promotora de sus promotores respectivos, o debido a la estabilidad innata de los ARNm. Aunque el análisis de SAGE proporciona una cuantificación de los niveles globales en el estado estacionario para los ARNm para genes, no distingue entre actividad promotora del gen y estabilidad del ARNm como la base de la expresión elevada del ARNm. De este modo, a fin de distinguir entre las dos posibilidades, se midió la semivida de los ARNm. De forma breve, la expresión de los genes candidatos se evaluó mediante análisis de transferencia Northern de células CHO-K1 en cultivos con agitación en puntos variables tras el tratamiento de células con actinomicina D.

Inicialmente, se analizaron los genes de rpS21, GAPDH y EF-1, y se encontró que todos ellos tienen ARNm relativamente estables con semividas mayores que 8 horas. Estos resultados sugieren que la mayor abundancia de estos ARNm resultó de la mayor estabilidad de los ARNm y no necesariamente mayores actividades de los promotores respectivos.

También se midió mediante análisis de transferencia Northern la semivida de los ARNm de galectina, ferritina, y β -actina, como se describe anteriormente, a 0, 4, 8, 10, y 15 horas después del tratamiento de las células con actinomicina D. En la Figura 6A se muestra una transferencia Northern representativa. Los niveles de ARNm relativos se representan gráficamente en la Figura 6B. Estos datos muestran que aunque tanto galectina como ferritina tuvieron semividas mayores que 8 horas, el ARNm de β -actina se dio la vuelta más rápidamente, con una semivida de aproximadamente 6 horas. De este modo, la contribución relativa de la potencia del promotor a los niveles de ARNm globales en el estado estacionario fue mayor para β -actina que para los otros candidatos en células CHO-K1. En consecuencia, en estas condiciones, el promotor de β -actina se puede caracterizar como un promotor fuerte.

Ejemplo 2: Aislamiento y caracterización de promotores de β -actina y de rpS21 de hámster

A la luz de los resultados descritos en el Ejemplo 1, para el estudio posterior, se seleccionó el candidato con la mayor abundancia (rpS21) y aquel con el recambio de ARNm más rápido (β -actina). Para aislar ADN genómicos para promotores de β -actina de hámster y de rpS21, se identificó una biblioteca genómica CHO-K1 en λ FIX II

(Stratagene, La Jolla, CA).

A fin de aislar los clones genómicos de β -actina y rpS21, las cepas bacterianas de *E. coli* XL1-Blue MRA (P2) se hicieron crecer en medio LB que contiene sulfato de magnesio 10 mM y maltosa al 0,2%. Las células bacterianas se pelletizaron y se resuspendieron en sulfato de magnesio 10 mM a una lectura de absorbancia de 0,5 a 600 nm. Se incubaron aproximadamente un millón de fagos de la biblioteca con las células bacterianas durante 15 minutos a 37°C. Se añadió agarosa fundida a la mezcla de fagos/bacterias, y las bacterias se recubrieron sobre placas BioAssay que contienen agar (Nunc, Rochester, NY). Tras el endurecimiento de la agarosa superior, las placas se invirtieron y se hicieron crecer a 30°C toda la noche. Las placas se enfriaron subsiguientemente y se cubrieron dos veces con filtros de nailon Genescreen Plus™ (Perkin Elmer Life Sciences, Wellesley, MA). Los filtros de nailon se desnaturalizaron durante 2 minutos en hidróxido de sodio 0,1 M con cloruro de sodio 1,5 M, y se neutralizaron subsiguientemente. Los filtros se reticularon mediante UV y se sondaron.

Una sonda usada para el aislamiento del promotor de β -actina de hámster se obtuvo mediante PCR aleatoria a partir del extremo 5' del gen de β -actina (nt 238-381 de nº de acceso GenBank® U20114). Una sonda usada para el aislamiento del promotor de rpS21 de hámster se obtuvo mediante PCR usando los cebadores expuestos en SEC ID NOs:12 y 13. El fago hibridante para ambos promotores de β -actina y rpS21 se purificaron usando técnicas estándar. El ADN del fago aislado a partir de los lisados de fago se purificó mediante extracciones secuenciales con cloroformo, fenol, fenol/cloroformo (1:1), y finalmente, cloroformo.

Para el aislamiento de promotores del gen de β -actina de hámster, tras la precipitación con etanol, se digirió ADN con enzimas de restricción que tuvieron sitios en la porción 5' del gen de β -actina de hámster, y se sometió a transferencia Southern usando la misma sonda que se usó para identificar la genoteca.

Usando este enfoque, se generó un fragmento de AvrII de aproximadamente 7 kb y un fragmento de Sall de aproximadamente 5,5 kb, los cuales se hibridaron a la sonda. Estos se clonaron subsiguientemente con el plásmido pBluescript II KS (Stratagene). El fragmento de AvrII de 7 kb tiene el número de referencia ATCC PTA-5309, depositado el 3 de julio de 2003 en la American Tissue Culture Collection, P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, U.S.A.

Los plásmidos que contienen los fragmentos de AvrII y Sall se digirieron con SfoI para eliminar el extremo 3' de los fragmentos que contenían una porción del marco de lectura abierto del gen de β -actina. Estos fragmentos se clonaron entonces en el plásmido pDsRED-1 (Clontech) para crear los constructos denominados pDsRED-Avr (6,5 kb) y pDsRED-Avr (5,1 kb). A fin de generar un constructo que contiene todo el intrón 1 del gen de β -actina, se llevó a cabo la PCR usando los siguientes cebadores:

Directo: AGGCCAGCTTGGGACCAAGACAGAA (SEC ID NO:35)

Inverso: CGCGGATCCGGCGAACTATATCAGGGC (SEC ID NO:36).

El fragmento de la PCR generó dos productos: un producto predilecto de aproximadamente 7 kb, y un producto de 3 kb inesperado más pequeño. Estos dos productos de la PCR se clonaron en el plásmido pDsRED-1 (Clontech) para generar los constructos pDsRED-Avr(1)-7 y pDsRED-Avr(1)-3.

Cada uno de los fragmentos del promotor de β -actina de hámster que se clonó en el plásmido pDsRED-1 (Clontech) se transfirió en células CHO-K1. Las potencias relativas de los promotores de cada uno de los fragmentos del promotor de β -actina de hámster se midieron usando FACS como se describió anteriormente. Los resultados de los ensayos de actividad se resumen más abajo.

El fragmento de Avr(1)-3 del promotor de β -actina que abarca desde nt -1970 hasta nt +1037 mostró la mayor actividad promotora. El fragmento de Avr(1)-7 que abarca desde nt -6000 hasta nt +1037 mostró una actividad que fue 47% de la actividad mostrada por Avr(1)-3. Los fragmentos de Avr (6,5 Kb), Sal (5,1Kb), actina (3 kb), y actina-P (2,8 kb) mostraron solamente 2%, 2%, 2%, y 0% de actividad promotora, respectivamente, en comparación con el fragmento de Avr(1)-3.

El fragmento de Avr(1)-3 se secuenció subsiguientemente, y la secuencia se expone en SEC ID NO:1. Adicionalmente, también se secuenció la región de 660 nt en dirección 5' de fragmento de Avr(1) 3. Esta secuencia más larga desde nt -2622 hasta nt +1037 se expone en SEC ID NO:7.

Para el aislamiento del promotor de rpS21, tras el aislamiento de ADN del fago hibridante, se amplificó el ADN mediante PCR usando los siguientes cebadores:

Directo: AGCTCTAATACGACTCACTATAGGGC (SEC ID NO:40)

Inverso: CTCTAGGCCAGCGGAGCGCAG (SEC ID NO:41).

El producto de la PCR se clonó en el vector PCR2.1 (Invitrogen) y se secuenció subsiguientemente. La secuencia nucleotídica del promotor de rpS21 de hámster se expone en SEC ID NO:39. El promotor se cortó usando sitios de

EcoRI que flanquean a los sitios de clonación, y se clonó en el vector pDsRED1-1 (Clontech).

Ejemplo 3: Comparación funcional de los promotores de β -actina de hámster y de CMV

La actividad promotora de Avr (1)-3 se comparó con la del promotor temprano inmediato de CMV (Invitrogen) y el promotor de EF-1 humano (Invivogen).

5 Células CHO-K1 se transfectaron transitoriamente con el plásmido pDsRED-1 que contiene Avr (1)-3, el promotor temprano inmediato de CMV en dirección 5', o el promotor de EF-1 humano, cada uno ligado operablemente al gen de RFP. La expresión de RFP se evaluó mediante FACS 48 horas después de la transfección.

10 Como se muestra en la Figura 7A, en células transfectadas con Avr (1)-3, la secuencia del promotor de β -actina (SEC ID NO:1) mostró un mayor nivel de expresión de RFP en comparación con cualquiera de los promotores de CMV o de EF-1. En particular, la expresión fue aproximadamente dos veces mayor con Avr (1)-3 que con el promotor de CMV.

15 A fin de determinar si este perfil de expresión observado es sostenible en transfectantes estables, células CHO-K1 transfectadas se seleccionaron durante dos semanas con G418TM. Entonces se evaluó la expresión de RFP en los conjuntos supervivientes de células. Como se representa en la Figura 7B, de forma similar a las células transfectadas transitoriamente, la expresión de RFP más elevada se observó en células transfectadas con Avr(1)-3, la secuencia del promotor de β -actina expuesta en SEC ID NO:1.

Ejemplo 4: Actividad del promotor de β -actina de hámster en células BHK-21 y HEK293

20 La actividad del promotor de β -actina de hámster se comparó con la del promotor de CMV en células BHK-21 (ATCC n° CCL 10) y HEK293 (ATCC n° CRL-1573) usando ensayos de transfección estable como se describe en el Ejemplo 3. Como se observa previamente en células CHO-K1, la expresión de RFP en células BHK-21 fue significativamente mayor cuando se usa el promotor de β -actina en lugar del promotor de CMV (Tabla 3). En células HEK293, el promotor de β -actina de hámster dio como resultado expresión de RFP a niveles aproximadamente equivalentes a los del promotor de CMV.

TABLA 3

Estirpe celular	Promotor de CMV	Promotor de β -actina
BHK-21	8,3 \pm 0,4	121 \pm 99,8
HEK293	139 \pm 9,9	102 \pm 8,3

25

Ejemplo 5: Promotores de β -actina de rata y de ratón

Se investigaron bases de datos públicamente disponibles de secuencias nucleotídicas usando ajustes por defecto en busca de homólogos potenciales de la secuencia del promotor de β -actina de hámster expuesta en SEC ID NO:1.

30 La porción 5' de un gen de β -actina de hámster (n° de acceso GenBank® U21104; SEC ID NO:4) exhibe 98% de identidad con la porción 3' de la secuencia del promotor de β -actina de hámster. Sin embargo, esta homología es solamente 40% a lo largo de toda la longitud de la secuencia del promotor de β -actina de hámster expuesta en SEC ID NO:1. No se conoce ninguna actividad promotora para esta porción.

35 Los promotores de β -actina previamente conocidos, humano (n° de acceso GenBank® gi28337A) y de pollo (n° de acceso GenBank® gi2170437), se alinearon con el promotor de β -actina de hámster para la determinación de la homología con el programa BLAST® usando los ajustes por defecto. Las secuencias del promotor de β -actina humano y de pollo tuvieron solamente 10% y 1% de identidad, respectivamente, con el promotor de β -actina de hámster (SEC ID NO:1).

40 Se identificó un supercódigo genómico de rata (*Rattus norvegicus*) (n° de acceso GenBank® NW_042778) en el cromosoma 12 del genoma de rata por contener una secuencia nucleotídica que tiene un 67% de identidad a lo largo de toda la longitud de SEC ID NO:1.

De forma similar, se identificó un código (n° de acceso GenBank® NT_039324) en el cromosoma 5 del genoma de ratón (*Mus musculus*) por tener una identidad de 80% a lo largo de toda la longitud de SEC ID NO:1.

45 Los alineamientos de secuencias de la secuencia del promotor de β -actina de hámster (SEC ID NO:1) con la secuencia del gen de hámster, y promotores de β -actina de ser humano, pollo, rata y ratón se representan en las Figuras 3, 4, 5, 1, y 2, respectivamente.

Ejemplo 6: Actividades de los promotores de β -actina de rata y de ratón

Las secuencias de los promotores de rata y de ratón expuestas en SEC ID NOs:2 y 3, respectivamente, se clonaron en el plásmido pDsRED-1 (Clontech). El promotor de CMV también se clonó en dirección 5' del gen de RFP en el plásmido pDsRED-1. Estos plásmidos se transfectan en célula CHO-K1, u otra estirpe celular. La expresión de la RFP se evalúa mediante FACS 48 horas después de la transfección.

Se espera que las células transfectadas con el promotor de β -actina de rata o de ratón muestren una expresión de RFP mayor que el promotor de CMV en condiciones similares.

Ejemplo 7: Expresión de proteínas usando promotor de β -actina de hámster

Para evaluar adicionalmente la actividad del promotor de β -actina de hámster, se usó un sistema de expresión que utiliza selección mediante dihidrofolato reductasa (DHFR) y amplificación mediante metotrexato (MTX). El vector pGZ6 se derivó del plásmido pCLHAXSV2DHFR para contener el promotor de β -actina de hámster de 3 kb (SEC ID NO:1) además de un gen de DHFR bajo el control del promotor temprano de SV40. El plásmido pCLHAXSV2DHFR se ha descrito previamente por Cole et al. (1993) *Biotechnology*, 11:1014-1024. De forma breve, el promotor de metalotionina (MT) en el vector pCLHAXSV2DHFR se sustituyó por el promotor de β -actina para crear el vector pGZ6. Los ADNc para dos proteínas de interés terapéutico, esfingomielinasa ácida (ASM) y α -glucosidasa (GAA), se ligaron operablemente al promotor de β -actina de hámster. El ADNc de ASM se obtuvo a través del consorcio IMAGE™ (nº de acceso GenBank® A1587087). El ADNc para GAA se obtuvo de Dr. Martinuik en la New York University School of Medicine. Las secuencias nucleotídicas de los ADNc de ASM y de GAA se exponen en SEC ID NOs:37 y 38, respectivamente. De forma similar, los dos ADNc se clonaron también en dirección 3' del promotor de CMV en un vector que contiene el mismo casete de expresión de DHFR. La estirpe celular CHO-K1 deficiente en DHFR, DXB11, se transfectó por triplicado con ambos conjuntos de vectores de expresión. Después de dos semanas de selección en medio deficiente en nucleótidos que contiene MTX 20 nM, se lavó un conjunto no clonado heterogéneo de células con PBS y se transfirió a medio libre de suero. Veinticuatro horas más tarde, se midieron los niveles de ASM o GAA en el medio.

Los resultados de uno de tales experimentos se demuestran en las Figuras 8A y 8B. Los niveles de ASM generados a partir del promotor de β -actina de hámster en los conjuntos estables fueron 2 a 15 veces mayores que con el promotor de CMV, y en el caso de los conjuntos de GAA, 2 a 5 veces mayores.

Los conjuntos estables se usaron adicionalmente para evaluar la capacidad del promotor de β -actina para sostener la expresión proteica a largo plazo. Típicamente, para la producción industrial de proteínas, la expresión elevada se logra seleccionando células con un mayor número de copias de genes a través de un procedimiento que implica incrementar el número de etapas de selección y/o la concentración de MTX. A fin de determinar si se podría lograr una mayor expresión vía esta estrategia con el promotor de β -actina (SEC ID NO:1), los conjuntos de ASM seleccionados inicialmente en MTX 20 nM se amplificaron mediante selección durante dos semanas en niveles de MTX (200 nM) mayores de diez veces. Como se resume en la Tabla 4, dos de los tres conjuntos de β -actina mostraron niveles de ASM mayores de 2 a 3 veces tras la amplificación con respecto a los conjuntos de 20 nM de partida. Por el contrario, solamente uno de los conjuntos de CMV ensayados mostró niveles mayores que el conjunto de 20 nM, del que deriva. Entre los seis conjuntos de ASM generados con cualquiera de los dos promotores, el conjunto de β -actina que se expresa de forma más elevada generó seis veces la cantidad de ASM obtenida con el conjunto que se expresa de forma más elevada generado con el promotor de CMV. Esto demuestra que, al menos en las condiciones ensayadas, el promotor de β -actina de hámster es superior al promotor de CMV.

TABLA 4

Conjunto	Expresión de ASM en MTX 20 nM	Expresión de ASM en MTX 200 nM
Conjunto A de CMV-ASM	4,3	8,2
Conjunto B de CMV-ASM	16,9	9,5
Conjunto C de CMV-ASM	3,6	3,7
Conjunto A de β -actina-ASM	33,5	100,0
Conjunto B de β -actina-ASM	59,3	27,9
Conjunto C de β -actina-ASM	45,6	90,5

En un experimento distinto, el promotor de β -actina de hámster se usó para expresar la proteína del activador de plasminógeno tisular (tPA), que es un agente trombolítico usado en pacientes para disolver coágulos de sangre. Células CHO-DXB11 se transfectaron con un vector de expresión pGZ6-tPA en el que el promotor de β -actina de hámster está ligado operablemente al gen de tPA. Los transfectantes estables se seleccionaron mediante crecimiento en medio deficiente en nucleótidos que contiene MTX 200 nM. El conjunto resultante de células sin clonar se sometió entonces a MTX 500 nM, para amplificar el número de copias del transgén. Este conjunto de células se retiró de MTX, se expandió y se sembró sobre 2 microportadores Cytopore™ en un cultivo de agitación de 1 litro. Las células se hicieron crecer durante 7 días en un medio que contiene suero. Durante los siguientes 4 días, el suero se eliminó mediante cambios diarios del 80% con medio libre de suero. Entonces se recogieron cosechas de medios a lo largo de 15 días y se analizaron en busca de la expresión de tPA usando un kit de ELISA comercialmente disponible (kit de tPA TintElize®, Biopool International, Inc., Ventura, CA). Como se representa en la Figura 9 de este experimento, el uso del promotor de β -actina de hámster dio como resultado la expresión de tPA a una concentración de alrededor de 30 mg/l por día. Este resultado se compara favorablemente con los informes recientemente publicados en los que se produjo alrededor de 30-40 mg/l de tPA después de 4-8 días usando otros promotores (Senger et al. (2003) *Biotechnology Progress* 19: 1199-1209; Dowd et al. (2000) *Biotechnology Progress* 16:786-794).

Ejemplo 8: Producción de anticuerpos usando promotor de β -actina de hámster

A fin de producir un anticuerpo frente a un miembro de la familia de TGF- β , un ácido nucleico que codifica una cadena ligera de anticuerpo anti-TGF- β o una cadena pesada de anticuerpo anti-TGF- β se clona en dirección 3' del promotor de β -actina de hámster en dos vectores de expresión pGZ6 distintos.

La estirpe de células CHO-K1 deficiente en DHFR, DXB11, se transfecta con ambos vectores de expresión. Después de dos semanas de selección en medio deficiente en nucleótidos que contiene MTX, se miden en el medio los niveles de anticuerpo anti-TGF- β , incluyendo tanto la cadena ligera como la cadena pesada.

Ejemplo 9: Expresión de proteínas usando promotor de rpS21 de hámster

La actividad del promotor de rpS21 de hámster se comparó con la actividad del promotor de β -actina de hámster para la expresión en células CHO-DXB11. Se transfectaron células CHO-DXB11 con vectores de expresión que contienen α -glucosidasa humana (rhGAA) ligada operablemente al promotor de rpS21 de hámster de SEC ID NO:39 (pGZ3IC-GAA) o al promotor de β -actina de hámster de SEC ID NO:1 (pGZ6IC-GAA). En ambos casos, el gen de rhGAA se ligó al gen que codifica un marcador de la superficie celular (CD20), a través de un sitio interno de entrada al ribosoma.

Secuencia (IRES). Tras la selección de células con MTX 0,2 μ M en medio deficiente en nucleótidos, las células se marcaron con un anticuerpo conjugado a FITC contra CD20, y se clasificaron mediante FACS para clones que se expresan de forma elevada. Las células seleccionadas se colocaron en placas de 96 pocillos y se expandieron para la evaluación de la expresión de rhGAA. Se analizaron 38 clones para el promotor de rpS21 de hámster, y se analizaron 29 clones para el promotor de β -actina de hámster. La Tabla 5 muestra la distribución de intervalos de expresión en los clones resultantes para ambos promotores.

TABLA 5

Vector	Expresión de GAA <2 pg/célula/h	Expresión de GAA 2-5 pg/célula/h	Expresión de GAA 5-8 pg/célula/h	Expresión de GAA 8-10 pg/célula/h
pGZ3IC-GAA	16%	50%	26%	8%
pGZ6IC-GAA	52%	34%	14%	0%

En un experimento distinto, el promotor de rpS21 de hámster se usó para expresar ASM en células CHO-DXB11. La actividad del promotor de rpS21 se comparó con las actividades de ambos promotores de β -actina y de CMV. Las células CHO-DXB11 se transfectaron por triplicado y se seleccionaron directamente en MTX 200 nM, o se seleccionaron inicialmente en MTX 20 nM y después se amplificaron durante dos semanas en MTX 200 nM, como

se explica en el Ejemplo 7. Los niveles de ASM se midieron en el medio como se describió. La expresión de ASM en células sin transfectar fue indetectable.

5 Como se resume en la Tabla 6, los tres conjuntos de rpS21 mostraron niveles de ASM mayores de 2 a 3 veces tras la amplificación con respecto a los conjuntos de 20 nM de partida, de los que derivaron. Además, los niveles de ASM generados fueron mayores que los niveles generados con el promotor de CMV (Ejemplo 7).

TABLA 6

Conjunto	Expresión de ASM nU/célula/24 h (en MTX 20 nM)	Expresión de ASM nU/célula/24 h (en MTX 200 nM)
Conjunto A de rpS21-ASM	12	34
Conjunto B de rpS21-ASM	13	30
Conjunto C de rpS21-ASM	16	41

Los niveles de expresión de ASM generados con selección de los conjuntos directamente en MTX 200 nM se resumen en la Tabla 7.

10

TABLA 7

Conjunto	Expresión de ASM
Conjunto A de CMV-ASM	38
Conjunto B de CMV-ASM	193
Conjunto C de CMV-ASM	44
Conjunto A de β -actina-ASM	381
Conjunto B de β -actina-ASM	125
Conjunto C de β -actina-ASM	515
Conjunto A de rpS21-ASM	342
Conjunto B de rpS21-ASM	60
Conjunto C de rpS21-ASM	51

15 Los niveles de ASM generados a partir del promotor de rpS21 de hámster en MTX 200 nM fueron de media alrededor de 1 a 2 veces mayores que aquellos con el promotor de CMV. Por otro lado, los niveles de ASM generados a partir del promotor de β -actina fueron de media alrededor de 3 a 4 veces mayores que aquellos con el promotor de CMV. De este modo, el promotor de rpS21 fue al menos tan activo como el promotor de β -actina cuando se usa para expresar GAA; sin embargo, mostró menor actividad que el promotor de β -actina cuando se usó para expresar ASM. Ambos promotores, sin embargo, fueron más activos que el promotor de CMV.

20 La memoria descriptiva se entiende más a conciencia a la luz de las enseñanzas de las referencias citadas en la memoria descriptiva. Las realizaciones en la memoria descriptiva proporcionan una ilustración de las realizaciones de la invención y no se deberían de interpretar como límite del alcance de la invención. El experto reconoce fácilmente que muchas otras realizaciones están englobadas por la invención. La cita de cualesquiera referencias aquí no es una admisión de que tales referencias son técnica anterior para la presente invención.

25 Excepto que se indique de otro modo, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, cultivo celular, condiciones de tratamiento, etc., usados en la memoria descriptiva, incluyendo las reivindicaciones, se han de entender como modificados en todos los casos por la expresión "alrededor de". En consecuencia, excepto que se indique lo contrario de otro modo, los parámetros numéricos son aproximaciones y pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se buscan obtener por la presente invención. Excepto que se indique de otro modo, la expresión "al menos" que precede a una serie de elementos se ha de entender que se refiere a cada elemento en la serie. Los expertos en la técnica reconocerán o serán capaces de averiguar, usando no más allá de la experimentación habitual, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descrita aquí. Tales equivalentes están destinados a estar englobados por las siguientes reivindicaciones.

30

A continuación, se describen los casos preferidos de la presente descripción y se hace referencia a ellos como los casos E1 a E36.

- 5 E1. Un promotor de β -actina de roedor aislado que se escoge entre las secuencias nucleotídicas expuestas en SEC ID NOs: 1, 2 y 3, o una variante de las mismas que tiene actividad promotora.
- E2. Una secuencia nucleotídica de un promotor de β -actina de hámster aislado que se expone en SEC ID NO: 1, o una variante de la misma que tiene actividad promotora.
- 10 E3. Una secuencia nucleotídica de un promotor de β -actina de rata aislado que se expone en SEC ID NO: 2, o una variante de la misma que tiene actividad promotora.
- E4. Una secuencia nucleotídica de un promotor de β -actina de ratón aislado que se expone en SEC ID NO: 3, o una variante de la misma que tiene actividad promotora.
- 15 E5. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia nucleotídica que se expone en SEC ID NO: 1, o una variante de la misma que tiene actividad promotora.
- E6. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia nucleotídica que se expone en SEC ID NO: 2, o una variante de la misma que tiene actividad promotora.
- 20 E7. Un vector que comprende el promotor de SEC ID NO: 1, o una variante del mismo que tiene actividad promotora.
- E8. Un vector que comprende el promotor de SEC ID NO: 2, o una variante del mismo que tiene actividad promotora.
- 25 E9. Un vector que comprende el promotor de SEC ID NO: 3, o una variante del mismo que tiene actividad promotora.
- 30 E10. El vector de cualquiera de E7-9, en el que el promotor está ligado operablemente a un ácido nucleico heterólogo.
- E11. El vector de E10, en el que el ácido nucleico heterólogo codifica una proteína terapéutica.
- 35 E12. El vector de E11, en el que la proteína terapéutica se escoge entre esfingomielinasa ácida, α -glucosidasa, y activador de plasminógeno tisular.
- E13. Una célula hospedante transfectada con un vector de cualquiera de E7-12.
- 40 E14. La célula hospedante de E13, en la que la célula es una célula CHO.
- E15. Un método para producir una proteína que comprende:
- 45 (a) cultivar una célula transfectada con un vector que comprende un promotor de β -actina de hámster, o una variante del mismo, ligado operablemente a una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína; y
(b) recuperar la proteína.
- E16. El método de E15, en el que la proteína es un anticuerpo.
- 50 E17. El método de E16, en el que el anticuerpo se une a un miembro de la familia de TGF- β .
- E18. El método de E15, en el que la proteína es una proteína terapéutica.
- 55 E19. El método de E18, en el que la proteína terapéutica se escoge entre esfingomielinasa ácida, α -glucosidasa, y activador de plasminógeno tisular.
- E20. Un animal transgénico que comprende el promotor como en uno cualquiera de E1-6.
- 60 E21. El animal transgénico de E20, en el que el animal es un mamífero.
- E22. Un promotor de rpS21 aislado que tiene la secuencia nucleotídica que se expone en SEC ID NO: 39, o una variante de la misma que tiene actividad promotora.
- 65 E23. Un vector que comprende la secuencia nucleotídica que se expone en SEC ID NO: 39, o una variante de la misma que tiene actividad promotora.

- E24. Un vector de E23, en el que la secuencia nucleotídica está ligada operablemente a un ácido nucleico heterólogo.
- 5 E25. El vector de E24, en el que el ácido nucleico heterólogo codifica una proteína terapéutica.
- E26. El vector de E25, en el que la proteína terapéutica es α -glucosidasa o esfingomielinasa ácida.
- E27. Una célula hospedante transfectada con un vector de cualquiera de E23-26.
- 10 E28. La célula hospedante de E27, en la que la célula es una célula CHO.
- E29. El método para producir una proteína que comprende:
- 15 (a) cultivar una célula transfectada con un vector que comprende un promotor de rpS21 de hámster, o una variante del mismo, ligado operablemente a una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína; y
(b) recuperar la proteína.
- E30. El método de E29, en el que la proteína es un anticuerpo.
- 20 E31. El método de E29, en el que la proteína es una proteína terapéutica.
- E32. El método de E31, en el que la proteína terapéutica es α -glucosidasa o esfingomielinasa ácida.
- 25 E33. Un animal transgénico que comprende el promotor como en E22.
- E34. El animal transgénico de E33, en el que el animal es un mamífero.
- E35. Un promotor de β -actina aislado que tiene una secuencia nucleotídica como la depositada con el número de
30 referencia ATCC PTA-5309.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> ESTES, SCOTT
- 35 ZHANG, WEIQUN
GENZYME CORP.
- <120> NUEVOS PROMOTORES DE LA BETA-ACTINA Y RPS21, Y SUS USOS
- <130> 7680.27-304
- <140>
- 40 <141>
- <150> 60/480,768
- <151> 24-06-2003
- <160> 41
- <170> PatentIn version 3.2
- 45 <210> 1
- <211> 3007
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 50 <223> promotor de beta-actina aislado de células CHO

ES 2 665 493 T3

<400> 1

```

gggaccaaga cagaaccata agccagtggg atagatcaga aatgttccag aggtgggatg    60
gggccagagt gcctgcccct tgaaccgtcc cagggaccag aggtgacaaa gtggcaacac    120
aggtcctgcc tgggaatctg gtctgctcct acttagtaaa gctgcctggt gtcacacaag    180
aggcccccac ttattcctgc acccctggtg gtaggtggcg tcttctcccc tgcagccacc    240
aggctcccct gagaacactg ccggcagtcc tcattgacag gcagtattcg ctctgcccca    300
ccccacctg tgaattgcag ggctggcagg tcctcaggca gctggcaaac cgcctgaaca    360
actgagagat acagggccag ggccagggca gtcccgtccc ccggaggcag ggaggggacg    420
tgctgggaaa gttctctctc tcaggcccag gttggtgact gcagaaggct tctgtcaaat    480
ctcttttgtg ggaaccacag agtagccctg aacgtggggg tgtgcttcca gtatactctg    540
gggtcacctt ttccatactg gaggcctctg caacttcaaa atgctctgct accaacctag    600
cacaaggaag ttggtccagc ctccccacgc agggcactg ctgcagtcca tatatggact    660
aagccttcct tggtttcaac acctacactc actgagcccc tactatgtgt atgcagagcc    720
gagacaggcc cgagcatctc atctgaagca cccttcttgc ctaaattcag ttttctgtca    780
ctttctccca ggagggtgtg gtcccctctaa gctaagccag gggtcctca cccctgcccc    840
actcccatcc ctagtgtagg tatcagctga agagcttctt gaggagaaca ctcttgggtg    900
ctgacatfff gataaatagg cccatgttta ggagagcagg ggtccggggg cgggagatct    960
tctctggtgg attgagggct ccaagaacta ctctttgagc acgctgcccc tcccagagtc   1020
cccacagcct ccagatggac tagaacacag ttcggctgtg gctgcacata actaacagag   1080
gatagatggt gggttcccagc ccaacagtgc ctggcaatca cccagagcca ccagctaacg   1140
gccttggctt agttttttgc ctgggtgtga tcaggcagcc ctccaaaact gcccggactc   1200
catgacaagt ttgcttgtt ctatagagca cagttccttt ctaggctctg ggcaaggac    1260

```

ES 2 665 493 T3

atcgggagac atcttctctgc aacagctcca gtcactggac caccaggctc gccctgtctt 1320
 tgggtgtggt ccctgagtct cctaagtggc ccaaacctgt gaagaccctt ccaaccacag 1380
 ttttgcctct aaattgtacc ccaacacacc tagcaaattg aaaccccacc agaagtcccc 1440
 cagatctggc tttccggcta ttgctggcaa gggggagtga ctcccggccc attcaatcca 1500
 ggccccgcgt gttcctcaaa caagaagcca cgtaaacata aaccgagcct ccatgctgac 1560
 ccttgcccat cgaggctactc aatgttcacg tgatatccac acccagaggg tcctgggggtg 1620
 ggtgcatgag ccccagaatg caggcttgat aaccgagacc ctgaatcggg cagtgtccac 1680
 aagggcggag gccagtcac gcatgttcgg gcctatgggg ccagcaccca acgccccaac 1740
 tctccatcct ctctctcaat ctccgctttc tctctctctc tctttttttt tttttatttt 1800
 ttttttttgc aaaaggaggg gagaggggtg aaaaaaatgc tgactgtgc ggctaggccg 1860
 gtgagtgagc ggcgcggagc caatcagcgc tcgccgttcc gaaagtggcc ttttatggct 1920
 cgagtggccg ctgtggcgtc ctataaaacc cggcggcgca acgcgcagcc actgtcagat 1980
 ccgcgtccac ccgcgagcac aggcctttcg cagctctttc ttcgccgctc cacacccgcc 2040
 accaggtaag cagggacaac aggccagcc ggcacagcc ctcccgtggg cagtgaccgc 2100
 gctgcagggc cgcgggggac actcggcgcg gacaccgggg aaggctggag ggtggtgccg 2160
 ggccgcggag cggacacttt cagatccaac tttcagtcca ggtgtagac cttttacagc 2220
 cgcattgcc a ggtgtagac accggtggac ccgctctggc tcagagcacg cggcttgggg 2280
 gaaccatta gggtcgcagt gtggcgcta tgagagccga tgagccttc ggtggtgaa 2340
 ccgtatctgc ccacctggg gggaggacac aaggtcggga gccaaacgcc acgatcatgc 2400
 cttggtggcc catgggtctt tgtctaaacc ggtttgccca tttggcttgc cggcgggcg 2460
 ggcgcggcgg gcccggtcgc gccgggtggg ggctgggttg cactgcgctc tgcgcgctct 2520
 atggtggtt attggggcgc gtgcacgctg gggaggagc ctttctctt cccccctcc 2580
 caagttaaac ttgcgcgtgc gtattgagac ttggagcgc gccaccgggg ttgggcgagg 2640
 gcggggcctg tgtccggaag gggcggggtc gcagcggctt cggggcgcct gctcgcgctt 2700
 cctgctgggt gtggtcgcct cccgcgcgcg cactagccgc ccgccggcgg ggcgaaggcg 2760
 gggcttgcgc ccgcttgggg agggggcggg ggctggctt cctgccgtgg ggccgcctcc 2820
 ggaccagcgt ttgcctctta tgtaataac gcggccggcc tgggcttctt ttgtcccctg 2880
 agtttgggcg cgcgccctt ggcggcccga ggccgcggtt tgccggaagt gggcagggcg 2940
 gcagcggctg cgcctagtgg cccgctagtg accgcgacct tcttttgtgc cctgatatag 3000
 ttcgccg 3007

<210> 2

<211> 2493

<212> ADN

5 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 2

tgtgggaaag ataaagtcgc tctgaacctg ggggtgtggt tccagtatgc tggagtgggt 60
 gtcacccttt ccagactgga ggcctctgca acttcaaat gccctgccac aagcctagaa 120
 caaggaagct ggtctggcct cctcatgcac agccactgta gcccatatat ggatgaagcc 180

ES 2 665 493 T3

ttccttgggt tcaacaccta cactttgtga gccagtgcac acctactatg catgtgtaaa 240
 gccatggcag gtccagagca tcccacctga agcattctcc ttgcctaaat atagctttct 300
 gtcactctct cccaggagtt gtgcgtcctt ctaagctaag ctgagggacc cgacctcaa 360
 ctctgatccc ctgctgtagc tatcagccaa atggctagct tcctgagcag aactctccta 420
 cttaggtgag gagagcaggg ggttcttctc tctggaggat ttggggctct ggtgaccacc 480
 agcacttccc tgagtagttt gtcactccca gagtccccgt ggccagcaga tgaacagttc 540
 agtgtacagt tcagctgtgg ctgcacataa tacatagagg ctagatggtg ggctccagcc 600
 caacgatgcc tggcagtcac ccagagccac tagctaacgg cccaggctta gtcttgcttg 660
 ggtgtgatca ggcagccctc caaaagtgcc ggactccatg agaagttttg cttgttcgat 720
 tgagcacagt tcctttctag gtcgggggca gaggatatct ggaggcatct tcctgcaaca 780
 aacacctcca gtcactggac caccggggct tgcctatcc ttgggactct ggcttgagt 840
 ggtcaagatc cctgaagacc ttcccaacca cagctctgct tccaagttgt accccaacac 900
 acctagcaaa ttagaactgc agcagaaggc cccagatct ggctttcctg actattgcta 960
 gcaaggggga gtgactctct gccattcaaa tccagacccc gtgtgtccct caaacaagaag 1020
 gccactcaaa tagggctccg gccttcaagc tgaccctcgc ccacttaggt gatcattatt 1080
 cccgtgacat ccacaccagc agggctcctg ggtgggtggg tgacccccag aatacagggc 1140
 tagtaaccga gtcactgaat gggatagtgt ccacaagggc gggggctatt cttgtccatc 1200
 tgggcctacg gaaccagcac ccatacgaaa actcttcac ccttctca atctcgttt 1260
 ctctctcgtc cgctttttt tcttctttt tttttttt tttttttt gcaaaaggag 1320
 gggagagggg gtaaaaaat gctgactgt gcggcagggc cggtgagtga gcgacgcgga 1380
 gccaatcagc gcccgcctt ccgaaagtg ccttttatgg ctcgagtggc cgctgtggcg 1440
 tcctataaaa cccggcggcg caacgcgcag ccactgtcga gtccgcctc acccgcgagt 1500
 acaaccttct tgcaactcct ccgtcgcgg tccacaccgc ccaccaggta agcagggagc 1560
 tcggggccag cggggcccaa ctttacctg gccactacct cgctgcagga tcgtgaggaa 1620
 cactcagaag ggacaccgta gaggggtgga gcgtggtacc gggccgcgga gcggacactg 1680
 gcaaaagctta actttccgcc taggggttag agtgtttgca gtcgtattcc cgcggttag 1740
 aactcgtgg gcacgctcct gcttggctgc cggggcttgg ggacacacta gagtgcggt 1800
 gtgggcattt ggagagccgg tgcggcttgc ggggtgtaag ccgcatctgt ccacctgag 1860
 gggacacagt attgggagtc aggcgttaca atcacgctt gatggcctat ggtctttgt 1920
 ccaaacgggt ttgcccatt cggcttggcg ggcgcggcgg ggccggctcg gccgggtggg 1980
 ggctgggatg ccattgcgcg tgcgcgtct atcactgggc attggggcgc gtgcgcgctg 2040
 gggagggaa tcttctctc ccctcttcc gaggtaagag ttgcgcgtgc gtattgagac 2100
 taggagcgcg gccgccccg gttgggcgag ggcggggcgg ttgcccggaa ggggcggggt 2160
 cgtagcggct agggcgcctg ctgcgcctc ctgctgggtg tggcgcctc ccgcgcgcgc 2220
 actagccgcc cgtgcctca gtgtagcgg ggcctgtgcc cgtttgggga gggggcggag 2280
 gcctggcttc ctgccgtggg tccgcctccg ggccagcgtt tgcctttat ggtaataatg 2340
 cggctgtcct gcgcttctt tgtcccctga gcttgggcgc gcgccccctg gcggctcgag 2400
 gccgcggctt gccggaagtg ggcagggcgg cagcggctgc tcttggcggc tccgcgggta 2460
 ccatagccct cttttgtgcc ttgatagttc gcc 2493

<210> 3

<211> 2953

5 <212> ADN

<213> *Mus musculus*

ES 2 665 493 T3

<400> 3

agaccagaat tgtttcagag gtcgggtggg gctgaggtgc ctgcccctg accagtccca 60
 ggactgagag gtgacaaagt ggcaacacag gtcctgcctg ggaatctggg ctgctctaac 120
 ctagtaaagc tgtctggtgt cacccaagag gtcacctca catcctgcac ccctgatggc 180
 tgatggcatc tttctccctt gcacccacc agggttctcc tgggaatact ctgggctctc 240
 cttattgaca ggcagcattt gccctgcccc acccccacct gtgacttgca ggactggcag 300
 gtccttgggc agctggcaaa ctgcctgagc aactgagaaa tacaaggcca gggccagggc 360
 agtcctgtcc cccggaggca gggaggagac tgctgggaa agttctctca gggttggtga 420
 ctgcagaaga cttttgtcaa atttttttt tttttttggt gggaaagata actaggggtg 480
 tgtttccagt tcacagcata tgctggggtg atggtcacct cttccagaca aggctcagc 540
 aacttcaaaa tgccctgcca ccagccaaga acaaggaagc tggccactgt agtccatata 600
 tggatgaagc cttctttggt ttcaacacct aacttttgtg agccagtga cacctaccta 660
 tgcattgact gaggcacggc aggccagag catctcacct gaagcacct tcttgccata 720
 atccagcttt ctgtcacact ctcccagaag gtgcgtgtcc ttctaagcta agctgagggg 780
 tccggccctc aaccctgacc ccgtgtgtag ctctcagcca aatagctggc ttgctaagta 840
 gaacactggt acttaggtga gggggacagg ggctgcttct ctctgagga ttggggctc 900
 cggtgaccac caacttttcc ctgagcagct tgtcactccc agaatcccca cggctggcag 960
 atggactagt gcacaactca gctgtgctg cacataata atagaggata gatggtgggc 1020
 cccagcccag cgatgtctgg cagtcacca gagacactag ctaacggccc aggcttagtc 1080
 ttgcctgggt gtgatcaggc agttctcaa aagtgcctga ctccatgaga agttttgttt 1140
 gttctattga gcacagttcc tttctagatc cggggcaggg gatattctgga ggcatcttct 1200
 tgcaaacct ccagttattg gaccactggg gctcgcccta tgcttgggat aggatggcct 1260
 tgagtctcta agaggtcaag atccatgaaa acctctcaa ccagagttct gcttccaagt 1320
 tgaacccaa cacacctagc aaattagaac cacagcagaa ggggcccccc cggatctggc 1380
 tttccggcta ttgctagcaa ttgctagcaa gggggagtga ctctctgtcc attcaatcca 1440
 ggccccgct gtccctcaa caagaggcca cacaaatagg gtccgggcct cgatgctgac 1500
 cctcatccac ttaagtgtc gatatccag tgacatccac acccagaggg tcctgggggtg 1560
 gttgggtgac cccagaatg caggcctagt aaccgagaca ttgaatggg cagtgtccac 1620
 aagggcggag gctattctctg tacatctggg cctacggagc cagcacccat cgccaaaact 1680
 cttcatcctc ttcctcaatc tcgctttctc tctcgctttt ttttttttct ttcttctttt 1740

ES 2 665 493 T3

tttttttttt tttcaaaagg aggggagagg gggtaaaaaa atgctgcaact gtgcggcgag 1800
 gccggtgagt gagcgacgcg gagccaatca gcgcccgcg ttcgaaaagt tgccttttat 1860
 ggctcgagtg gccgctgttg cgtcctataa aaccggcg cgcaacgcgc agccactgtc 1920
 gagtcgctc caccgcgag cacagcttct ttgcagctcc ttcggtgccc gtccacacc 1980
 gccaccaggt aagcagggac gccgggcca gcgggccttc gctctctcgt ggctagtacc 2040
 tcactgcagg gtcctgagga tcaactcagaa cggacacat gggcgggtg aggggtgtgc 2100
 cgggcccgg agcggacact ggcacagcca actttacgcc tagcgtgtag actctttgca 2160
 gccacattcc cgcggtgtag aactcgttg gcccgctccc gctcgggtgc tggggcttgg 2220
 ggacacacta gggctcgggt gtgggcattt gatgagccgg tgcggcttgc ggggtttaa 2280
 agccgtatta ggtccatctt gagagtacac agtattggga accagacgct acgatcacgc 2340
 ctcaatggcc tctgggtctt tgtccaaacc ggtttgccta ttcggcttgc cgggcccggc 2400
 ggcgggccc cgggcccggc agggcccgtc cggcccgggtg ggggctggga tgcactgcg 2460
 cgtgcgctct ctactactgg gcatcgaggc gcgtgtgcgc tagggagggg gctcttcctc 2520
 tccccctctt cctagttagc tgcgctgctg tattgaggct gggagcgcgg ctgcccgggg 2580
 ttgggagagg gcggggccgt tgtccggaag gggcggggtc acagtggcac gggcgccttg 2640
 tttgcgcttc ctgctgggtg tggtcgcctc ccgcccgcgc acaagcccgc cgtcggcgca 2700
 gtgtaggcgg agcttgcgcc cgtttgggga gggggcggag gcttggcttc ctgcccctagg 2760
 tccgcctccc ggccagcgtt tgccttttat ggtaataatg cggccggtct gcgcttcctt 2820
 tgtcccctga gcttgggctc gcgccccctg gcggctcgag cccgcggett gccggaagt 2880
 ggcagggcgg cagcggctgc tcttggcggc cccgaggtga ctatagcctt cttttgtgtc 2940
 ttgatagtcc gcc 2953

<210> 4

<211> 4164

<212> ADN

5 <213> *Cricetulus griseus*

<400> 4

aatgctgcac tgtcgggcta ggccggtgag tgagcggcgc ggagccaatc agcgtcgc 60
 gttccgaaag ttgcctttta tggctcagat ggcgctgtg gcgtcctata aaaccggcg 120
 gcgcaacgcg cagccactgt cgagtcgcg tccaccgcg agcacaggcc tttcgcagct 180
 ctttcttcgc cgtccacac ccgccaccag gtaagcagg acaacaggcc cagccggcca 240
 cagccctccc gtgggcagt accgcgctgc agggctcgg gggacactcg gcgaggacac 300
 cggggaaggc tggagggtg tgcgggccc cggagcggac actttcagat ccaactttca 360
 gtccagggtg tagaccctt acagccgat tgcacgggtg tagacaccgg tggaccgct 420
 ctggctcaga gcacgaggct tgggggaacc cattagggtc gcagtgtggg cgctatgaga 480
 gccgatgcag ctttcgggtg ttgaaccgta tctgccacc ttggggggag gacacaaggt 540
 cgggagccaa acgccagat catgccttgg tggccatgg gtctttgtct aaaccggtt 600
 gccatttgg cttgcccggc gggcgggcgc ggcgggccc gctcggccgg gtgggggctg 660
 ggttgccact gcgcttgcgc gctctatggc tgggtattgg ggcgctgca cgctggggag 720

ES 2 665 493 T3

ggagcccttc ctcttcccc tctccaagt taaacttgcg cgtgctgatt gagacttggg 780
 gcgcgccac cggggttggg cgagggcggg gccgttgctc ggaagggcg gggtcgcaga 840
 ggattcgggg cgctgctcg cgcttctgc tgggtgtggt cgcctcccgc gcgcgacta 900
 gaccgccgg cggggggcg aaggcgggc ttgcgccgt ttggggagg ggcggagacc 960
 tggcttcctg ccgtggggcc gcctccggac cagcgtttgc ctcttatggt aataacgcg 1020
 ccggcctggg ctccatttgt cccctgagtt tgggcgcgcg ccccttggcg gcccgagacc 1080
 gcggcctgcc ggaagtggg agggcggca cggctgcgc tagtggccc ccagtgaccg 1140
 cgaccctctt ttgtgccctg atatagttc ccatggatga cgatatcgt gcgctcgtt 1200
 tcgacaacgg ctccggcatg tgcaaacgg gcttcgcgg cgacgatgct ccccgggccg 1260
 tcttcccatc catcgtggg cgccctagg accaggtagg tgacccttc ctttgcgggt 1320
 agcgtgctg gggtttctt gggggagag gtgaccatat tgagaacatc gttcccctcc 1380
 gcagggcgtg atggtgggca tgggcccaga ggactcctac gtgggtgacg aggccagag 1440
 caagagaggt attctgacc tgaagtacc cattgaacac ggcattgtca ccaactggga 1500
 cgatatggag aagatctgg accacacct ctacaacgag ctgctgtggt cccccagga 1560
 gcaccctgtg ctgctcacc agggccccct gaacccaag gccaacctg aaaagatgac 1620
 ccaggtcagc agccaggggt gccacctcca tcttgccaa cttctcggc acgcccttc 1680
 tcaattgtct tcttctgct gttctccat aggactctt tctatgagct gagtctcct 1740
 tggactttg cagtttctg ttttccccg atgaggtcct tttttctt tgattgcctt 1800
 tctgactagg tgttttaaac cctacggtg tgtgggtgta ggtactaaca atgactcgtg 1860
 tgacaacct aatgaggctg gtgataagt gccttgaggt gtgtattcag tagatgcaca 1920
 gtaggttaa aatggagccc ctgctctgag atttctcca gcacacttac cttagctgtg 1980
 ttcttgact ctgcatgtc catatctgtc ctgacagtc tacctgcctt gactacttgt 2040
 ggcttttgg gtttgacaat gcctcattt tctttataga tcatgttga gacctcaac 2100
 acccagcca tgtacgtagc cattcaggct gtgctgtccc tgtatgcctc tggctgtacc 2160
 actggcattg tgatggactc cggagacgg gtacaccaca ctgtgccat ctatgagggc 2220
 tacgctctc ctcatgccat cctgcgtctg gacctggctg gccgggacct gacagactac 2280
 ctcatgaaga tcctgaccga gcgtggctac agctttacca ccacagctga gaggaaatt 2340
 gtgctgaca tcaagagaa gctgtgctat gttgccctgg acttcgagca ggagatggc 2400
 actgctgcat cctcttctc cctggagaag agctatgagc tgcctgatgg ccaggctac 2460
 accattggca atgagcgggt ccgttgccct gaggtcttt tccagcctc ctctctgggt 2520
 gaggttgaag gacctagttt ctcatctaa tggtagccaa ctcttgatct tgagaccatg 2580
 ctataagtct atcttctct tccctttc cctcaggtat ggaatcctgt ggcattccag 2640
 aaactacatt caattccatc atgaagtgt acgtcgacat ccgcaaagac ctctatgcca 2700
 acacagtgt gtctggtgg accaccatgt acccaggcat tgctgaccgg atgcagaagg 2760
 agatcactgc tctggctccc agcaccatga agatcaagg gagctaagca tccttagcct 2820
 tggaccatg atgggccctt ccaggccaac cccttgactg tgggtaagac aggagtccag 2880

ES 2 665 493 T3

agcactcact atcactgtgt cttggcttct cagatcattg ctcctcctga gcgcaagtac 2940
 tctgtgtgga tcggtggctc catcctggcc tcaactgtcca ccttccagga gatgtggatc 3000
 agcaagcagg agtacgatga gtccggcccc tccatcgtcc accgcaaagc cttctaggcg 3060
 gactgttact gagctgtgtt ttacaccctt tctttgacaa aacctaactt gcgcagaaaa 3120
 aaaaatgaga caacattggc atggctttgt ttttttgttt tgttttttta atttttttaa 3180
 aaaaggtttt gttttttttt ttttttgtgt tgttttggcg cttttgactc aggattttaa 3240
 aactggaacg gtgaaggcga cagcagtcgg ttggagcaaa catcccccaa agttctacaa 3300
 tgtggctgag gactttgatt gcacattttt tttctttttt aagtcattcc aagtaccat 3360
 gagatggcta caggaagtcc ctcaccctcc caaaagccat cccatttccc tagaagagga 3420
 tggctgagtc cattccctga gtccacaccg gggagggtgac agcattgctt ctgtgtaaat 3480
 tatggactcc caaaattttt ttaaactctc cgccttaaaa cttcttttgt ttttaatttt 3540
 ggatggctca ccatcgtggc cccttttttt tttttttttt tttgtcccc caacttgatg 3600
 tatgaaggct tttggctctc ctgggagtgg gttgagggtg tgaggcagcc agggcttgcc 3660
 tgtacactga cttgagacca gtttaataaa gtgcacacct tacaacagc gctgcttggt 3720
 tgtggctttg ctagattctg ggtagcagcg ggggaggggg tcactattac ctttgctcca 3780
 agaggttcta ggggtggtctg ggccttgcc agtagttttt agtgggagga cacaagcatc 3840
 atgaccttta accagttatc acaaatacc tgtccattga gttctgaagt ctttaattgtg 3900
 tcttggttgg aagggtgtcc atcctgaatt ggaataccc cctgggcca gttgggttcc 3960
 tgcaagaaac aaccctgtaa tctcaacct cctctacct tgtgggaagc aggaatcctg 4020
 ttgggaggg agctttactg cttttgagtt ctgcaagaca gtgggaagta aaagcagctt 4080
 cggttctctt gctttaccag atacatgatc acaaagtta aggggtgtaa ggctccccag 4140
 gcatgggtat ctttccccgg tacc 4164

<210> 5

<211> 2011

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 5

gagctctgtc tcttggccag ctgaatggag gccagcggc aacacaggtc ctgcctgggg 60
 atcagggtctg ctctgcaccc caccttgctg cctggagccg cccacctgac aacctctcat 120
 ccctgctctg tagatccggt cccateccca ctgcccaccc cccccccca gcactccacc 180
 cagttcaacg ttccacgaac ccccagaacc agccctcatc aacaggcagc aagaagggcc 240
 ccccgccat cgccccacaa cgccagccgg gtgaactgta gcgttggcag gtccctgaggc 300
 agctgaaaga tacaaggcca gggacaggac agtcccatcc ccaggaggca gggagtatac 360
 aggctgggga agtttgccct tgcgtggggg ggtgatggag gaggctcagc aagtcttctg 420
 gactgtgaac ctgtgtctgc cactgtgtgc tgggtgggtg tcatctttcc caccaggctg 480
 tggcctctgc aaccttcaag ggaggagcag gtccattgg ctgagcacag cttgtacgt 540
 gaactgaaca agcagcctcc ttcctggcca caggttccat gtccttatat ggactcatct 600

ES 2 665 493 T3

'ttgcctattg cgacacacac tcaatgaaca cctactacgc gctgcaaaga gccccgcagg 660
 cctgaggtgc cccacacctca ccactcttcc tatttttgtg taaaaatcca gcttcttgtc 720
 accacacctca aggaggggga ggaggaggaa ggcaggttcc tctaggctga gccgaatgcc 780
 cctctgtggt cccacgccac tgatcgctgc atgcccacca cctgggtaca cacagtctgt 840
 gattcccgga gcagaacgga ccctgcccac ccggtcttgt gtgctactca gtggacagac 900
 ccaaggcaag aaaggggtgac aaggacaggg tcttcccagg ctggctttga gttcctagca 960
 ccgccccgcc cccaatctc tgtggcacat ggagtcttgg tccccagagt cccccagcgg 1020
 cctccagatg gtctgggagg gcagttcagc tgtggctgcy catagcagac atacaacgga 1080
 cgggtgggcc agaccaggc tgtgtagacc cagccccccc gccccgcagt gcctaggta 1140
 cccactaacg ccccaggcct ggtcttggct gggcgtgact gttaccctca aaagcaggca 1200
 gctccagggt aaaagggtgcc ctgccctgta gagcccactt ccttcccagg gctgcggctg 1260
 ggtaggtttg tagccttcat cacgggccac ctccagccac tggaccgctg gccctgccc 1320
 tgtctggggg agtgtggtcc tgcgactcta atggccgcaa gccacctgac tcccccaaca 1380
 ccacactcta cctctcaagc ccaggtctct ccctagtgac ccaccagca catttagcta 1440
 gctgagcccc acagccagag gtcctcaggc cctgctttca gggcagttgc tctgaagtcg 1500
 gcaaggggga gtgactgcct ggccactcca tgccctcaa gagctcctt tgcaggagcg 1560
 tacagaacct agggccttg caccctgca gaccctggc caccacact gggcgctcag 1620
 tgcccaagag atgtccacac ctaggatgtc ccgcggggg tggggggccc gagagacggg 1680
 caggccgggg gcaggcctgg ccatgcgggg ccgaaccggg cactgccag cgtggggcgc 1740
 gggggccacg gcgcgcgccc ccagccccg ggccagcac cccaaggcgg ccaacgc caa 1800
 aactctccct cctcctctt ctcaatctcg ctctcgctct ttttttttt cgcaaaagga 1860
 ggggagaggg ggtaaaaaaa tgctgactg tcggcgaagc cggtgagtga gcggcgcggg 1920
 gccaatcgcg tgcgccgtt cgaaggttgc cttttatggc tcgagcggcc gcggcggcgc 1980
 cctataaaac ccagcggcgc gacgcgccac c 2011

<210> 6

<211> 1278

<212> ADN

5 <213> *Gallus gallus*

<400> 6

tcgaggtgag cccacggtt tgcttcaact tcccctctc cccccctcc ccacccccaa 60
 ttttgtatth atttatthtt taattattht gtgcagcgat gggggcgggg gggggggggg 120
 cgcgcgccag gcggggcggg gcggggcgag gggcggggcg gggcgaggcg gagaggtgcy 180
 gcggcagcca atcagagcgg cgcgctccga aagtttctt ttatggcgag gcggcggcgg 240
 cggcggccct ataaaaagc aagcgcgcgg cggcggggag tcgctgcgtt gccttcgccc 300
 cgtgccccgc tccgcgccgc ctgcgcgcc ccgccccggc tctgactgac cgcgttactc 360
 ccacaggtga gcgggcggga cggcccttct cctccgggct gtaattagcg cttggtttaa 420
 tgacggctcg tttcttttct gtggctgcyt gaaagcctta aagggtccg ggagggccct 480
 ttgtgcgggg gggagcggct cggggggtgc gtgcgtgtgt gtgtgcgtgg ggagcgcgcg 540

ES 2 665 493 T3

gtgcggcccc cgctgccccg cggctgtgag cgctgcgggc gcggcgcggg gctttgtgcg 600
ctccgcgtgt gcgcgagggg agcgcggccg gggcggtgc cccgcggtgc ggggggctg 660
cgaggggaac aaaggctgcg tgcggggtgt gtgcgtgggg gggtgagcag ggggtgtggg 720
cgcgcggtc gggctgtaac cccccctgc acccccctcc ccgagttgct gagcacggcc 780
cggcttcggg tgcggggctc cgtgcggggc gtggcgcggg gctcgcctg ccgggcgggg 840
ggtgcgggca ggtgggggtg ccggcgggg cggggccgcc tcgggcccgg gagggctcgg 900
gggaggggcg cggcggcccc ggagcgccgg cggctgtcga ggcgcggcga gccgcagcca 960
ttgcctttta tggtaatcgt gcgagagggc gcagggactt cttttgtccc aaatctggcg 1020
gagccgaaat ctgggaggcg ccgccgacc ccctctagcg ggcgcgggcg aagcggtgcg 1080
gcgccggcag gaaggaatg ggcggggagg gccttcgtgc gtcgccgcgc cgccgtcccc 1140
ttctccatct ccagcctcgg gctgcccga gggggacggc tgccttcggg ggggacgggg 1200
cagggcgggg ttcggcttct ggcgtgtgac cggcggggtt tatacttcc cttctctgtt 1260
cctccgcagc cagccatg 1278

<210> 7

<211> 3668

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia del promotor de beta-actina más larga de células CHO

<400> 7

cttctccac ttcctcttc cccacccca ccctgtttc tgtgctctct cctgtctgca 60
catcaaacct aacaactcag gcatccccct ctggccctgc catcttctca gggctctctc 120
cttcttcag gctgaggaca cccaggccag gcagcctcgt attcatcaa cagaacagag 180
cccctcagt tgtgtgtagt gggaggaagt ggggggtgtg gagcccctca aagggtctgc 240
ttgtttgatg ttgtgggggt tgggggcagt gctgagttaa gactagcctg aatagcacca 300
tgactgtctg catagctact caggaagctg aggcaggaag atgaggagt ggaggccagc 360
ctgggctata tagggagaca ctatttcaa caaacaggag gagctgggca tggtygcata 420
tgcctttaat cataaactc aggaagtaca ggcaggagga ttaggagttc aaggttactt 480
gggctacata gagaatttga ggcagctca ggctgcgtga gacactgtca aaaaaacaaa 540
agaacaaaac cccacacac aaaaaaact tcccaacaaa ccaagaaaat caatctctct 600
ctcgttatct cttgctttct ctcatgccta agagaact ggaatggc cattgcagac 660
cgggaccaag acagaacct aagccagtgg gatagatcag aaatgttcca gaggtgggat 720
ggggccagag tgcctgccc ttgaaccgtc ccagggacca gaggtgacaa agtggcaaca 780
caggtcctgc ctgggaatct ggtctgtcc tacttagtaa agctgcctgg tgtcacacaa 840
gaggccccca ctattcctg caccctgggt ggtaggtggc gtcttctccc ctgcagccac 900
caggctcccc tgagaactc gccggcagtc ctcatgaca ggcagtattc gctctgcccc 960
acccccacct gtgaattgca gggctggcag gtcctcaggc agctggcaaa ccgcctgaac 1020
aactgagaga tacagggcca gggccagggc agtcccgtcc cccggaggca gggaggggac 1080

ES 2 665 493 T3

gtgctgggaa agttctctct ctcaggccca ggttggtgac tgcagaaggc ttctgtcaaa 1140
 tctcttttgt gggaaaccaca gagtagccct gaacgtgggg gtgtgcttcc agtatactct 1200
 ggggtcaccc tttccatact ggaggcctct gcaacttcaa aatgctctgc taccaaccta 1260
 gcacaaggaa gttggtccag cctccccacg cagggccact gctgcagtcc atatatggac 1320
 taagccttcc ttggtttcaa cacctacact cactgagccc ctactatgtg tatgcagagc 1380
 cgagacaggc ccgagcatct catctgaagc acccttcttg cctaaattca gttttctgtc 1440
 acttttctccc aggaggtgtg tgtccctcta agctaagcca ggggtccctc acccctgccc 1500
 cactcccatc cctagtgtag gtatcagctg aagagcttcc tgagcagaac actcttgggt 1560
 gctgacattt tgataaatag gcccatgttt aggagagcag ggggtccggg gcgggagatc 1620
 ttctctggtg gattgagggc tccaagaact actctttgag cacgctgccc ctcccagagt 1680
 cccacagcc tccagatgga ctagaacaca gttcggctgt ggctgcacat aactaacaga 1740
 ggatagatgg tgggtcccag cccaacagtg cctggcaatc acccagagcc accagctaac 1800
 ggcttggct tagttttttg cctgggtgtg atcaggcagc cctccaaaac tgcccggact 1860
 ccatgacaag ttttgcttgt tctatagagc acagttcctt tctaggtctg gggcaaggga 1920
 catcgggaga catcttctct caacagctcc agtcaactgga ccaccaggct cgccctgtct 1980
 ttggtgtgtg gccctgagtc tcctaagtgg cccaaacctg tgaagacccc tccaaccaca 2040
 gttttgcttc taaattgtac cccaacacac ctagcaaatt gaaacccac cagaagtccc 2100
 ccagatctgg ctttccggtc attgctggca agggggagtg actcccggcc cattcaatcc 2160
 aggccccgcy tgttctcaa acaagaagcc acgtaaacat aaaccgagcc tccatgctga 2220
 cccttgccc tcgaggtact caatgttcc gtgatatcca caccagagg gtcctggggt 2280
 ggggtcatga gccccagaat gcaggcttga taaccgagac cctgaatcgg gcagtgtcca 2340
 caagggcgga gcccagtc tgcatgttcg ggcctatggg gccagcacc aacgcaaaa 2400
 ctctccatcc tcttctcaa tctcggcttt ctctctctct ctctttttt ttttttattt 2460
 ttttttttg caaaaggagg ggagaggggg taaaaaatg ctgcaactgtg cggctaggcc 2520
 ggtgagttag cggcgcgag ccaatcagcy ctcgccgttc cgaaagtgc cttttatggc 2580
 tcgagtggcc gctgtggcgt cctataaaac ccggcggcgc aacgcgcagc cactgtcgag 2640
 tccgcgtcca cccgcgagca caggcctttc gcagctcttt cttcgcgct ccacaccgc 2700
 caccaggtaa gcagggacaa caggcccagc cggccacagc cctcccgtgg gcagtgaccg 2760
 cgctgcaggg tcgcggggga cactcggcgc ggacaccggg gaaggctgga ggggtgtgcc 2820
 gggccgcgga gcggacactt tcagatccaa ctttcagtcc aggggtgtaga ccctttacag 2880
 ccgcattgcc acggtgtaga caccggtgga cccgctctgg ctcagagcac gcggcttggg 2940
 ggaaccatt agggtcgag tgtggcgct atgagagcc atgcagctt cgggtgttga 3000
 accgtatctg cccaccttg ggggaggaca caaggtcggg agccaaacgc cacgatcatg 3060
 ccttggggc ccatgggtct ttgtctaaac cggtttgcct atttggcttg ccgggcccc 3120
 gggcgcgcg gcgccgctc ggccgggtgg gggctgggtt gccactgcyt ttgcgcgctc 3180
 tatggctggg tattggggcg cgtgcacgct ggggagggag cccttctct tccccctctc 3240

ES 2 665 493 T3

ccaagttaaa cttgcgcgtg cgtattgaga cttggagcgc ggccaccggg gttgggcgag 3300
 ggcggggccc ttgtccggaa ggggcggggt cgcagcggct tcggggcgcc tgctcgcgct 3360
 tcctgctggg tgtggtcgcc tcccgcgcgc gcaactagcc cccgccggcg gggcgaaggc 3420
 ggggcttgcg cccgtttggg gagggggcgg aggcctggct tcctgccgtg gggccgcctc 3480
 cggaccagcg tttgcctctt atggttaataa cgcggccggc ctgggcttcc tttgtcccct 3540
 gagtttgggc gcgcgcccc tggcggcccg aggcgcggc ttgccggaag tgggcagggc 3600
 ggcagcggct gcgcctagtg gcccgctagt gaccgcgacc ctcttttggt ccctgatata 3660
 gttcgccg 3668
 <210> 8
 <211> 19
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador directo para beta-actina
 <400> 8
 gctcttctt cgccgctcc 19
 10 <210> 9
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> cebador inverso para beta-actina
 <400> 9
 accaccctcc agcctccc 19
 <210> 10
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador directo para EF-1
 <400> 10
 25 gaacgcaggt gttgtgaaaa 20
 <210> 11
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> cebador inverso para EF-1

<400> 11
 ctcggcagcc tocttct 17
 <210> 12
 <211> 16
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador directo para rps21
 <400> 12
 10 gtggacctgt acgtgc 16
 <210> 13
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> cebador inverso para rpS21
 <400> 13
 ttctcacttt tattatgac 20
 <210> 14
 20 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador directo para ferritina
 25 <400> 14
 cgccagaact accaccagga c 21
 <210> 15
 <211> 20
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador inverso para ferritina
 <400> 15
 ttcagagcca catcatcccg 20
 35 <210> 16
 <211> 21
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador directo para galectina
 <400> 16
 5 tggtcgcaag caacctgaat c 21
 <210> 17
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> cebador inverso para galectina
 <400> 17
 ttgaagtcac cgtctgccgc 20
 <210> 18
 15 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador directo M13
 20 <400> 18
 gtttccag tcacgac 17
 <210> 19
 <211> 14
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> etiqueta de SAGE de repetición alu
 <400> 19
 catggaagca gaat 14
 30 <210> 20
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> etiqueta de SAGE de COX I mitocondrial
 <400> 20
 catgcaggag cttc 14

<210> 21
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> etiqueta de SAGE de proteína ribosómica S21
 <400> 21
 catgggggag cgtt 14
 <210> 22
 10 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> etiqueta de SAGE de COX II mitocondrial
 15 <400> 22
 catggtactg acac 14
 <210> 23
 <211> 14
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> etiqueta de SAGE de GAPDH
 <400> 23
 catggcctcc aagg 14
 25 <210> 24
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> etiqueta de SAGE de ATPasa mitocondrial
 <400> 24
 catgataata cgta 14
 <210> 25
 <211> 14
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> etiqueta de SAGE de repetición B-1
 <400> 25
 catgcctta atcc 14
 <210> 26
 5 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> etiqueta de SAGE de citocromo B mitocondrial
 10 <400> 26
 catgaatcgg aggc 14
 <210> 27
 <211> 14
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> etiqueta de SAGE de EF-1
 <400> 27
 catgaggcag acag 14
 20 <210> 28
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> etiqueta de SAGE de galectina
 <400> 28
 catggcggca gacg 14
 <210> 29
 <211> 14
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> etiqueta de SAGE de repetición Alu
 <400> 29
 35 catggtggct caca 14
 <210> 30
 <211> 14

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> etiqueta de SAGE de cadena pesada de ferritina
 5 <400> 30
 catgttggt gccg 14
 <210> 31
 <211> 14
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> etiqueta de SAGE desconocida
 <400> 31
 catgccctgt gccg 14
 15 <210> 32
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> etiqueta de SAGE de proteína ribosómica L41
 <400> 32
 catgagagcg aagt 14
 <210> 33
 <211> 14
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> etiqueta de SAGE de deshidrogenasa mitocondrial
 <400> 33
 30 catgaggagg ccta 14
 <210> 34
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> etiqueta de SAGE de beta-actina
 <400> 34

catgccctga gtcc 14
 <210> 35
 <211> 26
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador directo para amplificar el intrón 1 que contiene el promotor de beta-actina
 <400> 35
 aggccagct tgggaccaag acagaa 26
 10 <210> 36
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> cebador inverso para amplificar el intrón 1 que contiene el promotor de beta-actina
 <400> 36
 cgcggatccg gcgaactata tcagggc 27
 <210> 37
 <211> 1884
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADNc que codifica esfingomielinasa ácida
 <400> 37

ES 2 665 493 T3

atggcccgct acggagcgtc actccgccag agctgcccga ggtccggccg ggagcagggg 60
 caagacggga ccgccggagc ccccgactc ctttgatgg gcctggcgct ggcgctggcg 120
 ctggcgctgg ctctgtctga ctctcgggtt ctctgggctc cggcagaggc tcaccctctt 180
 tctccccaag gccatcctgc caggttacat cgcatagtgc cccggctccg agatgtcttt 240
 ggggtggggg acctcacctg cccaatctgc aaaggctctat tcaccgcat caacctcggg 300
 ctgaagaagg aaccaatgt ggctcgcgtg ggctccgtgg ccatcaagct gtgcaatctg 360
 ctgaagatag caccacctgc cgtgtgcaa tccattgtcc acctcttga ggatgacatg 420
 gtggagggtg ggagacgctc agtctgagc ccatctgagg cctgtggcct gctcctgggc 480
 tccacctgtg ggcactggga cttttctca tcttggaa ca tctctttgcc tactgtgccg 540
 aagccgcccc ccaaaccccc tagccccca gcccagggtg cccctgtcag ccgcatcctc 600
 ttcctcactg acctgcactg ggatcatgac tacctggagg gcacggacc tgactgtgca 660
 gaccactgt gctgccgccc gggttctggc ctgccgccc catcccggcc aggtgccgga 720
 tactggggcg aatacagcaa gtgtgacctg cccctgagga ccctggagag cctgttgagt 780
 gggctgggcc, cagccggccc tttgatatg gtgtactgga caggagacat ccccgacat 840
 gatgtctggc accagactcg tcaggaccaa ctgcccggccc tgaccaccgt cacagcactt 900
 gtgaggaagt tcctggggcc agtgccagtg tacctgtctg tggtaacca tgaaagcaca 960
 cctgtcaata gcttccctcc ccccttcatt gagggcaacc actcctcccg ctggctctat 1020
 gaagcgtg ccaaggcttg ggagccctgg ctgcctgccg aagccctgcg caccctcaga 1080
 attgggggt tctatgctct tccccatac cccggctctc gcctcatctc tctcaatatg 1140
 aattttgtt cccgtgagaa cttctggctc ttgatcaact ccacggatcc cgcaggacag 1200
 ctccagtggc tgggtggggg gcttcaggct gctgaggatc gaggagacaa agtgcataata 1260
 attggccaca tccccagag gcaactgtctg aagagctgga gctggaatta ttaccgaatt 1320
 gtgaccagg atgagaacac cctggctgct cagttctttg gccacactca tgtggatgaa 1380
 tttgaggct tctatgatga agagactctg agccggccgc tggctgtagc cttcctggca 1440
 cccagtgcaa ctacctacat cggccttaat cctgggtacc gtgtgtacca aatagatgga 1500
 aactactccg ggagctctca cgtggctctg gaccatgaga cctacatcct gaatctgacc 1560
 caggcaaaca taccgggagc cataccgac tggcagcttc tctacaggc tcgagaaacc 1620
 tatgggctgc ccaacacact gcctaccgcc tggcacaacc tggatatatc catgccccg 1680

 gacatgcaac tttccagac cttctggttt ctctaccata agggccacc accctcggag 1740
 ccctgtggca cgccctgccg tctggctact ctttgtgcc agctctctgc ccgtgctgac 1800
 agccctgctc tgtgcccca cctgatgcca gatgggagcc tcccagaggc ccagagcctg 1860
 tggccaaggc cactgttttg ctga 1884

<210> 38

5 <211> 2859

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADNc que codifica alfa-glucosidasa

10 <400> 38

ES 2 665 493 T3

atgggagtga ggcacccgcc ctgctccac cggctcctgg cgtctgccc cctcgtgtcc 60
 ttggcaaccg ctgcaactcct ggggcacatc ctactcctatg atttctgct ggttccccga 120
 gagctgagtg gctcctcccc agtctctggag gagactcacc cagctcacca gcagggagcc 180
 agcagaccag ggcctcggga tgcccaggca caccctggcc gtcccagagc agtgcccaca 240
 cagtgcgacg tccccccaa cagccgcttc gattgcgccc ctgacaaggc catcacccag 300
 gaacagtgcg aggcctcggg ctgctgctac atcctgcaa agcaggggct gcagggagcc 360
 cagatggggc agcctcgtg cttcttcca cccagctacc ccagctaca gctggagaac 420
 ctgagctcct ctgaaatggg ctacacggcc accctgacc gtaccacccc caccttcttc 480
 cccaaggaca tcctgaccct gcggctggac gtgatgatgg agactgagaa ccgcctccac 540
 ttcacgatca aagatccagc taacaggcgc tacgaggtgc ccttgagac cccgcgtgtc 600
 cacagccggg caccgtcccc actctacagc gtggagttct ctgaggagcc cttcggggtg 660
 atcgtgcacc ggcagctgga cggccgctg ctgctgaaca cgacggtggc gccctgttc 720
 tttgaggacc agttccttca gctgtccacc tcgtgccct cgcagtatat cacaggcctc 780
 gccgagcacc tcagtcccct gatgtcagc accagctgga ccaggatcac cctgtggaac 840
 cgggaccttg cgcccacgcc cgtgctgaac ctctacgggt ctacccttt ctacctgctg 900
 ctggaggagc gcgggtcggc acacggggtg ttctgctaa acagcaatgc catggatgtg 960
 gtcctgcagc cgagccctgc ccttagctgg aggtcgacag gtgggatcct ggatgtctac 1020
 atcttcttgg gccagagcc caagagcgtg gtgcagcagt acctggacgt tgtgggatac 1080
 ccgttcatgc cgccatactg gggcctgggc ttccacctgt gccgctgggg ctactcctcc 1140
 accgctatca cccgccaggt ggtggagaac atgaccaggg cccacttccc cctggacgtc 1200
 caatggaacg acctggacta catggactcc cggagggact tcacgttcaa caaggatggc 1260
 ttccgggact tcccggccat ggtgcaggag ctgcaccagg gcggccggcg ctacatgatg 1320
 atcgtggatc ctgccatcag cagctcgggc cctgccggga gctacaggcc ctacgacgag 1380
 ggtctgcgga ggggggtttt catcaccaac gagaccggcc agccgctgat tgggaaggta 1440
 tggccgggt cactgcctt ccccacttc accaaccaca cagccctggc ctggtgggag 1500
 gacatggtgg ctgagttcca tgaccaggtg cccttcgacg gcatgtggat tgacatgaac 1560
 gagccttcca acttcatcag gggctctgag gacggctgcc ccaacaatga gctggagaac 1620

ES 2 665 493 T3

ccaccctacg tgcctggggt ggttgggggg accctccagg cggccaecat ctgtgcctcc 1680
agccaccagt ttctctccac aactataaac ctgcacaacc tctacggcct gaccgaagcc 1740
atcgcctccc acagggcgct ggtgaaggct cgggggacac gccatttgt gatctcccgc 1800
tcgacctttg ctggccacgg ccgatacgcc ggcactgga cgggggacgt gtggagctcc 1860
tgggagcagc tcgctcctc cgtgccagaa atcctgcagt ttaacctgct gggggtgcct 1920
ctggtcgggg ccgacgtctg cggcttcctg ggcaaacct cagaggagct gtgtgtgcgc 1980
tggaccacgc tgggggcctt ctacccttc atgcggaacc acaacagcct gctcagtctg 2040
ccccaggagc cgtacagctt cagcagccg gccagcagg ccatgaggaa ggccctcacc 2100
ctgcgctacg cactcctccc ccacctctac acgctgttcc accaggcca cgtcgcgggg 2160
gagaccgtgg cccggcccct cttctggag tcccccaagg actctagcac ctggactgtg 2220
gaccaccagc tcctgtgggg ggaggccctg ctcatcacc cagtgtcca ggccgggaag 2280
gccgaagtga ctggctactt ccccttgggc acatggtacg acctgcagac ggtgccaata 2340
gaggcccttg gcagcctccc accccacct gcagctccc gtgagccagc catccacagc 2400
gaggggagc ggggtgacgt gccggcccc ctggacacca tcaacgtcca cctccgggct 2460
gggtacatca tccccctgca gggccctggc ctcaacaaca cagagtccg ccagcagccc 2520
atggcccttg ctgtggccct gaccaagggt ggagaggccc gaggggagct gttctgggac 2580
gatggagaga gcctggaagt gctggagcga ggggcctaca cacaggtcat cttcctggcc 2640
aggaataaca cgatcgtgaa tgagctggta cgtgtgacca gtgagggagc tggcctgcag 2700
ctgcagaagg tgactgtcct gggcgtggcc acggcgcccc agcaggtcct ctccaacggt 2760
gtccctgtct ccaacttcac ctacagcccc gacaccaagg tcctggacat ctgtgtctcg 2820
ctgttgatgg gagagcagtt tctcgtcagc tgggtgtaa 2859

<210> 39

<211> 1958

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> promotor de rpS21 de hámster

<400> 39

gatcaacatt tacgctggct gttttaatga gagcaccggt cttgggtcac ctactgtca 60
cattggatga ggaccagta agtctgaga gccgcagatg tagccggtgt gggatgaatgc 120
tgggctgggt tctgctggtc aaggctaccag aggctgcctc agcttctca gagggacaaa 180
gggtcattaa cactgaggag gcttgtttat tagtttactc ttttcttcc acctaaaagt 240
ttgagctttt ctattagtgc tacaagtatg catcatggtc tgcttctcgt gaaggttttg 300
agcagatgga acacattcta tgaaaacccc tatcacaacc ctgtctacta attctaaact 360
ctgagtcagt cctgggtcag tttcaacggg ctgttcttc tctcattagt ggccatattc 420
ccttgctggt ggatttgga gctctgagt ggataccaga aaatacgatt ttttctttg 480
ttgtgggctt catgctgcct ttgtgttccg tttttttttt tttggggggg gggatgtggt 540

ES 2 665 493 T3

ggagttatatt ggtaataactt tgacccttgc aggccctggt tttatgatgt tagggggccc 600
taggcattgt tcagggcagt tactggaggc tagacctttc tcaacactct aaccagtg 660
tatgtgcaact aaactttttc acctgtttcc agtccctgcc ctttttagga ctgctgaatt 720
tgctgagtag agctactgca aatttctggg gttttccttg gccactttct ccttactggc 780
actctgggtg tgctccatct ctggccacta aagagacctt cagggttcaa ctcaacacac 840
acaggtgcag ctctcaaagc taaaacacaa acaaaccacc cttgtacaca ggccctatgg 900
cctccaagg gcagtggtc taagtcttctg ttctgatgca cagaaagggt ctagtggaaa 960
ttccagacac aatgccaca cctgctttcc caggcgtgag gagggtttca gcagacctca 1020
tgacagtcct gggaaagggtg cgggtgcgcg tggcagggag gggagagctc tccccaagat 1080
catttaactg ggtgtgcaca cctgaggcac cagtctgcc agagagacat caggtgcaca 1140
gttctacaga taagcgagac aagcggctcc tatgtgaaga atgtaacggg aggaaaacca 1200
acagtgtaga ctgggagtct tgtgtccggg ctggtttga gcctcttcaa cagggggctg 1260
cctgagcgtt aggggcattt tcctcctggt ttttaaagat tttatttgtt atgtagacag 1320
tgtactgcac cctctgggca gactcacaac actgggcggc cggatgccgt gctggccaga 1380
gcaggagagg gcagggcctg ggtggagacg ccgcagggga gcgcgccggc ccggacgcct 1440
ggctggtctc ggcggttccc actggactgc cgctctgctg acaccctgc ccgcctcct 1500
ccgccgcgac tggcggcggc ttccggggag cgatttccag gtgcaggtct ggggtgtcgg 1560
cgtccccgca ggcgagccgg ctcccttca cgctcttct atcccgcgcc cccgccgcc 1620
cccgccccc cctcaacctc aagcagggga gaccggccg gggcggggca cgaagagcg 1680
ggcggctcct gctgtgggcg gagctctcct gctatgggcg gagctggggg cggagccgcc 1740
ttggtagggg agagccaggc tccagtgtct gaggctttgt gcggaagagc cggggcttct 1800
ttgaccgga agcggagaa aagactccca agccggcctc cggaacgggt gatacagca 1860
tcgtgacctg gaagtattca ccacacgac cggccctccc gcccaagaga gctgcctggg 1920
gacgaccac ttctttctg cgctccgctg gcctagag 1958

<210> 40

<211> 26

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 40

agctctaata cgactcacta tagggc 26

10 <210> 41

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 41

ctctaggcca gcggagcgca g 21

REIVINDICACIONES

1. Un promotor de rpS21 aislado que tiene la secuencia nucleotídica expuesta en SEC ID NO: 39, o una variante de la misma que tiene actividad promotora, en el que la identidad de la variante y de la SEC ID NO: 39 es de al menos 95% a lo largo de toda la longitud de la SEC ID NO: 39.
- 5 2. Un vector que comprende el promotor de la reivindicación 1.
3. El vector de la reivindicación 2, en el que la secuencia nucleotídica está ligada operablemente a un ácido nucleico heterólogo.
4. El vector de la reivindicación 3, en el que el ácido nucleico heterólogo codifica una proteína terapéutica.
5. El vector de la reivindicación 4, en el que la proteína es terapéutica es α -glucosidasa o esfingomielinasa ácida.
- 10 6. Una célula hospedante transfectada con el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5.
7. La célula hospedante de la reivindicación 6, en la que la célula hospedante es una célula de ovario de hámster chino (CHO).
8. Un método para producir una proteína, en el que el método comprende:
 - 15 (a) cultivar una célula transfectada con el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 2-5, en el que el promotor está ligado operablemente a una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína; y
 - (b) recuperar la proteína.
9. El método de la reivindicación 8, en el que la proteína es un anticuerpo.
10. El método de la reivindicación 8, en el que la proteína es una proteína terapéutica.
11. El método de la reivindicación 10, en el que la proteína terapéutica es α -glucosidasa o esfingomielinasa ácida.
- 20 12. Un animal transgénico no humano que comprende el promotor de la reivindicación 1, en el que el animal contiene células manipuladas genéticamente en las que el promotor ya no está ligado operablemente al mismo ácido nucleico que en un genoma de origen natural.
- 25 13. El animal transgénico de la reivindicación 12, en el que el animal es un mamífero.

TCTGGCTCAGAGCACGGCGCTTGGGGAAACCCATTAGGGTCGCCAGTGTGGCGCTATGAG
 |||||
 TCTGGCTCAGAGCACGGCGCTTGGGGAAACCCATTAGGGTCGCCAGTGTGGCGCTATGAG
 AGCCGATGCAGCTTTCGGGTGTTGAACCGTATCTGCCACCTTGGGGGAGGACACAAGG
 |||||
 AGCCGATGCAGCTTTCGGGTGTTGAACCGTATCTGCCACCTTGGGGGAGGACACAAGG
 TCGGGAGCCAAACGCCACGATCATGCCCTTGGTGGCCCATGGGTCTTGTCTAAACCCGGTT
 |||||
 TCGGGAGCCAAACGCCACGATCATGCCCTTGGTGGCCCATGGGTCTTGTCTAAACCCGGTT
 TGCCCATTTGGCTTGCCGGCGGGCGGGCCCGGGCTCGGCCGGGTGGGGCT
 |||||
 TGCCCATTTGGCTTGCCGGCGGGCGGGCCCGGGCTCGGCCGGGTGGGGCT
 GGGTTGCCACTGCGCTTGCCGCTCTATGGCTGGGTATTGGGGCGCGTGCACGCTGGGGA
 |||||
 GGGTTGCCACTGCGCTTGCCGCTCTATGGCTGGGTATTGGGGCGCGTGCACGCTGGGGA
 GGGAGCCCTTCCTTCGCCCTCCCAAGTTAAACTTGCCTGCGTATTGAGACTTGG
 |||||
 GGGAGCCCTTCCTTCGCCCTCCCAAGTTAAACTTGCCTGCGTATTGAGACTTGG
 AGCGGGCCACCGGGTGGGGGAGGGCGGGCCGTGTCCGGAAGGGCGGGTCCGCAG
 |||||
 AGCGGGCCACCGGGTGGGGGAGGGCGGGCCGTGTCCGGAAGGGCGGGTCCGCAG

FIG. 3 (CONT. 1)

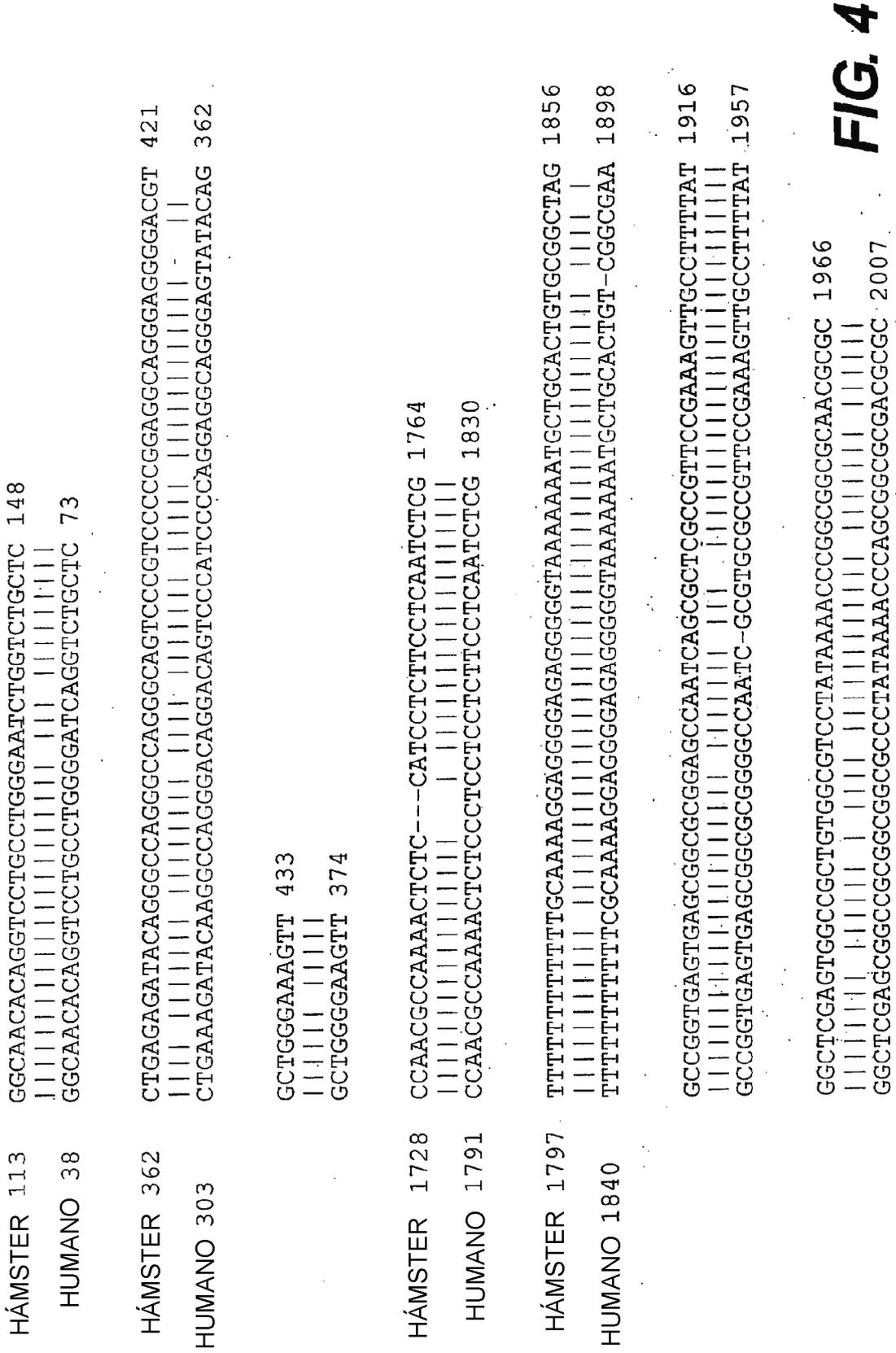


FIG. 4

HÁMSTER 1878 AGCCAATCAGCGCTCGCCGTTCCGAAAGTTGCCCTTTTATGGC 1919
|||||
POLLO 186 AGCCAATCAGAGCGCGCGCTCCGAAAGTTCCCTTTTATGGC 227

FIG. 5

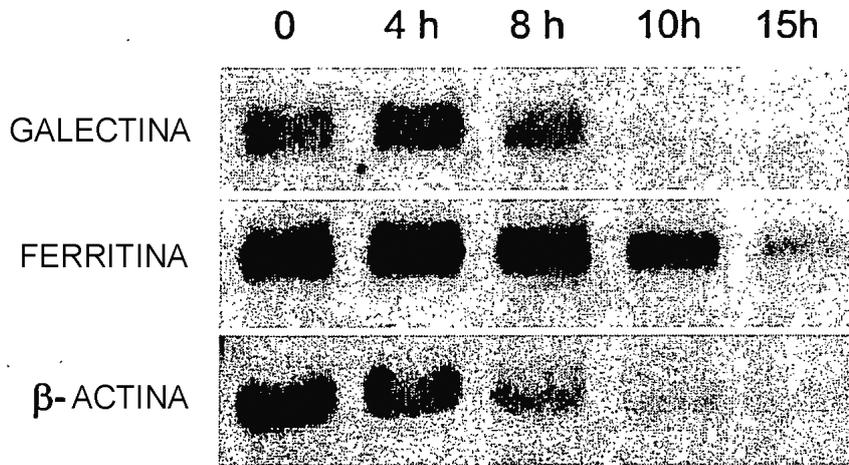


FIG. 6A

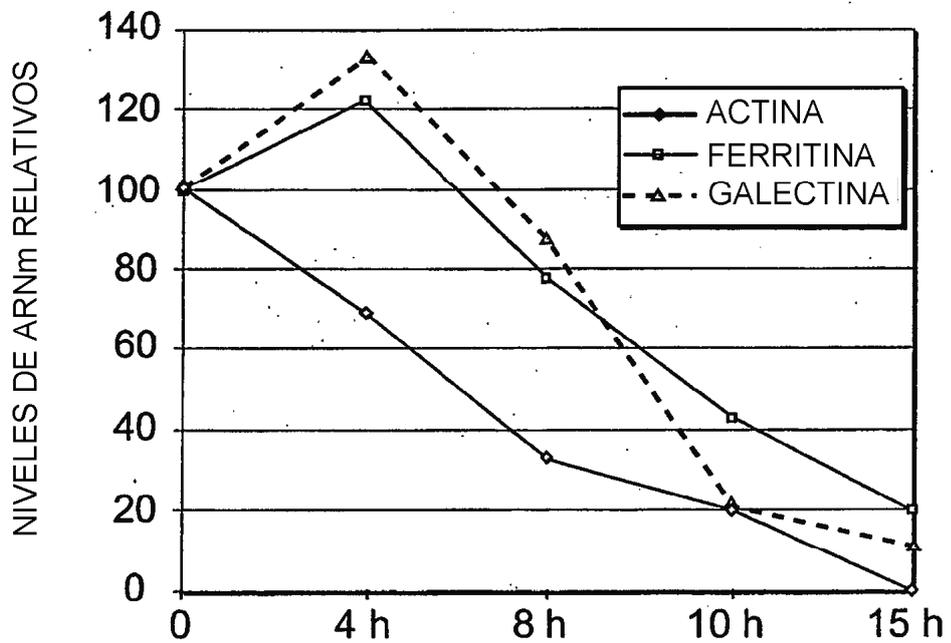


FIG. 6B

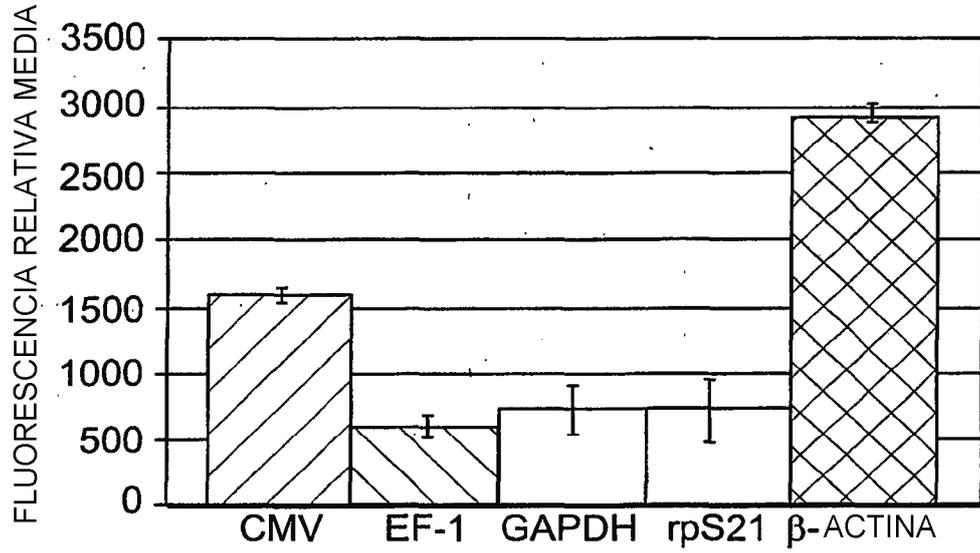


FIG. 7A

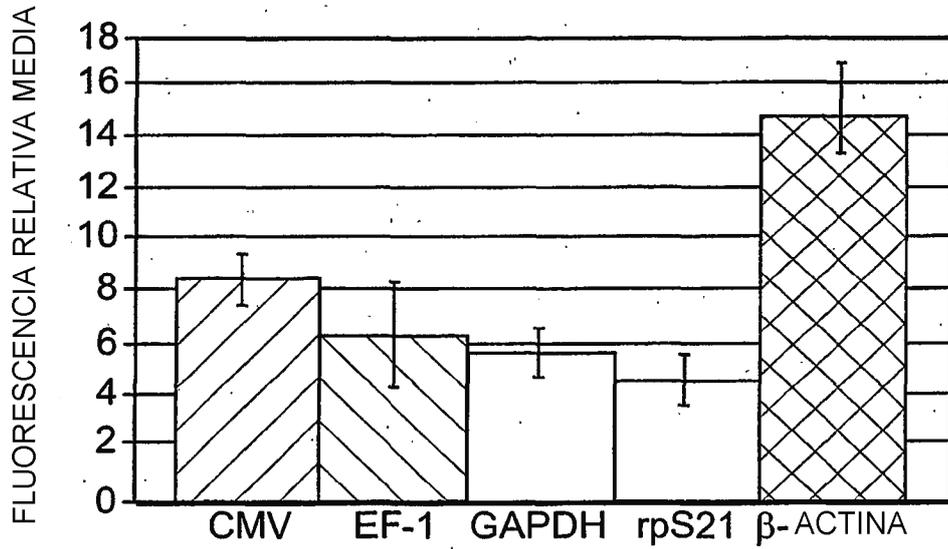


FIG. 7B

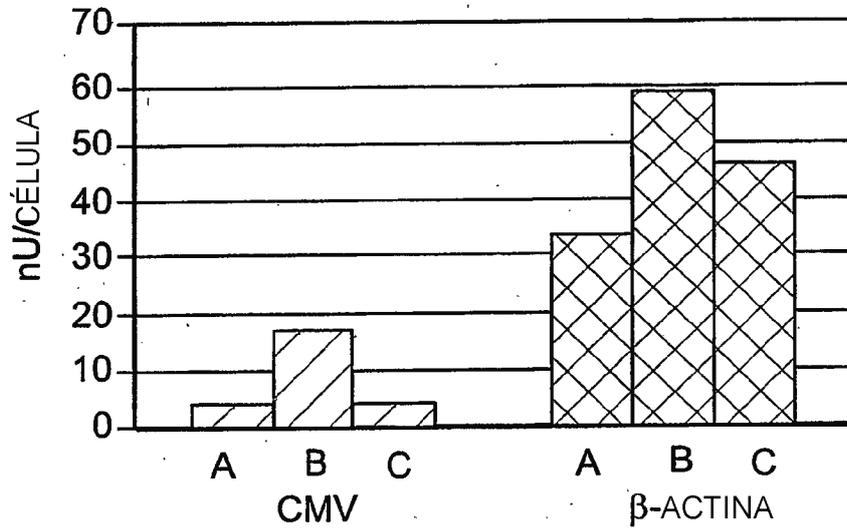


FIG. 8A

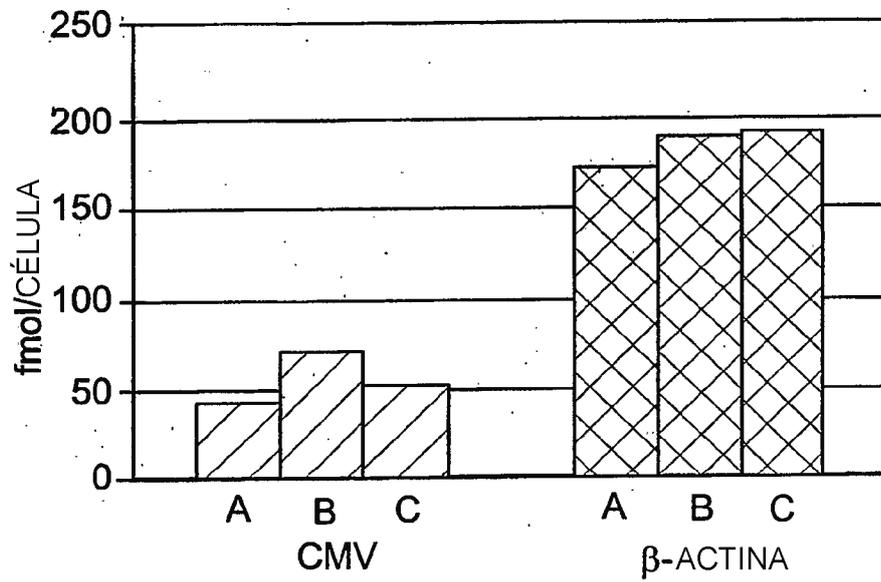


FIG. 8B

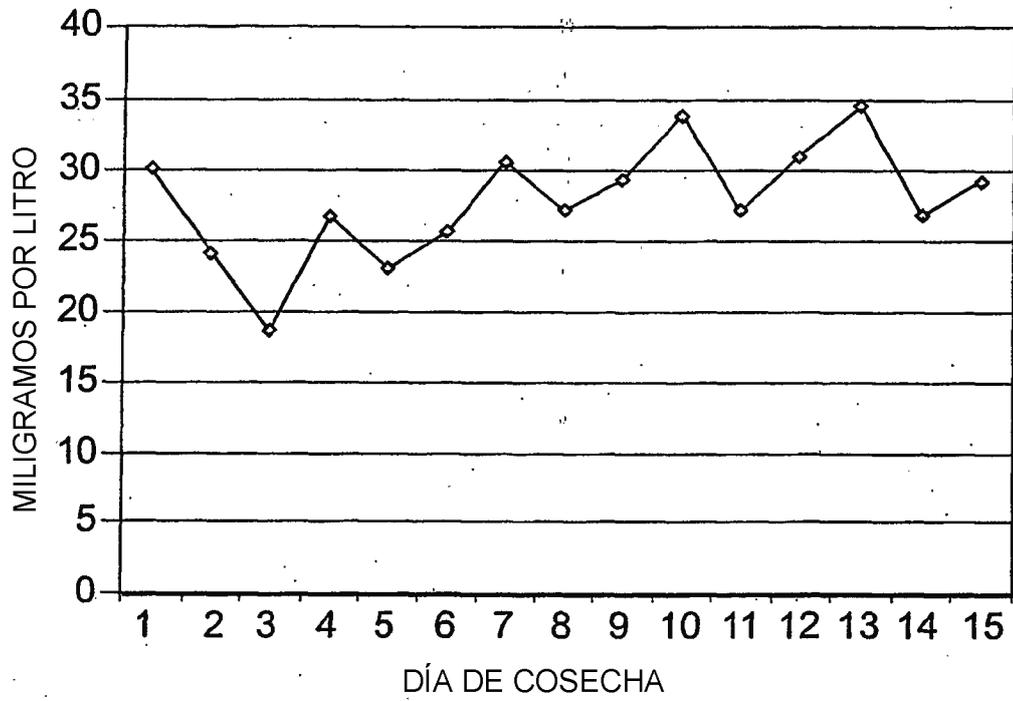


FIG. 9