

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 670 368**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.09.2009 PCT/US2009/057031**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.03.2010 WO10031074**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.09.2009 E 09813808 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.03.2018 EP 2326720**

54 Título: **Composiciones y procedimientos para regular la osmolaridad celular**

30 Prioridad:

15.09.2008 US 97149 P

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

30.05.2018

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**MALPHETTES, LAETITIA;
SNOWDEN, ANDREW y
YUK, INN, H.**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 670 368 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

Composiciones y procedimientos para regular la osmolaridad celular

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere generalmente a la biología molecular y celular, los sistemas de cultivo celular y los biorreactores, y a la producción recombinante de productos, tales como polipéptidos en cultivo celular. En particular, la presente invención proporciona composiciones y procedimientos para regular la osmolaridad intracelular en células, por ejemplo, en células cultivadas, incluyendo células cultivadas en biorreactores. Específicamente, la invención proporciona un procedimiento para expresar una proteína de interés en una célula en condiciones de hiperosmolaridad.

15 **Antecedentes de la técnica relacionada**

Los biorreactores en los que se cultivan células de mamífero se usan para preparar fármacos de proteínas recombinantes, tales como factores de crecimiento, agentes trombolíticos, interferones, interleucinas, eritropoyetinas, factores estimulantes de colonias y otras diversas citocinas y anticuerpos. Sin embargo, en los biorreactores, la osmolaridad del cultivo se incrementa como resultado de la adición de bases para controlar el pH, así como la alimentación de nutrientes y complementos para suministrar la energía necesaria para el cultivo. Típicamente, durante una tanda de biorreactores por lotes alimentados, la osmolaridad se incrementa desde aproximadamente 300 miliosmoles/kg (mOsm) a valores a veces tan altos como de 600 mOsm. Se ha demostrado que, en comparación con los cultivos celulares de 300 mOsm, en un intervalo de osmolaridad (por encima de 340 mOsm y por debajo de un umbral comprendido entre 400 y 450 mOsm), se incrementa la productividad específica de las células de mamífero, mientras que disminuye la tasa de crecimiento de las células y la tasa de muerte de las células no sufre ningún impacto. Para la mayoría de las líneas celulares parece existir un umbral de osmolaridad por encima del cual se incrementa drásticamente la tasa de muerte celular con la osmolaridad (a menudo estos umbrales parecen estar comprendidos entre 400 y 450 mOsm).

En los biorreactores, la osmolaridad incrementada se correlaciona con una tonicidad incrementada (NaCl incrementado). El alto contenido de NaCl activa el factor de transcripción proteína de unión al potenciador de respuesta a la tonicidad/elemento de respuesta osmótica (TonEBP/OREBP, donde TonE también se llama "potenciador de la tonicidad" o "elemento de respuesta osmótica"), que activa TonE, dando como resultado una transcripción incrementada de varios genes de protección, los promotores de los cuales están controlados por sus sitios de unión afines: el potenciador ORE/TonE.

La regulación de la actividad transcripcional de TonEBP/OREBP es compleja. En los 30 minutos de hipertonicidad, TonEBP/OREBP se fosforila y se transloca en el núcleo. Horas más tarde, se incrementan el ARNm de TonEBP/OREBP y la abundancia de proteínas. Además, la hipertonicidad incrementa la actividad de transactivación de TonEBP/OREBP, asociada con la fosforilación de su dominio de transactivación. Más lentamente, la hipertonicidad incrementa la abundancia de TonEBP/OREBP a través de la inducción de su ARNm y la síntesis de proteínas.

Varios artículos de ciencia básica analizan el papel de TonEBP. Hasler *et al.*, Journal of the American Society of Nephrology, vol. 17, n.º 6, junio de 2006, pág. 1521-1531, y el artículo de revisión de Jeon *et al.*, Acta Physiologica, vol. 187, n.º 1-2, mayo de 2006, pág. 241-247, informan de TonEBP y su papel en la protección de las células renales del estrés hipertónico. Na *et al.*, Journal of the American Society of Nephrology, vol. 14, n.º 2, febrero de 2003, pág. 283-288, abordan el silenciamiento del activador transcripcional TonEBP/NFAT5 mediante interferencia por el ARN. Zharkikh *et al.*, American Journal of Physiology, vol. 283, n.º 6, diciembre de 2002, pág. F1351-F1364, informan de un estudio para desarrollar ratones transgénicos con expresión celular específica principal de proteína fluorescente verde. Rai *et al.*, American Journal of Physiology, vol. 273, n.º 2 Pt 2, agosto de 1997, pág. F264-F273, se dirigen a la clonación de promotores del gen de la acuaporina-2 de rata y ratón y a la identificación de un elemento regulador en cis negativo. Woo *et al.*, Molecular and Cellular Biology, vol. 22, n.º 16, 2002, pág. 5753-5760, informan de que TonEBP/NFAT5 estimula la transcripción de HSP70 en respuesta a la hipertonicidad.

55 **Sumario de la invención**

En el presente documento se proporcionan moléculas de ácido nucleico aislado, sintético o recombinante que comprenden: (a) al menos un elemento regulador transcripcional de respuesta a la ósmosis (ORTRE) que comprende al menos un potenciador transcripcional de respuesta a TonEBP o de respuesta a NFATc enlazado funcionalmente a una secuencia reguladora transcripcional; (b) la molécula de ácido nucleico de (a), en la que la secuencia reguladora transcripcional es activa de manera transcripcional en una célula eucariótica, o la secuencia reguladora transcripcional deriva de una célula eucariótica; (c) la molécula de ácido nucleico de (a) o (b), en la que la secuencia reguladora transcripcional es activa de manera transcripcional en un vertebrado, un mamífero, un ser humano, un insecto, una planta, una levadura o una célula fúngica, o un virus, o la secuencia reguladora transcripcional deriva de un vertebrado, un mamífero, un ser humano, un insecto, una planta, una levadura o una

célula fúngica, o un virus, o la secuencia reguladora transcripcional es una secuencia sintética; o, (d) la molécula de ácido nucleico de (a), en la que la secuencia reguladora transcripcional comprende un promotor y/o un potenciador.

5 En modos de realización alternativos, la al menos una molécula (secuencia) de potenciador transcripcional de respuesta a TonEBP o de respuesta a NFATc está posicionada en 5' con respecto al promotor en una orientación sentido o antisentido; o, la al menos una secuencia de potenciador transcripcional de respuesta a TonEBP o de respuesta a NFATc está posicionada en 3' con respecto al promotor en una orientación sentido o antisentido; o, la al menos una secuencia de potenciador transcripcional de respuesta a TonEBP o de respuesta a NFATc está posicionada en 5' con respecto al promotor en una orientación sentido o antisentido, y una segunda, tercera y/o
10 secuencia de potenciador transcripcional de respuesta a TonEBP o de respuesta a NFATc adicional está posicionada en 3' con respecto al promotor en una orientación sentido o antisentido.

15 En modos de realización alternativos, el OR-TRE comprende adicionalmente al menos un potenciador transcripcional de respuesta a la proteína activadora 1 (AP-1) enlazado funcionalmente a la secuencia de potenciador transcripcional de respuesta a TonEBP o de respuesta a NFATc. El potenciador transcripcional de respuesta a la proteína activadora 1 (AP-1) puede estar posicionado en 5' con respecto al OR-TRE en una orientación sentido o antisentido; o, el potenciador transcripcional de respuesta a la proteína activadora 1 (AP-1) puede estar posicionado en 3' con respecto al OR-TRE en una orientación sentido o antisentido; o, un potenciador transcripcional de respuesta a la proteína activadora 1 (AP-1) puede estar posicionado en 5' con respecto al OR-TRE en una orientación sentido o antisentido, y un segundo, tercero y/o potenciador transcripcional de respuesta a la proteína activadora 1 (AP-1) adicional está posicionado en 3' con respecto al OR-TRE en una orientación sentido o antisentido.

25 En aspectos alternativos, el potenciador transcripcional de respuesta a la proteína activadora 1 (AP-1) está posicionado en 5' con respecto al promotor, en una orientación sentido o antisentido; o, el potenciador transcripcional de respuesta a la proteína activadora 1 (AP-1) está posicionado en 3' con respecto al promotor, en una orientación sentido o antisentido; o, un potenciador transcripcional de respuesta a la proteína activadora 1 (AP-1) está posicionado en 5' con respecto al promotor en una orientación sentido o antisentido, y un segundo potenciador transcripcional de respuesta a la proteína activadora 1 (AP-1) está posicionado en 3' con respecto al promotor en una orientación sentido o antisentido.
30

35 En un modo de realización, al menos un potenciador transcripcional de respuesta a TonEBP o de respuesta a NFATc y/o al menos un potenciador transcripcional de respuesta a la proteína activadora 1 (AP-1) tiene (comprende), o comprende adicionalmente, una secuencia de molécula de ácido nucleico eucariótico (por ejemplo, de un vertebrado, un mamífero, un ser humano, un insecto, una levadura o fúngico), uno procariótico, uno vegetal, vírico y/o uno sintético.

40 En modos de realización alternativos, el al menos un potenciador transcripcional de respuesta a TonEBP comprende la secuencia de ácido nucleico de 5'-T/A/C)GGAA(A/T)NN(T/A/C)N(T/A/C)-3' (SEQ ID NO: 1), en la que N puede ser cualquier residuo de ácido nucleico; y/o el al menos un potenciador transcripcional de respuesta a NFATc comprende la secuencia de ácido nucleico de 5'-(T/A/C)GGAA(C/G)(A/G)-3' (SEQ ID NO: 2), o 5'-(T/A/C)GGAAANN(T/A/C)N(T/A/C)-3' (SEQ ID NO: 4), en la que N puede ser cualquier residuo de ácido nucleico; y/o el al menos un potenciador transcripcional de respuesta a la proteína activadora 1 (AP-1) comprende la secuencia de ácido nucleico de 5'-TGA(C/G)TCA-3' (SEQ ID NO: 3).
45

50 En modos de realización alternativos, el al menos un potenciador transcripcional de respuesta a TonEBP comprende la secuencia de nucleótidos de 5'-(T/A/C)GGAAANN(T/A/C)N(T/A/C)-3' (SEQ ID NO: 4); y/o el al menos un potenciador transcripcional de respuesta a NFATc comprende la secuencia de ácido nucleico de 5'-TGGAAATTTGT-3' (SEQ ID NO: 5); y/o el al menos un potenciador transcripcional de respuesta a la proteína activadora 1 (AP-1) comprende la secuencia de nucleótidos de 5'-TGACTCA-3' (SEQ ID NO: 6).

55 En un modo de realización, el OR-TRE comprende la secuencia de nucleótidos 5'-TTGGAAAATCACCAGAATGGGATTTAGAGAGGTGGGGTTCCTGACTCATT-3' (SEQ ID NO: 7) o los residuos de 2 a 12 de (SEQ ID NO: 7) (que se corresponde con 5'-TGGAAAATCAC-3') (SEQ ID NO: 9), o 5'-TTGACTAGTTGGAAAATCACCAGAATGGGATTTAGAGAGGTGGGGTTCCTGACTCATTGCTAGCTCGAGCTCGGTACCCGGGTCGAGTAGGCGTGTACGGTGGGAG-3' (SEQ ID NO: 8), donde los sitios de unión a TonE y AP1 en (SEQ ID NO: 7) y (SEQ ID NO: 8) aparecen en negrita.

60 En un modo de realización, un elemento (secuencia) de potenciador transcripcional de respuesta a TonEBP usado en una construcción de respuesta a la ósmosis como se proporciona en el presente documento comprende un ácido nucleico que se une específicamente a una proteína que comprende el motivo de residuo de aminoácido RAHYETEG (SEQ ID NO: 9).

En un modo de realización, el al menos un potenciador transcripcional de respuesta a TonEBP está posicionado en

ES 2 670 368 T3

5' con respecto a al menos un potenciador transcripcional de respuesta a la proteína activadora 1 (AP-1), o, al menos una secuencia de potenciador transcripcional de respuesta a la proteína activadora 1 (AP-1) está posicionada en 5' con respecto a al menos un potenciador transcripcional de respuesta a TonEBP.

- 5 En modos de realización alternativos, al menos una secuencia de potenciador transcripcional de respuesta a TonEBP está posicionada dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250, 300, 350, 400 o 500 o más residuos de nucleótido de al menos un potenciador transcripcional de respuesta a la proteína activadora 1 (AP-1).
- 10 En modos de realización alternativos, al menos un potenciador transcripcional de respuesta a TonEBP está posicionado dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250, 300, 350, 400 o 500 o más residuos de nucleótido del promotor.
- 15 En modos de realización alternativos, al menos una secuencia de potenciador transcripcional de respuesta a la proteína activadora 1 (AP-1) está posicionada dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250, 300, 350, 400 o 500 o más nucleótidos del promotor.
- 20 En modos de realización alternativos, el promotor es un promotor constitutivo, un promotor inducible, un promotor sintético, un promotor de mamífero, un promotor bacteriano, un promotor vegetal, un promotor de levadura, un promotor fúngico, un promotor vírico o un promotor de citomegalovirus (CMV).
- 25 En modos de realización alternativos, el OR-TRE comprende de uno a diez (1 a 10) o más potenciadores transcripcionales de respuesta a TonEBP, y/o el OR-TRE comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más potenciadores transcripcionales de respuesta a la proteína activadora 1 (AP-1).
- 30 En modos de realización alternativos, la molécula de ácido nucleico comprende adicionalmente una o más moléculas (secuencias) de ácido nucleico adicionales enlazadas funcionalmente al promotor activas de manera transcripcional en una célula, por ejemplo, una célula eucariótica. La molécula o moléculas (secuencias) de ácido nucleico adicionales pueden comprender una o más moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas, o uno o más ácidos nucleicos reguladores (un ácido nucleico que tiene una función o efecto inhibitor, estabilizador o regulador por incremento). Por ejemplo, un ácido nucleico regulador puede ser una o más moléculas (secuencias) de ácido nucleico sentido o antisentido. En modos de realización alternativos, la molécula de ácido nucleico adicional comprende: (a) una molécula de ácido nucleico que codifica proteínas; (b) una molécula de ácido nucleico regulador; o (c) la molécula de ácido nucleico de (b), en la que la molécula de ácido nucleico regulador es una molécula de ácido nucleico inhibitor, estabilizador o regulador por incremento, o una secuencia sentido o una antisentido.
- 35 En modos de realización alternativos, la molécula de ácido nucleico adicional comprende una molécula (secuencia) de ácido nucleico que codifica una proteína o péptido de protección frente a la ósmosis; o, la molécula de ácido nucleico adicional comprende una molécula (secuencia) de ácido nucleico que codifica: una proteína antiapoptótica; una proteína que confiere resistencia al estrés oxidativo a una célula; una proteína chaperona implicada en facilitar el plegamiento de proteínas; una proteína implicada en la secreción extracelular de proteínas; una enzima glucolítica; una proteína de regulación del ciclo celular; una enzima de glucosilación, o cualquier combinación de las mismas.
- 40 En modos de realización alternativos, el ácido nucleico regulador, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico inhibitor, comprende una secuencia sentido, una secuencia antisentido, una ribocima, un ARN interferente corto (ARNic) o un microARN (miARN). La molécula de ácido nucleico adicional puede comprender una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido NFATc o uno TonEBP.
- 45 Además, se proporcionan moléculas de ácido nucleico aislado, sintético o recombinante de respuesta a la ósmosis que comprenden: (a) al menos un OR-TRE como se proporciona en el presente documento enlazado funcionalmente a un ácido nucleico, en las que el OR-TRE regula o induce la transcripción del ácido nucleico; (b) la molécula de ácido nucleico de (a), en la que el ácido nucleico transcrito codifica (comprende) una molécula de ácido nucleico que codifica polipéptidos; (c) la molécula de ácido nucleico de (b), en la que el ácido nucleico transcrito codifica: (i) una proteína o péptido de protección frente a la ósmosis, o una proteína que protege a una célula en un entorno de osmolalidad creciente, o protege a una célula en condiciones de hiperosmolalidad o hiperosmolalidad creciente; (ii) una proteína antiapoptótica; (iii) una proteína que confiere resistencia al estrés oxidativo a una célula; (iv) una proteína chaperona implicada en facilitar el plegamiento de proteínas; (v) una proteína implicada en la secreción extracelular de proteínas; (vi) una enzima glucolítica; (vii) una proteína de regulación del ciclo celular; (viii) una enzima de glucosilación; o (ix) cualquier combinación de (i) a (viii); (d) la molécula de ácido nucleico de (a), en la que el ácido nucleico transcrito comprende un ácido nucleico regulador, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico inhibitor, estabilizador o regulador por incremento, o una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia sentido o antisentido; (e) la molécula de ácido nucleico de (d), en la que el ácido nucleico regulador, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico inhibitor, estabilizador o regulador por incremento, comprende una secuencia sentido, una antisentido, una ribocima, un ARN interferente corto (ARNic) o un microARN (miARN); (f) la molécula de ácido nucleico que codifica polipéptidos de (b), en la que el ácido nucleico transcrito codifica un polipéptido NFATc,
- 50
- 55
- 60
- 65

un polipéptido AP-1, un polipéptido TonEBP, un polipéptido de calcineurina o una combinación de los mismos.

En modos de realización alternativos, la proteína o péptido de protección frente a la ósmosis es una prolina o una glicina-betaína, un transportador de taurina, un transportador de glicina betaína-ácido γ -aminobutírico, un cotransportador de sodio-mioinositol, una proteína de choque térmico, una acuaporina o una aldosa reductasa. La proteína antiapoptótica puede ser una Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, BHRF1, X-IAP, IAP1, IAP2 IEX-1L, Bfl-1 o Bcl-w. La proteína que confiere resistencia al estrés oxidativo a una célula puede ser una superóxido dismutasa, una catalasa, una glutatión peroxidasa, una peroxirredoxina, una sulfirredoxina, tiorredoxina, tiorredoxina reductasa, tiorredoxina peroxidasa, tioltransferasa, glutarredoxina o una glutatión reductasa.

En modos de realización alternativos, la proteína chaperona implicada en facilitar el plegamiento de proteínas es una proteína de unión a inmunoglobulina (BiP), calnexina, calreticulina, ERp57 o una proteína disulfuro isomerasa (PDI).

La enzima glucolítica puede ser una piruvato carboxilasa o una piruvato cinasa. La proteína de regulación del ciclo celular puede ser una ciclina o una cinasa dependiente de ciclina, o un inhibidor de una ciclina o una cinasa dependiente de ciclina.

Adicionalmente, se proporcionan moléculas de ácido nucleico aislado, sintético o recombinante que comprenden al menos un elemento regulador transcripcional de respuesta a la ósmosis enlazado funcionalmente a al menos una molécula de ácido nucleico que comprende una molécula de ácido nucleico que selecciona una diana. La molécula de ácido nucleico que selecciona una diana puede comprender una molécula de ácido nucleico para seleccionar como diana un gen lactogénico o un mensaje lactogénico o una proteína lactogénica para disminuir la expresión de un gen lactogénico o un mensaje lactogénico o una proteína lactogénica. El gen lactogénico puede ser una lactato deshidrogenasa. El ácido nucleico que comprende una molécula de ácido nucleico que selecciona como diana un gen lactogénico o mensaje de genes lactogénicos puede comprender un ARN interferente corto (ARNic), un microARN (miARN), un ARN antisentido y/o un ARN con actividad de ribocima. En un modo de realización, el al menos un elemento regulador transcripcional de respuesta a la ósmosis comprende un elemento regulador transcripcional de respuesta a la ósmosis (OR-TRE) como se proporciona en el presente documento.

En un aspecto, la molécula de ácido nucleico de respuesta a la ósmosis comprende adicionalmente una molécula de ácido nucleico que codifica un transcrito (mensaje) que comprende una región no traducida en 5', una región no traducida en 3' o tanto una región no traducida en 5' como una región no traducida en 3'. En un aspecto, la molécula de ácido nucleico de respuesta a la ósmosis comprende adicionalmente al menos una secuencia reguladora transcripcional o traduccional que, en un modo de realización, puede estar posicionada dentro de la región no traducida en 5' o posicionada dentro de la región no traducida en 3', o ambas.

Además, se proporcionan vectores que comprenden (a) la molécula de ácido nucleico como se proporciona en el presente documento, (b) el ácido nucleico como se proporciona en el presente documento; y/o (c) el ácido nucleico de respuesta a la ósmosis como se proporciona en el presente documento. En modos de realización alternativos, el vector es un casete de expresión, un virus recombinante, un plásmido, un fago, un fagémido, un cromosoma artificial o un vehículo de clonación; o, el vector es un vector derivado de bacteriófago P1, un cromosoma artificial bacteriano, un cromosoma artificial de levadura o un cromosoma artificial de mamífero; o el vector es un episoma extracromosómico. En un aspecto, el vector es un vector de integración.

Adicionalmente, se proporcionan células que comprenden: (a) el ácido nucleico como se proporciona en el presente documento, (b) el ácido nucleico como se proporciona en el presente documento; y/o (c) el ácido nucleico de respuesta a la ósmosis como se proporciona en el presente documento; o (b) un vector como se proporciona en el presente documento. En modos de realización alternativos, la célula es una célula de mamífero, una célula de ser humano, una célula de ratón, una célula de insecto, una célula fúngica, una célula bacteriana, una célula vegetal, una célula inmortal o una célula de ovario de hámster chino (CHO). El vector en la célula puede ser un episoma extracromosómico o el vector se puede integrar de manera estable en el genoma de la célula. Un ácido nucleico como se proporciona en el presente documento puede ser una construcción de expresión transitoria y episómica o una construcción de expresión integrada de manera genómica, que, de manera alternativa, puede ser un inserto genómico estable.

Además, se proporcionan biorreactores, placas de cultivo, placas de Petri, tubos de ensayo, frascos rodantes y similares, que comprenden una célula como se proporciona en el presente documento.

Adicionalmente, se proporcionan procedimientos para proteger a una célula en un entorno de osmolalidad creciente, o en condiciones de hiperosmolalidad o hiperosmolalidad creciente, o mantener la osmolalidad u osmolaridad en una célula, que comprenden expresar una proteína o péptido de protección frente a la ósmosis o una molécula de ácido nucleico regulador de protección frente a la ósmosis, en los que el procedimiento comprende: (a) introducir un polinucleótido en la célula, en los que dicho polinucleótido comprende: una molécula de ácido nucleico como se proporciona en el presente documento y/o una molécula de ácido nucleico de respuesta a la ósmosis como se proporciona en el presente documento, o el vector como se proporciona en el presente documento; en los que el polinucleótido codifica una proteína o péptido de protección frente a la ósmosis, o es por sí mismo una molécula de

ácido nucleico de protección frente a la ósmosis; y (b) cultivar la célula de tal manera que se exprese la proteína o péptido de protección frente a la ósmosis o el ácido nucleico regulador de protección frente a la ósmosis, de este modo protegiendo a la célula en un entorno de osmolalidad creciente, o en condiciones de hiperosmolalidad o hiperosmolalidad creciente.

5

En aspectos alternativos de estos procedimientos, la proteína o péptido de protección frente a la ósmosis comprende: (i) una proteína que protege a una célula en un entorno de osmolalidad creciente (por ejemplo, protege a una célula en condiciones de hiperosmolalidad o hiperosmolalidad creciente); (ii) una proteína antiapoptótica; (iii) una proteína que confiere resistencia al estrés oxidativo a una célula; (iv) una proteína chaperona implicada en facilitar el plegamiento de proteínas; (v) una proteína implicada en la secreción extracelular de proteínas; (vi) una enzima glucolítica; (vii) una proteína de regulación del ciclo celular; (viii) una enzima de glucosilación; o (ix) cualquier combinación de (i) a (viii).

10

Además, se proporcionan procedimientos para incrementar la producción o regular la producción de una proteína recombinante en una célula (incluyendo células cultivadas, por ejemplo, como células en un biorreactor), o incrementar la producción de proteínas plegadas correctamente o proteínas glucosiladas correctamente en condiciones de hiperosmolalidad en una célula (incluyendo células cultivadas, por ejemplo, como células en un biorreactor), que comprenden: (a) proporcionar una molécula de ácido nucleico heterógeno o recombinante que codifica la proteína recombinante; y (b) insertar de manera estable o de manera transitoria en la célula un polinucleótido que comprende: un ácido nucleico como se proporciona en el presente documento y/o el ácido nucleico de respuesta a la ósmosis como se proporciona en el presente documento, en los que la molécula de ácido nucleico codifica una proteína o péptido de protección frente a la ósmosis, o un ácido nucleico regulador de protección frente a la ósmosis; y (c) cultivar la célula en condiciones en las que se expresan la proteína o péptido de protección frente a la ósmosis o el ácido nucleico regulador de protección frente a la ósmosis de (b) y la proteína recombinante de (a), de este modo incrementando la producción o regulando la producción de la proteína recombinante en la célula, o incrementando la producción o regulando la producción de proteínas plegadas correctamente o proteínas glucosiladas correctamente en condiciones de hiperosmolalidad en la célula.

15

20

25

Adicionalmente, se proporcionan procedimientos para incrementar la producción o regular la producción de una proteína recombinante, o incrementar la producción o regular la producción de proteínas plegadas correctamente o proteínas glucosiladas correctamente en condiciones de hiperosmolalidad en una célula, en un biorreactor, un implante o un órgano artificial, que comprenden: (a) proporcionar un biorreactor, un implante o un órgano artificial que comprende una célula como se proporciona en el presente documento, en los que la célula comprende un ácido nucleico como se proporciona en el presente documento y/o la molécula de ácido nucleico de respuesta a la ósmosis como se proporciona en el presente documento, o el vector como se proporciona en el presente documento; y la molécula de ácido nucleico o vector codifica una proteína o péptido de protección frente a la ósmosis; y (b) cultivar la célula en condiciones en las que se expresan la proteína o péptido de protección frente a la ósmosis o el ácido nucleico regulador de protección frente a la ósmosis y la proteína recombinante, o disponer el biorreactor, implante u órgano artificial en condiciones que toleren la expresión de la proteína o péptido de protección frente a la ósmosis o el ácido nucleico regulador de protección frente a la ósmosis, y la proteína recombinante por la célula.

30

35

40

Adicionalmente, se proporcionan procedimientos para añadir o potenciar la adaptabilidad o resistencia al estrés osmótico o choque osmótico de una célula que comprenden introducir en una célula un polinucleótido que comprende: un ácido nucleico como se proporciona en el presente documento y/o la molécula de ácido nucleico de respuesta a la ósmosis como se proporciona en el presente documento, o el vector como se proporciona en el presente documento; en los que la molécula de ácido nucleico o vector codifica una proteína o péptido de protección frente a la ósmosis o un ácido nucleico regulador de protección frente a la ósmosis. En aspectos alternativos, como se usa en el presente documento el estrés osmótico es diferente del choque osmótico en tanto que el estrés osmótico abarca un cambio gradual en la osmolalidad (estrés) de un sistema de cultivo, una célula, etc., frente al choque osmótico, que abarca un cambio agudo (choque) en la osmolalidad (estrés) de un sistema de cultivo, una célula, etc.

45

50

En aspectos alternativos de estos procedimientos, el procedimiento añade o potencia la adaptabilidad o resistencia al estrés osmótico hipertónico o choque osmótico hipertónico de la célula, o el procedimiento añade o potencia la adaptabilidad o resistencia al estrés osmótico hipotónico o choque osmótico hipotónico de la célula.

55

Además, se proporcionan procedimientos para incrementar la producción o regular la producción de una proteína recombinante en una célula, o incrementar la producción de proteínas plegadas correctamente o proteínas glucosiladas correctamente en condiciones de hiperosmolalidad en una célula, que comprenden: (a) proporcionar una molécula de ácido nucleico heterógeno o recombinante que codifica la proteína recombinante; y (b) insertar de manera estable o de manera transitoria en una célula un polinucleótido que comprende: un ácido nucleico como se proporciona en el presente documento y/o la molécula de ácido nucleico de respuesta a la ósmosis como se proporciona en el presente documento, o el vector como se proporciona en el presente documento; en los que la molécula de ácido nucleico o vector codifica una proteína o péptido de protección frente a la ósmosis; y (c) cultivar la célula en condiciones en las que se expresan la proteína o péptido o ácido nucleico de protección frente a la ósmosis de (b) y la proteína recombinante de (a).

60

65

Adicionalmente, se proporcionan procedimientos para incrementar la producción o regular la producción de una proteína recombinante en un implante o un órgano artificial, o incrementar la producción de proteínas plegadas correctamente o proteínas glucosiladas correctamente en condiciones de hiperosmolalidad en un implante o un órgano artificial, que comprenden: (a) proporcionar una célula que comprende una molécula de ácido nucleico heterógeno o recombinante que codifica la proteína recombinante; y (b) insertar de manera estable o de manera transitoria en la célula un polinucleótido que comprende: un ácido nucleico como se proporciona en el presente documento y/o la molécula de ácido nucleico de respuesta a la ósmosis como se proporciona en el presente documento, o el vector como se proporciona en el presente documento, en los que la molécula de ácido nucleico codifica una proteína o péptido de protección frente a la ósmosis o una molécula de ácido nucleico de protección frente a la ósmosis; y (c) insertar la célula en el implante u órgano artificial y mantener el implante u órgano artificial en condiciones que permitan la expresión de la proteína o péptido de protección frente a la ósmosis o la molécula de ácido nucleico de protección frente a la ósmosis, y la proteína recombinante en la célula, de este modo incrementando la producción o regulando la producción de la proteína recombinante en el implante o en el órgano artificial.

Además, se proporcionan procedimientos para la producción eficaz de biomoléculas en sistemas de producción celular densos o en fase tardía, o que permitan obtener rendimientos más altos de biomoléculas totales o rendimientos más altos de proteínas procesadas de manera postraducciona en sistemas de producción celular densos o en fase tardía, que comprenden: (a) insertar de manera estable o de manera transitoria en una célula que pueda generar la biomolécula un polinucleótido que comprende: un ácido nucleico como se proporciona en el presente documento y/o la molécula de ácido nucleico de respuesta a la ósmosis como se proporciona en el presente documento, o el vector como se proporciona en el presente documento, en los que la molécula de ácido nucleico codifica una proteína o péptido de protección frente a la ósmosis o una molécula de ácido nucleico de protección frente a la ósmosis; (b) el procedimiento de (a), en el que la biomolécula es una molécula pequeña, un polipéptido y/o ácido nucleico; o (c) el procedimiento de (a) o (b), en el que el procedimiento da como resultado rendimientos más altos de polipéptidos plegados apropiadamente o plegados preferentemente (por ejemplo, un plegamiento natural, plegamiento con patrón natural) o glucosilados.

Además, se proporcionan órganos artificiales o implantes que comprenden una célula como se proporciona en el presente documento, un vector como se proporciona en el presente documento y/o una molécula de ácido nucleico de respuesta a la ósmosis como se proporciona en el presente documento. Adicionalmente, se proporcionan productos de fabricación que comprenden una célula como se proporciona en el presente documento, un vector como se proporciona en el presente documento y/o una molécula de ácido nucleico de respuesta a la ósmosis como se proporciona en el presente documento. Adicionalmente, se proporcionan kits que comprenden una célula como se proporciona en el presente documento, una molécula de ácido nucleico como se proporciona en el presente documento, un vector como se proporciona en el presente documento y/o una molécula de ácido nucleico de respuesta a la ósmosis como se proporciona en el presente documento. En un aspecto, el kit comprende adicionalmente instrucciones para poner en práctica un procedimiento como se proporciona en el presente documento.

De esta manera, en determinados modos de realización, en el presente documento se proporcionan una molécula de ácido nucleico aislado que comprende al menos un elemento regulador transcripcional de respuesta a la ósmosis (OR-TRE) que comprende al menos un potenciador transcripcional de respuesta a TonEBP o potenciador transcripcional de respuesta a NFATc enlazado funcionalmente a un regulador transcripcional y al menos un potenciador transcripcional de respuesta a la proteína activadora (AP-1) enlazado funcionalmente a dicho potenciador transcripcional de respuesta a TonEBP o potenciador transcripcional de respuesta a NFATc. El regulador transcripcional puede ser, por ejemplo, un promotor, un potenciador o una combinación de los mismos. En algunos modos de realización, un primer potenciador transcripcional de respuesta a TonEBP o potenciador transcripcional de respuesta a NFATc posicionado en 5' con respecto a un promotor y un segundo potenciador transcripcional de respuesta a TonEBP o potenciador transcripcional de respuesta a NFATc posicionado en 3' con respecto al promotor. En algunos modos de realización, un primer potenciador transcripcional de respuesta a la proteína activadora 1 (AP-1) está posicionado en 5' del OR-TRE y un segundo potenciador transcripcional de respuesta a la proteína activadora 1 (AP-1) está posicionado en 3' del OR-TRE. En algunos modos de realización, el potenciador transcripcional de respuesta a la proteína activadora 1 (AP-1) está posicionado en 5' del regulador transcripcional y el regulador transcripcional es un promotor. En otros modos de realización, el potenciador transcripcional de respuesta a la proteína activadora 1 (AP-1) está posicionado en 3' del regulador transcripcional, que es un promotor. En todavía otros modos de realización, un primer potenciador transcripcional de respuesta a la proteína activadora 1 (AP-1) está posicionado en 5' con respecto al regulador transcripcional y un segundo potenciador transcripcional de respuesta a la proteína activadora 1 (AP-1) está posicionado en 3' con respecto al regulador transcripcional, en los que el primer regulador transcripcional y el segundo regulador transcripcional son ambos promotores. En algunos modos de realización, la molécula de ácido nucleico contiene (a) al menos un potenciador transcripcional de respuesta a TonEBP que comprende la secuencia de ácido nucleico de (SEQ ID NO: 1); o (b) al menos un potenciador transcripcional de respuesta a NFATc que comprende la secuencia de ácido nucleico de (SEQ ID NO: 2) o (SEQ ID NO: 4); o (c) al menos un potenciador transcripcional de respuesta a la proteína activadora 1 (AP-1) que comprende la secuencia de ácido nucleico de (SEQ ID NO: 3) (en la que N puede

ser cualquier nucleótido).

En determinados modos de realización, el OR-TRE como se proporciona en el presente documento comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9.

5 La molécula de ácido nucleico como se proporciona en el presente documento puede comprender adicionalmente una molécula de ácido nucleico adicional enlazada funcionalmente al regulador transcripcional, en la que el regulador transcripcional es un promotor que es activo de manera transcripcional en una célula eucariótica. La molécula de ácido nucleico adicional puede ser una molécula de ácido nucleico que codifica proteínas (por ejemplo, que codifica una proteína de interés) o molécula de ácido nucleico regulador (por ejemplo, una molécula inhibidora, una molécula estabilizadora, una molécula de ácido nucleico regulador por incremento o una que produce una molécula antisentido). En algunos modos de realización, la molécula de ácido nucleico inhibidor comprende una secuencia antisentido, una ribocima, un ARN interferente corto (ARNic) o un microARN (miARN). En algunos modos de realización, la molécula de ácido nucleico adicional codifica una proteína o péptido de protección frente a la ósmosis, tal como, por ejemplo, una prolina o una glicina-betaína, un transportador de taurina, un transportador de glicina betaína-ácido γ -aminobutírico, un cotransportador de sodio-mioinositol, una proteína de choque térmico, una acuaporina, una aldosa reductasa o una esterasa diana de neuropatía (NTE). En otros modos de realización, la molécula de ácido nucleico adicional codifica una proteína o péptido que confiere una propiedad beneficiosa a las proteínas expresadas en las células. Una proteína que confiere un beneficio puede ser, por ejemplo, una proteína antiapoptótica (por ejemplo, Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, BHRF1, X-IAP, IAP1, IAP2 IEX-1L, Bfl-1 o Bcl-w); una proteína que confiere resistencia al estrés oxidativo a una célula (por ejemplo, superóxido dismutasa, una catalasa, una glutatión peroxidasa, una peroxirredoxina, una sulfirredoxina, tioredoxina, tioredoxina reductasa, tioredoxina peroxidasa, tioltransferasa, glutarredoxina o una glutatión reductasa); una proteína chaperona implicada en facilitar el plegamiento de proteínas (por ejemplo, proteína de unión a inmunoglobulina (BiP), calnexina, calreticulina, ERp57 o una proteína disulfuro isomerasa (PDI)); una proteína implicada en la secreción extracelular de proteínas; una enzima glucolítica (por ejemplo, piruvato carboxilasa o una piruvato cinasa); una proteína de regulación del ciclo celular (por ejemplo, ciclina o una cinasa dependiente de ciclina, o un inhibidor de una ciclina o de una cinasa dependiente de ciclina); una enzima de glucosilación, o cualquier combinación de las mismas. En otros modos de realización, la molécula de ácido nucleico adicional codifica un polipéptido NFATc o uno TonEBP.

30 En algunos modos de realización, el OR-TRE está enlazado funcionalmente a al menos una molécula de ácido nucleico que selecciona una diana, tal como, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico para seleccionar como diana un gen lactogénico, un mensaje lactogénico o una proteína lactogénica para disminuir la expresión de dicho gen lactogénico (por ejemplo, lactato deshidrogenasa), mensaje lactogénico o una proteína lactogénica. En algunos modos de realización, estas moléculas de ácido nucleico que seleccionan como diana un gen lactogénico o mensaje lactogénico comprenden un ARN interferente corto (ARNic), un microARN (miARN), un ARN antisentido y/o un ARN con actividad de ribocima.

35 La divulgación en relación con la invención incluye vectores que comprenden los ácidos nucleicos como se proporciona en el presente documento y células huésped que contienen dichos vectores.

40 En determinados modos de realización, la molécula de ácido nucleico como se proporciona en el presente documento comprende adicionalmente (i) una molécula de ácido nucleico adicional que codifica un polipéptido que confiere una propiedad beneficiosa a las proteínas expresadas en las células enlazada funcionalmente al regulador transcripcional, en la que dicho regulador transcripcional es un promotor que es activo de manera transcripcional en una célula eucariótica y (ii) una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de interés que se va a expresar en células en la que la expresión de la molécula de ácido nucleico de (i) imparte dicha propiedad beneficiosa al polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico de (ii). En dichos modos de realización, la molécula de (i) codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en una proteína antiapoptótica; una proteína que confiere resistencia al estrés oxidativo a una célula; una proteína chaperona implicada en facilitar el plegamiento de proteínas; una proteína implicada en la secreción extracelular de proteínas; una enzima glucolítica; una proteína de regulación del ciclo celular; una enzima de glucosilación, o cualquier combinación de las mismas.

50 La divulgación en relación con la invención también proporciona un procedimiento para proteger a una célula en condiciones de hiperosmolalidad que comprende:

(a) introducir un polinucleótido en una célula en el que dicho polinucleótido comprende:

60 (i) una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína o péptido de protección frente a la ósmosis o una molécula de ácido nucleico regulador y

(ii) un polinucleótido que codifica una segunda proteína de interés enlazada funcionalmente a un promotor; y

65 (b) cultivar la célula de tal manera que se exprese la proteína o péptido de protección frente a la ósmosis, o el ácido nucleico regulador de protección frente a la ósmosis y la proteína de interés, de este modo protegiendo a la célula en condiciones de hiperosmolalidad y permitiendo la expresión de la segunda proteína de interés.

En estos modos de realización, la proteína o péptido de protección frente a la ósmosis puede ser, por ejemplo, una prolina o una glicina-betaina, un transportador de taurina, un transportador de glicina betaina-ácido γ -aminobutírico, un cotransportador de sodio-mioinositol, una proteína de choque térmico, una acuaporina, una aldosa reductasa o una esterasa diana de neuropatía (NTE).

Adicionalmente, se proporciona un procedimiento para añadir o potenciar la adaptabilidad o resistencia al estrés osmótico o choque osmótico de una célula que comprende introducir en una célula un polinucleótido que comprende la molécula de ácido nucleico de la invención en el que la molécula de ácido nucleico adicional es (a) una proteína o péptido de protección frente a la ósmosis; o (b) un ácido nucleico regulador de protección frente a la ósmosis.

Específicamente, la invención proporciona un procedimiento para expresar una proteína de interés en una célula en condiciones de hiperosmolalidad que comprende:

(A) introducir un polinucleótido en una célula en el que dicho polinucleótido comprende:

(i) una molécula de ácido nucleico que comprende

al menos un elemento regulador transcripcional de respuesta a la ósmosis (OR-TRE) que comprende

(a) al menos un potenciador transcripcional de respuesta a TonEBP que comprende la secuencia de ácido nucleico de 5'-(T/A/C)GGAA(A/T)NN(T/A/C)N(T/A/C)-3' (SEQ ID NO: 1), o potenciador transcripcional de respuesta a NFATc, que comprende la secuencia de ácido nucleico de 5'-(T/A/C)GGAA(C/G)(A/G)-3' (SEQ ID NO: 2) o 5'-(T/A/C)GGAAANN(T/A/C)N(T/A/C)-3' (SEQ ID NO: 4), enlazado funcionalmente a un regulador transcripcional, y

(b) al menos un potenciador transcripcional de respuesta a la proteína activadora (AP-1) que comprende la secuencia de ácido nucleico de 5'-TGA(C/G)TCA-3' (SEQ ID NO: 3),

enlazado funcionalmente a dicho potenciador transcripcional de respuesta a TonEBP o potenciador transcripcional de respuesta a NFATc, y

una molécula de ácido nucleico adicional que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína o péptido que confiere una propiedad beneficiosa a las proteínas expresadas en las células, enlazada funcionalmente al regulador transcripcional, en el que dicho regulador transcripcional es un promotor que es activo de manera transcripcional en una célula eucariótica, y

(ii) un polinucleótido que codifica una segunda proteína de interés enlazada funcionalmente a un promotor; y

(B) cultivar la célula de tal manera que la expresión de la molécula de ácido nucleico de (i) imparta dicha propiedad beneficiosa a la proteína codificada por el polinucleótido de (ii) cuando dichas células se cultivan en condiciones de hiperosmolalidad,

en el que la proteína o péptido que confiere una propiedad beneficiosa a las proteínas expresadas en las células es una proteína antiapoptótica; una proteína que confiere resistencia al estrés oxidativo a una célula; una proteína chaperona implicada en facilitar el plegamiento de proteínas; una proteína implicada en la secreción extracelular de proteínas; una enzima glucolítica; una proteína de regulación del ciclo celular; una enzima de glucosilación; o cualquier combinación de las mismas.

En un modo de realización, el al menos un potenciador transcripcional de respuesta a TonEBP comprende la secuencia de nucleótidos de 5'-(T/A/C)GGAAANN(T/A/C)N(T/A/C)-3' (SEQ ID NO: 4); y/o el al menos un potenciador transcripcional de respuesta a NFATc comprende la secuencia de ácido nucleico de 5'-TGGAAATTTGT-3' (SEQ ID NO: 5); y/o el al menos un potenciador transcripcional de respuesta a la proteína activadora 1 (AP-1) comprende la secuencia de nucleótidos de 5'-TGACTCA-3' (SEQ ID NO: 6).

En los procedimientos de la invención, las células se pueden cultivar inicialmente en condiciones de cultivo normales (es decir, con condiciones de tonicidad estándar) y posteriormente se pueden alterar las condiciones de cultivo para incrementar la osmolalidad a una cantidad suficiente para incrementar la expresión de dicha segunda proteína de interés. Esto se puede lograr agregando al cultivo un compuesto que incremente dicha osmolalidad.

En algunos modos de realización, la expresión de proteínas de manera tardía en el cultivo (cuando las condiciones de cultivo tienen osmolalidad incrementada) es beneficiosa para preparar dichas proteínas como proteínas que sean tóxicas para la célula, proteínas que sean inestables o proteínas que sean difíciles de expresar en condiciones de cultivo normales.

En otros modos de realización, las condiciones de cultivo iniciales son condiciones de cultivo estándar y se deja que el cultivo se vuelva hiperosmótico en el transcurso del cultivo celular, de este modo incrementando la expresión de dicha segunda proteína de interés que está bajo el control de un OR-TRE. Estas proteínas pueden ser proteínas que sean tóxicas para la célula, proteínas que sean inestables o proteínas que sean difíciles de expresar en condiciones de cultivo normales.

La invención proporciona adicionalmente un procedimiento para expresar una proteína de interés en una célula en condiciones de hiperosmolalidad que comprende introducir un polinucleótido en una célula en el que dicho polinucleótido comprende:

(A) una molécula de ácido nucleico que comprende

al menos un elemento regulador transcripcional de respuesta a la ósmosis (OR-TRE) que comprende

(a) al menos un potenciador transcripcional de respuesta a TonEBP que comprende la secuencia de ácido nucleico de 5'-(T/A/C)GGAA(A/T)NN(T/A/C)N(T/A/C)-3' (SEQ ID NO: 1), o potenciador transcripcional de respuesta a NFATc, que comprende la secuencia de ácido nucleico de 5'-(T/A/C)GGAA(C/G)(A/G)-3' (SEQ ID NO: 2) o 5'-(T/A/C)GGAAANN(T/A/C)N(T/A/C)-3' (SEQ ID NO: 4), enlazado funcionalmente a un regulador transcripcional, y

(b) al menos un potenciador transcripcional de respuesta a la proteína activadora (AP-1) que comprende la secuencia de ácido nucleico de 5'-TGA(C/G)TCA-3' (SEQ ID NO: 3), enlazado funcionalmente a dicho potenciador transcripcional de respuesta a TonEBP o potenciador transcripcional de respuesta a NFATc, y

una molécula de ácido nucleico adicional que comprende

(i) una molécula de ácido nucleico que codifica proteínas que codifica una proteína de interés;

(ii) y una molécula de ácido nucleico regulador,

enlazada funcionalmente al regulador transcripcional, en la que dicho regulador transcripcional es un promotor que es activo de manera transcripcional en una célula eucariótica, y

(B) un polinucleótido que codifica una segunda proteína de interés enlazada funcionalmente a un segundo OR-TRE;

en el que dicha molécula de ácido nucleico de (A) codifica TonEBP; y en el que, en condiciones de osmolalidad incrementada, se expresa dicha molécula de ácido nucleico de (A), de este modo expresando la proteína TonEBP, y en el que dicha proteína TonEBP regula positivamente la expresión de TonEBP y dicha segunda proteína de interés.

Esto crea un sistema de bucle de retroalimentación positiva. En un modo de realización, el al menos un potenciador transcripcional de respuesta a TonEBP comprende la secuencia de nucleótidos de 5'-(T/A/C)GGAAANN(T/A/C)N(T/A/C)-3' (SEQ ID NO: 4); y/o el al menos un potenciador transcripcional de respuesta a NFATc comprende la secuencia de ácido nucleico de 5'-TGGAAATTGT-3' (SEQ ID NO: 5); y/o el al menos un potenciador transcripcional de respuesta a la proteína activadora 1 (AP-1) comprende la secuencia de nucleótidos de 5'-TGA(T/C)TCA-3' (SEQ ID NO: 6). En estos modos de realización, la segunda proteína de interés puede ser, por ejemplo, una proteína de protección frente a la ósmosis (por ejemplo, una prolina o una glicina-betaína, un transportador de taurina, un transportador de glicina betaína-ácido γ -aminobutírico, un cotransportador de sodio-mioinositol, una proteína de choque térmico, una acuaporina, una aldosa reductasa o una esterasa diana de neuropatía (NTE)); una proteína que imparte una propiedad beneficiosa a los polipéptidos expresados por dichas células (por ejemplo, una proteína antiapoptótica; una proteína que confiere resistencia al estrés oxidativo a una célula; una proteína chaperona implicada en facilitar el plegamiento de proteínas; una proteína implicada en la secreción extracelular de proteínas; una enzima glucolítica; una proteína de regulación del ciclo celular; una enzima de glucosilación; o cualquier combinación de las mismas). En algunos modos de realización, el procedimiento puede comprender la expresión de una tercera proteína de interés enlazada funcionalmente a un promotor, en los que la proteína que imparte una propiedad beneficiosa actúa sobre la tercera proteína de interés.

Los detalles de uno o más modos de realización de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y la descripción a continuación. Otras características, objetivos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y a partir de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La **figura 1a** y **figura 1b** ilustran esquemáticamente cómo los elementos reguladores transcripcionales de respuesta a la ósmosis (OR-TRE) de la presente invención incrementan la tolerancia a la ósmosis, como se analiza en detalle a continuación.

La **figura 2** ilustra esquemáticamente un experimento que demuestra la actividad reguladora por incremento transcripcional de una construcción de la presente invención midiendo un marcador en sobrenadantes de células transfectadas, como se describe en detalle en el ejemplo 1 a continuación.

La **figura 3** ilustra esquemáticamente elementos reguladores transcripcionales de respuesta a la ósmosis (OR-TRE) ejemplares de la presente invención, como se describe en detalle en el ejemplo 1 a continuación.

La **figura 4** ilustra esquemáticamente la eficacia de protección frente a la ósmosis *in vivo* de los elementos reguladores transcripcionales de respuesta a la ósmosis (OR-TRE) ejemplares de la presente invención ilustrados en la figura 3, como se describe en detalle en el ejemplo 1 a continuación.

La **figura 5** ilustra esquemáticamente los niveles de expresión inducida por POR3 y POR7 normalizados con sus niveles de expresión constitutiva, como se describe en detalle en el ejemplo 1 a continuación. Los símbolos de referencia similares en los diversos dibujos indican elementos similares.

La **figura 6** muestra los efectos de uno, tres o siete ORE en la producción de proteínas en medio hipertónico.

Descripción detallada de la invención

En el presente documento se proporcionan composiciones y procedimientos para regular la osmolaridad intracelular en células, por ejemplo, en células cultivadas, tales como células usadas en biorreactores. En un aspecto, en el presente documento se proporcionan composiciones y procedimientos para regular la osmolaridad intracelular en células de mamífero cultivadas. En un modo de realización, en el presente documento se proporcionan sistemas de expresión del gen “de respuesta a la ósmosis” o de detección de la ósmosis artificial (recombinante) y procedimientos para prepararlos y usarlos. En otro modo de realización, incorporando estos sistemas de expresión del gen “de respuesta a la ósmosis” o de detección de la ósmosis en las células también se proporcionan células genomanipuladas que tienen una respuesta a la ósmosis potenciada o un mecanismo de detección de la ósmosis potenciado. De esta manera, en un aspecto, cuando se usan estas células en sistemas de cultivo, por ejemplo, en biorreactores, su grado de respuesta a la ósmosis potenciado (por ejemplo, resistencia potenciada al estrés osmótico hipertónico o hipotónico) da como resultado una mejor salud y supervivencia de las células y una producción de productos incrementada o aumentada en un sistema de cultivo o biorreactor.

En un modo de realización, las construcciones como se proporciona en el presente documento se usan como sistemas de expresión de ácidos nucleicos y/o polipéptidos inducibles, donde la señal que induce o disminuye la transcripción de una construcción como se proporciona en el presente documento (por ejemplo, un ácido nucleico en una construcción como se proporciona en el presente documento) es un cambio en la osmolaridad, osmolalidad y/o tonicidad en el entorno intracelular y/o extracelular de la célula (por ejemplo, un cambio que provoca condiciones de hiperosmolalidad o que incrementa el grado de hiperosmolalidad), por ejemplo, en un fluido de cultivo, como en un biorreactor, placa de cultivo, placa de Petri, tubo de ensayo, frasco rodante, implante, órgano artificial y similares.

En modos de realización alternativos, debido a que las composiciones y procedimientos como se proporciona en el presente documento proporcionan un fenotipo de protección frente a la ósmosis a una célula, se pueden usar estas composiciones y procedimientos para incrementar o aumentar la generación de (fabricación de) moléculas, polipéptidos y/o ácidos nucleicos “difíciles de expresar”, por ejemplo, moléculas, polipéptidos y/o ácidos nucleicos que sean tóxicos para una célula, por ejemplo, que tengan toxicidad inherente para la célula huésped. También se usan las composiciones y procedimientos como se proporciona en el presente documento para incrementar o aumentar la expresión (fabricación) de polipéptidos “difíciles de expresar” que son “difíciles de expresar” en el contexto de los “difíciles de expresar” apropiadamente o como se prefiera/desea (por ejemplo, un patrón de plegamiento natural), por ejemplo, para incrementar o aumentar el procesamiento postraduccionales apropiado, por ejemplo, para incrementar o aumentar el plegamiento apropiado y/o la glucosilación preferente/deseada (por ejemplo, un patrón de glucosilación natural) de polipéptidos en células que tienen mecanismos postraduccionales que tienen sensibilidad a las condiciones de estrés osmótico (por ejemplo, condiciones de hiperosmolalidad), por ejemplo, como en las condiciones de cultivo o biorreactor de estrés osmótico, por ejemplo, como en entornos de cultivo celular en fase tardía o densos. En otro modo de realización, también se usan las composiciones y procedimientos como se proporciona en el presente documento para incrementar o aumentar la expresión de polipéptidos “difíciles de expresar” que son “difíciles de expresar” en el contexto de las proteínas que no se pueden procesar apropiadamente de manera postraduccionales o en rendimientos suficientes en condiciones de estrés osmótico (por ejemplo, condiciones de hiperosmolalidad), por ejemplo, como en las condiciones de cultivo o biorreactor de estrés osmótico, por ejemplo, como en entornos de cultivo celular en fase tardía o densos, por ejemplo, proteínas que no se pliegan o se glucosilan de manera normal o en rendimientos suficientes en condiciones de estrés osmótico. En modos de realización alternativos, debido a que se generan rendimientos más altos de polipéptidos, por ejemplo, glucosilados o plegados, modificados de manera postraduccionales correcta al poner en práctica las composiciones y procedimientos como se proporciona en el presente documento, se mantiene la calidad del producto en entornos de cultivo celular en fase tardía o densos, tales como los biorreactores. Por ejemplo, en un aspecto, la práctica de las composiciones y procedimientos como se proporciona en el presente documento da como

resultado mantener la calidad de proteína recombinante en un procedimiento de fabricación, por ejemplo, mantener la calidad de proteína recombinante aprobada por la FDA en un procedimiento de fabricación, particularmente cuando la calidad del producto se ve comprometida en entornos de cultivo celular en fase tardía o densos, como los biorreactores.

5 En otros modos de realización, también, debido a que las composiciones y procedimientos proporcionados en el presente documento imparten un fenotipo de protección frente a la ósmosis a una célula, se pueden usar estas composiciones y procedimientos para incrementar o aumentar la generación (fabricación) en un sistema de producción celular denso o en fase tardía, incluyendo, por ejemplo, un cultivo celular, o células de crecimiento denso
10 o en fase tardía en un biorreactor, placa de cultivo, placa de Petri, tubo de ensayo, frasco rodante, implante, órgano artificial y similares. Por consiguiente, el uso de las composiciones y procedimientos como se proporciona en el presente documento permite la producción eficaz de biomoléculas en sistemas de producción celular densos o en fase tardía, lo que incluye obtener rendimientos más altos de biomoléculas totales (por ejemplo, moléculas pequeñas, polipéptidos y/o ácidos nucleicos) o rendimientos más altos de proteínas procesadas de manera
15 postraduccional, por ejemplo, rendimientos más altos de polipéptidos plegados apropiadamente o plegados preferentemente (por ejemplo, un plegamiento natural) o glucosilados.

Asimismo, se pueden usar las composiciones y procedimientos como se proporciona en el presente documento para inducir la expresión de proteínas recombinantes, o para incrementar el grado de plegamiento de proteínas apropiado y/o glucosilación en una célula, durante las condiciones de cultivo, incluyendo condiciones de cultivo después de que se haya conseguido la densidad celular óptima; la inducción, por ejemplo, un incremento en la transcripción mediante un OR-TRE como se proporciona en el presente documento, se desencadena por un cambio (por ejemplo, un incremento) en la osmolaridad, osmolalidad y/o tonicidad en el entorno intracelular y/o extracelular de la célula (por ejemplo, un cambio que provoca condiciones de hiperosmolalidad o que incrementa el grado de hiperosmolalidad). Se pueden usar las composiciones y procedimientos como se proporciona en el presente documento para desacoplar el crecimiento celular y la expresión de proteínas recombinantes en un sistema de expresión celular, por ejemplo, un implante, un órgano artificial, un biorreactor, un medio de cultivo y similares. Se pueden usar las composiciones y procedimientos como se proporciona en el presente documento como un sistema promotor o transcripcional inducible en condiciones de hiperosmolalidad, o condiciones de osmolaridad alta,
20 osmolalidad y/o tonicidad.
25
30

Los productos producidos mediante células cultivadas, la producción de los cuales mediante las células en cultivo se incrementa al poner en práctica los procedimientos y/o composiciones como se proporciona en el presente documento, incluyen polipéptidos recombinantes, polisacáridos, moléculas pequeñas, tales como policétidos (por ejemplo, antibióticos), ácidos nucleicos, viriones y partículas víricas encapsidadas (por ejemplo, siendo las “células productoras” las células cultivadas) y similares.
35

Las células genomanipuladas como se proporciona en el presente documento pueden resistir mejor el estrés osmótico (por ejemplo, condiciones de hiperosmolalidad, incluyendo resistencia potenciada al estrés osmótico hipertónico o hipotónico), están protegidas pese a la osmolalidad creciente (por ejemplo, condiciones de hiperosmolalidad) y, en modos de realización alternativos, pueden mantener tanto el crecimiento como la viabilidad alta a osmolalidades más altas o más bajas que la normal (fisiológica). En un modo de realización, el uso de las células y sistemas de expresión del gen “de respuesta a la hiperosmolalidad” o “de respuesta a la ósmosis” o de detección de la ósmosis como se proporciona en el presente documento permite obtener mejores rendimientos en cultivos o biorreactores para proteínas “difíciles de expresar”, por ejemplo, disminuyendo la toxicidad para la célula en condiciones de estrés osmótico y garantizando una cantidad suficiente y calidad consistente de un producto de células cultivadas, que puede ser un producto de proteínas recombinantes y/o una proteína plegada apropiadamente o plegada preferentemente (por ejemplo, un plegamiento natural) o glucosilada.
40
45

En un modo de realización, la solución proporcionada en el presente documento es una solución a los rendimientos de producto disminuidos por células en condiciones de cultivo de estrés osmótico proporcionando un sistema de expresión del gen de respuesta a la ósmosis, uno de detección de la ósmosis o uno con sensibilidad a la hiperosmolalidad; y en el presente documento se proporcionan células que comprenden estos sistemas de respuesta a la ósmosis, de detección de la ósmosis y con sensibilidad a la hiperosmolalidad como se proporciona en el presente documento, donde las células como se proporciona en el presente documento tienen supervivencia y resistencia potenciadas con respecto a los efectos negativos de las condiciones de hiperosmolalidad, hipoosmolalidad o cualquier condición de estrés osmótico, incluyendo estrés osmótico hipertónico o hipotónico. En el presente documento se proporcionan composiciones, células y procedimientos para prevenir o mejorar los problemas provocados por hiperosmolalidad u osmolalidad incrementada, por ejemplo, hiperosmolalidad correlacionada con (asociada con) condiciones de tonicidad incrementada (por ejemplo, contenido incrementado de sal, tal como contenido incrementado de sales de sodio o potasio, por ejemplo, NaCl), en sistemas de cultivo, tales como biorreactores. En el presente documento se proporcionan composiciones, células y procedimientos para prevenir o mejorar los problemas provocados por hipoosmolalidad u osmolalidad disminuida, por ejemplo, osmolalidad disminuida correlacionada con (asociada con) tonicidad disminuida (por ejemplo, contenido disminuido de sal, contenido disminuido de sales de sodio o potasio, por ejemplo, NaCl), en sistemas de cultivo tales como biorreactores.
50
55
60
65

En aspectos alternativos, en el presente documento se proporcionan composiciones, células y procedimientos para prevenir o mejorar los problemas provocados por hiperosmolalidad u osmolalidad incrementada, o los problemas provocados por hipoosmolalidad u osmolalidad disminuida, en los que la hiperosmolalidad o hipoosmolalidad está provocada por niveles (cantidades) incrementados o disminuidos, respectivamente, de componentes, ingredientes o elementos de cualquier cultivo o sistema tampón, incluyendo, por ejemplo: sales inorgánicas y minerales, tales como, por ejemplo, cloruro de sodio, cloruro de calcio, sulfato cúprico, nitrato férrico, sulfato ferroso, cloruro de potasio, sulfato de magnesio, cloruro de magnesio, fosfato de sodio monobásico, fosfato de sodio dibásico y/o sulfato de zinc; u oligoelementos, tales como, por ejemplo, paramolibdato de amonio, óxido de amonio y vanadio, sulfato de manganeso, cloruro de níquel, ácido selenioso, metasilicato de sodio y/o cloruro estannoso; o un tampón o ingrediente tampón, tal como, por ejemplo: un fosfato (incluyendo, por ejemplo, fosfato monosódico, fosfato disódico), un carbonato y/o un bicarbonato (por ejemplo, un carbonato de sodio y/o bicarbonato de sodio), HEPES (ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinetanosulfónico) y/o butirato de sodio; o cualquier ingrediente o componente de cultivo que pueda incrementar y/o disminuir la osmolalidad, tal como, por ejemplo: un hidrato de carbono, tal como una glucosa y/o una galactosa, cualquier aminoácido natural o sintético, un nucleótido y/o un cofactor, un intermedio metabólico, tal como, por ejemplo: hipoxantina, ácido linoleico, ácido lipoico, diclorhidrato de putrescina, piruvato de sodio y/o timidina, o una vitamina u cualquier otro compuesto orgánico requerido a concentración baja, tal como: biotina, D-pantotenato de calcio, cloruro de colina, cianocobalamina, ácido fólico, i-inositol, niacinamida, piridoxal, piridoxina, riboflavina, tiamina, una hormona y/o un cofactor, por ejemplo, insulina, transferrina y factor de crecimiento epidérmico, o un péptido, una proteína y/o un hidrolizado de tejido (por ejemplo, una peptona), o un antibiótico, por ejemplo, sulfato de gentamicina, o un ácido graso, tal como ácido linoleico, alfa tocoferol, lípido/EtOH, o un copolímero de bloque, por ejemplo, un polímero basado en óxido de etileno y óxido de propileno, por ejemplo, PLURONI™ (BASF, Florham Park, N.J.), que puede funcionar como un agente antiespumante, un agente humectante, un dispersante, un espesante, un emulsionante, un tensioactivo, un protector frente a la ósmosis, por ejemplo, prolina, glutamato, sorbitol, betaína, inositol, taurina y/o glicerol-fosfocolina.

En un modo de realización, se usan uno o más compuestos protectores frente a la ósmosis cuando se ponen en práctica las composiciones y/o procedimientos como se proporciona en el presente documento para intensificar el efecto de protección frente a la ósmosis de poner en práctica las composiciones y/o procedimientos relacionados con la presente invención; por ejemplo, las composiciones y/o procedimientos como se proporciona en el presente documento incluyen (comprenden) el uso de uno o más compuestos protectores frente a la ósmosis, tales como prolina, glutamato, sorbitol, betaína, inositol, taurina y/o glicerol fosfocolina.

Las composiciones como se proporciona en el presente documento, por ejemplo, los elementos reguladores transcripcionales de respuesta a la ósmosis (OR-TRE) como se proporciona en el presente documento, comprenden al menos una secuencia de potenciador transcripcional de respuesta a la proteína de unión al potenciador de la tonicidad (TonEBP) (también conocida como "proteína de unión al elemento de respuesta osmótica (OREBP)" o "NFAT5") (una secuencia de potenciador ORE/TonE) y/o un OR-TRE como se proporciona en el presente documento puede comprender un factor transcripcional de respuesta a la tonicidad NFATc. El estrés osmótico, incluyendo las condiciones de hiperosmolalidad provocada, por ejemplo, por condiciones de alto contenido de sal (sales de alto contenido de sodio o potasio, por ejemplo, NaCl), activa un factor de transcripción proteína de unión al potenciador de respuesta a la tonicidad/elemento de respuesta osmótica (NFATc o TonEBP/OREBP) mediante fosforilación (aunque la invención no está limitada por ningún mecanismo de acción particular), y la TonEBP/OREBP fosforilada se transloca desde el citoplasma al núcleo, dando como resultado una transcripción incrementada de tanto los elementos reguladores transcripcionales de respuesta a la ósmosis (OR-TRE) como se proporciona en el presente documento como de los elementos reguladores transcripcionales de respuesta a la ósmosis endógenos.

La activación de elementos reguladores transcripcionales de respuesta a la ósmosis endógenos incrementa la expresión (transcripción) de varios ácidos nucleicos de protección, por ejemplo, genes, los promotores de los cuales están controlados por el potenciador ORE/TonE, incluyendo el transportador de taurina (*TauT*), el transportador de glicina betaína-ácido γ -aminobutírico (*BGT1*), el cotransportador de sodio-mioinositol, proteína de choque térmico 70 (*HSP70*), acuaporina 2 (*AQP2*) y el gen de la aldosa reductasa (*AR*); y en modos de realización alternativos, los ácidos nucleicos de respuesta a la ósmosis como se proporciona en el presente documento comprenden secuencia(s) codificante(s) para estos ácidos nucleicos endógenos de respuesta a la ósmosis, por ejemplo, genes. De esta manera, en un aspecto, las composiciones y procedimientos como se proporciona en el presente documento imparten resistencia frente a la ósmosis a las células mediante la expresión de respuesta a la ósmosis de ácidos nucleicos endógenos de respuesta a la ósmosis, por ejemplo, genes, incorporados (insertados) en las composiciones como se proporciona en el presente documento; por ejemplo, incluyendo el transportador de taurina (*TauT*), el transportador de glicina betaína-ácido γ -aminobutírico (*BGT1*), el cotransportador de sodio-mioinositol, proteína de choque térmico 70 (*HSP70*), acuaporina 2 (*AQP2*) y/o el gen de la aldosa reductasa (*AR*).

Sin embargo, en aspectos alternativos, las composiciones y procedimientos como se proporciona en el presente documento imparten resistencia frente a la ósmosis a las células mediante la expresión de respuesta a la ósmosis de ácidos nucleicos, por ejemplo, genes (y proteínas) heterógenos con respecto a las células en las que se han insertado. Por ejemplo, el transportador de taurina (*TauT*), el transportador de glicina betaína-ácido γ -aminobutírico (*BGT1*), el cotransportador de sodio-mioinositol, proteína de choque térmico 70 (*HSP70*), acuaporina 2 (*AQP2*) y/o el

- gen de la aldosa reductasa (AR) pueden ser heterógenos con respecto a la célula. Las composiciones y procedimientos como se proporciona en el presente documento también pueden impartir resistencia frente a la ósmosis a las células mediante la expresión de respuesta a la ósmosis de una proteína o péptido de protección frente a la ósmosis endógeno o heterógeno, tal como una prolina o una glicina-betaína, o un transportador de taurina, o un transportador de glicina betaína-ácido γ -aminobutírico, o un cotransportador de sodio-mioinositol, o una proteína de choque térmico, o una proteína de choque térmico 70, o una acuaporina (una proteína de poro de membrana que actúa como un canal para el agua), o una acuaporina 2, o una aldosa reductasa.
- Las composiciones y procedimientos como se proporciona en el presente documento también pueden impartir resistencia frente a la ósmosis a las células mediante la expresión de respuesta a la ósmosis de una proteína antiapoptótica de protección frente a la ósmosis endógena o heterógena, tal como Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, BHRF1, XIAP, IAP1, IAP2 IEX-1L, Bfl-1 o Bcl-w.
- Las composiciones y procedimientos como se proporciona en el presente documento también pueden impartir resistencia frente a la ósmosis a las células mediante la expresión de respuesta a la ósmosis de una proteína endógena o heterógena que confiere resistencia al estrés oxidativo a una célula, tal como una superóxido dismutasa, una catalasa, una glutatión peroxidasa, una peroxirredoxina, una sulfirredoxina, tiorredoxina, tiorredoxina reductasa, tiorredoxina peroxidasa, tioltransferasa, glutarredoxina o una glutatión reductasa.
- Las composiciones y procedimientos como se proporciona en el presente documento protegen a las células contra el estrés osmótico, por ejemplo, protegen contra condiciones de hiperosmolalidad, para mejorar o prevenir las consecuencias adversas tales como, pero no limitadas a, proteínas desplegadas o mal plegadas, etc. De esta manera, en modos de realización alternativos, las composiciones y procedimientos como se proporciona en el presente documento posibilitan que una célula, incluyendo células cultivadas, genere y secrete más producto endógeno, incluyendo proteínas o proteínas en un estado de plegamiento correcto y/o que tienen mejores perfiles de glucosilación (normal, natural), etc. En un aspecto, las composiciones y procedimientos como se proporciona en el presente documento pueden impartir resistencia frente a la ósmosis a las células mediante la expresión de respuesta a la ósmosis de una proteína chaperona endógena o heterógena implicada en facilitar el plegamiento de proteínas, incluyendo la llamada respuesta a las proteínas desplegadas (o "UPR", que se activa en respuesta a una acumulación de proteínas desplegadas o mal plegadas para prevenir la muerte celular programada o apoptosis desencadenada por una acumulación de proteínas desplegadas o mal plegadas), tal como una proteína de unión a inmunoglobulina (BiP) (también llamada proteína regulada por glucosa 78 o Grp78), calnexina, calreticulina, ERp57 o una proteína disulfuro isomerasa (PDI).
- Las composiciones y procedimientos como se proporciona en el presente documento también pueden impartir resistencia frente a la ósmosis a las células mediante la expresión de respuesta a la ósmosis de una proteína endógena o heterógena implicada en la secreción extracelular de proteínas.
- Las composiciones y los procedimientos como se proporciona en el presente documento también pueden impartir resistencia frente a la ósmosis a las células mediante la expresión de respuesta a la ósmosis de una enzima glucolítica endógena o heterógena, por ejemplo, una piruvato carboxilasa o una piruvato cinasa.
- Las composiciones y procedimientos como se proporciona en el presente documento también pueden impartir resistencia frente a la ósmosis a las células mediante la expresión de respuesta a la ósmosis de una proteína de regulación del ciclo celular endógena o heterógena, por ejemplo, una ciclina o una cinasa dependiente de ciclina (una CDK) o un inhibidor de una ciclina o una cinasa dependiente de ciclina.
- En un aspecto, se pueden usar las secuencias de ácido nucleico de respuesta a la ósmosis como se proporciona en el presente documento para potenciar/incrementar la producción de proteínas recombinantes en cultivos de células de mamífero, por ejemplo, mejorando el estrés celular posterior al estrés osmótico. Además, se proporcionan procedimientos de uso de estas secuencias de ácido nucleico de respuesta a la ósmosis como se proporciona en el presente documento.
- Además, se proporcionan ácidos nucleicos en los que la expresión de los genes de interés está bajo el control de elementos de respuesta a la ósmosis, de tal manera que las proteínas de interés se puedan expresar en condiciones de osmolalidad incrementada. En estos casos, el OR-TRE está enlazado funcionalmente al ácido nucleico que codifica el gen de interés. En estos modos de realización, los ácidos nucleicos también pueden contener genes o ácidos nucleicos resistentes a la ósmosis controlados por OR-TRE y/o ácidos nucleicos que codifican proteínas o péptidos que confieren un efecto beneficioso sobre las proteínas expresadas que podría ser, por ejemplo, un efecto sobre el metabolismo, secreción, viabilidad o crecimiento de la célula, o puede ser algo que tenga un efecto beneficioso sobre la calidad de la proteína expresada, tal como un plegamiento correcto, modificaciones postraduccionales y similares.
- Además, en el presente documento se proporciona un mecanismo de retroalimentación positiva en el que el OR-TRE dirige la expresión de TonEBP de tal manera que la proteína pueda entonces inducir la expresión adicional de TonEBP. Cuando se usa junto con otros genes bajo el control de OR-TRE, la retroalimentación positiva también

tiene el efecto de inducir la expresión de estos genes. La retroalimentación positiva puede proporcionar una adaptabilidad potenciada de las células con respecto a la hiperosmolalidad.

Se puede incrementar artificialmente la osmolalidad del cultivo para inducir la expresión de los genes bajo el control de los OR-TRE de una forma regulada y predecible para registrar el tiempo de producción de proteínas para optimizar determinadas propiedades. De manera alternativa, al disponer la expresión de los genes bajo el control de OR-TRE, los genes se pueden expresar de manera tardía en las fases de cultivo a medida que la osmolalidad se incrementa de manera natural. Estos procedimientos pueden ser útiles en la expresión de proteínas que sean tóxicas para las células, proteínas que sean inestables y proteínas que simplemente sean difíciles de expresar en condiciones de cultivo estándar.

Además, se proporciona una variedad de promotores artificiales novedosos que posibilitan la expresión del gen de respuesta a la tonicidad y sus posibles aplicaciones para la fabricación de proteínas recombinantes. En un aspecto, los ácidos nucleicos como se proporciona en el presente documento comprenden promotores de mamíferos de respuesta a la ósmosis; y, de manera alternativa, en un aspecto, los ácidos nucleicos como se proporciona en el presente documento comprenden una región no traducida de respuesta a la ósmosis del ARNm de TonEBP para la expresión con sensibilidad a la ósmosis de una secuencia de ácido nucleico de interés.

En un modo de realización, los ácidos nucleicos como se proporciona en el presente documento comprenden promotores de respuesta a TonEBP/OREBP que comprenden uno o múltiples módulos de operador específicos del potenciador TonEBP/OREBP clonados secuencia arriba de un promotor eucariótico mínimo. En un aspecto, se usa la secuencia de nucleótidos 1053 a 1007 del promotor de aldosa reductasa de ratón (véase, por ejemplo, Daoudal (1997) J. Biol. Chem. Jan 31; 272(5):2615-2619) que contiene el TonE en la posición 1053 y un sitio de proteína activadora 1 (AP-1) en la posición 1014.

En aspectos alternativos, los ácidos nucleicos como se proporciona en el presente documento que contrarrestan los efectos de la osmolalidad incrementada en la producción de proteínas recombinantes mediante la inserción de uno o de múltiples elementos de respuesta osmótica secuencia arriba o dentro de la secuencia de promotor que induce la expresión de un transgén, de esta manera incrementando su actividad transcripcional a medida que se incrementa la osmolalidad. Por ejemplo, en los sistemas naturales, casi todos los genes de respuesta a la tonicidad tienen uno o más sitios de respuesta a la proteína activadora 1 (AP-1) dentro de las 35 pb de un TonE; y, en aspectos alternativos, los ácidos nucleicos como se proporciona en el presente documento comprenden uno o una pluralidad de sitios de AP-1 (secuencias de unión a AP-1) a una distancia similar (más, menos o la misma) de un sitio de TonE. La presencia de uno o más motivos de respuesta a AP-1 en los ácidos nucleicos como se proporciona en el presente documento contribuye a un alto grado de respuesta inducido por NaCl, por ejemplo, en este aspecto, los elementos reguladores transcripcionales de respuesta a la ósmosis (ORTRE) que comprenden el motivo de respuesta a AP-1 como se proporciona en el presente documento están más sensibilizados o tienen más respuesta (tienen más respuesta a la tonicidad) a las condiciones de estrés osmótico, por ejemplo, están más sensibilizados o tienen más respuesta a las condiciones de cultivo de alto contenido de sal (por ejemplo, sales de sodio o potasio, por ejemplo, NaCl). Las composiciones y/o procedimientos en relación con la presente invención usan una variedad de alternativas de expresión de un transgén, o ventanas, que se hacen posibles variando el número de elementos de respuesta osmótica, por ejemplo, TonE y/o AP-1, enlazados funcionalmente a una secuencia de promotor para ajustar los niveles de expresión de un transgén (un "gen de interés") a un nivel deseado, por ejemplo, desde una expresión de referencia a una expresión más alta, o máxima, en condiciones de estrés osmótico (por ejemplo, hipotónicas o hipertónicas).

En un modo de realización, un incremento en el grado de respuesta a la hiperosmolalidad celular (por ejemplo, grado de respuesta a la tonicidad) está mediado por un ácido nucleico como se proporciona en el presente documento, lo que incrementa la tasa de transcripción de una molécula de ácido nucleico, tal como un transgén o "gen de interés", "como se media/controla por el promotor de la unidad de transcripción. Por ejemplo, en un aspecto, un incremento en la actividad de transactivación del gen NFATc/OREBP o TonEBP/OREBP de respuesta a la hiperosmolalidad (por ejemplo, de respuesta a la tonicidad) está mediado por el promotor del elemento regulador transcripcional de respuesta a la ósmosis (OR-TRE) como se proporciona en el presente documento. En modos de realización alternativos, se puede usar cualquier promotor activo de manera transcripcional en una célula eucariótica en un elemento regulador transcripcional de respuesta a la ósmosis (OR-TRE) como se proporciona en el presente documento, por ejemplo, un promotor que comprende o consiste en un promotor constitutivo o un promotor inducible, o un promotor sintético, o un promotor de mamífero, vegetal, de insecto, bacteriano, de levadura, fúngico o vírico, o un promotor de citomegalovirus (CMV), por ejemplo, un promotor mínimo que consiste en un fragmento de un promotor de CMV humano. En un aspecto, se usa una unidad de transcripción mínima, por ejemplo, una versión mínima o reducida al máximo de un vector de expresión, por ejemplo, como se describe en el presente documento, para expresar lo más eficazmente la molécula de ácido nucleico (por ejemplo, transgén o gen de interés).

Aunque la invención no está limitada por ningún mecanismo de acción particular, en un aspecto, los elementos reguladores transcripcionales de respuesta a la ósmosis (OR-TRE) como se proporciona en el presente documento incrementan la tolerancia a la ósmosis debido al bucle de retroalimentación positiva inducido por TonEBP de la célula para la expresión de TonEBP, como se ilustra esquemáticamente en la figura 1a y la figura 1b.

Las composiciones y procedimientos como se proporciona en el presente documento mejoran la osmolalidad incrementada correlacionada con la tonicidad incrementada (contenido incrementado de sal, tal como sales de sodio o potasio, por ejemplo, o NaCl). En un aspecto, el alto contenido de sal (sales de sodio o potasio) en el entorno de cultivo activa el factor de transcripción proteína de unión al potenciador de respuesta a la tonicidad/elemento de respuesta osmótica (TonEBP/OREBP) como se proporciona en el presente documento, dando como resultado una transcripción incrementada de los genes de protección frente a la ósmosis incorporados en las construcciones como se proporciona en el presente documento. En estas construcciones, los promotores se controlan, por ejemplo, mediante un elemento regulador transcripcional de respuesta a la ósmosis (OR-TRE), o el potenciador ORE/TonE, que, en un aspecto, incluye una o más secuencias de unión a la proteína AP-1.

Aunque la invención no está limitada por ningún mecanismo de acción particular, en un aspecto, la regulación de la actividad transcripcional de TonEBP/OREBP es como se representa esquemáticamente en la figura 1a; este esquema implica el tráfico nucleocitoplásmico, la transactivación y la fosforilación. En un aspecto, en los 30 min de hipertonicidad, TonEBP/OREBP se fosforila y su distribución nuclear, es decir, la proporción de la cantidad en la fracción nuclear con respecto a la cantidad en la fracción citoplásmica, se incrementa. En un aspecto, la transactivación de TonEBP depende de la tonicidad: la actividad transcripcional de TonEBP es positiva en condiciones isotónicas, disminuye en la hipotonicidad y se incrementa en la hipertonicidad.

La figura 1a representa esquemáticamente cómo se estimula TonEBP mediante hipertonicidad e induce la transcripción de promotores que contienen uno o múltiples sitios de unión afines de TonEBP: ORE/TonE. En un modo de realización, se puede usar cualquier promotor que contenga TonE (potenciador de la tonicidad, también llamado el elemento de respuesta osmótica) endógeno para inducir la expresión de una proteína recombinante para una producción biofarmacéutica potenciada.

La figura 1b representa esquemáticamente un ejemplo de aplicación de la actividad dependiente de la ósmosis de TonEBP: un bucle de retroalimentación positiva de respuesta a la ósmosis. Sin embargo, advirtiendo que la invención no está limitada por ningún mecanismo de acción particular, la figura 1b representa uno de los muchos mecanismos de acción ejemplares posibles: un bucle de retroalimentación positiva de respuesta a TonEBP donde TonEBP transactiva su propia expresión de modo que cuando la tonicidad se incrementa, TonEBP amplifica sintéticamente su propia estimulación: cuanto mayor es la activación de respuesta a la ósmosis de TonEBP, más TonEBP se produce, dando como resultado una mayor retroalimentación.

Al diseñar construcciones como se proporciona en el presente documento, el elemento regulador transcripcional de respuesta a la ósmosis (OR-TRE) como se proporciona en el presente documento puede transactivar una variedad de genes de protección frente a la ósmosis, de esta manera posibilitando que las células se adapten a una osmolalidad alta. En un mecanismo ejemplar, dicho bucle de retroalimentación positiva de respuesta a la ósmosis podría tanto acelerar como amplificar la adaptación de las células de mamífero al estrés osmótico. Incrementaría su tolerancia a la osmolalidad alta sin las desventajas de la sobreexpresión constitutiva.

En algunos aspectos, una sobreexpresión constitutiva de TonEBP podría representar un drenaje de energía excesivo para las células en condiciones isotónicas; sin embargo, debido a que la divulgación en relación con la invención abarca elementos reguladores transcripcionales de respuesta a la ósmosis (OR-TRE) que pueden crear un fenotipo resistente a la ósmosis para cualquier célula que exprese cualquier proteína recombinante, en algunas circunstancias se contempla una construcción o una célula como se proporciona en el presente documento que se puede diseñar para expresar de manera constitutiva un gen que otorgue algún grado de resistencia frente a la ósmosis a una célula. En modos de realización alternativos, las construcciones relacionadas con la presente invención son de respuesta a la ósmosis en tanto que pueden tener respuesta a incrementos o disminuciones en la osmolalidad, osmolaridad, y/o tonicidad intracelular y/o extracelular. En modos de realización alternativos, "de respuesta a la ósmosis" significa cualquier cambio en la osmolalidad u osmolaridad, por ejemplo, cualquier disminución o incremento en la osmolalidad u osmolaridad, por ejemplo, cualquier cambio en molalidad, incluyendo cualquier cambio en (por ejemplo, condiciones crecientes o decrecientes de) la hiperosmolalidad o hipoosmolalidad. En un aspecto, la "osmolalidad" es una medida de la presión osmótica de las partículas de soluto disueltas en una solución acuosa. Las partículas de soluto incluyen tanto iones como moléculas no ionizadas.

La osmolalidad se expresa como la concentración de partículas activas de manera osmótica (es decir, osmoles) disueltas en 1 kg de agua (1 mOsm/kg de H₂O a 38 °C es equivalente a una presión osmótica de 19 mmHg). "Osmolaridad" se refiere al número de partículas de soluto disueltas en 1 litro de solución. Los solutos que se pueden añadir al medio de cultivo para incrementar la osmolalidad del mismo incluyen proteínas, péptidos, aminoácidos, polímeros no metabolizados, vitaminas, iones, sales (por ejemplo, sales de sodio o potasio), azúcares, metabolitos, ácidos orgánicos, lípidos, etc. En un modo de realización, se incrementa la concentración de aminoácidos y sales, por ejemplo, sales de sodio y potasio (por ejemplo, NaCl) en el medio de cultivo a fin de conseguir los intervalos de osmolalidad deseados expuestos en el presente documento. Cuando se usa en el presente documento, la abreviatura "mOsm" significa "miliosmoles/kg de H₂O".

Por ejemplo, en un modo de realización, las composiciones y procedimientos proporcionados en el presente documento se usan para mantener un medio de cultivo celular, por ejemplo, uno encontrado en un biorreactor, para que tenga una osmolaridad en el intervalo de entre aproximadamente 210 y 350 miliosmoles (mOsm), o en el intervalo de entre aproximadamente 260 y 320 miliosmoles (mOsm), o, en modos de realización alternativos, que seleccione como diana una osmolaridad de cultivo celular de aproximadamente 280, 290, 300 o 310 mOsm/kg.

En un modo de realización alternativo, las composiciones y procedimientos proporcionados en el presente documento se usan para mantener un medio de cultivo celular de osmolaridad relativamente baja, por ejemplo, para mantener un medio de cultivo celular que tenga una osmolaridad de aproximadamente 248 mOsm a aproximadamente 280 mOsm, véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º (USPN) 5.747.341. En un modo de realización alternativo, las composiciones y procedimientos proporcionados en el presente documento se usan para mantener un medio de cultivo celular de entre aproximadamente 280 a 330 mOsm, o de entre aproximadamente 400 a 600 mOsm, por ejemplo, como se describe en la pub. de sol. de patente de EE. UU. n.º 20050272124. En un modo de realización alternativo, las composiciones y procedimientos proporcionados en el presente documento se usan para mantener un medio de cultivo celular de entre aproximadamente 250 a aproximadamente 600 mOsm, como se describe, por ejemplo, en la USPN 5.705.364.

Proteínas de resistencia al estrés o entorno

En el presente documento se proporcionan ácidos nucleicos de respuesta a la ósmosis que comprenden al menos uno de los elementos reguladores transcripcionales de respuesta a la ósmosis como se proporciona en el presente documento enlazado funcionalmente a un ácido nucleico que codifica una proteína o péptido de protección frente a la ósmosis; una proteína antiapoptótica; una proteína que confiere resistencia al estrés oxidativo a una célula; una proteína chaperona implicada en facilitar el plegamiento de proteínas; una proteína implicada en la secreción extracelular de proteínas; una enzima glucolítica; una proteína de regulación del ciclo celular; o cualquier combinación de las mismas.

Genes de protección frente a la ósmosis

En el presente documento se proporcionan ácidos nucleicos de respuesta a la ósmosis que codifican proteínas que afectan favorablemente al contenido de agua y/o potencial osmótico de las células de mamífero. Por ejemplo, los ácidos nucleicos como se proporciona en el presente documento pueden expresar con respuesta a la ósmosis ácidos nucleicos que codifican la biosíntesis de cualquier proteína que afecte al contenido de agua y/o potencial osmótico de las células de mamífero, por ejemplo, prolina y glicina-betaína, y/o proteínas que afecten a los niveles de otros solutos activos de manera osmótica, tales como los azúcares.

Los ácidos nucleicos como se proporciona en el presente documento pueden expresar con respuesta a la ósmosis una pluralidad de genes que mejoran la resistencia osmótica y tienen modos de acción complementarios. Las combinaciones de estos genes expresados por ácidos nucleicos como se proporciona en el presente documento pueden tener efectos aditivos y/o sinérgicos al mejorar la resistencia osmótica en una célula, por ejemplo, en una célula de mamífero. En modos de realización alternativos, el beneficio se confiere por medio de la expresión constitutiva de uno o más de estos genes, y/o también expresando uno o más de una manera de respuesta a la ósmosis, por ejemplo, usando un sistema de expresión transcripcional y/o postranscripcional de respuesta a la ósmosis como se proporciona en el presente documento. Proporcionando una variedad de combinaciones tanto de incremento constitutivo como inducido por ósmosis en la expresión de proteínas que proporcionan a las células genomanipuladas una respuesta a la ósmosis potenciada, o un mecanismo de detección de la ósmosis potenciado, se pueden diseñar o equipar las composiciones y/o procedimientos relacionados con la invención para que tengan patrones de expresión con sensibilidad a la ósmosis adecuados para cualquier célula, por ejemplo, para cualquier célula de mamífero, que exprese cualquier proteína recombinante, para soportar mejor el estrés de la hiper o hipoosmolaridad. Por ejemplo, se pueden usar las composiciones y procedimientos como se proporciona en el presente documento para mejorar o prevenir la producción de lactato que acidifica las condiciones de cultivo, por ejemplo, en un sistema de cultivo o un biorreactor. En la mayoría de los sistemas de cultivo y biorreactores, a fin de mantener el pH del medio, la base se bombea y, como resultado, se incrementa la osmolalidad.

Existe una correlación entre la acumulación de lactato y el crecimiento y la viabilidad celulares disminuidos en los biorreactores por lotes alimentados. De esta manera, la sobreexpresión de respuesta a la ósmosis de las enzimas glucolíticas, tales como piruvato carboxilasa, piruvato cinasa y otras enzimas, por las composiciones y procedimientos como se proporciona en el presente documento posibilita que una célula transformada, por ejemplo, una célula de mamífero, cambie de producción de lactato a consumo de lactato. El resultado de esta sobreexpresión de la(s) enzima(s) glucolítica(s) es mantener la viabilidad por la célula y la producción de proteínas recombinantes incrementada por la célula, por ejemplo, la célula de mamífero.

Generación y manipulación de ácidos nucleicos y vectores

En el presente documento se proporcionan ácidos nucleicos que comprenden un elemento regulador transcripcional de respuesta a la ósmosis (OR-TRE), ácidos nucleicos de respuesta a la ósmosis y casetes de expresión, vectores,

(TonEBP) secuencia arriba (en 5' con respecto a) y enlazada funcionalmente a una secuencia de promotor activa de manera transcripcional en una célula eucariótica. La secuencia de potenciador adicional también se puede enlazar funcionalmente a los elementos reguladores transcripcionales de respuesta a la ósmosis (OR-TRE) como se proporciona en el presente documento.

5 Se puede usar cualquier secuencia reguladora transcripcional, por ejemplo, una secuencia de promotor o una de potenciador, funcional en una célula eucariótica, por ejemplo, una célula de mamífero, para poner en práctica las composiciones y/o procedimientos relacionados con la presente invención, por ejemplo, se puede usar en una construcción de ácido nucleico como se proporciona en el presente documento. Por ejemplo, en modos de
10 realización alternativos, un promotor usado para poner en práctica las composiciones y/o procedimientos relacionados con la presente invención es un promotor mínimo (también llamado un "promotor de núcleo"), un promotor inducible o un promotor constitutivo. Una secuencia reguladora transcripcional, por ejemplo, una secuencia de potenciador, de promotor, está "enlazada funcionalmente a" una secuencia que se va a transcribir, por ejemplo, una secuencia que codifica proteínas, cuando la ARN polimerasa que inicia la transcripción en el promotor transcribe la secuencia codificante en un ARN, por ejemplo, un ARNm. En un modo de realización, un promotor como se usa
15 en el presente documento es una región reguladora de (en) un ácido nucleico, por ejemplo, un ADN o gen, que se puede localizar secuencia arriba (es decir, hacia la región 5' de la cadena sentido) del ácido nucleico o gen que se va a transcribir, de esta manera, el promotor inicia (permite) la transcripción del ácido nucleico o gen.

20 En modos de realización alternativos, una secuencia reguladora transcripcional, por ejemplo, una secuencia de promotor o una de potenciador, puede estar "enlazada funcionalmente a" una secuencia que se va a transcribir, por ejemplo, una secuencia que codifica proteínas, o un ácido nucleico regulador, tal como una molécula de ácido nucleico inhibidor, estabilizador o regulador por incremento, o una secuencia antisentido u otra secuencia inhibidora (tal como miARN o ARNic) incluso si el promotor o potenciador no está cerca (próximo) a la secuencia que se va a transcribir; en otras palabras, no hay límite con respecto a la distancia a la que una secuencia reguladora transcripcional (por ejemplo, como un potenciador, tal como un potenciador transcripcional de respuesta a AP-1 o a
25 TonEBP) está con respecto a (está posicionada en relación con) la secuencia que se va a transcribir (por ejemplo, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 o 500 o más residuos), y no hay limitación sobre su disposición en una construcción (en o dentro de una construcción); adviértase que en algunos modos de realización la secuencia reguladora transcripcional es *cis* con respecto a la secuencia que se va a transcribir, mientras que en otros aspectos es *trans* con respecto a la secuencia que se va a transcribir.

35 En modos de realización alternativos, la secuencia reguladora transcripcional, por ejemplo, una secuencia de promotor o una de potenciador (por ejemplo, un potenciador transcripcional de respuesta a APE1 o a TonEBP), puede estar en una orientación sentido o antisentido con respecto a la secuencia que se va a transcribir, o en la misma cadena o en una opuesta con respecto a la secuencia que se va a transcribir.

40 Se puede usar cualquier promotor mínimo, por ejemplo, un promotor de núcleo o un promotor mínimo que sea la porción mínima de una secuencia de promotor o motivo requerido para iniciar apropiadamente la transcripción. En un aspecto, un promotor mínimo o de núcleo usado para poner en práctica las composiciones y/o procedimientos relacionados con la invención es o comprende un fragmento de un promotor de CMV humano; los promotores mínimos (promotores de núcleo) y los procedimientos para identificarlos y prepararlos se conocen bien en la técnica, por ejemplo, véase Baliga (2001) Biol. Proceed. Online 3:64-69; Hettiarachchi (2003) Nucleic Acids Res. 31(18):5256-5265. Por ejemplo, se puede usar parte del dominio A del promotor 35S de CaMV, que contiene una
45 caja TATA y que se extiende desde la posición 90 al sitio de inicio de la transcripción +1, como un "promotor mínimo". Además de la caja TATA, que es el sitio de unión para la ARN polimerasa II, este promotor mínimo contiene al menos tres cajas similares a CAAT; estas secuencias potencian la actividad de las secuencias secuencia arriba e influyen en la eficacia de la actividad del promotor. En un aspecto, estas cajas similares a CAAT se usan solas o se unen a regiones de promotor heterógenas para inducir la expresión de construcciones como se proporciona en el presente documento. Otros "promotores mínimos" ejemplares que se pueden usar para poner en práctica las composiciones y/o procedimientos relacionados con la presente invención incluyen un promotor que
50 comprende una secuencia **CCCACCCCC** (caja CCAC) como se describe, por ejemplo, por Bassel-Duby (1992) Mol. Cell Biol. 12(11): 5024-5032; o un promotor de núcleo de ARN polimerasa II como se describe, por ejemplo, por Juven-Gershon (2008) Curr. Opin. Cell Biol. 20(3):253-9. Epub, 22 de abril de 2008; Juven-Gershon (2006) Biochem. Soc. Trans. 34(Pt 6):1047-50; o el promotor mínimo del gen de la cadena pesada de miosina (-164 a +16); véase, por ejemplo, Smith (1998) Am. J. Physiol. 274(5 Pt 1):C1188-95.

60 Los promotores eucarióticos ejemplares que se pueden usar para poner en práctica las composiciones y/o procedimientos relacionados con la presente invención incluyen los promotores inmediato temprano de CMV, de timidina cinasa del VHS, temprano y tardío de SV40, de RTL de retrovirus, de metalotioneína I de ratón, de choque térmico, el promotor temprano y tardío de SV40, el promotor de RTL de retrovirus y el de metalotioneína I de ratón. También se puede usar cualquier promotor conocido para controlar la expresión de genes en células procarióticas o eucarióticas o sus virus. Los promotores que se pueden usar para poner en práctica las composiciones y/o procedimientos relacionados con la presente invención también incluyen los promotores *lac* o *trp* de *E. coli*, el
65 promotor *lacI*, el promotor *lacZ*, el promotor *T3*, el promotor *T7*, el promotor *gpt*, el promotor *lambda PR*, el promotor

lambda PL, promotores de operones que codifican enzimas glucolíticas. tales como 3-fosfoglicerato cinasa (PGK) y el promotor de fosfatasa ácida, promotores fúngicos y similares.

Los promotores vegetales ejemplares que se pueden usar para poner en práctica las composiciones y/o procedimientos relacionados con la presente invención incluyen tanto promotores inducibles como constitutivos, por ejemplo, promotores constitutivos tales como la región de iniciación de la transcripción 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), el promotor 1' o 2' derivado del ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens*; y/o promotores inducibles, por ejemplo, tras la exposición a hormonas vegetales, tales como auxinas; y otras regiones de iniciación de la transcripción de genes vegetales conocidos.

También se puede usar cualquier potenciador y/o promotor conocido para controlar la expresión de genes en células procarióticas o eucarióticas o sus virus. En modos de realización alternativos, como se usa en el presente documento, un potenciador es una región corta de ácido nucleico, por ejemplo, ADN, que se puede unir específicamente a una proteína, que se puede llamar un activador, o una proteína de unión al potenciador. En un aspecto, la unión de activadores a esta región de potenciador puede iniciar la transcripción de una secuencia que codifica proteínas, por ejemplo, un gen, o afectar (iniciar, detener, incrementar o disminuir) la actividad de un promotor. El promotor y/o gen afectado por, o "enlazado funcionalmente a", el potenciador, puede estar a una distancia considerable del potenciador, o incluso puede estar en un vector o cromosoma diferente. En modos de realización alternativos, el incremento o disminución de la transcripción efectuado por el potenciador sobre el promotor se puede deber a que los activadores unidos al potenciador afectan directa o indirectamente a la incorporación de "factores de transcripción" adicionales con respecto al potenciador sobre el promotor, lo que puede potenciar la unión de otras proteínas necesarias para la transcripción, tales como las ARN o ADN polimerasas.

En un aspecto, los casetes de expresión, vectores, virus recombinantes, plásmidos, fagos, fagémidos, cromosomas artificiales y vehículos de clonación como se proporciona en el presente documento expresados en células eucarióticas también pueden contener potenciadores adicionales para incrementar los niveles de expresión. Los potenciadores son elementos de ADN que actúan en cis, normalmente desde aproximadamente 10 a aproximadamente 300 pb de longitud, que actúan sobre un promotor para incrementar su transcripción. Los ejemplos incluyen el potenciador SV40 en el lado tardío del origen de replicación, pb 100 a 270, el potenciador de promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de replicación y los potenciadores de adenovirus.

Los promotores tempranos y tardíos del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación vírico de SV40. Fiers *et al.*, Nature. 273:113 (1978); Mulligan and Berg, Science, 209:1422-1427 (1980); Pavlakis *et al Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:7398-7402 (1981). El promotor inmediato temprano del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción HindIII E. Greenaway *et al.*, Gene, 18:355-360 (1982). En la pat. de EE. UU. n.º 4.419.446 se divulga un sistema para expresar ADN en huéspedes de mamífero usando el papilomavirus bovino como un vector. Una modificación de este sistema se describe en la pat. de EE. UU. n.º 4.601.978. Véanse también Gray *et al.*, Nature, 295:503-508 (1982) sobre la expresión del ADNc que codifica el interferón inmunitario en células de mono; Reyes *et al.*, Nature, 297:598-601 (1982) sobre la expresión del ADNc del interferón β humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina cinasa del virus del herpes simple; Canaani (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:5166-5170, sobre la expresión del gen del interferón β 1 humano en células cultivadas de ratón y conejo; y Gorman (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:6777-6781, sobre la expresión de secuencias de CAT bacteriana en células de riñón de mono CV-1, fibroblastos de embrión de pollo, células de ovario de hámster chino, células HeLa y células NIH-3T3 de ratón usando la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous como promotor.

Otros procedimientos, vectores y células huésped adecuados para la adaptación a la síntesis del polipéptido de interés en el cultivo de células de vertebrado recombinantes se describen en Gething *et al.*, Nature, 293:620-625 (1981); Mantei *et al.*, Nature, 281:40-46 (1979); Levinson *et al.*; el documento EP 117.060; y el documento EP 117.058. En un modo de realización, un plásmido usado para poner en práctica las composiciones y/o procedimientos relacionados con la presente invención para la expresión del cultivo de células de mamífero de una composición como se proporciona en el presente documento, incluyendo cualquier ácido nucleico o polipéptido, es pRK5 (pub. EP n.º 307.247) o pSV16B (pub. PCT n.º WO 91/08291, publicada el 13 de junio de 1991).

Vectores de expresión y vehículos de clonación

En el presente documento se proporcionan casetes de expresión, vectores, virus recombinantes, plásmidos, fagos, fagémidos, cromosomas artificiales y vehículos de clonación que comprenden los ácidos nucleicos como se proporciona en el presente documento (que comprenden un elemento regulador transcripcional de respuesta a la ósmosis (OR-TRE) como se proporciona en el presente documento), y/o un ácido nucleico de respuesta a la ósmosis como se proporciona en el presente documento, incluyendo ácidos nucleicos de regulación de la ósmosis como se proporciona en el presente documento. Se pueden usar partículas víricas, baculovirus, fagos, plásmidos, fagémidos, cósmidos, fásmidos, cromosomas artificiales bacterianos, ADN vírico (por ejemplo, virus de la variolovacuna, adenovirus, virus de la viruela aviar, seudorrabia y derivados de SV40), cromosomas artificiales basados en P1, plásmidos de levadura, cromosomas artificiales de levadura y cualquier otro vector específico para

huéspedes de interés específicos (tales como células de mamífero) para poner en práctica las composiciones y/o procedimientos relacionados con la invención. En un aspecto, los casetes de expresión, vectores, virus recombinantes, plásmidos, fagos, fagémidos, cromosomas artificiales y vehículos de clonación usados para poner en práctica las composiciones y/o procedimientos relacionados con la invención pueden incluir secuencias de ADN cromosómico, no cromosómico y sintético. Se conocen grandes números de vectores adecuados por los expertos en la técnica y están disponibles comercialmente.

Los vectores ejemplares incluyen vectores eucarióticos, tales como pXT1, pSG5 (Stratagene), pSVK3, pBPV, pMSG, pSVLSV40 (Pharmacia). Sin embargo, se puede usar cualquier otro plásmido u otro vector siempre que sean replicables y viables en el huésped. Se pueden emplear vectores de bajo número de copias o de alto número de copias con la presente invención.

Los casetes de expresión, vectores, virus recombinantes, plásmidos, fagos, fagémidos, cromosomas artificiales y vehículos de clonación usados para poner en práctica las composiciones y/o procedimientos relacionados con la invención pueden comprender un promotor, un sitio de unión a ribosoma para la iniciación de la traducción y un terminador de la transcripción; y también pueden incluir secuencias apropiadas para amplificar la expresión. Los vectores de expresión en mamíferos pueden comprender un origen de replicación, cualquier sitio de unión a ribosoma necesario, un sitio de poliadenilación, sitios de donador y aceptor de empalme, secuencias de terminación transcripcional y secuencias no transcritas flanqueantes en 5'. En algunos aspectos, se pueden usar las secuencias de ADN derivadas de los sitios de empalme y poliadenilación de SV40 para proporcionar los elementos genéticos no transcritos requeridos.

En un aspecto, el vector de expresión puede tener dos sistemas de replicación para permitir que se mantenga en dos organismos, por ejemplo, en células de mamífero o de insecto para la expresión y en un huésped procariótico para la clonación y amplificación. Además, para los vectores de expresión de integración, el vector de expresión puede contener al menos una secuencia homóloga con respecto al genoma de la célula huésped. Puede contener dos secuencias homólogas que flanquean la construcción de expresión. El vector de integración se puede dirigir a un locus específico en la célula huésped seleccionando la secuencia homóloga apropiada para su inclusión en el vector.

Las construcciones para vectores de integración se conocen bien en la técnica. Los promotores eucarióticos ejemplares incluyen inmediato temprano de CMV, de timidina cinasa del VHS, temprano y tardío de SV40, de RTL de retrovirus y de metalotioneína I de ratón. La selección del vector y promotor apropiados se encuentra dentro del nivel de pericia en la técnica. El vector de expresión también contiene un sitio de unión a ribosoma para la iniciación de la traducción y un terminador de la transcripción. El vector también puede incluir secuencias apropiadas para amplificar la expresión. Las regiones de promotor se pueden seleccionar de cualquier gen deseado usando vectores de cloranfenicol transferasa (CAT) u otros vectores con marcadores seleccionables. Además, los vectores de expresión contienen preferentemente uno o más genes con marcadores seleccionables para proporcionar un rasgo fenotípico para la selección de células huésped transformadas, tales como dihidrofolato reductasa o resistencia a neomicina, para el cultivo de células eucarióticas, o tales como resistencia a tetraciclina o a ampicilina en *E. coli*.

Los vectores de expresión en mamíferos también pueden comprender un origen de replicación, cualquier sitio de unión a ribosoma necesario, un sitio de poliadenilación, sitios de donador y aceptor de empalme, secuencias de terminación transcripcional y secuencias no transcritas flanqueantes en 5'. En algunos aspectos, se pueden usar las secuencias de ADN derivadas de los sitios de empalme y poliadenilación de SV40 para proporcionar los elementos genéticos no transcritos requeridos.

En aspectos alternativos, los ácidos nucleicos como se proporciona en el presente documento, por ejemplo, los que comprenden un elemento regulador transcripcional de respuesta a la ósmosis (OR-TRE), y/o ácidos nucleicos de respuesta a la ósmosis como se proporciona en el presente documento, son episómicos o están integrados de manera estable en el genoma de una célula, por ejemplo, una célula que se va a cultivar.

Para la integración estable de una construcción de ácido nucleico como se proporciona en el presente documento, se puede usar cualquier excipiente o vehículo adecuado, por ejemplo, un vector lentivírico y/o sistema de encapsidación como se describe, por ejemplo, en las USPN 7.311.907; 7.262.049, que describen un vector lentivírico seudotipado; las USPN 7.250.299; 7.226.780; 7.220.578; 7.211.247; 7.160.721, que describen procedimientos para potenciar el crecimiento celular e incrementar la densidad de cultivos celulares que contienen células huésped infectadas con lentivirus; las USPN 7.078.031; 7.070.993; 7.056.699; 6.955.919; por nombrar solo algunos vectores y sistemas de encapsidación que se pueden usar para poner en práctica las composiciones y/o procedimientos relacionados con la presente invención.

Para la transferencia episómica de una construcción de ácido nucleico como se proporciona en el presente documento, se puede usar cualquier excipiente o vehículo adecuado, por ejemplo, un vector episómico nuclear estable como se describe en la USPN 7.294.505; un sistema de vector lentivírico para la replicación episómica de un gen deseado como se describe en la USPN 6.808.923; un vector de expresión episómica para expresión de genes específica de tejido como se describe en la USPN 6.797.494; vectores de papilomavirus humano para la transducción episómica como se describe en la USPN 6.605.281; un vector episómico como se describe en la USPN

6.479.279 o 6.410.314; por nombrar solo algunos vectores y sistemas de encapsidación que se pueden usar para poner en práctica las composiciones y/o procedimientos relacionados con la presente invención.

5 Otros casetes de expresión, vectores, virus recombinantes, plásmidos, fagos, fagémidos, cromosomas artificiales o vehículos de clonación y sistemas que se pueden usar para poner en práctica las composiciones y/o procedimientos relacionados con la presente invención incluyen, por ejemplo, vectores adenovíricos competentes para la replicación como se describe en la USPN 7.371.570; sistemas de encapsidación en trans basados en adenovirus (Ad) como se describe en la USPN 7.348.178; un adenovirus como se describe en la USPN 7.323.177; 7.319.033; 7.318.919; o 7.306.793; por nombrar solo algunos vectores y sistemas de encapsidación que se pueden usar para poner en práctica las composiciones y/o procedimientos relacionados con la presente invención.

Genes marcadores

15 En un aspecto, los casetes de expresión, vectores, virus recombinantes, plásmidos, fagos, fagémidos, cromosomas artificiales y vehículos de clonación usados para poner en práctica las composiciones y/o procedimientos relacionados con la invención contienen uno o más genes marcadores seleccionables para permitir la selección de células huésped, por ejemplo, células de mamífero, que contienen un ácido nucleico como se proporciona en el presente documento.

20 Los marcadores seleccionables ejemplares incluyen genes que codifican dihidrofolato reductasa o genes que confieren resistencia a neomicina, para el cultivo de células eucarióticas, genes que confieren resistencia a tetraciclina o a ampicilina. Los casetes de expresión, vectores, virus recombinantes, plásmidos, fagos, fagémidos, cromosomas artificiales y vehículos de clonación usados para poner en práctica las composiciones y/o procedimientos relacionados con la invención también pueden incluir un gen marcador seleccionable para permitir la selección de células que se han transformado, por ejemplo, genes que hacen que las bacterias sean resistentes a fármacos, tales como ampicilina, cloranfenicol, eritromicina, canamicina, neomicina y tetraciclina. Los marcadores seleccionables también pueden incluir genes biosintéticos, tales como los que se encuentran en las vías biosintéticas de histidina, triptófano y leucina.

30 En un aspecto, a fin de mejorar la capacidad de identificar las células transfectadas, se usan uno o más ácidos nucleicos marcadores que se pueden seleccionar o que se pueden cribar como, o además del, gen expresable de interés. Los "genes marcadores" o "ácidos nucleicos marcadores" son ácidos nucleicos que imparten un fenotipo distinto a las células que expresan el gen/ácido nucleico marcador, de esta manera permitiendo que las células transfectadas se distingan de las células que no tienen el marcador.

35 Los "genes marcadores" o los "ácidos nucleicos marcadores" pueden codificar un marcador que se puede seleccionar o bien que se puede cribar, dependiendo de si el marcador confiere un rasgo que se puede "seleccionar" mediante medios químicos, es decir, a través del uso de un agente selectivo (por ejemplo, un antibiótico o similar), o si es simplemente un rasgo que se puede identificar a través de la observación o las pruebas, es decir, "cribando". Por ejemplo, la proteína fluorescente verde o cualquier otra proteína fluorescente, proteínas bioluminiscentes del tipo de luciferasa y similares. En la técnica se conocen muchos ejemplos de genes marcadores adecuados y se pueden emplear en la práctica de las composiciones y/o procedimientos relacionados con la presente invención.

45 Los "genes marcadores" o los "ácidos nucleicos marcadores" también pueden codificar un "marcador secretable", la secreción del cual se puede detectar como un medio de identificación o selección para las células transfectadas. Los ejemplos incluyen marcadores que codifican un antígeno secretable que se puede identificar mediante interacción con anticuerpos, o incluso enzimas secretables que se pueden detectar por su actividad catalítica. Las proteínas secretables se encuentran en una serie de clases, incluyendo proteínas difundibles pequeñas detectables, por ejemplo, mediante ELISA; enzimas activas pequeñas detectables en solución extracelular (por ejemplo, fosfatasa alcalina secretada, luciferasa secretada, α -amilasa secretada derivada de *Bacillus stearothermophilus* (SAMY), derivados de xilanas A derivada de *Bacillus subtilis*) y proteínas unidas a membrana o unidas a membrana de manera transitoria. Se puede usar cualquier marcador seleccionable para poner en práctica la presente invención, y los marcadores seleccionables adecuados para transfecciones de células, incluyendo transfecciones de células de mamífero, se conocen en la técnica. Dichos marcadores pueden incluir, pero no están limitados a: adenosina desaminasa, aminoglucósido fosfotransferasa (en combinación con neomicina), gen de resistencia a bleomicina (en combinación con fleomicina o bleomicina o zeocina), citosina desaminasa (en combinación con N-(fosfonacetil)-L-aspartato, inosina y citosina), dihidrofolato reductasa (DHFR) (en combinación con metotrexato), histidinol deshidrogenasa (en combinación con histidinol), higromicina-B-fosfotransferasa (en combinación con higromicina), timidina cinasa y xantina-guanina fosforribosiltransferasa. Cuando se usa un marcador de adenosina desaminasa, las células que incorporan el gen se pueden seleccionar por crecimiento en presencia de concentraciones bajas del inhibidor de ADA 2'-desoxicoformicina con concentraciones citotóxicas de adenosina o su análogo 9- β -D-xilofuranosil adenina.

Células huésped y células transformadas

65

- Además, en el presente documento se proporcionan células transformadas o transfectadas que comprenden una construcción de ácido nucleico como se proporciona en el presente documento, por ejemplo, un elemento regulador transcripcional de respuesta a la ósmosis (OR-TRE) como se proporciona en el presente documento o un ácido nucleico de respuesta a la ósmosis o de regulación de la ósmosis como se proporciona en el presente documento.
- 5 La célula huésped puede ser cualquiera de las células huésped consabidas para los expertos en la técnica, incluyendo células procarióticas, células eucarióticas, tales como células bacterianas, células fúngicas, células de levadura, células de mamífero, células de insecto o células vegetales. Las células bacterianas ejemplares incluyen cualquier especie en los géneros *Escherichia*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Salmonella*, *Pseudomonas* y *Staphylococcus*, incluyendo, por ejemplo, *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas fluorescens*. Las células fúngicas ejemplares incluyen cualquier especie de *Aspergillus*.
 10 Las células de levadura ejemplares incluyen cualquier especie de *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, o *Schwanniomyces*, incluyendo *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* o *Schizosaccharomyces pombe*. Las células de insecto ejemplares incluyen cualquier especie de *Spodoptera* o *Drosophila*, incluyendo *Drosophila S2* y *Spodoptera Sf9*. Las células animales ejemplares incluyen CHO, COS o melanoma de Bowes o cualquier línea celular humana o de ratón. La selección de un huésped apropiado está en las capacidades de los expertos en la técnica. Las técnicas para transformar una amplia variedad de especies de plantas superiores se conocen y se describen en la literatura técnica y científica. Véase, por ejemplo, Weising (1988) Ann. Rev. Genet. 22:421-477; la USPN 5.750.870.
- 20 Se puede introducir un casete de expresión, vector, virus recombinante, plásmido, fago, fagémido, cromosoma artificial o vehículo de clonación como se proporciona en el presente documento en las células huésped usando cualquiera de una variedad de técnicas, incluyendo transformación, transfección, transducción, infección vírica, cañones de genes o transferencia génica mediada por Ti. Los procedimientos particulares incluyen la transfección con fosfato calcio, la transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección o electroporación (Davis, L., Dibner, M., Battey, 1., Basic Methods in Molecular Biology, (1986)).
- En un aspecto, las construcciones que se proporcionan en el presente documento se introducen en las células para el cribado, de esta manera, los ácidos nucleicos entran en las células de una manera adecuada para la expresión posterior del ácido nucleico. El procedimiento de introducción está dictado en gran medida por el tipo de célula
 30 seleccionada como diana. Los procedimientos ejemplares incluyen precipitación con CaPO₄, fusión de liposomas, lipofección (por ejemplo, LIPOFECTIN™), electroporación, infección vírica, etc. Las construcciones como se proporciona en el presente documento se pueden integrar de manera estable en el genoma de la célula huésped (por ejemplo, con introducción retrovírica) o pueden existir de manera transitoria o bien de manera estable en el citoplasma; por ejemplo, a través del uso de plásmidos tradicionales, utilizando secuencias reguladoras estándar, marcadores de selección, etc.
- 35 Cuando sea apropiado, se pueden cultivar las células huésped genomanipuladas como se proporciona en el presente documento en medios nutritivos convencionales modificados según sea apropiado para activar los promotores, seleccionar los transformantes o amplificar los genes como se proporciona en el presente documento. Tras la transformación de una cepa huésped adecuada y el crecimiento de la cepa huésped a una densidad celular apropiada, se puede inducir el promotor seleccionado mediante medios apropiados (por ejemplo, variación de la temperatura o inducción química) y las células se pueden cultivar durante un período adicional para permitir que produzcan el polipéptido recombinante deseado.
- 40 Las células huésped que contienen las construcciones como se proporciona en el presente documento se pueden cultivar en medios nutritivos convencionales modificados según sea apropiado para activar los promotores, seleccionar los transformantes o amplificar los genes. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, pueden ser las usadas previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión, y serán evidentes para el experto en la técnica.
- 50 Los procedimientos de transfección se conocen por el experto en la técnica, por ejemplo, CaPO₄ y electroporación. Dependiendo de la célula huésped usada, la transformación se realiza usando técnicas estándar apropiadas para dichas células. El tratamiento con calcio que emplea cloruro de calcio, como se describe en Sambrook *et al.*, 1989, *supra*, o electroporación, se usa generalmente para procariotas u otras células que contienen barreras de paredes celulares sustanciales. Para células de mamífero sin dichas paredes celulares, se puede emplear el procedimiento de precipitación con fosfato de calcio de Graham and van der Eb, *Virology*, 52:456-457 (1978). Los aspectos generales de las transformaciones de sistemas de células huésped de mamífero se han descrito en la pat. de EE. UU. n.º 4.399.216. Las transformaciones en levadura se llevan a cabo típicamente de acuerdo con el procedimiento de Van Solingen *et al.*, *J. Bact.*, 130:946 (1977) y Hsiao *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76:3829 (1979). Sin embargo, también se pueden usar otros procedimientos para introducir ADN en células, tales como mediante microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplastos bacterianos con células inalteradas, o policones, por ejemplo, polibreno o poliomitina. Para diversas técnicas para transformar células de mamífero, véanse Keown *et al.*, *Methods in Enzymology*, 185:527-537 (1990) y Mansour *et al.*, *Nature*, 336:348-352 (1988).
- 60 Secuencias de ácido nucleico regulador
- 65

En un modo de realización, en el presente documento se proporcionan ácidos nucleicos de respuesta a la ósmosis y de regulación de la ósmosis que comprenden al menos un ácido nucleico regulador, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico inhibidor, estabilizador o regulador por incremento. En un modo de realización, se usa una secuencia que selecciona como diana un mensaje de genes, por ejemplo, un gen lactogénico o mensaje de genes lactogénicos. En un modo de realización, esa secuencia es inhibidora, por ejemplo, comprende un ARN interferente corto (ARNic), un microARN (miARN), un ARN antisentido y/o un ARN con actividad de ribocima. De esta manera, en modos de realización alternativos, la divulgación relacionada con la invención proporciona el uso de ácidos nucleicos reguladores (inhibidores, estabilizadores o reguladores por incremento), incluyendo ácidos nucleicos que pueden "seleccionar como diana" un gen, un mensaje (ARNm) o proteína para incrementar, potenciar, disminuir o anular la expresión y/o actividad del gen, mensaje (ARNm) o proteína.

En un modo de realización, estos ácidos nucleicos reguladores (por ejemplo, inhibidores) son oligonucleótidos, por ejemplo, que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales, ácidos nucleicos naturales, ácidos nucleicos sintéticos y/o ácidos nucleicos recombinantes. La divulgación relacionada con la invención abarca el uso de estructuras similares a ácidos nucleicos con cadenas principales sintéticas, véase, por ejemplo, Mata (1997) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 144:189-197; Strauss-Soukup (1997) *Biochemistry* 36:8692-8698; Samstag (1996) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 6:153-156. La divulgación relacionada con la invención proporciona el uso de ácidos nucleicos reguladores (inhibidores, estabilizadores o reguladores por incremento), desoxirribonucleótidos (ADN) o ribonucleótidos (ARN), en forma monocatenaria o bien bicatenaria. La divulgación relacionada con la invención proporciona el uso de ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales. La divulgación relacionada con la invención proporciona el uso de oligonucleótidos mixtos reguladores (por ejemplo, inhibidores) que comprenden una porción de ARN que lleva sustituyentes 2'-O-alkilo conjugados con una porción de ADN por medio de un enlace fosfodiéster, véase, por ejemplo, la USPN 5.013.830. La divulgación relacionada con la invención proporciona el uso de estructuras similares a ácidos nucleicos con cadenas principales sintéticas. Los análogos de cadena principal del ADN proporcionados en el presente documento incluyen fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato, fosforamidato, alquilfosfotriéster, sulfamato, 3'-tioacetal, metileno (metilimino), 3'-N-carbamato, morfolincarbamato y ácidos peptidonucleicos (APN); véanse *Oligonucleotides and Analogues, a Practical Approach*, editado por F. Eckstein, IRL Press en Oxford University Press (1991); *Antisense Strategies*, Anales de la Academia de Ciencias de Nueva York, volumen 600, eds. Baserga y Denhardt (NYAS 1992); Milligan (1993) *J. Med. Chem.* 36:1923-1937; *Antisense Research and Applications* (1993, CRC Press). La divulgación relacionada con la invención proporciona el uso de APN que contienen cadenas principales no iónicas, tales como unidades de N-(2-aminoetil)glicina. Se describen, por ejemplo, enlaces fosforotioato mediante las USPN 6.031.092; 6.001.982; 5.684.148; véanse también, los documentos WO 97/03211; WO 96/39154; Mata (1997) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 144:189-197. Otras cadenas principales sintéticas usadas en ácidos nucleicos como se proporciona en el presente documento incluyen enlaces metilfosfonato o enlaces metilfosfonato y fosfodiéster alternos (véase, por ejemplo, la USPN 5.962.674; Strauss-Soukup (1997) *Biochemistry* 36:8692-8698) y enlaces bencilfosfonato (véase, por ejemplo, la USPN 5.532.226; Samstag (1996) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 6:153-156). La divulgación relacionada con la invención proporciona el uso de ácidos nucleicos reguladores (por ejemplo, inhibidores), incluyendo genes, polinucleótidos, ADN, ARN, ADNc, ARNm, cebadores de oligonucleótidos, sondas y productos de amplificación.

Se pueden introducir los ácidos nucleicos como se proporciona en el presente documento en células eucarióticas (por ejemplo, de mamífero) con el propósito de expresar transcritos de ARN que funcionan para afectar a los patrones de expresión del gen que aún no está traducido en proteína. Los ácidos nucleicos reguladores (por ejemplo, inhibidores) ejemplares usados para poner en práctica las composiciones y/o procedimientos relacionados con la presente invención incluyen ARN interferentes cortos (ARNic) y microARN (miARN), ARN antisentido y ARN con actividad de ribocima: estos pueden funcionar para reducir o eliminar expresión de genes de células naturales (endógenos) o introducidos (heterógenos), por ejemplo, genes de mamífero.

Se pueden construir o aislar los genes y ácidos nucleicos usados para poner en práctica las composiciones y/o procedimientos relacionados con la presente invención, que, cuando se transcriben, producen ARN regulador (por ejemplo, sentido o antisentido) o ARN bicatenario que es complementario a todo o parte(s) de un ARN mensajero seleccionado como diana. El ARN bicatenario o ARNc o miARN o regulador (por ejemplo, antisentido o sentido) reduce la producción del producto de polipéptidos del ARN mensajero. El producto de polipéptidos puede ser cualquier proteína codificada por el genoma de la célula de mamífero.

Los genes y ácidos nucleicos usados para poner en práctica las composiciones y/o procedimientos relacionados con la presente invención también se pueden construir o aislar, que cuando se transcriben producen enzimas de ARN, o ribocimas, que pueden actuar como endorribonucleasas y catalizar la escisión de moléculas de ARN con secuencias seleccionadas.

La escisión de los ARN mensajeros seleccionados puede dar como resultado la producción reducida de sus productos de polipéptidos codificados. Estos ácidos nucleicos reguladores (por ejemplo, inhibidores) se pueden usar para preparar líneas celulares de mamífero novedosas; estas líneas celulares de mamífero pueden expresar niveles reducidos de polipéptidos, incluyendo, pero no limitados a los polipéptidos citados en el presente documento que se pueden ver afectados por ARN antisentido o interferente.

Se pueden determinar las longitudes y concentraciones óptimas de ácidos nucleicos reguladores (por ejemplo, inhibidores o reguladores por incremento) usados en cualquier modo de realización particular, por ejemplo, en un biorreactor, un implante, en un cultivo celular, expresados como una proteína recombinante, y similar, usando procedimientos y sistemas de cribado rutinarios. Las estrategias para diseñar longitudes y concentraciones óptimas se describen bien en la literatura científica y de patente y el experto en la técnica puede diseñar ácidos nucleicos reguladores (por ejemplo, inhibidores o reguladores por incremento), por ejemplo, oligonucleótidos, usando los reactivos novedosos como se proporciona en el presente documento usando procedimientos y sistemas de cribado rutinarios.

10 *Oligonucleótidos antisentido*

En el presente documento se proporcionan oligonucleótidos antisentido que comprenden al menos una secuencia que selecciona como diana un mensaje de genes, por ejemplo, una secuencia que selecciona como diana un gen lactogénico o mensaje de genes lactogénicos. Las estrategias para diseñar oligonucleótidos antisentido se describen bien en la literatura científica y de patente, y el experto en la técnica puede diseñar oligonucleótidos que codifican proteínas (por ejemplo, que codifican proteínas lactogénicas) usando los reactivos novedosos como se proporciona en el presente documento. Por ejemplo, los protocolos de paseo genético/cartografía de ARN para cribar para determinar oligonucleótidos antisentido eficaces se conocen bien en la técnica, véase, por ejemplo, Ho (2000) *Methods Enzymol.* 314:168-183, que describe un ensayo de cartografía de ARN, que se basa en técnicas moleculares estándar para proporcionar un procedimiento fácil y fiable para la selección de secuencias antisentido potentes. Véase también Smith (2000) *Eur. J. Pharm. Sci.* 11:191-198.

En un modo de realización, se usan los ácidos nucleicos naturales como oligonucleótidos de ácidos nucleicos reguladores (por ejemplo, inhibidores o reguladores por incremento). Los oligonucleótidos antisentido pueden ser de cualquier longitud; por ejemplo, en aspectos alternativos, los oligonucleótidos antisentido son de entre aproximadamente 5 a 100, aproximadamente 10 a 80, aproximadamente 15 a 60, aproximadamente 18 a 40. La longitud óptima se puede determinar mediante un cribado rutinario. Los oligonucleótidos antisentido pueden estar presentes en cualquier concentración. La concentración óptima se puede determinar mediante un cribado rutinario. Se conoce una amplia variedad de análogos de nucleótidos y ácidos nucleicos sintéticos y no naturales que pueden abordar este problema potencial. Por ejemplo, se pueden usar ácidos peptidonucleicos (APN) que contengan cadenas principales no iónicas, tales como unidades de N-(2-aminoetil)glicina. También se pueden usar oligonucleótidos antisentido que tengan enlaces fosforotioato, como se describe en el documento WO 97/03211; el documento WO 96/39154; Mata (1997) *Toxicol Appl Pharmacol* 144:189-197; *Antisense Therapeutics*, ed. Agrawal (Humana Press, Totowa, N.J., 1996). Los oligonucleótidos antisentido que tienen análogos de cadena principal de ADN sintético proporcionados en el presente documento también pueden incluir ácidos nucleicos con fosforoditioato, metilfosfonato, fosforamidato, alquilfosfotriéster, sulfamato, 3'-tioacetil, metileno(metilimino), 3'-N-carbamato y morfolincarbamato, como se describe anteriormente.

Se puede usar la metodología de la química combinatoria para crear un gran número de oligonucleótidos que se pueden cribar rápidamente para determinar oligonucleótidos específicos que tengan especificidades y afinidades de unión apropiadas hacia cualquier diana, tal como las secuencias de xilanas, mananas y/o glucanas sentido y antisentido como se proporciona en el presente documento (véase, por ejemplo, Gold (1995) *J. of Biol. Chem.* 270:13581-13584).

45 *Ribocimas reguladoras*

En el presente documento se proporcionan ribocimas que pueden un transcrita (un mensaje), por ejemplo, que se puedan unir a un mensaje que codifica proteínas lactogénicas. En un modo de realización, estas ribocimas pueden regular (por ejemplo, inhibir) la actividad de proteína, por ejemplo, la actividad de proteína lactogénica, por ejemplo, seleccionando como diana ARNm. Las estrategias para diseñar ribocimas y seleccionar la secuencia antisentido específica de proteína lactogénica para la selección de una diana se describen bien en la literatura científica y de patente, y el experto en la técnica puede diseñar dichas ribocimas usando los reactivos novedosos como se proporciona en el presente documento. Las ribocimas actúan uniéndose a un ARN diana a través de la porción de unión a ARN diana de una ribocima que se mantiene en proximidad cercana con respecto a una porción enzimática del ARN que escinde el ARN diana. De esta manera, la ribocima reconoce y se une a un ARN diana a través del apareamiento de bases complementarias, y, una vez unida al sitio correcto, actúa enzimáticamente para escindir e inactivar el ARN diana. La escisión de un ARN diana de tal manera destruirá su capacidad para dirigir la síntesis de una proteína codificada si la escisión se produce en la secuencia codificante. Después de que una ribocima se haya unido a y haya escindido su diana de ARN, se puede liberar de ese ARN para unirse a y escindir nuevas dianas repetidamente.

En algunas circunstancias, la naturaleza enzimática de una ribocima puede ser ventajosa con respecto a otras tecnologías, tales como la tecnología antisentido (donde una molécula de ácido nucleico simplemente se une a una diana de ácido nucleico para bloquear su transcripción, traducción o asociación con otra molécula), puesto que la concentración eficaz de ribocima necesaria para efectuar un tratamiento terapéutico puede ser más baja que la de un oligonucleótido antisentido. Esta ventaja potencial refleja la capacidad de la ribocima para actuar

enzimáticamente. De esta manera, una única molécula de ribocima puede escindir muchas moléculas de ARN diana. Además, una ribocima es típicamente un inhibidor altamente específico, dependiendo la especificidad de la inhibición no solo del mecanismo de unión del apareamiento de bases, sino también del mecanismo mediante el cual la molécula inhibe la expresión del ARN al que se une. Es decir, la inhibición está provocada por la escisión de la diana de ARN y así la especificidad se define como la proporción de la tasa de escisión del ARN seleccionado como diana con respecto a la tasa de escisión del ARN no seleccionado como diana. Este mecanismo de escisión depende de factores adicionales a los implicados en el apareamiento de bases. De esta manera, la especificidad de acción de una ribocima puede ser mayor que la del oligonucleótido antisentido que se une al mismo sitio de ARN.

Una ribocima usada para poner en práctica las composiciones y/o procedimientos relacionados con la invención puede ser una molécula de ARN de ribocima enzimática, que se puede formar en un motivo cabeza de martillo, un motivo horquilla, como un motivo del virus de la hepatitis delta, un motivo de intrón del grupo I y/o un ARN similar a RNasaP en asociación con una secuencia guía de ARN. Los ejemplos de motivos cabeza de martillo se describen, por ejemplo, por Rossi (1992) *Aids Research and Human Retroviruses* 8:183; los motivos horquilla por Hampel (1989) *Biochemistry* 28:4929, y Hampel (1990) *Nuc. Acids Res.* 18:299; el motivo del virus de la hepatitis delta por Perrotta (1992) *Biochemistry* 31:16; el motivo RNasaP por Guerrier-Takada (1983) *Cell* 35:849; y el intrón del grupo I por Cech, pat. de EE. UU. n.º 4.987.071. La enumeración de estos motivos específicos no pretende ser limitante.

Interferencia por el ARN (ARNi)

En un aspecto, en el presente documento se proporcionan moléculas reguladoras de ARN (por ejemplo, inhibidor, estabilizador o regulador por incremento), por ejemplo, una molécula de "ARNi", para seleccionar como diana secuencias que codifican proteínas, tales como secuencias que codifican proteínas lactogénicas. La molécula de ARNi puede comprender una molécula de ARN bicatenario (ARNbc), por ejemplo, moléculas de ARNic, miARN y/o ARN horquillado corto (ARNhc). La molécula de ARNi, por ejemplo, ARNip (ARN inhibidor pequeño) puede inhibir la expresión de un gen que codifica proteínas (por ejemplo, un gen que codifica proteínas lactogénicas) y/o miARN (microARN) para inhibir la traducción de un mensaje de proteínas (por ejemplo, un mensaje de proteínas lactogénicas). En un aspecto, la molécula de ARNi, por ejemplo, ARNic y/o miARN, es de aproximadamente 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o más nucleótidos dúplex de longitud.

Aunque la divulgación relacionada con la invención no está limitada por ningún mecanismo de acción particular, el ARNi puede entrar en una célula y provocar la degradación de un ARN monocatenario (ARNmc) de secuencias similares o idénticas, incluyendo ARNm endógenos. Cuando una célula se expone a ARN bicatenario (ARNbc), el ARNm del gen homólogo se degrada selectivamente mediante un proceso llamado interferencia por el ARN (ARNi). Un posible mecanismo básico detrás del ARNi es la ruptura de un ARN bicatenario (ARNbc) que coincide con una secuencia específica del gen en tramos cortos llamados ARN interferente corto, que desencadenan la degradación del ARNm que coincide con su secuencia. En un aspecto, se usan los ARNi como se proporciona en el presente documento en agentes terapéuticos silenciadores de genes, véase, por ejemplo, Shuey (2002) *Drug Discov. Today* 7:1040-1046. En un aspecto, en el presente documento se proporcionan procedimientos para degradar selectivamente el ARN usando las moléculas de ARNi, por ejemplo, ARNic y/o miARN, como se proporciona en el presente documento. El procedimiento se puede poner en práctica *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. En un aspecto, se pueden usar las moléculas de ARNi como se proporciona en el presente documento para generar una mutación con pérdida de función en una célula, un órgano o un animal.

Los procedimientos para preparar y usar ácidos nucleicos reguladores, por ejemplo, moléculas de ARNi, ARNic y/o miARN, para regular la expresión del ARN, por ejemplo, para degradar selectivamente el ARN, se conocen bien en la técnica, véanse, por ejemplo, las USPN 6.506.559; 6.511.824; 6.515.109; 6.489.127.

Animales transgénicos no humanos

En el presente documento se proporcionan animales transgénicos no humanos que comprenden un elemento regulador transcripcional de respuesta a la ósmosis (OR-TRE) como se proporciona en el presente documento, por ejemplo, para estudiar la osmorregulación en el animal no humano. Los animales transgénicos no humanos se pueden diseñar y generar usando cualquier procedimiento conocido en la técnica; véanse, por ejemplo, las USPN 6.211.428; 6.187.992; 6.156.952; 6.118.044; 6.111.166; 6.107.541; 5.959.171; 5.922.854; 5.892.070; 5.880.327; 5.891.698; 5.639.940; 5.573.933; 5.387.742; 5.087.571, que describen la preparación y el uso de células y huevos transformados y ratones, ratas, conejos, ovejas, cerdos, pollos, cabras, peces y vacas transgénicos. Véase también, por ejemplo, Pollock (1999) *J. Immunol. Methods* 231:147-157, que describe la producción de proteínas recombinantes en la leche de animales transgénicos productores de leche; Baguisi (1999) *Nat. Biotechnol.* 17:456-461, que demuestra la producción de cabras transgénicas.

Cultivo celular, implantes y biorreactores

En modos de realización alternativos, se pueden usar las composiciones y procedimientos como se proporciona en el presente documento para promover la salud y la viabilidad de una célula en cualquier implante, órgano artificial o sistema de cultivo, por ejemplo, en biorreactores, implantes, órganos artificiales o placas de cultivo celular simples,

frascos, placas, tubos o matraces. Las composiciones y procedimientos se usan para promover la salud y la viabilidad de las células en condiciones de cultivo, por ejemplo, cuando las células se diseñan para producir un producto, por ejemplo, un producto de proteínas recombinantes o de polisacáridos, o un producto vírico (por ejemplo, partícula de virión) en el caso de una "línea celular productora" (véanse, por ejemplo, las USPN 5.837.484, 6.566.118), o una molécula orgánica, tal como un policétido, entonces debido a que las células son más sanas y más viables debido a la incorporación de una composición como se proporciona en el presente documento (por ejemplo, un casete de expresión, vector, virus recombinante, plásmido, fago, fagémido, cromosoma artificial o vehículo de clonación como se proporciona en el presente documento, o cualquier ácido nucleico quimérico que comprenda un elemento regulador transcripcional de respuesta a la ósmosis (OR-TRE) como se proporciona en el presente documento), se prepara más de este producto deseado.

También se pueden usar las composiciones y procedimientos como se proporciona en el presente documento para aumentar la producción de moléculas, por ejemplo, proteínas recombinantes, por células en un sistema de cultivo, por ejemplo, un biorreactor, un implante y similares. En un aspecto, las composiciones y procedimientos como se proporciona en el presente documento se usan para mantener o incrementar la producción de proteína plegada apropiadamente o plegada preferentemente (por ejemplo, un plegamiento natural) y/o glucosilada en condiciones de condiciones osmóticas inferiores a las óptimas (inferiores a las condiciones osmóticas óptimas para una célula o sistema de cultivo particular), por ejemplo, en condiciones de hiperosmolaridad y/o hipoosmolaridad, tales como las que se observan en las condiciones de cultivo celular en fase tardía o densos. De esta manera, en un modo de realización, se usan las composiciones y procedimientos como se proporciona en el presente documento para mantener o incrementar la calidad del producto (por ejemplo, proteínas recombinantes) producido en una célula, por ejemplo, un sistema de cultivo celular, particularmente en condiciones de estrés osmótico, tales como las que se observan en las condiciones de cultivo celular en fase tardía o densos.

Las composiciones y procedimientos como se proporciona en el presente documento se pueden poner en práctica con cualquier sistema de cultivo conocido en la técnica, véanse, por ejemplo, las USPN 5.705.364; 5.721.121; 5.976.833; 6.180.401; 6.410.270; 6.716.602; 7.294.484; 7.294.481; y las pub. de sol de pat. n.^{os} 20030096414; 20050272124 (que describen cultivos celulares por lotes alimentados); 20060160180; 20070254358; 20070231901 (que describen un sistema de cultivo celular microfluídico); 20070184529 (que describe la manipulación del entorno de cultivo celular para la glucosilación); 20070161106.

Por ejemplo, en un modo de realización se usa un "cultivo celular por lotes alimentados", por ejemplo, un cultivo por lotes donde las células y el medio de cultivo se suministran inicialmente a un recipiente de cultivo y se alimentan nutrientes de cultivo adicionales, continuamente o en incrementos discretos, al cultivo durante el cultivo, con o sin obtención periódica de células y/o productos antes de la finalización del cultivo. Los sistemas de cultivo por lotes alimentados usados para poner en práctica las composiciones y/o procedimientos relacionados con la presente invención pueden ser "cultivos por lotes alimentados semicontínuos", por ejemplo, donde los cultivos enteros, incluyendo células y medio, periódicamente se retiran y reemplazan por medio recién preparado. También se puede usar el "cultivo por lotes" simple, por ejemplo, donde todos los componentes para el cultivo celular, incluyendo células y todos los nutrientes de cultivo, se suministran a un recipiente de cultivo al inicio del procedimiento de cultivo para poner en práctica las composiciones y/o procedimientos relacionados con la presente invención. También se puede usar el cultivo por perfusión para poner en práctica las composiciones y/o procedimientos relacionados con la presente invención, por ejemplo, donde un sobrenadante no se retira del recipiente de cultivo durante un procedimiento de crecimiento de cultivo de fabricación; se pueden restringir las células en el cultivo, por ejemplo, mediante filtración, encapsulación, anclaje a microexcipientes, etc. y el medio de cultivo se introduce continua o intermitentemente y se retira del recipiente de cultivo.

Las células como se proporciona en el presente documento (incluyendo cualquier célula que comprenda un casete de expresión, vector, virus recombinante, plásmido, fago, fagémido, cromosoma artificial o vehículo de clonación como se proporciona en el presente documento, o cualquier ácido nucleico quimérico que comprenda un elemento regulador transcripcional de respuesta a la ósmosis (OR-TRE) como se proporciona en el presente documento) se pueden usar en cualquier sistema de cultivo celular, incluyendo cualquier biorreactor, placa de cultivo celular, tubos o matraz. Además, se proporcionan sistemas de biorreactor, sistemas de cultivo celular, placas, tubos y matraces que comprenden células.

Por ejemplo, en la práctica de las composiciones y/o procedimientos relacionados con la presente invención, una fase de crecimiento celular puede estar seguida de una fase de producción de polipéptidos, que es distinta de la misma. En un modo de realización, se lleva a cabo una fase de producción en un recipiente de cultivo diferente de la fase de crecimiento celular.

De manera alternativa, se puede emplear el mismo recipiente para cada etapa. Por ejemplo, el medio de cultivo de la fase de crecimiento se puede suministrar con medio que contiene osmolalidad alta y bajo contenido de glucosa para la producción. De manera alternativa, se pueden usar intercambiadores de medio que usan dispositivos de separación de fluidos celulares disponibles en la técnica (por ejemplo, filtración de flujo transversal, cribas giratorias o microexcipientes de lecho fluidizado) para posibilitar que se use el mismo recipiente.

5 En un modo de realización, la fase de producción implica inocular las células animales cultivadas de la fase de crecimiento a una densidad de siembra celular de al menos aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células/ml, o al menos aproximadamente $3,0 \times 10^6$ células/ml o entre aproximadamente 1 y 10×10^6 células/ml. En un modo de realización, las células animales se cultivan a una osmolalidad inicial de aproximadamente 400 a 600 mOsm, o entre aproximadamente 400 a 500 mOsm, en un recipiente de cultivo, por ejemplo, tal como el ejemplificado para la fase de crecimiento.

10 En un modo de realización, para conseguir un medio de cultivo que tenga la osmolalidad especificada, se puede usar un medio de cultivo PS-04™, DIESEF™ o SUPER CELL™, o medios similares, y se puede incrementar la osmolalidad del medio de cultivo por medio de la adición de la concentración de referencia de glucosa y una sal (tal como NaCl, por ejemplo). Este tipo de medio de cultivo contiene un exceso de aminoácidos a fin de proporcionar nutrientes celulares adicionales y conseguir una osmolalidad inicial alta. Sin embargo, como será fácilmente evidente para el experto en la técnica, se puede(n) ajustar la(s) concentración/concentraciones de otros constituyentes en el medio de cultivo a fin de conseguir la osmolalidad deseada.

15 En un modo de realización, la osmolalidad se mantiene sustancialmente en el intervalo deseable durante el cultivo. Controlar el suministro de glucosa al medio de cultivo celular ayuda a prevenir incrementos excesivos de la osmolalidad sustancialmente por encima de la óptima deseable.

20 En un modo de realización, la fase de producción se lleva a cabo en presencia de una concentración de glucosa controlada durante el cultivo para que esté en un intervalo entre aproximadamente 0,01 y 1 g/l, preferentemente 0,02-0,5 g/l y más preferentemente 0,05-0,2 g/l. A fin de comprobar y controlar la concentración de glucosa del medio de cultivo en el intervalo especificado, son útiles FIA u otros sistemas de control automatizados en línea.

25 En un modo de realización, también se controla la concentración de glutamina durante el cultivo para que esté en un intervalo de 0,2 a 2 mM, más preferentemente de 0,5 a 1 mM. Se puede conseguir el control de la concentración de glutamina usando un sistema de FIA similar al analizado anteriormente, por ejemplo.

30 En un modo de realización, las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH, dO_2 y similares, son las usadas previamente con la célula huésped seleccionada para la producción de proteínas, y serán evidentes para el experto en la técnica. Por ejemplo, se puede ajustar el pH a un intervalo de entre 6,5 y 7,5 y la temperatura para la producción puede estar entre 30 °C y 38 °C.

35 En un modo de realización, se puede reducir el ciclo de producción desde el tiempo normal de aproximadamente 10 a 15 días o más para proteínas recombinantes a aproximadamente 9 días o menos, o 7 días o menos. En determinados modos de realización (por ejemplo, cuando el polipéptido de interés es DNasa), la fase de producción se finaliza antes de que se obtenga la concentración de polipéptido máxima. Esto es ventajoso puesto que la composición de DNasa resultante tiene un porcentaje de desamidación reducido en comparación con la DNasa producida en series más largas. Tras la fase de producción de polipéptidos, el polipéptido de interés se puede recuperar del medio de cultivo usando técnicas que están bien establecidas en la técnica.

Biorreactores, implantes y órganos artificiales

45 Además, se proporcionan implantes y órganos artificiales, sistemas de biorreactor, sistemas de cultivo celular, placas, tubos, frascos y matraces que comprenden células como se proporciona en el presente documento. Se puede usar cualquier implante, órgano artificial, sistemas de biorreactor, sistema de cultivo celular, placa de cultivo celular, placa (por ejemplo, placa de Petri), tubo de cultivo celular y/o matraz de cultivo celular (por ejemplo, un frasco rodante) para poner en práctica las composiciones y/o procedimientos relacionados con la presente invención.

50 Por ejemplo, un biorreactor como se proporciona en el presente documento, o un biorreactor usado para poner en práctica los procedimientos como se proporciona en el presente documento, puede ser un dispositivo de biorreactor implantable como se describe, por ejemplo, en la pub. de sol. de pat. de EE. UU. n.º 20080112995; o un dispositivo de biorreactor como se describe, por ejemplo, en las pub. de sol. de pat. de EE. UU. n.ºs 20080057571; 20080044890; 20080044850; 20080038816; 20080032396; 20080032389; 20080032380; 20080014629; 55 20080014215; y/o 20080003669, y/o en las pat. de EE. UU. n.ºs (USPN) 7.378.023; 7.371.567, que describen biorreactores para órganos bioartificiales; 7.351.584; que describe biorreactores para hepatocitos de mamífero; 7.348.175, que describe un biorreactor controlado y equipado mediante microprocesador; 7.300.584, que describe un dispositivo para el tratamiento biológico de una suspensión en un biorreactor; 7.290.669, que describe un biorreactor de flujo ascendente; 7.264.962, que describe un reactor enzimático de tres fases; 7.229.808, que describe un biorreactor que usa material biológico inmovilizado viable; 7.198.941, que describe un aparato de biorreactor de recipiente poroso; 7.198.940, que describe un aparato de biorreactor y un sistema de cultivo celular para el cultivo y procesamiento automatizados de células vivas; 7.156.985, que describe un sistema de biorreactor que tiene control de temperatura mejorado; para describir solo algunos biorreactores y sistemas de cultivo celular 60 ejemplares que se pueden usar para poner en práctica las composiciones y/o procedimientos relacionados con la presente invención.

En modos de realización alternativos, en el presente documento se proporcionan implantes, por ejemplo, implantes médicos (por ejemplo, células que secretan insulina o una citocina u hormona), o endoprótesis vasculares, implantes ortopédicos, oculares o dentales que comprenden una célula como se proporciona en el presente documento. Por ejemplo, los implantes y órganos artificiales (por ejemplo, piel, hígado, páncreas o dientes artificiales o de implante), sistemas de biorreactor, sistemas de cultivo celular, placas, tubos y matraces pueden comprender células madre, células pluripotentes, células indiferenciadas, células de plexo coroideo, células de Schwann, células retinianas, neuronas, células óseas, células hepáticas, hepatocitos, células endoteliales, adipocitos, células fibroblásticas, células de Kupffer, células renales, células de vasos sanguíneos, células de la piel, células periodontales, odontoblastos, dentinoblastos, cementoblastos, ameloblastos, tejido ectomesenquimatoso odontógeno, osteoblastos, osteoclastos, fibroblastos y otras células y tejidos implicados en la odontogénesis o formación ósea y/o células madre, y otras células de órganos de ser humano o animal, o las células son células madre embrionarias o adultas, o una combinación de los mismas.

Se puede usar cualquier biorreactor, implante, endoprótesis vascular, órgano artificial o dispositivo similar que comprenda una célula como se proporciona en el presente documento para preparar o usar las composiciones o procedimientos como se proporciona en el presente documento; por ejemplo, implantes como se describe en las USPN 7.388.042; 7.381.418; 7.379.765; 7.361.332; 7.351.423; 6.886.568; 5.965.125; 5.270.192; y las pub. de sol de pat. n.^{os} 20040127987; 20080119909 (que describen implantes auriculares); 20080118549 (que describe implantes oculares); 20080020015 (que describe un apósito bioactivo para heridas); 20070254005 (que describe bioprótesis para válvulas cardíacas, injertos vasculares, implantes de menisco); 20070059335; 20060128015 (que describen implantes hepáticos).

Potenciadores transcripcionales de respuesta a la ósmosis y sus proteínas de unión

En el presente documento se proporciona al menos un elemento regulador transcripcional de respuesta a la ósmosis (OR-TRE) que comprende al menos una secuencia de potenciador transcripcional de respuesta a TonEBP o de respuesta a NFATc enlazada funcionalmente a una secuencia reguladora transcripcional, por ejemplo, enlazada funcionalmente al promotor, tal como un promotor mínimo, un promotor constitutivo o un promotor inducible y similares. Las secuencias de potenciador transcripcional de respuesta a TonEBP y de respuesta a NFATc, y las proteínas TonEBP y NFATc que se unen a ellas, se conocen bien en la técnica.

Por ejemplo, una secuencia de potenciador transcripcional de respuesta a TonEBP puede comprender la secuencia: 5'-(T/A/C)GGAA(A/T)NN(T/A/C)N(T/A/C)-3' (SEQ ID NO: 1); y se describen las secuencias de potenciador transcripcional de respuesta a TonEBP, por ejemplo, véase Daoudal (1997) J. Biol. Chem. 272(5):2615-2619; Ferraris (1999) Am. J. Physiol. 276(3 Pt 1), y otras descritas a continuación. Los sitios de unión a TonEBP activos ejemplares que se pueden usar para poner en práctica las composiciones y/o procedimientos relacionados con la presente invención incluyen los que se encuentran en la **tabla 1**:

Tabla 1

Origen	Secuencia	Referencia
BGT1 canino	5' TGGAAAAGTCC 3'	10
Aldosa reductasa humana A	5' TGGAAAAATAT 3'	5
Aldosa reductasa humana B	5' TGGAAAAATTT 3'	5
Aldosa reductasa humana C	5' TGGAAAATCAC 3'	5
Aldosa reductasa de conejo	5' CGGAAAATCAC 3'	3
Aldosa reductasa de ratón y rata	5' CGGAAAATCAC 3'	1
Sitios de unión a TonEBP humana	5' TGGAAAATTAC 3'	8
Sitios de unión a TonEBP humana modificados 6	5' TGGAATATTAC 3'	8
Sitios de unión a TonEBP humana modificados 7	5' TGGAAATTTAC 3'	8
Sitios de unión a TonEBP de conejo modificados 1	5' AGGAAAATCAC 3'	2
Sitios de unión a TonEBP de conejo modificados 2	5' CGGAAAAAACC 3'	2
Sitios de unión a TonEBP de conejo modificados 3	5' CGGAAAATACC 3'	2
Sitios de unión a TonEBP de conejo modificados 4	5' CGGAAAATCCC 3'	2
TonEA para sodio/mioinositol humano	5' TGGAAAACACTAC 3'	9
TonEB1 para sodio/mioinositol humano	5' ATAGAATTCCA 3' (antisentido: 5' TGGAAATCTAT 3')	9
TonEB2/3 para sodio/mioinositol humano	5' TGGAAAATTCCA 3'	9
TonEC1 para sodio/mioinositol humano	5' TGGAAAATTAC 3'	9
TonEC2 para sodio/mioinositol humano	5' TGGAAAGTTAC 3'	9
TonEp para sodio/mioinositol humano	5' TGGAAAGTCC 3'	9

TonEA para HSP70 de ratón	5' TGGAAAGTTTT 3'	11
TonEB para HSP70 de ratón	5' TGGAAAATTTT 3'	11
TonEC para HSP70 de ratón	5' TGGAAATCTCC 3'	11
TonED para HSP70 de ratón	5' TGGAAAAACAC 3'	11
Gen del transportador de urea A de ratón	5' GGAGTTTTCCA 3' (antisentido: 5' TGGAAAACCTCC 3')	4

1. Daoudal S, Toumaire C, Halere A, Veyssi re G, Jean C. Isolation of the mouse aldose reductase promoter and identification of a tonicity-responsive element. *J. Biol Chem.* 1997 Jan 31; 272(5):2615-9.
- 5 2. Ferraris JD, Williams CK, Ohtaka A, García-Pérez A. Functional consensus for mammalian osmotic response elements. *Am J Physiol.* 1999 Mar; 276(3 Pt 1).
3. Ferraris JD, Williams CK, Jung KY, Bedford JJ, Burg MB, García-Pérez A. ORE, a eukaryotic minimal essential osmotic response element. The aldose reductase gene in hyperosmotic stress. *J Biol Chem.* 1996 Aug 2; 10 271(31):18318-21.
4. Fenton RA, Cottingham CA, Stewart GS, Howorth A, Hewitt JA, Smith CP. Structure and characterization of the mouse UT-A gene (Slc14a2). *Am J Physiol. Renal Physiol.* 2002 Apr; 282(4):F630.
- 15 5. Ko BC, Ruepp B, Bohren KM, Gabbay KH, Chung SS. Identification and characterization of multiple osmotic response sequences in the human aldose reductase gene. *J Biol Chem.* 1997 Jun 27; 272(26):16431-7.
6. Lopez-Rodríguez C, Aramburu J, Rakeman AS, Rao A: NFAT5, a constitutively nuclear NFAT protein that does not cooperate with Fos and Jun. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96:7214-7219.
- 20 7. Lopez-Rodríguez C, Aramburu J, Jin L, Rakeman AS, Michino M, Rao A: Bridging the NFAT and NF-kappaB families: NFAT5 dimerization regulates cytokine gene transcription in response to osmotic stress. *Immunity* 2001, 15:47-58.
- 25 8. Miyakawa H, Woo SK, Chen CP, Dahl SC, Handler JS, Kwon HM. Cis- and trans-acting factors regulating transcription of the BGT1 gene in response to hypertonicity. *Am J Physiol.* 1998 Apr; 27 4(4 Pt 2):F753-61.
9. Rim JS, Atta MG, Dahl SC, Berry GT, Handler JS, Kwon HM. Transcription of the sodium/myo-inositol cotransporter gene is regulated by multiple responsive enhancers spread over 50 kilobase pairs in the 5'-flanking region. *J. Biol Chem.* 1998 Aug 7; 273(32):20615-21.
- 30 10. Stroud JC, Lopez-Rodríguez C, Rao A, Chen L: Structure of a TonEBP-DNA complex reveals DNA encircled by a transcription factor. *Nat Struct Biol* 2002, 9:90-94.
- 35 11. Woo SK, Lee SD, Na KY, Park WK, Kwon HM. TonEBP/NFAT5 stimulates transcription of HSP70 in response to hypertonicity. *Mol Cell Biol.* 2002 Aug; 22(16):5753-60.

Aumento del fenotipo de protección frente a la  smosis

40 En un aspecto, las composiciones y/o procedimientos como se proporciona en el presente documento también expresan las proteínas que se unen a los potenciadores transcripcionales de respuesta a la ósmosis, por ejemplo, las composiciones (construcciones) como se proporciona en el presente documento comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una proteína que se une a un potenciador transcripcional de respuesta a la ósmosis usada en una construcción como se proporciona en el presente documento. Este modo de realización 45 alternativo es particularmente útil en aspectos en relación con la invención donde se usan las construcciones y/o procedimientos como se proporciona en el presente documento como sistemas de expresión de ácidos nucleicos y/o polipéptidos inducibles; donde las construcciones como se proporciona en el presente documento pueden suministrar (fabricar) por sí mismas, de manera constitutiva o bien de manera inducible (por ejemplo, con respuesta a la ósmosis), proteínas adicionales o nuevas que se unen a los potenciadores transcripcionales de respuesta a la ósmosis para "aumentar" la activación de la transcripción de las secuencias de potenciador transcripcional de 50 respuesta a la ósmosis presentes en una construcción como se proporciona en el presente documento.

En otro modo de realización, las proteínas adicionales o nuevas que se unen a los potenciadores transcripcionales de respuesta a la ósmosis para "aumentar" la activación de la transcripción de las secuencias de potenciador 55 transcripcional de respuesta a la ósmosis están presentes en construcciones separadas distintas de un elemento regulador transcripcional de respuesta a la  smosis (OR-TRE) como se proporciona en el presente documento.

Por ejemplo, un procedimiento ejemplar como se proporciona en el presente documento comprende el uso de tanto una construcción que comprende OR-TRE como se proporciona en el presente documento como de otra

construcción de expresión (por ejemplo, un vector de expresión) para generar secuencias de unión al potenciador transcripcional de respuesta a la ósmosis nuevas o adicionales.

5 Por ejemplo, una construcción como se proporciona en el presente documento puede codificar una proteína de unión al potenciador de respuesta a la tonicidad, o "proteína de unión a TonE", o "TonEBP", que tiene la secuencia: 1

```

MPSDFISLLS ADLDLESPPS LYSRESVYDL LPKELQLPPS RETSVASMSQ TSGGEAGSPP
61 PAVVAADASS APSSSSMGGA CSSFTTSSSP TIYSTSVTDS KAMQVESCSS AVGVSNRQVS
121 EKQLTSNTVQ QHPSTPKRHT VLYISPPPED LLDNSRMSCQ DEGCGLSESEQ SCSMMMEDSP
181 SNFNSMSTSS YNDNTEVPRK SRKRNPQRP GVKRRDCEES NMDIFDADSA KAPHYVLSQL
241 TTDNKGNSKA GNGTLENQKG TGVKKSPMLC GQYPVKSEK ELKIVVQPET QHRARYLTEG
301 SRGSVKDRTO QGFPTVKLEG HNEPVVLQVF VGNDSGRVKP HGFYQACRVT GRNTTPCKEV
361 DIEGTTVIEV GLDPSNNMTL AVDCVGILKL RNADVEARIG IAGSKKKSTR ARLVFRVNM
421 RKDGSTLTQ TPSSPILCTQ PAGVPEILKK SLHSCSVKGE EEVFLIGKNF LKGTKVIFQE
481 NVSDENSWKS EAEIDMELFH QNHLIVKVPP YHDQHITLPV SVGIYVVTNA GRSHDVQPFT
541 YTPDPAAAGA LNVNVKKEIS SPARPCSFEE AMKAMKTTC NLDKVNIIPN ALMTPLIPSS
601 MIKSEDVTPM EVTAEKRSST IFKTKSVGS TQQTLENISN IAGNGSFSSP SSSHLPSENE
661 KQQQIQPKAY NPETLTTIQT QDISQPGTFP AVSASSQLPN SDALLQQATQ FQTRETQSRE
721 ILQSDGTVVN LSQLTEASQQ QQQSPLQEQ QTLQQQISSN IFPSPNSVSQ LQNTIQQLQA
781 GSFTGSTASG SSGSVDLVQQ VLEAQQQLSS VLFSAPDGNE NVQEQLSADI FQQVSIQSG
841 VSPGMFSSTE PTVHTRPDNL LPGRAESVHP QSENTLSNQQ QQQQQQQQVM ESSAAMVMEM
901 QQSICQAAAQ IQSELFPSTA SANGNLQQSP VYQQTSHMMS ALSTNEDMQM QCELFSSPPA
961 VSGNETSTTT TQQVATPGTT MFQTSSSGDG EETGTQAKQI QNSVFQTMVQ MQHSGDNQPQ
1021 VNLFSSTKSM MSVQNSGTQQ QGNGLFQQGN EMMSLQSGNF LQQSSHSQAQ LFHPQNPIAD
1081 AQNLSQETQG SLFHSPNPIV HSQTSTTSSE QMQPPMFHSQ STIAVLQGSS VPQDQQSTNI
1141 FLSQSPMNNL QTNTVAQEAFAAPNSISPL QSTSNSEQQA AFQQQAPISH IQTPMLSQEQ
1201 AQPPQQGLFQ PQVALGSLPP NPMPQSQQGT MFQSQHSIVA MQSNSPSQEQ QQQQQQQQQQ
1261 QQQQQQSILF SNQNTMATMA SPKQPPNMI FNPQNPNMAN QEQQNQSIFH QSNMAPMNQ
1321 EQQPMQFQSQ STVSSLQNPQ PTQSESSQTP LFHSSPQIQL VQGSPSSQEQ QVTLFLSPAS
1381 MSALQTSINQ QDMQQSPLYSPQNNMPGIQG ATSSPQPQAT LFHNTAGGTM NQLQNSPGSS
1441 QQTSGMFLFG IQNNCSQLLT SGPATLPDQL MAISQPGQPQ NEGQPPVTTL LSQQMPENSP
1501 LASSINTNQN IEKIDLLVSL QNQGNNLTGS F
    
```

10 También se puede usar la secuencia activadora transcripcional de respuesta a la tonicidad de NFATc en construcciones como se proporciona en el presente documento; la vía de señalización de NFATc se describe, por ejemplo, en Li (2007) *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 292(5):C1606-16. También se puede usar la secuencia de respuesta a la proteína de unión al potenciador de respuesta a la tonicidad descrita, por ejemplo, por Miyakawa (1999) "Tonicity-responsive enhancer binding protein, arel-like protein that stimulates transcription in response to hypertonicity" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96(5):2538-2542 (véase también, por ejemplo, Lopez-Rodriguez (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96(13):7214-7219) para poner en práctica las composiciones y/o procedimientos relacionados con la presente invención. Esta proteína regula la expresión del gen inducida por el estrés osmótico en células de mamífero. A diferencia de los miembros monoméricos de esta familia de proteínas, esta proteína existe como un homodímero y forma dímeros estables con elementos de ADN. Se han descubierto múltiples variantes de transcritos que codifican diferentes isoformas para este gen. Una isoforma que se puede usar para poner en práctica las composiciones y/o procedimientos relacionados con la presente invención es:

1 MPSEDFISLLS ADLDLESPKS LYSRDSLKLH PSQNFHFRAGL LEESVYDLLP KELQLPPSRE
 61 TSVASMSQTS GGEAGSPPPA VVAADASSAP SSSSMGGACS SFTTSSSPTI YSTSVDTSKA
 121 MQVESCS SAV GVSNRGVSEK QLTSNTVQQH PSTPKRHTVL YISPPPEDLL DNSRMSCQDE
 181 GCGLESEQSC SMWMEDSPSN FSNMSTSSYN DNTEVPRKSR KRNPQRPGV KRRDCEESNM
 241 DIFDADSAKA PHYVLSQLTT DNKGNKAGN GTLENQKGTG VKKSPMLCGQ YPVKSEGKEL
 301 KIVVQPETQH RARYLTEGSR GSVKDRTQQG FPTVKLEGHN EPVVLQVFGV NDSGRVKPHG
 361 FYQACRVIGR NTPCKEVDI EGTIVIEVGL DPSNNMTLAV DCVGILKLRN ADVEARIGIA
 421 GSKKKSTRAR LVFRVNIMRK DGSTLTLQTP SSPILCTQPA GVPEILKKS L HSCSVKGEE
 481 VFLIGKNFLK GTKVIFQENV SDENSWKSEA EIDMELFHQN HLIVKVPPYH DQHITLPSV
 541 GIYVVTNAGR SHDVQPFYTYT PDPAAAGALNV NVKKEISSPA RPCSFEEAMK AMKTTGCNLD
 601 KVNIIIPNALM TPLIPSSMIK SEDVTPMEVT AEKRSSTIFK TTKSVGSTQQ TLENISNIAG
 661 NGSFSSPSSS HLPSENEKQQ QIQPKAYNPE TLTIIQTQDI SQPGTFPAVS ASSQLPNSDA
 721 LLQQATQFQT RETQSREILQ SDGTVVNLSQ LTEASQQQQQ SPLQEQAQTL QQQISSNIFP
 781 SPNSVSQ LQN TIQQ LQAGSF TGSTASGSSG SVDLVQQVLE AQQQLSSVLF SAPDGNENVQ
 841 EQLSADIFQQ VSQIQSGVSP GMFSSTEPTV HTRPDNLLPG RAESVHPQSE NTLNQQQQQ
 901 QQQQVMMESS AAMVMEMQQS ICQAAAQIQS ELFPSTASAN GNLQQSPVYQ QTSHMMSALS
 961 TNEDMQMQCE LFSSPPAVSG NETSTTTTQQ VATPGTTFMQ TSSSGDGEET GTQAKQIQNS
 1021 VFQTMVQM QH SGDNQPQVNL FSSTKSMMSV QNSGTQQQGN GLFQQGNEMM SLQSGNFLQQ
 1081 SSSHQAQLFH PQNPIADAQN LSQETQGS LF HSPNPVHSQ TSTTSSEQMQ PPMFHSQSTI
 1141 AVLQGS SV PQ DQQSTNIFLS QSPMNNLQTN TVAQEAFFAA PNSISPLQST SNSEQQAAFQ
 1201 QQAPI SHIQT PMLSQEQAQP PQQGLFQPQV ALGSLPPNPM PQSQQGTMFQ SQHSIVAMQS
 1261 NSPSQEQQQQ QQQQQQQQQQ QQQSILFSNQ NTMATMASPK QPPPNMIFNP NQNPANQEQ
 1321 QNQSIFHQQS NMAPMNQEQQ PMQFQSQSTV SSLQNPQPTQ SESSQTPLFH SSPQIQLVQG
 1381 SPSSQEQQVT LFLSPASMSA LQTSINQQDM QQSPLYSPQN NMPGIQGATS SPQPQATLFH
 1441 NTAGGTMNQL QNSPGSSQQT SGMFLFGIQN NCSQLLTS GP ATLDPQLMAI SQPGQPQNEG
 1501 QPPVTLLSQ QMPENSPLAS SINTNQNIK IDLLVSLQNO GNNLTGSF

5 Véase, por ejemplo, Nagase (1998) *DNA Res.* 5(6):355-364; Lopez-Rodriguez (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96(13):7214-7219; Miyakawa (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96(5):2538-2542.

Como se describe anteriormente, en el presente documento se proporcionan construcciones de ácido nucleico que, cuando se insertan y expresan en una célula (incluyendo células en un biorreactor, cultivo celular, implantes y similares) proporcionan un fenotipo de protección frente a la ósmosis a esa célula. En modos de realización alternativos, en el presente documento se proporcionan construcciones de protección frente a la ósmosis con capacidad potenciada, por ejemplo, que codifican también un polipéptido NFATc, un polipéptido AP-1, un polipéptido TonEBP, un polipéptido de calcineurina o una combinación de los mismos. Se logra una capacidad de protección frente a la ósmosis intensificada cuando una construcción como se proporciona en el presente documento también expresa un polipéptido NFATc debido a que, por ejemplo, los polipéptidos NFATc se unen a potenciadores de respuesta a la tonicidad, dando como resultado más expresión (mayor, más alta) de proteínas de protección frente a la ósmosis en la célula. Se logra una capacidad de protección frente a la ósmosis intensificada cuando una construcción como se proporciona en el presente documento también expresa un polipéptido AP-1 debido a que, por ejemplo, los polipéptidos AP-1 pueden ser un cofactor necesario para la unión del polipéptido NFATc a potenciadores de respuesta a la tonicidad. Se logra una capacidad de protección frente a la ósmosis intensificada cuando una construcción como se proporciona en el presente documento también expresa un polipéptido TonEBP debido a que, por ejemplo, las proteínas TonEBP se unen a las secuencias de potenciador transcripcional de respuesta a TonEBP como se proporciona en el presente documento. Los ácidos nucleicos que codifican el polipéptido NFATc, AP-1, TonEBP y/o calcineurina también se pueden regular mediante un elemento regulador transcripcional de respuesta a la ósmosis (OR-TRE) como se proporciona en el presente documento, o mediante otro potenciador o promotor.

En un modo de realización alternativo, en lugar de expresarse en la misma construcción que una molécula de ácido nucleico de respuesta a la ósmosis con ORE-TRE como se proporciona en el presente documento, los polipéptidos NFATc, AP-1, TonEBP y/o calcineurina se expresan en construcciones separadas, por ejemplo, vectores separados, que pueden ser construcciones de expresión transitoria y episómica o construcciones de expresión integrada de

manera genómica.

Kits y genotecas

5 En el presente documento se proporcionan kits que comprenden composiciones y procedimientos como se proporciona en el presente documento, incluyendo células como se proporciona en el presente documento, secuencias diana, agentes de transfección, agentes de transducción, instrucciones (con respecto a los procedimientos como se proporciona en el presente documento), o cualquier combinación de los mismos. Como tal, se proporcionan kits, células, vectores y similares en el presente documento.

10

La invención se describirá adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos; sin embargo, se ha de entender que la invención no está limitada a dichos ejemplos.

EJEMPLOS

15

Ejemplo 1: Diseño de elementos reguladores transcripcionales híbridos con sensibilidad a la ósmosis. La invención proporciona elementos reguladores transcripcionales de respuesta a la ósmosis (ORTRE).

20

Este ejemplo describe el uso de un sitio de unión a TonE para diseñar un elemento regulador transcripcional híbrido sintético de respuesta a la ósmosis ejemplar de la presente invención, y sus características de expresión, a osmolalidades crecientes. Estos resultados demuestran que los elementos reguladores transcripcionales de respuesta a la ósmosis de la presente invención se pueden transactivar de una manera dependiente de la ósmosis.

Procedimientos:

25

Construcción del promotor de respuesta a la ósmosis POR1

30

El promotor de respuesta a la ósmosis POR1 se clonó mediante amplificación por PCR del promotor de CMV humano con los oligonucleótidos OLM155

5'-TTGACTAGTTGGAAAATCACCAGAATGGGATTTAGAGAGGTGGGGTTCCTGA
CTCATTGCTAGCTCGAGCTCGGTACCCGGGTCGAGTAGGCGTGTACGGTGGGAG-3'

35

(SEQ ID NO: 8) y la secuencia de hibridación OLM165 5'-GGTGGTTTAATCGATAGAACC-3' (SEQ ID NO: 10), donde los sitios de unión a TonE y AP1 están en negrita, estos sitios de unión, así como la secuencia entre ellos, se toman como el elemento de respuesta osmótica (OR), la secuencia de hibridación está en cursiva; se introducen respectivamente un sitio de clonación para SpeI y uno para NheI en 5' y 3' del elemento de respuesta osmótica (OR), y los sitios de clonación están subrayados. El producto de PCR se clonó con TOPO, de esta manera, dando como resultado pLM216. El promotor híbrido con su intrón directamente en 3' se extrajo de pLM216 con (SpeI/Clal) y se clonó en el plásmido de expresión STIgMA-FC Stalkless (SpeI/Clal), de esta manera, dando como resultado pOsmo1 (intrón de POR1-STIgMA-Fc-pA; POR1, fragmento de P-OR de CMV).

40

Cultivo celular, transfección

45

Las células de ovario de hámster chino CHO-K1 DUX-B11 (dhfr-) se cultivaron en suspensión en un medio de bajo contenido de proteína libre de suero (insulina humana recombinante). Se usaron protocolos de transfección con LIPOFECTAMINE™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) optimizados para la transfección transitoria de alta eficacia de las células. Las células transfectadas de manera transitoria se obtuvieron seis (6) horas después de la transfección y se sembraron en placas de seis (6) pocillos en medio que contenía suero a osmolalidad creciente. La osmolalidad del medio se ajustó en cada pocillo añadiendo un volumen fijo de una solución salina tamponada con fosfato con una concentración creciente de sal. Las células transfectadas de manera transitoria se analizaron de manera rutinaria después de 48 horas para determinar la expresión del gen de fusión a Fc mediante ELISA.

50

Resultados

55

A fin de analizar el potencial del elemento de respuesta a la ósmosis para el diseño de un sistema de regulación de genes de mamífero para la producción biofarmacéutica y la genomanipulación de respuesta al estrés, se han fusionado el elemento de respuesta a la ósmosis del promotor de aldosa reductasa de ratón (secuencias 1053 a 1007) que contiene un sitio de TonE y un sitio de AP-1 (proteína activadora 1) (véase, por ejemplo, Daoudal *et al.* 1997, *supra*) en 5' de una porción del promotor inmediato temprano de citomegalovirus humano, de esta manera construyendo el promotor de respuesta a la ósmosis 1 POR1.

60

Se construyó un plásmido en el que el promotor POR1 ejemplar induce la expresión de una proteína de fusión a Fc pOsmo1 (intrón de POR1-STIgMA-Fc-pA; POR1, fragmento de P OR de CMV). Tras la transfección de los plásmidos de expresión de fusión a Fc inducida por un promotor constitutivo (el promotor de citomegalovirus humano) o bien por POR1 en células CHOK1 DUX-B11 (dhfr-), las células transfectadas se sembraron y cultivaron durante 48 horas (h) en medios de osmolalidades crecientes. Entonces, se sometieron a ensayo los sobrenadantes de las células para

65

determinar la expresión de fusión a Fc, como se ilustra esquemáticamente en la figura 2, donde las osmolalidades se expresan como mOsm, y la concentración de proteínas tanto del promotor constitutivo como del elemento regulador transcripcional POR1 de la invención en mg/l.

5 Los niveles de expresión del plásmido de expresión inducida por el promotor constitutivo permanecieron estables desde 300 a 400 mOsm y, entonces, disminuían a medida que se incrementaba adicionalmente la osmolalidad. Esto probablemente refleja comportamientos celulares bien descritos a osmolalidad alta: tasas de crecimiento celular decreciente y viabilidad de las células decreciente con osmolalidad creciente.

10 De ahí que la expresión constitutiva del gen indicador explique los efectos de las osmolalidades altas sobre la expresión de proteínas recombinantes.

15 El promotor de citomegalovirus humano y el promotor de respuesta a la ósmosis 1 indujeron niveles de expresión de proteínas recombinantes equivalentes a 300 mOsm. A medida que la osmolalidad se incrementaba hasta 400 mOsm, se incrementaban los niveles de expresión inducida por POR1 y, entonces, disminuían con la osmolalidad creciente. Sin embargo, los niveles de expresión inducida por POR1 disminuyeron a una tasa mucho más lenta que sus homólogos inducidos por el promotor constitutivo.

20 Conclusión

25 La comparación de los niveles de expresión de fusión a Fc inducida por el constitutivo e inducida por POR1 ejemplar indica que, aunque la fisiología de las células se ve afectada a osmolalidades altas y, de esta manera, disminuye la producción de proteínas global, el POR1 ejemplar de la invención induce niveles de expresión de proteínas más altos que el promotor de CMV en medio hiperosmótico. Estos resultados demuestran que los elementos reguladores transcripcionales de respuesta a la ósmosis de la presente invención se pueden transactivar de una manera dependiente de la ósmosis cuando se transfectan en células CHO-K1 DUX-B11 (dhfr-). De esta manera, estos resultados demuestran que se pueden usar los elementos reguladores transcripcionales de la invención, como se ejemplifica mediante esta expresión de un transgén inducida por POR1, como un detector de la osmolalidad en tiempo real.

30

Ejemplo 2: Diseño de un conjunto de elementos reguladores transcripcionales de respuesta a la ósmosis

35 Este ejemplo describe el diseño y las pruebas de un conjunto de elementos reguladores transcripcionales de respuesta a la ósmosis de la presente invención. Se sometió a prueba el impacto del incremento del número de elementos de respuesta a la ósmosis en una construcción de la presente invención en la ventana de expresión de proteínas recombinantes a osmolalidades crecientes. La figura 3 ilustra esquemáticamente cómo se construyeron tres elementos reguladores transcripcionales de respuesta a la ósmosis sintéticos ejemplares de la presente invención.

40 Procedimientos:

Construcción de los promotores de respuesta a la ósmosis

45 POR1 se extrajo de pOsmo1 (SpeI/ClaI) y se clonó en pOsmo1 (NheI/ClaI), de esta manera, dando como resultado un promotor híbrido de respuesta a la ósmosis que contenía 2 elementos de respuesta osmótica: pLM217 (intrón de POR2). Asimismo, POR3 se construyó mediante la extracción del intrón de POR2 de pLM217 (SpeI/ClaI) y la inserción en pOsmo1 (NheI/ClaI), de esta manera, dando como resultado pOsmo2 (intrón de POR3-STIgMA-Fc-pA; POR3, fragmento de P-OR-OR-OR de CMV). El intrón de POR2 se extrajo de pLM217 (SpeI/ClaI) y se clonó en pLM217 (NheI/ClaI), de esta manera, dando como resultado pLM218: intrón de POR4 (POR4, fragmento de P-OR-OR-OR-OR de CMV). El intrón de POR4 se extrajo de pLM218 (SpeI/ClaI) y se ligó en pOsmo2 (NheI/ClaI), de esta manera, dando como resultado pOsmo3 (intrón de POR7-STIgMA-Fc-pA; POR7, fragmento de P-OR-OR-OR-OR-OR-OR de CMV).

Cultivo celular, transfección

55

60 Las células de ovario de hámster chino CHO-K1 DUX-B11 (dhfr-) se cultivaron en suspensión en un medio de bajo contenido de proteína libre de suero (insulina humana recombinante). Se usaron protocolos de transfección con LIPOFECTAMINE™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) optimizados para la transfección transitoria de alta eficacia de las células. Las células transfectadas de manera transitoria se obtuvieron 6 horas después de la transfección y se sembraron en placas de 6 pocillos en medio que contenía suero a osmolalidad creciente. La osmolalidad del medio se ajustó en cada pocillo añadiendo un volumen fijo de una solución salina tamponada con fosfato con una concentración creciente de sal. Las células transfectadas de manera transitoria se analizaron de manera rutinaria después de 48 horas para determinar la expresión del gen de fusión a Fc mediante ELISA.

65 Resultados

A fin de evaluar el impacto de un número creciente de elementos de respuesta a la ósmosis en 5' del fragmento del promotor de citomegalovirus humano, se construyeron dos promotores de respuesta a la ósmosis adicionales que llevaban 3 o bien 7 elementos de respuesta a la ósmosis clonados uno al lado del otro: POR3 y POR7, como se ilustra en la figura 3. Las células CHO-K1 DUX-B11 (dhfr-) se transfectaron con un plásmido de expresión de fusión a Fc inducido por el promotor constitutivo de citomegalovirus humano o bien por el promotor de respuesta a la ósmosis 3, POR3, o bien por el promotor de respuesta a la ósmosis 7, POR7. Seis (6) horas después de la transfección, las células se obtuvieron y se sembraron en medio de osmolalidad creciente. La expresión constitutiva del gen indicador no sufrió significativamente ningún impacto por la osmolalidad entre 300 mOsm y 400 mOsm, entonces, el nivel de expresión de fusión a Fc disminuía a medida que se incrementaba la osmolalidad, como se ilustra en la figura 4, que ilustra esquemáticamente la eficacia de protección frente a la ósmosis *in vivo* de los elementos reguladores transcripcionales de respuesta a la ósmosis (OR-TRE) ejemplares de la presente invención ilustrados en la figura 3; véanse también los datos normalizados en la figura 5.

Los niveles de expresión de fusión a Fc inducida por POR3 fueron la mitad de sus niveles de expresión constitutiva homólogos en el medio isotónico, como se ilustra en la figura 4. A medida que la osmolalidad del medio se incrementaba desde 300 mOsm a 500 mOsm, se incrementaba la expresión inducida por POR3 a un máximo de 1,5 veces los niveles de expresión isotónica y, entonces, disminuía con la osmolalidad desde 500 mOsm hasta 700 mOsm.

Los niveles de expresión de fusión a Fc inducida por POR7 fueron quince veces más bajos que sus homólogos de expresión constitutiva en el medio isotónico, como se ilustra en la figura 4. A medida que la osmolalidad se incrementaba desde 300 mOsm a 550 mOsm, se incrementaban los niveles de expresión de fusión a Fc inducida por POR7 a un máximo de cuatro veces los niveles de expresión isotónica y, entonces, disminuían con la osmolalidad. Los datos están normalizados en la figura 5.

25 **Conclusión**

Cuanto más (cuanto más alto sea el número de) elementos de respuesta a la ósmosis se codifiquen (inserten) dentro de los elementos reguladores transcripcionales de respuesta a la ósmosis (OR-TRE) (también llamados "promotores de respuesta a la ósmosis híbridos") de la presente invención, más bajo es el nivel de expresión de un transgén en medio isotónico, pero más alto es su factor de inducción (la proporción de sus niveles de expresión máxima entre los niveles de expresión isotónica). De esta manera, se ha construido un conjunto de promotores de respuesta a la ósmosis que producen una variedad de ventanas de expresión de un transgén y factores de inducción; y la invención proporciona una variedad de elementos reguladores transcripcionales de respuesta a la ósmosis (OR-TRE) que tienen uno o una pluralidad de elementos de respuesta a la ósmosis insertados en la construcción; por ejemplo, que tienen una o una pluralidad de secuencias de potenciador transcripcional de respuesta a la proteína de unión al potenciador de la tonicidad (TonEBP) (motivos de unión a TonEBP) y, como modos de realización alternativos, que tienen también opcionalmente uno o una pluralidad de sitios de unión a la proteína AP-1 (motivos de unión a AP-1).

40 **Niveles de expresión normalizados**

Análisis de los datos

45 La disminución relativa en los niveles de expresión constitutiva desde la expresión isotónica a la hipertónica es indicativa de la disminución relacionada con la ósmosis en la producción de proteínas debido al crecimiento y la viabilidad celulares inhibidos. De esta manera, se han normalizado los niveles de expresión inducida por POR3 y POR7 con sus niveles de expresión constitutiva; véase la figura 4.

50 **Conclusión**

Este ejemplo presenta datos que demuestran cómo al incrementar el número de elementos de respuesta a la ósmosis codificados en las construcciones de la presente invención (el elemento regulador transcripcional de respuesta a la ósmosis (OR-TRE) de la presente invención o "promotor de respuesta a la ósmosis") produce niveles de expresión isotónica más bajos de una manera dependiente del número de elementos de respuesta a la ósmosis. Este ejemplo también presenta datos que demuestran que el nivel de transactivación real de estos promotores mediante las construcciones ejemplares de la presente invención se incrementa con la osmolalidad de una manera lineal desde 350 mOsm a 700 mOsm.

60 **EJEMPLO 3: Modulación transcripcional y postranscripcional del gen con sensibilidad a la ósmosis**

Este ejemplo describe construcciones ejemplares de la invención que tienen una modulación transcripcional y postranscripcional del gen con sensibilidad a la ósmosis; por ejemplo, construcciones ejemplares de la invención que pueden regular por incremento positivamente tanto los niveles de expresión transcripcional como postranscripcional del mensaje y polipéptido, respectivamente, en condiciones de estrés osmótico (por ejemplo, alto contenido de sal).

Los modos de realización alternativos combinan la osmorregulación con controles transcripcionales y/o controles a nivel postranscripcional (por ejemplo, traduccional): (1) (a nivel transcripcional) un promotor de respuesta a la ósmosis de mamífero endógeno y/o bien un promotor de respuesta a la ósmosis eucariótico sintético de la presente invención; y (2) (a nivel postranscripcional) mediante la incorporación de una o más secuencias o motivos reguladores transcripcionales o traduccionales. Se pueden incorporar (insertar) estos controles en una construcción de la invención, de tal manera que cualquier mensaje (transcrito) generado a partir de esa construcción tenga una región no traducida en 5' y/o en 3' con sensibilidad a la ósmosis; y, en un modo de realización, controles a nivel transcripcional y/o postranscripcional (por ejemplo, traduccional) adicionales.

Por ejemplo, la presencia de secuencias o motivos de control a nivel transcripcional y/o postranscripcional (por ejemplo, traduccional) genera un ARNm (un mensaje) que es más estable y/o duradero, por ejemplo, más estable y/o duradero en condiciones de hiperosmolalidad (por ejemplo, un entorno hiperosmótico); de esta manera, dando como resultado una expresión de proteínas recombinantes incrementada en condiciones de hiperosmolalidad, por ejemplo, a osmolalidades altas. Este modo de realización aumenta el factor de regulación entre la expresión de referencia en medio isotónico y la inducción génica máxima en condiciones de hiperosmolalidad, por ejemplo, en medio hiperosmótico.

Ejemplo 4:

El rendimiento de la producción de proteínas recombinantes inducida por un promotor constitutivo disminuye constantemente a medida que se incrementa la osmolalidad. Se razonó que la introducción de elemento(s) de respuesta a la ósmosis en un promotor constitutivo podría transactivar adicionalmente el promotor constitutivo y contrarrestar los efectos negativos de la hipertonicidad en la producción de proteínas recombinantes. A fin de someter a prueba esta hipótesis, se introdujeron uno, tres o siete elementos de respuesta a la ósmosis entre el potenciador del promotor de CMV humano y el P_{fragmento de CMV}.

Procedimientos:

Construcción de los promotores de respuesta a la ósmosis

El potenciador del promotor de CMV humano se amplificó por PCR con los oligonucleótidos OLM401: 5'-CAAGCTTGACTAGTCAATCAATTACGGGGTTCATTAGTTCAT-3' (SEQ ID NO: 38) y OLM400: 5'-AGCTAGCACACCGTACACGCCTACCG-3' (SEQ ID NO: 39) (los sitios de restricción en negrita, la secuencia de hibridación en cursiva). El producto de PCR se digirió con HindIII y NheI, se extrajo el intrón de P_{OR1} de un plásmido intermediario (SpeI/EcoRI), ambos fragmentos de ADN se clonaron en otro plásmido intermediario (HindIII/EcoRI), de esta manera, dando como resultado: intrón de P_{constOR1}: intrón de P_{fragmento de CMV} con E_{hCMV}OR1. La misma estrategia se usó para construir el intrón de P_{constOR3}: intrón de P_{fragmento de CMV} con E_{hCMV}OR3 e intrón de P_{constOR7}: intrón de P_{fragmento de CMV} con E_{hCMV}OR7.

P_{constOR1} se extrajo del plásmido intermediario (SpeI/ClaI) y se clonó en pOsmo1 (SpeI/ClaI), de esta manera, dando como resultado: pconstOsmo1 (intrón de P_{constOR1}-STIgMA-Fc-pA; P_{constOR1}: P_{OR1} con E_{hCMV}). La misma estrategia se usó para construir pconstOsmo3 (intrón de P_{constOR3}-STIgMA-Fc-pA; P_{constOR3}: P_{OR3} con E_{hCMV}) y se construyó pconstOsmo7 (intrón de P_{constOR7}-STIgMA-Fc-pA; P_{constOR7}: P_{OR7} con E_{hCMV}).

Transfección de cultivos celulares

Las células de ovario de hámster chino CHO-K1 DUX-B11 (dhfr-) se cultivaron en suspensión en un medio de bajo contenido de proteína libre de suero (insulina humana recombinante). Se usaron protocolos de transfección con lipofectamine optimizados para la transfección transitoria de alta eficacia de las células. Las células transfectadas de manera transitoria se obtuvieron 6 horas después de la transfección y se sembraron en placas de 6 pocillos en medio que contenía suero a osmolalidad creciente. La osmolalidad del medio se ajustó en cada pocillo añadiendo un volumen fijo de una solución salina tamponada con fosfato con una concentración creciente de sal. Las células transfectadas de manera transitoria se analizaron de manera rutinaria con un ensayo de expresión del gen de fusión a Fc realizado mediante EFISA.

Resultados

A fin de evaluar el impacto de la introducción de un número creciente de elementos de respuesta a la ósmosis en 3' del potenciador del promotor de citomegalovirus humano y en 5' del fragmento del promotor de citomegalovirus humano, se construyeron tres promotores que llevaban 1, 3 o bien 7 elementos de respuesta a la ósmosis clonados uno al lado del otro: P_{constOR1}, P_{constOR3}, P_{constOR7}. Las células CHO-K1 DUX-B11 (dhfr-) se transfectaron con un plásmido de expresión de fusión a Fc inducido por el promotor constitutivo de citomegalovirus humano o bien uno de estos promotores genomanipulados. 6 horas después de la transfección, las células se obtuvieron y se sembraron en medio de osmolalidad creciente.

La expresión constitutiva del gen indicador disminuía constantemente a medida que se incrementaba la osmolalidad (**figura 6**).

- 5 Sorprendentemente, la introducción de un elemento de respuesta a la ósmosis entre el potenciador y el fragmento del promotor de CMV dio lugar a la duplicación de la expresión de proteínas recombinantes en medio isotónico. Entre 300 mOsm/kg y 450 mOsm/kg, los niveles de expresión de la proteína recombinante de interés inducidos por PconstOR1 se mantuvieron a este nivel alto y, entonces, disminuyeron con la osmolalidad desde 500 mOsm/kg hasta 700 mOsm/kg.
- 10 La introducción de tres elementos de respuesta a la ósmosis dentro del promotor de CMV humano constitutivo dio lugar a un ligero incremento de la expresión de proteínas recombinantes en comparación con el promotor de CMV natural a 300 mOsm/kg. Por el contrario, la introducción de siete elementos de respuesta a la ósmosis dio lugar a una ligera disminución de la expresión de proteínas recombinantes en medio isotónico. Los niveles de expresión de fusión a Fc inducidos por el promotor de CMV modificado para que contuviera tres o bien siete elementos de
- 15 respuesta a la ósmosis se incrementaron desde 300 mOsm/kg a 400 mOsm/kg y, entonces, disminuyeron constantemente hasta 700 mOsm/kg.

Conclusión

- 20 La introducción de un elemento de respuesta a la ósmosis dentro del promotor de CMV humano da lugar a la duplicación de los niveles de expresión de proteínas recombinantes a 300 mOsm/kg. Este fue un resultado inesperado.
- 25 La presencia de elementos de respuesta a la ósmosis posibilita contrarrestar los efectos de la osmolalidad incrementada en la expresión de proteínas recombinantes y, cuando se introducen tres o siete elementos de respuesta a la ósmosis, los niveles de expresión recombinante se regulan por incremento con osmolalidad creciente para alcanzar un máximo de 400 mOsm/kg y, entonces, disminuir constantemente.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Genentech Inc.

5 <120> Composiciones y procedimientos para regular la osmolaridad celular

<130> P4212R1WO

10 <140> 00/000000
<141> 15-09-2009

<150> 61/097149
<151> 15-09-2008

15 <160> 39

<170> PatentIn versión 3.5

20 <210> 1
<211> 11
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Consenso de construcción recombinante

<220>
<221> misc_feature
30 <222> (7)..(8)
<223> n es a, c, g o t

<220>
<221> misc_feature
35 <222> (10)..(10)
<223> n es a, c, g o t

<400> 1
hggaawnnhn h 11

40 <210> 2
<211> 7
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Consenso

<400> 2
50 hggaasr 7

<210> 3
<211> 7
<212> ADN
55 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Consenso

60 <400> 3
tgastca 7

<210> 4
<211> 11
65 <212> ADN

ES 2 670 368 T3

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Consenso
 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(8)
 <223> n es a, c, g o t
 10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> n es a, c, g o t
 15
 <400> 4
 hggaaannhn h 11
 <210> 5
 <211> 11
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Consenso
 25
 <400> 5
 tggaaatttg t 11
 <210> 6
 <211> 7
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Consenso
 35
 <400> 6
 tgactca 7
 <210> 7
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Consenso
 45
 <400> 7
 ttggaaaatc accagaatgg gatttagaga ggtggggttc ctgactcatt 50
 <210> 8
 <211> 106
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Consenso
 60
 <400> 8
 ttgactagtt ggaaaatcac cagaatggga tttagagagg tggggttcct gactcattgc 60
 tagctcgagc tcgggtacccg ggtogagtag gcgtgtacgg tgggag 106

	<210> 9	
	<211> 11	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Consenso	
	<400> 9	
10	tggaaaatca c	11
	<210> 10	
	<211> 11	
	<212> ADN	
15	<213> Canis familiaris	
	<400> 10	
	tggaaaagtc c	11
20	<210> 11	
	<211> 11	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
25	<400> 11	
	tggaaaaata t	11
	<210> 12	
	<211> 11	
30	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 12	
	tggaaaaatt t	11
35	<210> 13	
	<211> 11	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
40	<400> 13	
	tggaaaatca c	11
	<210> 14	
45	<211> 11	
	<212> ADN	
	<213> Oryctolagus cuniculus	
	<400> 14	
50	cggaaaatca c	11
	<210> 15	
	<211> 11	
	<212> ADN	
55	<213> Mus musculus	
	<400> 15	
	tggaaaatca c	11
60	<210> 16	
	<211> 11	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	

ES 2 670 368 T3

	<400> 16 tggaaaatta c	11
5	<210> 17 <211> 11 <212> ADN <213> Homo sapiens	
10	<400> 17 tggaatatta c	11
15	<210> 18 <211> 11 <212> ADN <213> Homo sapiens	
20	<400> 18 tggaaattta c	11
25	<210> 19 <211> 11 <212> ADN <213> Oryctolagus cuniculus	
30	<400> 19 aggaaaatca c	11
35	<210> 20 <211> 11 <212> ADN <213> Oryctolagus cuniculus	
40	<400> 20 cggaaaaaac c	11
45	<210> 21 <211> 11 <212> ADN <213> Oryctolagus cuniculus	
50	<400> 21 cggaaaatac c	11
55	<210> 22 <211> 11 <212> ADN <213> Oryctolagus cuniculus	
60	<400> 22 cggaaaatcc c	11
	<210> 23 <211> 11 <212> ADN <213> Homo sapiens	
	<400> 23 tggaaaacta c	11
	<210> 24 <211> 11 <212> ADN <213> Homo sapiens	

ES 2 670 368 T3

	<400> 24 atagaattcc a	11
5	<210> 25 <211> 11 <212> ADN <213> Homo sapiens	
10	<400> 25 tggaattcta t	11
15	<210> 26 <211> 12 <212> ADN <213> Homo sapiens	
20	<400> 26 tggaaaattc ca	12
25	<210> 27 <211> 11 <212> ADN <213> Homo sapiens	
30	<400> 27 tggaaaatta c	11
35	<210> 28 <211> 11 <212> ADN <213> Homo sapiens	
40	<400> 28 tggaaagtta c	11
45	<210> 29 <211> 11 <212> ADN <213> Homo sapiens	
50	<400> 29 tggaaagttc c	11
55	<210> 30 <211> 11 <212> ADN <213> Mus musculus	
60	<400> 30 tggaaagttt t	11
	<210> 31 <211> 11 <212> ADN <213> Mus musculus	
	<400> 31 tggaaaattt t	11
	<210> 32 <211> 11 <212> ADN	

ES 2 670 368 T3

<213> Mus musculus
 <400> 32
 tggaaatctc c 11
 5
 <210> 33
 <211> 11
 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 10
 <400> 33
 tggaaaaaca c 11
 15
 <210> 34
 <211> 11
 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 20
 <400> 34
 ggagttttcc a 11
 25
 <210> 35
 <211> 11
 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 30
 <400> 35
 tggaaaactc c 11
 35
 <210> 36
 <211> 1531
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 36

Met Pro Ser Asp Phe Ile Ser Leu Leu Ser Ala Asp Leu Asp Leu Glu
 1 5 10 15
 Ser Pro Lys Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Ser Val Tyr Asp Leu Leu Pro
 20 25 30
 Lys Glu Leu Gln Leu Pro Pro Ser Arg Glu Thr Ser Val Ala Ser Met
 35 40 45
 Ser Gln Thr Ser Gly Gly Glu Ala Gly Ser Pro Pro Pro Ala Val Val
 50 55 60
 Ala Ala Asp Ala Ser Ser Ala Pro Ser Ser Ser Ser Met Gly Gly Ala
 65 70 75 80
 Cys Ser Ser Phe Thr Thr Ser Ser Ser Pro Thr Ile Tyr Ser Thr Ser
 85 90 95
 Val Thr Asp Ser Lys Ala Met Gln Val Glu Ser Cys Ser Ser Ala Val
 100 105 110

ES 2 670 368 T3

Gly Val Ser Asn Arg Gly Val Ser Glu Lys Gln Leu Thr Ser Asn Thr
 115 120 125

Val Gln Gln His Pro Ser Thr Pro Lys Arg His Thr Val Leu Tyr Ile
 130 135 140

Ser Pro Pro Pro Glu Asp Leu Leu Asp Asn Ser Arg Met Ser Cys Gln
 145 150 155 160

Asp Glu Gly Cys Gly Leu Glu Ser Glu Gln Ser Cys Ser Met Trp Met
 165 170 175

Glu Asp Ser Pro Ser Asn Phe Ser Asn Met Ser Thr Ser Ser Tyr Asn
 180 185 190

Asp Asn Thr Glu Val Pro Arg Lys Ser Arg Lys Arg Asn Pro Lys Gln
 195 200 205

Arg Pro Gly Val Lys Arg Arg Asp Cys Glu Glu Ser Asn Met Asp Ile
 210 215 220

Phe Asp Ala Asp Ser Ala Lys Ala Pro His Tyr Val Leu Ser Gln Leu
 225 230 235 240

Thr Thr Asp Asn Lys Gly Asn Ser Lys Ala Gly Asn Gly Thr Leu Glu
 245 250 255

Asn Gln Lys Gly Thr Gly Val Lys Lys Ser Pro Met Leu Cys Gly Gln
 260 265 270

Tyr Pro Val Lys Ser Glu Gly Lys Glu Leu Lys Ile Val Val Gln Pro
 275 280 285

Glu Thr Gln His Arg Ala Arg Tyr Leu Thr Glu Gly Ser Arg Gly Ser
 290 295 300

Val Lys Asp Arg Thr Gln Gln Gly Phe Pro Thr Val Lys Leu Glu Gly
 305 310 315 320

His Asn Glu Pro Val Val Leu Gln Val Phe Val Gly Asn Asp Ser Gly
 325 330 335

Arg Val Lys Pro His Gly Phe Tyr Gln Ala Cys Arg Val Thr Gly Arg
 340 345 350

Asn Thr Thr Pro Cys Lys Glu Val Asp Ile Glu Gly Thr Thr Val Ile
 355 360 365

Glu Val Gly Leu Asp Pro Ser Asn Asn Met Thr Leu Ala Val Asp Cys
 370 375 380

ES 2 670 368 T3

Val Gly Ile Leu Lys Leu Arg Asn Ala Asp Val Glu Ala Arg Ile Gly
 385 390 395 400

Ile Ala Gly Ser Lys Lys Lys Ser Thr Arg Ala Arg Leu Val Phe Arg
 405 410 415

Val Asn Ile Met Arg Lys Asp Gly Ser Thr Leu Thr Leu Gln Thr Pro
 420 425 430

Ser Ser Pro Ile Leu Cys Thr Gln Pro Ala Gly Val Pro Glu Ile Leu
 435 440 445

Lys Lys Ser Leu His Ser Cys Ser Val Lys Gly Glu Glu Glu Val Phe
 450 455 460

Leu Ile Gly Lys Asn Phe Leu Lys Gly Thr Lys Val Ile Phe Gln Glu
 465 470 475 480

Asn Val Ser Asp Glu Asn Ser Trp Lys Ser Glu Ala Glu Ile Asp Met
 485 490 495

Glu Leu Phe His Gln Asn His Leu Ile Val Lys Val Pro Pro Tyr His
 500 505 510

Asp Gln His Ile Thr Leu Pro Val Ser Val Gly Ile Tyr Val Val Thr
 515 520 525

Asn Ala Gly Arg Ser His Asp Val Gln Pro Phe Thr Tyr Thr Pro Asp
 530 535 540

Pro Ala Ala Ala Gly Ala Leu Asn Val Asn Val Lys Lys Glu Ile Ser
 545 550 555 560

Ser Pro Ala Arg Pro Cys Ser Phe Glu Glu Ala Met Lys Ala Met Lys
 565 570 575

Thr Thr Gly Cys Asn Leu Asp Lys Val Asn Ile Ile Pro Asn Ala Leu
 580 585 590

Met Thr Pro Leu Ile Pro Ser Ser Met Ile Lys Ser Glu Asp Val Thr
 595 600 605

Pro Met Glu Val Thr Ala Glu Lys Arg Ser Ser Thr Ile Phe Lys Thr
 610 615 620

Thr Lys Ser Val Gly Ser Thr Gln Gln Thr Leu Glu Asn Ile Ser Asn

ES 2 670 368 T3

625	630	635	640
Ile Ala Gly Asn Gly Ser Phe Ser Ser Pro Ser Ser Ser His Leu Pro	645	650	655
Ser Glu Asn Glu Lys Gln Gln Gln Ile Gln Pro Lys Ala Tyr Asn Pro	660	665	
Glu Thr Leu Thr Thr Ile Gln Thr Gln Asp Ile Ser Gln Pro Gly Thr	675	680	685
Phe Pro Ala Val Ser Ala Ser Ser Gln Leu Pro Asn Ser Asp Ala Leu	690	695	700
Leu Gln Gln Ala Thr Gln Phe Gln Thr Arg Glu Thr Gln Ser Arg Glu	705	710	715
Ile Leu Gln Ser Asp Gly Thr Val Val Asn Leu Ser Gln Leu Thr Glu	725	730	735
Ala Ser Gln Gln Gln Gln Gln Ser Pro Leu Gln Glu Gln Ala Gln Thr	740	745	750
Leu Gln Gln Gln Ile Ser Ser Asn Ile Phe Pro Ser Pro Asn Ser Val	755	760	765
Ser Gln Leu Gln Asn Thr Ile Gln Gln Leu Gln Ala Gly Ser Phe Thr	770	775	780
Gly Ser Thr Ala Ser Gly Ser Ser Gly Ser Val Asp Leu Val Gln Gln	785	790	795
Val Leu Glu Ala Gln Gln Gln Leu Ser Ser Val Leu Phe Ser Ala Pro	805	810	815
Asp Gly Asn Glu Asn Val Gln Glu Gln Leu Ser Ala Asp Ile Phe Gln	820	825	830
Gln Val Ser Gln Ile Gln Ser Gly Val Ser Pro Gly Met Phe Ser Ser	835	840	845
Thr Glu Pro Thr Val His Thr Arg Pro Asp Asn Leu Leu Pro Gly Arg	850	855	860
Ala Glu Ser Val His Pro Gln Ser Glu Asn Thr Leu Ser Asn Gln Gln	865	870	875
			880

ES 2 670 368 T3

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Val Met Glu Ser Ser Ala Ala Met
 885 890 895

Val Met Glu Met Gln Gln Ser Ile Cys Gln Ala Ala Ala Gln Ile Gln
 900 905 910

Ser Glu Leu Phe Pro Ser Thr Ala Ser Ala Asn Gly Asn Leu Gln Gln
 915 920 925

Ser Pro Val Tyr Gln Gln Thr Ser His Met Met Ser Ala Leu Ser Thr
 930 935 940

Asn Glu Asp Met Gln Met Gln Cys Glu Leu Phe Ser Ser Pro Pro Ala
 945 950 955 960

Val Ser Gly Asn Glu Thr Ser Thr Thr Thr Thr Gln Gln Val Ala Thr
 965 970 975

Pro Gly Thr Thr Met Phe Gln Thr Ser Ser Ser Gly Asp Gly Glu Glu
 980 985 990

Thr Gly Thr Gln Ala Lys Gln Ile Gln Asn Ser Val Phe Gln Thr Met
 995 1000 1005

Val Gln Met Gln His Ser Gly Asp Asn Gln Pro Gln Val Asn Leu
 1010 1015 1020

Phe Ser Ser Thr Lys Ser Met Met Ser Val Gln Asn Ser Gly Thr
 1025 1030 1035

Gln Gln Gln Gly Asn Gly Leu Phe Gln Gln Gly Asn Glu Met Met
 1040 1045 1050

Ser Leu Gln Ser Gly Asn Phe Leu Gln Gln Ser Ser His Ser Gln
 1055 1060 1065

Ala Gln Leu Phe His Pro Gln Asn Pro Ile Ala Asp Ala Gln Asn
 1070 1075 1080

Leu Ser Gln Glu Thr Gln Gly Ser Leu Phe His Ser Pro Asn Pro
 1085 1090 1095

Ile Val His Ser Gln Thr Ser Thr Thr Ser Ser Glu Gln Met Gln
 1100 1105 1110

ES 2 670 368 T3

Pro Pro Met Phe His Ser Gln Ser Thr Ile Ala Val Leu Gln Gly
 1115 1120 1125

Ser Ser Val Pro Gln Asp Gln Gln Ser Thr Asn Ile Phe Leu Ser
 1130 1135 1140

Gln Ser Pro Met Asn Asn Leu Gln Thr Asn Thr Val Ala Gln Glu
 1145 1150 1155

Ala Phe Phe Ala Ala Pro Asn Ser Ile Ser Pro Leu Gln Ser Thr
 1160 1165 1170

Ser Asn Ser Glu Gln Gln Ala Ala Phe Gln Gln Gln Ala Pro Ile
 1175 1180 1185

Ser His Ile Gln Thr Pro Met Leu Ser Gln Glu Gln Ala Gln Pro
 1190 1195 1200

Pro Gln Gln Gly Leu Phe Gln Pro Gln Val Ala Leu Gly Ser Leu
 1205 1210 1215

Pro Pro Asn Pro Met Pro Gln Ser Gln Gln Gly Thr Met Phe Gln
 1220 1225 1230

Ser Gln His Ser Ile Val Ala Met Gln Ser Asn Ser Pro Ser Gln
 1235 1240 1245

Glu Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln
 1250 1255 1260

Gln Gln Gln Ser Ile Leu Phe Ser Asn Gln Asn Thr Met Ala Thr
 1265 1270 1275

Met Ala Ser Pro Lys Gln Pro Pro Pro Asn Met Ile Phe Asn Pro
 1280 1285 1290

Asn Gln Asn Pro Met Ala Asn Gln Glu Gln Gln Asn Gln Ser Ile
 1295 1300 1305

Phe His Gln Gln Ser Asn Met Ala Pro Met Asn Gln Glu Gln Gln
 1310 1315 1320

Pro Met Gln Phe Gln Ser Gln Ser Thr Val Ser Ser Leu Gln Asn
 1325 1330 1335

ES 2 670 368 T3

Pro Gly Pro Thr Gln Ser Glu Ser Ser Gln Thr Pro Leu Phe His
 1340 1345 1350

Ser Ser Pro Gln Ile Gln Leu Val Gln Gly Ser Pro Ser Ser Gln
 1355 1360 1365

Glu Gln Gln Val Thr Leu Phe Leu Ser Pro Ala Ser Met Ser Ala
 1370 1375 1380

Leu Gln Thr Ser Ile Asn Gln Gln Asp Met Gln Gln Ser Pro Leu
 1385 1390 1395

Tyr Ser Pro Gln Asn Asn Met Pro Gly Ile Gln Gly Ala Thr Ser
 1400 1405 1410

Ser Pro Gln Pro Gln Ala Thr Leu Phe His Asn Thr Ala Gly Gly
 1415 1420 1425

Thr Met Asn Gln Leu Gln Asn Ser Pro Gly Ser Ser Gln Gln Thr
 1430 1435 1440

Ser Gly Met Phe Leu Phe Gly Ile Gln Asn Asn Cys Ser Gln Leu
 1445 1450 1455

Leu Thr Ser Gly Pro Ala Thr Leu Pro Asp Gln Leu Met Ala Ile
 1460 1465 1470

Ser Gln Pro Gly Gln Pro Gln Asn Glu Gly Gln Pro Pro Val Thr
 1475 1480 1485

Thr Leu Leu Ser Gln Gln Met Pro Glu Asn Ser Pro Leu Ala Ser
 1490 1495 1500

Ser Ile Asn Thr Asn Gln Asn Ile Glu Lys Ile Asp Leu Leu Val
 1505 1510 1515

Ser Leu Gln Asn Gln Gly Asn Asn Leu Thr Gly Ser Phe
 1520 1525 1530

<210> 37
 <211> 1548
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 37

Met Pro Ser Asp Phe Ile Ser Leu Leu Ser Ala Asp Leu Asp Leu Glu
 1 5 10 15

5

10

ES 2 670 368 T3

Ser Pro Lys Ser Leu Tyr Ser Arg Asp Ser Leu Lys Leu His Pro Ser
 20 25 30

Gln Asn Phe His Arg Ala Gly Leu Leu Glu Glu Ser Val Tyr Asp Leu
 35 40 45

Leu Pro Lys Glu Leu Gln Leu Pro Pro Ser Arg Glu Thr Ser Val Ala
 50 55 60

Ser Met Ser Gln Thr Ser Gly Gly Glu Ala Gly Ser Pro Pro Pro Ala
 65 70 75 80

Val Val Ala Ala Asp Ala Ser Ser Ala Pro Ser Ser Ser Ser Met Gly
 85 90 95

Gly Ala Cys Ser Ser Phe Thr Thr Ser Ser Ser Pro Thr Ile Tyr Ser
 100 105 110

Thr Ser Val Thr Asp Ser Lys Ala Met Gln Val Glu Ser Cys Ser Ser
 115 120 125

Ala Val Gly Val Ser Asn Arg Gly Val Ser Glu Lys Gln Leu Thr Ser
 130 135 140

Asn Thr Val Gln Gln His Pro Ser Thr Pro Lys Arg His Thr Val Leu
 145 150 155 160

Tyr Ile Ser Pro Pro Pro Glu Asp Leu Leu Asp Asn Ser Arg Met Ser
 165 170 175

Cys Gln Asp Glu Gly Cys Gly Leu Glu Ser Glu Gln Ser Cys Ser Met
 180 185 190

Trp Met Glu Asp Ser Pro Ser Asn Phe Ser Asn Met Ser Thr Ser Ser
 195 200 205

Tyr Asn Asp Asn Thr Glu Val Pro Arg Lys Ser Arg Lys Arg Asn Pro
 210 215 220

Lys Gln Arg Pro Gly Val Lys Arg Arg Asp Cys Glu Glu Ser Asn Met
 225 230 235 240

Asp Ile Phe Asp Ala Asp Ser Ala Lys Ala Pro His Tyr Val Leu Ser
 245 250 255

ES 2 670 368 T3

Gln Leu Thr Thr Asp Asn Lys Gly Asn Ser Lys Ala Gly Asn Gly Thr
 260 265 270

Leu Glu Asn Gln Lys Gly Thr Gly Val Lys Lys Ser Pro Met Leu Cys
 275 280 285

Gly Gln Tyr Pro Val Lys Ser Glu Gly Lys Glu Leu Lys Ile Val Val
 290 295 300

Gln Pro Glu Thr Gln His Arg Ala Arg Tyr Leu Thr Glu Gly Ser Arg
 305 310 315 320

Gly Ser Val Lys Asp Arg Thr Gln Gln Gly Phe Pro Thr Val Lys Leu
 325 330 335

Glu Gly His Asn Glu Pro Val Val Leu Gln Val Phe Val Gly Asn Asp
 340 345 350

Ser Gly Arg Val Lys Pro His Gly Phe Tyr Gln Ala Cys Arg Val Thr
 355 360 365

Gly Arg Asn Thr Thr Pro Cys Lys Glu Val Asp Ile Glu Gly Thr Thr
 370 375 380

Val Ile Glu Val Gly Leu Asp Pro Ser Asn Asn Met Thr Leu Ala Val
 385 390 395 400

Asp Cys Val Gly Ile Leu Lys Leu Arg Asn Ala Asp Val Glu Ala Arg
 405 410 415

Ile Gly Ile Ala Gly Ser Lys Lys Lys Ser Thr Arg Ala Arg Leu Val
 420 425 430

Phe Arg Val Asn Ile Met Arg Lys Asp Gly Ser Thr Leu Thr Leu Gln
 435 440 445

Thr Pro Ser Ser Pro Ile Leu Cys Thr Gln Pro Ala Gly Val Pro Glu
 450 455 460

Ile Leu Lys Lys Ser Leu His Ser Cys Ser Val Lys Gly Glu Glu Glu
 465 470 475 480

Val Phe Leu Ile Gly Lys Asn Phe Leu Lys Gly Thr Lys Val Ile Phe
 485 490 495

ES 2 670 368 T3

Gln Glu Asn Val Ser Asp Glu Asn Ser Trp Lys Ser Glu Ala Glu Ile
 500 505 510

Asp Met Glu Leu Phe His Gln Asn His Leu Ile Val Lys Val Pro Pro
 515 520 525

Tyr His Asp Gln His Ile Thr Leu Pro Val Ser Val Gly Ile Tyr Val
 530 535 540

Val Thr Asn Ala Gly Arg Ser His Asp Val Gln Pro Phe Thr Tyr Thr
 545 550 555 560

Pro Asp Pro Ala Ala Gly Ala Leu Asn Val Asn Val Lys Lys Glu Ile
 565 570 575

Ser Ser Pro Ala Arg Pro Cys Ser Phe Glu Glu Ala Met Lys Ala Met
 580 585 590

Lys Thr Thr Gly Cys Asn Leu Asp Lys Val Asn Ile Ile Pro Asn Ala
 595 600 605

Leu Met Thr Pro Leu Ile Pro Ser Ser Met Ile Lys Ser Glu Asp Val
 610 615 620

Thr Pro Met Glu Val Thr Ala Glu Lys Arg Ser Ser Thr Ile Phe Lys
 625 630 635 640

Thr Thr Lys Ser Val Gly Ser Thr Gln Gln Thr Leu Glu Asn Ile Ser
 645 650 655

Asn Ile Ala Gly Asn Gly Ser Phe Ser Ser Pro Ser Ser Ser His Leu
 660 665 670

Pro Ser Glu Asn Glu Lys Gln Gln Gln Ile Gln Pro Lys Ala Tyr Asn
 675 680 685

Pro Glu Thr Leu Thr Thr Ile Gln Thr Gln Asp Ile Ser Gln Pro Gly
 690 695 700

Thr Phe Pro Ala Val Ser Ala Ser Ser Gln Leu Pro Asn Ser Asp Ala
 705 710 715 720

Leu Leu Gln Gln Ala Thr Gln Phe Gln Thr Arg Glu Thr Gln Ser Arg
 725 730 735

Glu Ile Leu Gln Ser Asp Gly Thr Val Val Asn Leu Ser Gln Leu Thr

ES 2 670 368 T3

740	745	750
Glu Ala Ser Gln Gln Gln Gln Gln Ser Pro Leu Gln Glu Gln Ala Gln 755 760 765		
Thr Leu Gln Gln Gln Ile Ser Ser Asn Ile Phe Pro Ser Pro Asn Ser 770 775 780		
Val Ser Gln Leu Gln Asn Thr Ile Gln Gln Leu Gln Ala Gly Ser Phe 785 790 795 800		
Thr Gly Ser Thr Ala Ser Gly Ser Ser Gly Ser Val Asp Leu Val Gln 805 810 815		
Gln Val Leu Glu Ala Gln Gln Gln Leu Ser Ser Val Leu Phe Ser Ala 820 825 830		
Pro Asp Gly Asn Glu Asn Val Gln Glu Gln Leu Ser Ala Asp Ile Phe 835 840 845		
Gln Gln Val Ser Gln Ile Gln Ser Gly Val Ser Pro Gly Met Phe Ser 850 855 860		
Ser Thr Glu Pro Thr Val His Thr Arg Pro Asp Asn Leu Leu Pro Gly 865 870 875 880		
Arg Ala Glu Ser Val His Pro Gln Ser Glu Asn Thr Leu Ser Asn Gln 885 890 895		
Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Val Met Glu Ser Ser Ala Ala 900 905 910		
Met Val Met Glu Met Gln Gln Ser Ile Cys Gln Ala Ala Ala Gln Ile 915 920 925		
Gln Ser Glu Leu Phe Pro Ser Thr Ala Ser Ala Asn Gly Asn Leu Gln 930 935 940		
Gln Ser Pro Val Tyr Gln Gln Thr Ser His Met Met Ser Ala Leu Ser 945 950 955 960		
Thr Asn Glu Asp Met Gln Met Gln Cys Glu Leu Phe Ser Ser Pro Pro 965 970 975		
Ala Val Ser Gly Asn Glu Thr Ser Thr Thr Thr Thr Gln Gln Val Ala 980 985 990		

ES 2 670 368 T3

Thr Pro Gly Thr Thr Met Phe Gln Thr Ser Ser Ser Gly Asp Gly Glu
 995 1000 1005

Glu Thr Gly Thr Gln Ala Lys Gln Ile Gln Asn Ser Val Phe Gln
 1010 1015 1020

Thr Met Val Gln Met Gln His Ser Gly Asp Asn Gln Pro Gln Val
 1025 1030 1035

Asn Leu Phe Ser Ser Thr Lys Ser Met Met Ser Val Gln Asn Ser
 1040 1045 1050

Gly Thr Gln Gln Gln Gly Asn Gly Leu Phe Gln Gln Gly Asn Glu
 1055 1060 1065

Met Met Ser Leu Gln Ser Gly Asn Phe Leu Gln Gln Ser Ser His
 1070 1075 1080

Ser Gln Ala Gln Leu Phe His Pro Gln Asn Pro Ile Ala Asp Ala
 1085 1090 1095

Gln Asn Leu Ser Gln Glu Thr Gln Gly Ser Leu Phe His Ser Pro
 1100 1105 1110

Asn Pro Ile Val His Ser Gln Thr Ser Thr Thr Ser Ser Glu Gln
 1115 1120 1125

Met Gln Pro Pro Met Phe His Ser Gln Ser Thr Ile Ala Val Leu
 1130 1135 1140

Gln Gly Ser Ser Val Pro Gln Asp Gln Gln Ser Thr Asn Ile Phe
 1145 1150 1155

Leu Ser Gln Ser Pro Met Asn Asn Leu Gln Thr Asn Thr Val Ala
 1160 1165 1170

Gln Glu Ala Phe Phe Ala Ala Pro Asn Ser Ile Ser Pro Leu Gln
 1175 1180 1185

Ser Thr Ser Asn Ser Glu Gln Gln Ala Ala Phe Gln Gln Gln Ala
 1190 1195 1200

Pro Ile Ser His Ile Gln Thr Pro Met Leu Ser Gln Glu Gln Ala
 1205 1210 1215

ES 2 670 368 T3

Gln Pro Pro Gln Gln Gly Leu Phe Gln Pro Gln Val Ala Leu Gly
 1220 1225 1230

Ser Leu Pro Pro Asn Pro Met Pro Gln Ser Gln Gln Gly Thr Met
 1235 1240 1245

Phe Gln Ser Gln His Ser Ile Val Ala Met Gln Ser Asn Ser Pro
 1250 1255 1260

Ser Gln Glu Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln
 1265 1270 1275

Gln Gln Gln Gln Gln Ser Ile Leu Phe Ser Asn Gln Asn Thr Met
 1280 1285 1290

Ala Thr Met Ala Ser Pro Lys Gln Pro Pro Pro Asn Met Ile Phe
 1295 1300 1305

Asn Pro Asn Gln Asn Pro Met Ala Asn Gln Glu Gln Gln Asn Gln
 1310 1315 1320

Ser Ile Phe His Gln Gln Ser Asn Met Ala Pro Met Asn Gln Glu
 1325 1330 1335

Gln Gln Pro Met Gln Phe Gln Ser Gln Ser Thr Val Ser Ser Leu
 1340 1345 1350

Gln Asn Pro Gly Pro Thr Gln Ser Glu Ser Ser Gln Thr Pro Leu
 1355 1360 1365

Phe His Ser Ser Pro Gln Ile Gln Leu Val Gln Gly Ser Pro Ser
 1370 1375 1380

Ser Gln Glu Gln Gln Val Thr Leu Phe Leu Ser Pro Ala Ser Met
 1385 1390 1395

Ser Ala Leu Gln Thr Ser Ile Asn Gln Gln Asp Met Gln Gln Ser
 1400 1405 1410

Pro Leu Tyr Ser Pro Gln Asn Asn Met Pro Gly Ile Gln Gly Ala
 1415 1420 1425

Thr Ser Ser Pro Gln Pro Gln Ala Thr Leu Phe His Asn Thr Ala
 1430 1435 1440

ES 2 670 368 T3

Gly Gly Thr Met Asn Gln Leu Gln Asn Ser Pro Gly Ser Ser Gln
 1445 1450 1455

Gln Thr Ser Gly Met Phe Leu Phe Gly Ile Gln Asn Asn Cys Ser
 1460 1465 1470

Gln Leu Leu Thr Ser Gly Pro Ala Thr Leu Pro Asp Gln Leu Met
 1475 1480 1485

Ala Ile Ser Gln Pro Gly Gln Pro Gln Asn Glu Gly Gln Pro Pro
 1490 1495 1500

Val Thr Thr Leu Leu Ser Gln Gln Met Pro Glu Asn Ser Pro Leu
 1505 1510 1515

Ala Ser Ser Ile Asn Thr Asn Gln Asn Ile Glu Lys Ile Asp Leu
 1520 1525 1530

Leu Val Ser Leu Gln Asn Gln Gly Asn Asn Leu Thr Gly Ser Phe
 1535 1540 1545

5 <210> 38
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> cebador de oligonucleótidos

<400> 38
 caagcttgac tagtcaatca attacggggt cattagttca t 41

15 <210> 39
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> cebador de oligonucleótidos

<400> 39
 agctagcaca ccgtacacgc ctaccg 26

25

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para expresar una proteína de interés en una célula en condiciones de hiperosmolalidad que comprende:
- 5 (A) introducir un polinucleótido en una célula en el que dicho polinucleótido comprende:
- (i) una molécula de ácido nucleico que comprende
- 10 al menos un elemento regulador transcripcional de respuesta a la ósmosis (OR-TRE) que comprende
- (a) al menos un potenciador transcripcional de respuesta a TonEBP que comprende la secuencia de ácido nucleico de 5'-(T/A/C)GGAA(A/T)NN(T/A/C)N(T/A/C)-3' (SEQ ID NO: 1), o potenciador transcripcional de respuesta a NFATc, que comprende la secuencia de ácido nucleico de 5'-(T/A/C)GGAA(C/G)(A/G)-3' (SEQ ID NO: 2) o 5'-(T/A/C)GGAAANN(T/A/C)N(T/A/C)-3' (SEQ ID NO: 4), enlazado funcionalmente a un regulador transcripcional, y
- 15 (b) al menos un potenciador transcripcional de respuesta a la proteína activadora (AP-1) que comprende la secuencia de ácido nucleico de 5'-TGA(C/G)TCA-3' (SEQ ID NO: 3),
- 20 enlazado funcionalmente a dicho potenciador transcripcional de respuesta a TonEBP o potenciador transcripcional de respuesta a NFATc, y
- una molécula de ácido nucleico adicional que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína o péptido que confiere una propiedad beneficiosa a las proteínas expresadas en las células, enlazada funcionalmente al regulador transcripcional, en la que dicho regulador transcripcional es un promotor que es activo de manera transcripcional en una célula eucariótica, y
- 25 (ii) un polinucleótido que codifica una segunda proteína de interés enlazada funcionalmente a un promotor; y
- 30 (B) cultivar la célula de tal manera que la expresión de la molécula de ácido nucleico de (i) imparta dicha propiedad beneficiosa a la proteína codificada por el polinucleótido de (ii) cuando dichas células se cultivan en condiciones de hiperosmolalidad,
- 35 en el que la proteína o péptido que confiere una propiedad beneficiosa a las proteínas expresadas en las células es una proteína antiapoptótica; una proteína que confiere resistencia al estrés oxidativo a una célula; una proteína chaperona implicada en facilitar el plegamiento de proteínas; una proteína implicada en la secreción extracelular de proteínas; una enzima glucolítica; una proteína de regulación del ciclo celular; una enzima de glucosilación; o cualquier combinación de las mismas.
- 40 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el al menos un potenciador transcripcional de respuesta a TonEBP comprende la secuencia de nucleótidos de 5'-(T/A/C)GGAAANN(T/A/C)N(T/A/C)-3' (SEQ ID NO: 4); y/o el al menos un potenciador transcripcional de respuesta a NFATc comprende la secuencia de ácido nucleico de 5'-TGGAAATTTGT-3' (SEQ ID NO: 5); y/o el al menos un potenciador transcripcional de respuesta a la proteína activadora 1 (AP-1) comprende la secuencia de nucleótidos de 5'-TGACTCA-3' (SEQ ID NO: 6).
- 45 3. El procedimiento de las reivindicaciones 1 o 2, en el que en la etapa (B) dichas células son células cultivadas inicialmente en condiciones de cultivo normales y, entonces, dicha osmolalidad se incrementa a una cantidad suficiente para incrementar la expresión de dicha segunda proteína de interés.
- 50 4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la osmolalidad se incrementa agregando a dicho cultivo un compuesto que incrementa dicha osmolalidad.
5. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que dicha segunda proteína de interés es tóxica para dicha célula.
- 55 6. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que dicha segunda proteína de interés es inestable.
7. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que dicha segunda proteína de interés es difícil de expresar en condiciones de cultivo normales.
- 60 8. El procedimiento de las reivindicaciones 1 o 2, en el que en la etapa (B) dichas células son células cultivadas inicialmente en condiciones de cultivo normales y que deja que el cultivo se vuelva hiperosmótico, de este

modo incrementando la expresión de dicha segunda proteína de interés.

9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que dicha segunda proteína de interés es tóxica para dicha célula.

10. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que dicha segunda proteína de interés es inestable.

11. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que dicha segunda proteína de interés es difícil de expresar en condiciones de cultivo normales.

12. Un procedimiento para expresar una proteína de interés en una célula en condiciones de hiperosmolalidad que comprende introducir un polinucleótido en una célula, en el que dicho polinucleótido comprende:

(A) una molécula de ácido nucleico que comprende

al menos un elemento regulador transcripcional de respuesta a la ósmosis (OR-TRE) que comprende

(a) al menos un potenciador transcripcional de respuesta a TonEBP que comprende la secuencia de ácido nucleico de $5'-(T/A/C)GGAA(A/T)NN(T/A/C)N(T/A/C)-3'$ (SEQ ID NO: 1), o potenciador transcripcional de respuesta a NFATc, que comprende la secuencia de ácido nucleico de $5'-(T/A/C)GGAA(C/G)(A/G)-3'$ (SEQ ID NO: 2) o $5'-(T/A/C)GGAAANN(T/A/C)N(T/A/C)-3'$ (SEQ ID NO: 4),

enlazado funcionalmente a un regulador transcripcional, y

(b) al menos un potenciador transcripcional de respuesta a la proteína activadora (AP-1) que comprende la secuencia de ácido nucleico de $5'-TGA(C/G)TCA-3'$ (SEQ ID NO: 3), enlazado funcionalmente a dicho potenciador transcripcional de respuesta a TonEBP o potenciador transcripcional de respuesta a NFATc, y

una molécula de ácido nucleico adicional que comprende

(i) una molécula de ácido nucleico que codifica proteínas que codifica una proteína de interés; y

(ii) una molécula de ácido nucleico regulador,

enlazada funcionalmente al regulador transcripcional, en la que dicho regulador transcripcional es un promotor que es activo de manera transcripcional en una célula eucariótica, y

(B) un polinucleótido que codifica una segunda proteína de interés enlazada funcionalmente a un segundo OR-TRE;

en el que dicha molécula de ácido nucleico de (A) codifica TonEBP; y en el que, en condiciones de osmolalidad incrementada, se expresa dicha molécula de ácido nucleico de (A), de este modo expresando la proteína TonEBP, y en el que dicha proteína TonEBP regula positivamente la expresión de TonEBP y dicha segunda proteína de interés.

13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que el al menos un potenciador transcripcional de respuesta a TonEBP comprende la secuencia de nucleótidos de $5'-(T/A/C)GGAAANN(T/A/C)N(T/A/C)-3'$ (SEQ ID NO: 4); y/o el al menos un potenciador transcripcional de respuesta a NFATc comprende la secuencia de ácido nucleico de $5'-TGGAAATTTGT-3'$ (SEQ ID NO: 5); y/o el al menos un potenciador transcripcional de respuesta a la proteína activadora 1 (AP-1) comprende la secuencia de nucleótidos de $5'-TGACTCA-3'$ (SEQ ID NO: 6).

14. El procedimiento de las reivindicaciones 12 o 13, en el que dicha segunda proteína de interés es una proteína de protección frente a la ósmosis.

15. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que dicha proteína de protección frente a la ósmosis es una prolina o una glicina-betaína, un transportador de taurina, un transportador de glicina betaína-ácido γ -aminobutírico, un cotransportador de sodio-mioinositol, una proteína de choque térmico, una acuaporina, una aldosa reductasa o una esterasa diana de neuropatía (NTE).

16. El procedimiento de las reivindicaciones 12 o 13, en el que dicha segunda proteína de interés es una proteína que imparte una propiedad beneficiosa a las proteínas expresadas por dichas células, y en el que dicha proteína que imparte una propiedad beneficiosa es una proteína antiapoptótica; una proteína que confiere resistencia al estrés oxidativo a una célula; una proteína chaperona implicada en facilitar el plegamiento de proteínas; una proteína implicada en la secreción extracelular de proteínas; una enzima glucolítica; una proteína de regulación del

ciclo celular; una enzima de glucosilación; o cualquier combinación de las mismas.

17. El procedimiento de la reivindicación 16 que comprende adicionalmente un tercer ácido nucleico que codifica una tercera proteína de interés enlazada funcionalmente a un promotor, en el que dicha proteína que imparte una propiedad beneficiosa actúa sobre dicha tercera proteína de interés.
- 5

Figura 1a

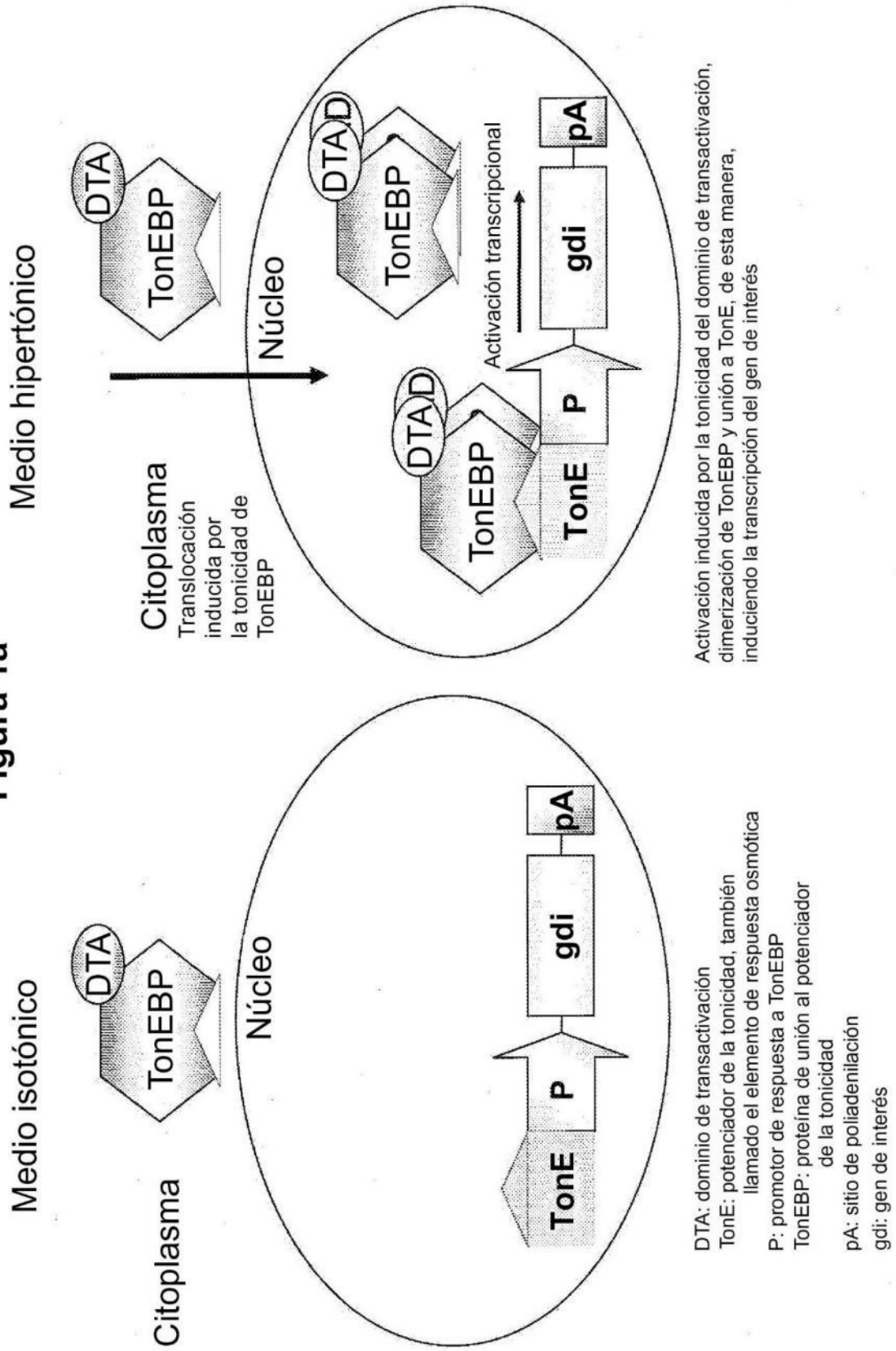


Figura 1b

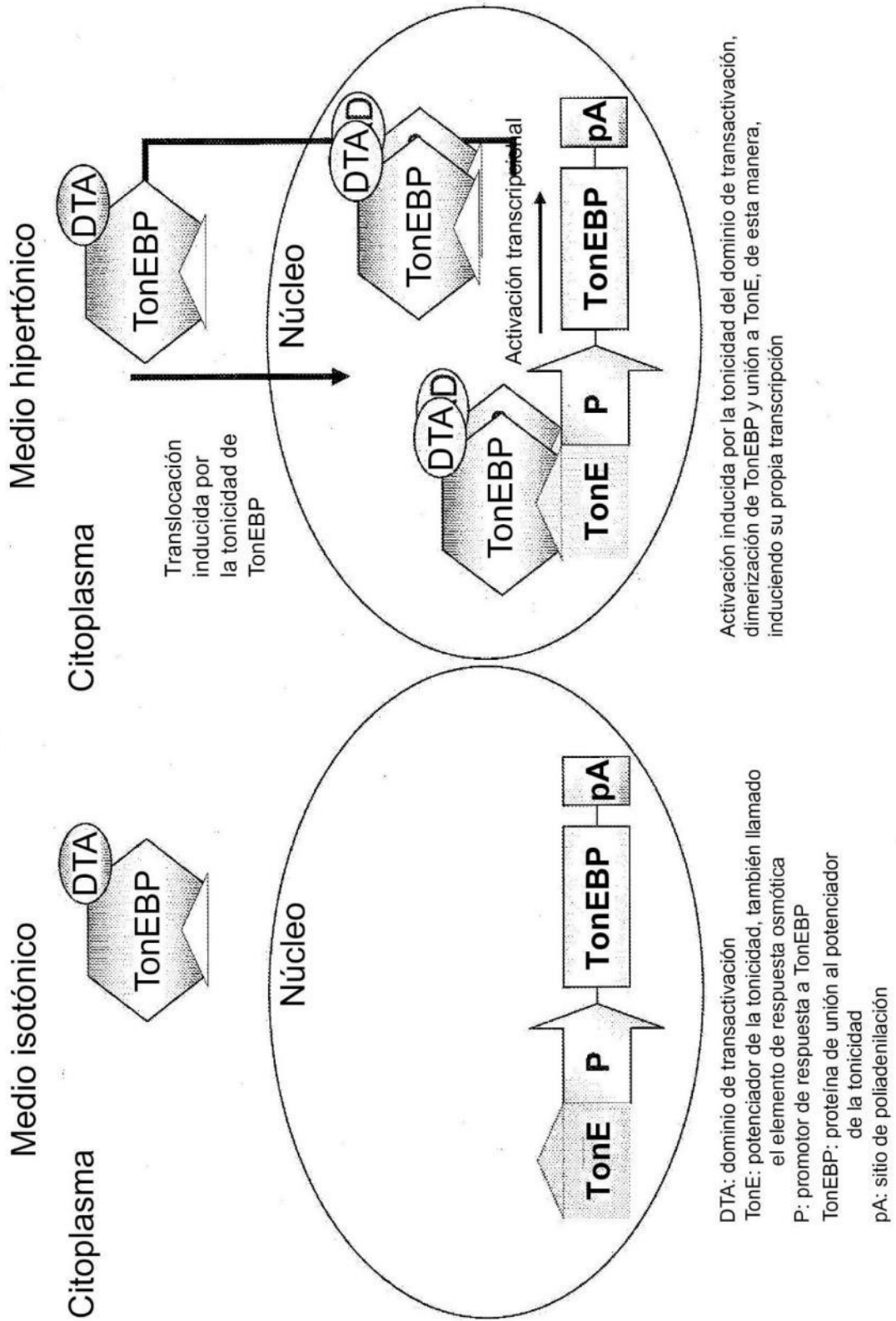


Figura 2

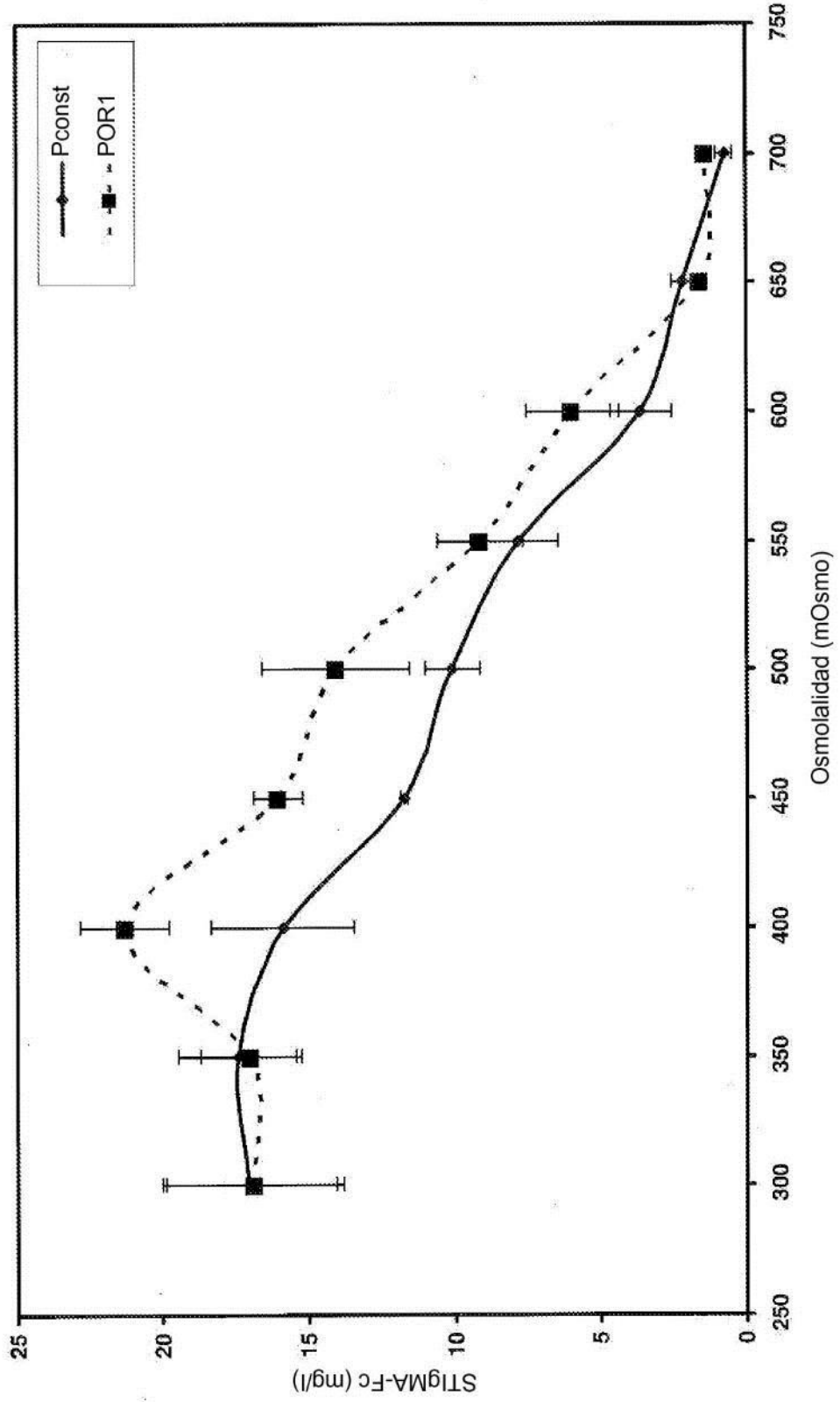


Figura 3

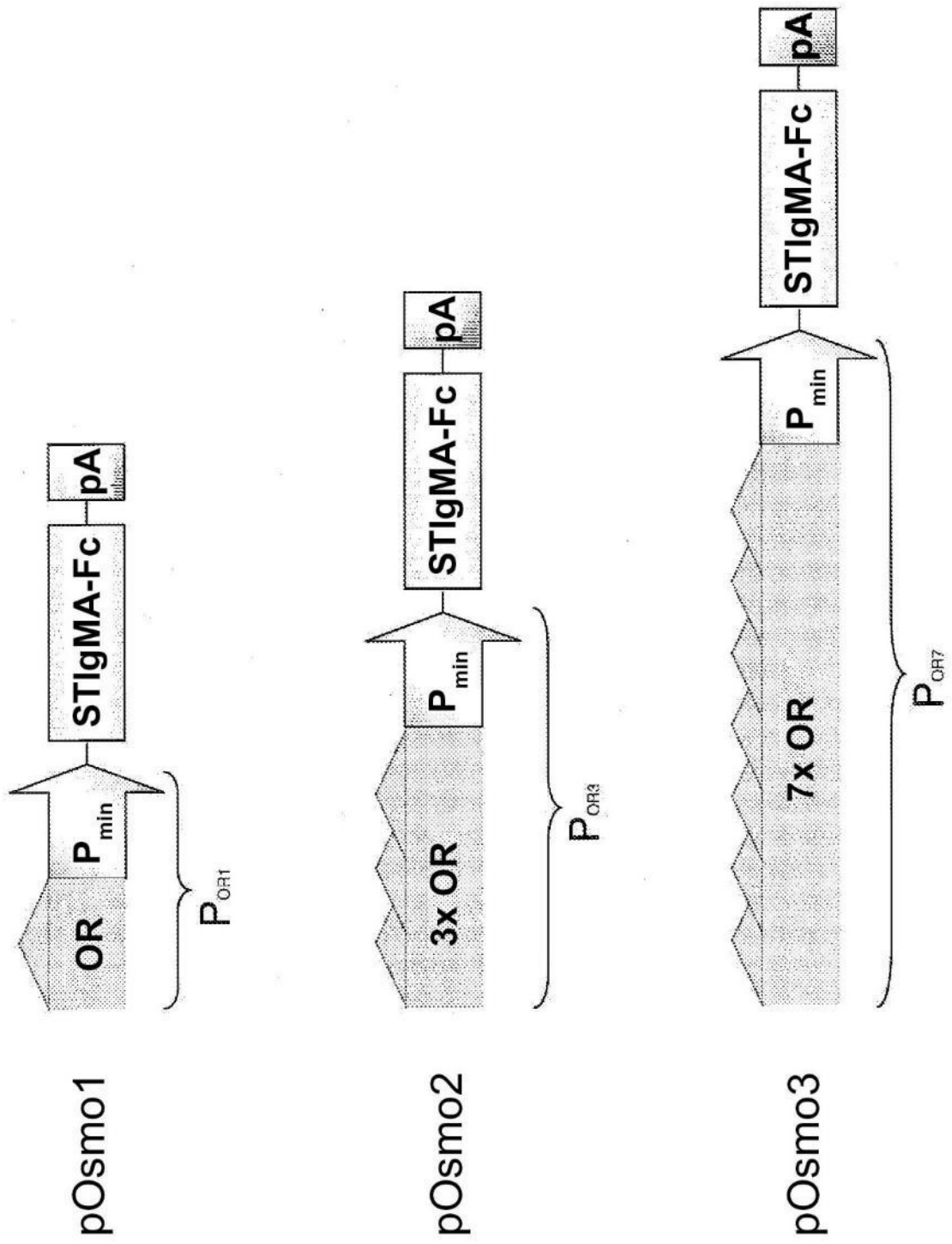


Figura 4

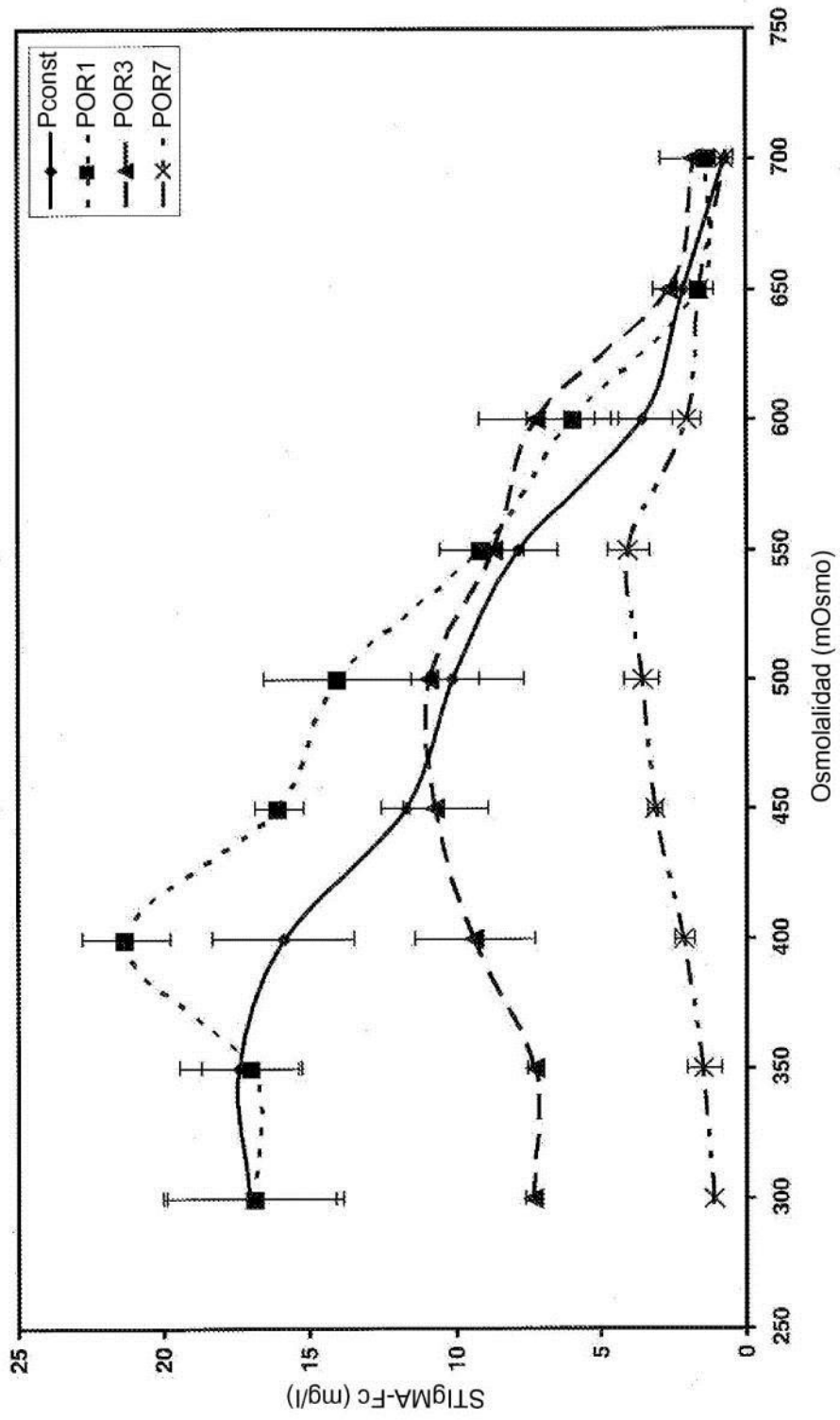


Figura 5

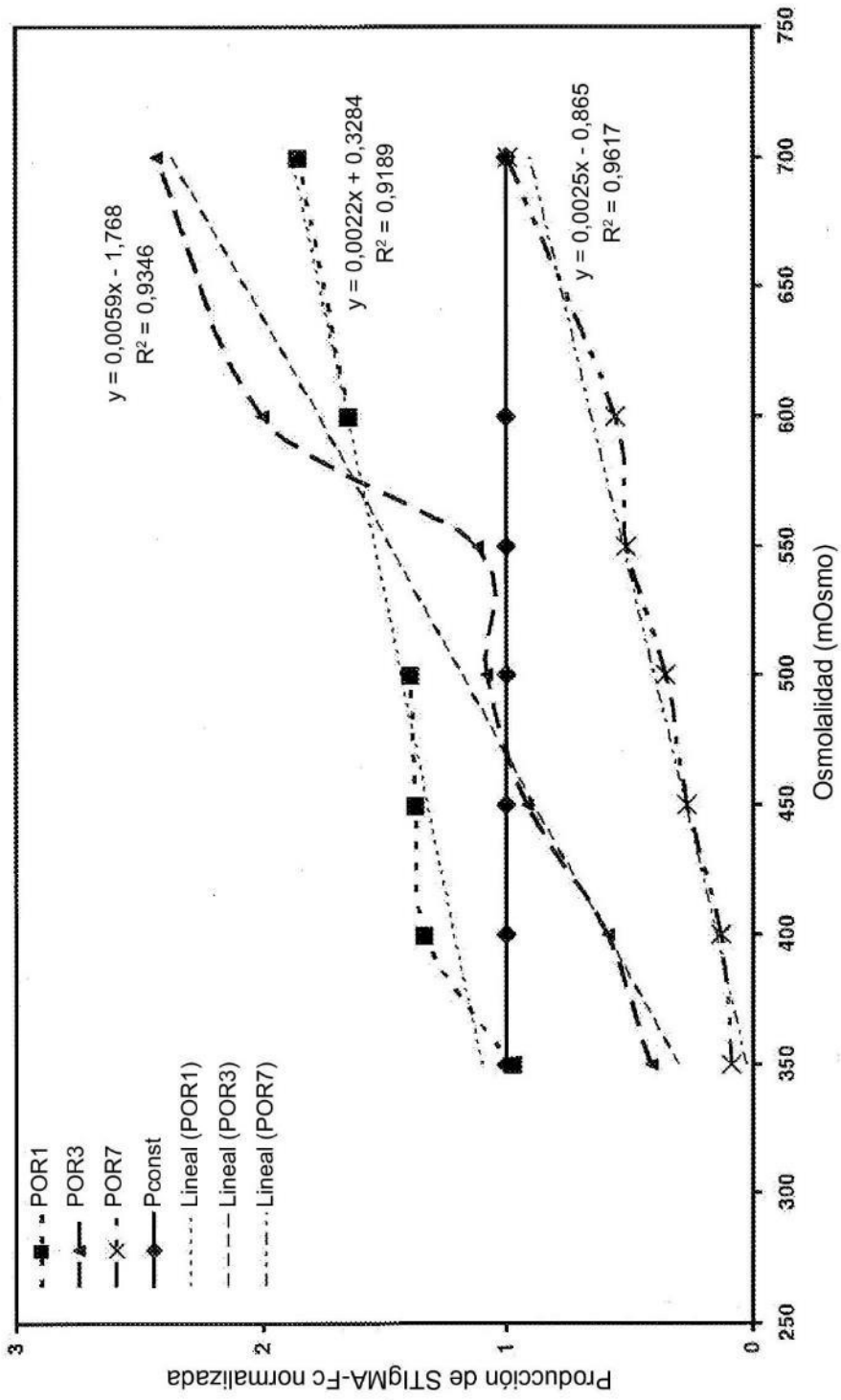


Figura 6

