

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 694 778**

51 Int. Cl.:

C12N 15/85

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.09.2013** **PCT/EP2013/069715**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.03.2014** **WO14044845**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.09.2013** **E 13773651 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.08.2018** **EP 2898077**

54 Título: **Vectores de expresión que comprenden secuencias promotoras y potenciadoras químicas de citomegalovirus**

30 Prioridad:

24.09.2012 EP 12185728

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

27.12.2018

73 Titular/es:

**LONZA BIOLOGICS PLC. (100.0%)
228-230 Bath Road
Slough, Berkshire SL1 4DX, GB**

72 Inventor/es:

**PAYNE, TOM;
YOUNG, ROBERT y
FEARY, MARC**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 694 778 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

Vectores de expresión que comprenden secuencias promotoras y potenciadoras quiméricas de citomegalovirus

Campo de la invención

La presente invención se refiere a sistemas de expresión en mamíferos, y en particular a construcciones de expresión que comprenden secuencias reguladoras de promotores quiméricos para la expresión heteróloga de una secuencia de ácidos nucleicos de interés en células de mamíferos. Las secuencias reguladoras de promotores quiméricos están compuestas de una secuencia promotora procedente del promotor de IE1 del citomegalovirus humano que consiste en la SEQ ID NO: 5 y una secuencia potenciadora procedente de la región IE1 del citomegalovirus de simio o que representa una quimera procedente de las regiones IE1 del citomegalovirus humano y de simio, comprendiendo la secuencia potenciadora la SEQ ID NO: 6.

Antecedentes

Los (poli)péptidos y proteínas recombinantes para aplicaciones en investigación básica, en diagnóstico y terapia, tales como moléculas de anticuerpos, vacunas, hormonas y factores de crecimiento, se producen utilizando una amplia variedad de organismos modificados genéticamente que incluyen tanto células procariotas como eucariotas. Sin embargo, la gran mayoría de péptidos o proteínas recombinantes incluyen modificaciones postraduccionales que no pueden ser imitadas ni reproducidas cuando se usan células hospedantes procariotas. Por esta razón, los sistemas de expresión génica de mamíferos han dejado de representar una opción preferida.

Los sistemas de expresión de mamíferos basados en células de ovario de hámster chino (CHO) se usan ampliamente en la producción de proteínas recombinantes. Además de las líneas celulares linfoides, las células de CHO representan uno de los pocos tipos de células que permiten un cultivo sencillo y eficaz por lotes en suspensión de alta densidad de células animales. Además, el uso de células de CHO da como resultado altos rendimientos del producto, mientras que las células linfoides son más difíciles de cultivar a escala industrial. En vista de los costos considerables para la producción recombinante de polipéptidos y proteínas, también es de suma importancia maximizar el rendimiento de la proteína recombinante por operación del biorreactor. Los parámetros del proceso que tienen un impacto considerable sobre el rendimiento del producto incluyen, entre otros, las condiciones del cultivo celular, el número de copias de los ácidos nucleicos (genes) que se han de expresar, la eficiencia con la que estos genes son transcritos y los mRNA correspondientes que se traducen, la estabilidad del mRNA, y similares.

Por consiguiente, las mejoras de la fuerza o actividad transcripcional de los elementos genéticos reguladores que controlan la expresión génica constituyen un factor particularmente crítico para aumentar el rendimiento de la proteína recombinante producida. Incluso pequeños aumentos progresivos en la actividad transcripcional solo a nivel celular se traducirán finalmente en mejoras considerables en el rendimiento del producto en cultivos por lotes de alta densidad a escala industrial.

La gran mayoría de los sistemas de expresión génica de mamíferos emplea vectores de expresión que codifican las secuencias de ácidos nucleicos heterólogas que se han de expresar bajo el control de secuencias reguladoras promotoras procedentes de virus. Dos de los elementos reguladores virales más frecuentemente utilizados en estos casetes de expresión son los de los genes tempranos inmediatos 1 y 2 (IE1 e IE2) del citomegalovirus humano (hCMV). Sin embargo, una desventaja asociada al uso de los elementos reguladores IE1 e IE2 de hCMV es su pronunciada especificidad de especies.

La patente de EE.UU. 5.866.359 describe que la expresión génica de dicho promotor de hCMV se puede mejorar coexpresando la proteína E1A adenovírica bajo el control de un promotor débil. E1A es un factor de transcripción multifuncional que puede actuar sobre la regulación del ciclo celular y tiene dominios tanto activadores transcripcionales independientes como funcionales represores. El ajuste fino de la expresión de E1A es crucial para lograr el equilibrio ideal entre la transactivación génica y cualquier impacto negativo sobre la progresión del ciclo celular. Sin embargo, la sobreexpresión de la expresión de E1A podría reducir la capacidad de la célula para sintetizar la proteína recombinante de interés.

La patente de EE.UU. 5.591.639 describe vectores que comprenden, aguas arriba (5') de una secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que se ha de expresar, el potenciador, el promotor y la región no traducida en 5' completa del principal gen temprano inmediato del citomegalovirus humano (hCMV-MIE), incluyendo el intrón A (es decir, el primer intrón natural). Sin embargo, si estaban presentes las primeras 400 pb (extremo 5') de esta secuencia (longitud total de aproximadamente 2100 pb), se observaban bajas tasas de expresión génica tanto en células COS7 como en células de CHO (Chapman, B.S. et al., (1991) *Nucl. Acids Res.* **19**, 3979-3986).

La actividad transcripcional de los elementos reguladores de los genes tempranos inmediatos del citomegalovirus de múrido (mCMV) es mayor que la de los correspondientes de hCMV sin presentar la preferencia de especies pronunciada observada para las secuencias humanas (Addison, C.L. et al., (1987). *J. Gen. Virol.* **78**, 1653-1661).

La publicación de patente internacional WO 2004/081167 describe vectores de expresión que comprenden el promotor IE2 de mCMV que se puede usar en combinación con un elemento potenciador de IE2 de mCMV. Keil y

colaboradores (Keil, G.M. et al., (2009) *J. Virol. Meth.* **160**, 132-137) describieron vectores de expresión para la expresión simultánea de proteínas duales de alto nivel en células de vertebrados e insectos empleando elementos promotores y potenciadores de IE1 de mCMV en combinación con un promotor de baculovirus. Finalmente, en la solicitud de patente europea EP 0314161 se describen construcciones de promotores quiméricos que comprenden

secuencias promotoras y potenciadoras, cada una de ellas de genes IE del citomegalovirus de origen humano, de murino o de simio.

Sin embargo, fracasaron los intentos para mejorar la actividad de los elementos reguladores del promotor de IE de mCMV, análogamente a los correspondientes de hCMV, por la inserción del primer intrón natural del principal gen temprano inmediato de murino aguas abajo (3') del promotor de IE de mCMV (véase, entre otros, la patente EP 1525320 B1). Sin embargo, la generación de vectores de expresión que comprende un casete quimérico compuesto por los elementos reguladores de IE1 de mCMV y el primer intrón natural del principal gen temprano inmediato humano dio como resultado rendimientos de producto comparables al uso de las secuencias completamente humanas (véase, por ejemplo, WO 2006/111387 A2). También se obtuvieron tasas de expresión génica similares para los vectores de expresión que comprendían las secuencias reguladoras de IE2 de mCMV (véase, entre otros, la patente EP 1601776 B1).

Por tanto, sigue existiendo la necesidad de sistemas mejorados de expresión génica de mamíferos que den como resultado altos rendimientos de los polipéptidos o las proteínas recombinantes producidos. En particular, existe la necesidad de sistemas de expresión génica de mamíferos que superen las limitaciones antes mencionadas, es decir, sistemas de expresión basados en las secuencias promotoras de mCMV o de hCMV pero que logren mayores tasas de expresión (y, por lo tanto, rendimientos de producto) que con los sistemas disponibles.

Por consiguiente, es un objeto de la presente invención proporcionar dichos sistemas de expresión génica, principalmente construcciones de expresión adecuadas y las correspondientes células hospedantes de mamíferos.

Sumario de la invención

En un aspecto, la presente invención se refiere a un vector de expresión para la expresión heteróloga de una secuencia de ácidos nucleicos de interés en células de mamífero, comprendiendo el vector una primera secuencia reguladora del promotor quimérico que está unida operativamente a una primera secuencia de ácidos nucleicos que se ha de expresar, en donde la secuencia reguladora del promotor quimérico comprende:

i) una secuencia promotora del promotor de IE1 del citomegalovirus humano que consiste en la SEQ ID NO: 5 y que está unida operativamente al sitio de iniciación de la transcripción de la secuencia de ácidos nucleicos que se ha de expresar; y

ii) una secuencia potenciadora de la región IE1 del citomegalovirus de simio o que representa una quimera de la región IE1 del citomegalovirus humano y de simio, estando situada la secuencia potenciadora en 5' y unida operativamente a la secuencia promotora humana, en donde la secuencia potenciadora comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 6.

En realizaciones particularmente preferidas, la secuencia reguladora del promotor quimérico comprende una secuencia de nucleótidos que se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 12 y la SEQ ID NO: 13.

En otras realizaciones particulares, el vector de expresión comprende además una segunda secuencia reguladora del promotor quimérico que está unida operativamente a una segunda secuencia de ácidos nucleicos que se ha de expresar, en donde la segunda secuencia reguladora del promotor quimérico es idéntica a la primera secuencia reguladora del promotor quimérico.

En realizaciones particulares alternativas, el vector de expresión comprende además una segunda secuencia reguladora del promotor quimérico que está unida operativamente a una segunda secuencia de ácidos nucleicos que se ha de expresar, en donde la segunda secuencia reguladora del promotor quimérico es diferente de la primera secuencia reguladora del promotor quimérico.

Preferiblemente, la primera y segunda secuencias de ácidos nucleicos que se han de expresar codifican diferentes polipéptidos. En realizaciones específicas, los diferentes polipéptidos representan subunidades de una proteína dimérica o multimérica. De manera particularmente preferible, la proteína dimérica o multimérica es una molécula de anticuerpo.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una célula hospedante de mamífero transfectada con un vector de expresión, como se ha definido antes en la presente memoria. Preferiblemente, la célula hospedante es una célula de CHO.

Todavía en otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para la expresión heteróloga de una secuencia de ácidos nucleicos de interés en una célula hospedante de mamífero, que comprende:

- i) transfectar la célula hospedante de mamífero con un vector de expresión, como se ha definido antes en la presente memoria; y
- ii) cultivar la célula hospedante de mamífero transfectada en condiciones que permitan la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos de interés.

5 En realizaciones preferidas, la transfección es una transfección estable.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de un vector de expresión, como se ha definido antes en la presente memoria, para la expresión heteróloga *in vitro* de una secuencia de ácidos nucleicos de interés en una célula hospedante de mamífero.

Otras realizaciones de la presente invención llegarán a ser evidentes a partir de la descripción detallada siguiente.

10 Descripción de los dibujos

La **Figura 1** ilustra el vector de expresión pRY42 (SEQ ID NO: 1) utilizado como “vector precursor” para generar los vectores de expresión de mamíferos, como se define en la presente memoria. El pRY42 abarca dos casetes reguladores para dirigir la expresión génica heteróloga (entre “mCMV” y “pA”, respectivamente): Múltiples sitios de clonación situados en 3’ (es decir, “aguas abajo”) de las regiones “Ex2” para la inserción de secuencias de ácidos nucleicos heterólogos que se han de expresar. Los casetes reguladores están flanqueados por sitios diana de reconocimiento de lipasa de tipo natural (“wFRT”) y mutantes (“F5-mFRT”). Se ha añadido un codón de metionina de iniciación en marco al extremo 5’ del sitio wFRT (“ATG+F”). Un promotor temprano de SV40 (“SV”) está localizado en 5’ (“aguas arriba”) de ATG+F. La transcripción de secuencias de ácidos nucleicos heterólogas es dirigida por el promotor del gen IE1 del citomegalovirus de múrido (“mCMV”) que va seguido por 5’UTR, donde el exón 1 (“Ex1”) es un híbrido de secuencias derivadas de CMV de múrido (“m”) y humano (“h”), y donde el exón 2 (“Ex2”) y la secuencia del intrón A (“Int A”) proceden de la secuencia de hCMV. El gen marcador de selección de β -lactamasa se denomina “bla”. El pRY42 se usa como vector diana para clonar las diferentes secuencias reguladoras del promotor quimérico, como se define en la presente memoria.

La **Figura 2** ilustra el vector de expresión pRY57 (SEQ ID NO: 2) que codifica la cadena ligera (“CL”) y la cadena pesada (“CP”) del anticuerpo monoclonal quimérico de ratón-humano (mAb) cB72.3 (Whittle, N. et al., (1987) *Protein Eng.* 1, 499-505), cada una situada entre los sitios de clonación 3’ de las regiones “Ex2” y los sitios de poliadenilación (“pA”), respectivamente. Por lo demás, el pRY57 es idéntico al pRY42. Las secuencias de ácidos nucleicos de CL y CP de pRY57 se separaron y clonaron en variantes de pRY42 en las que la secuencia promotora del mCMV original fue reemplazada por las diferentes secuencias reguladoras del promotor quimérico, como se define en la presente memoria.

La **Figura 3** representa esquemáticamente la secuencia promotora del mCMV original (SEQ ID NO: 3) incluida en pRY42 (parte superior) así como cinco secuencias reguladoras de diferentes promotores quiméricos (construcciones “1 a 5”), principalmente SEQ ID NO: 7 a SEQ ID NO: 11, respectivamente, que no forman parte de la presente invención, y que comprenden secuencias promotoras de IE1 de CMV de múrido (mCMV) situadas en 3’ de elementos potenciadores procedentes de la región IE1 de CMV de simio (sCMV) y/o humano (hCMV). Además, se muestran dos secuencias reguladoras adicionales del promotor quimérico (construcciones “6 y 7”), como se definen en la presente memoria (SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13), que comprenden secuencias promotoras de IE1 de hCMV situadas en 3’ de elementos potenciadores procedentes de la región IE1 de sCMV de simio y/o hCMV humano. Todas las secuencias promotoras de mCMV y hCMV empleadas específicamente en la presente invención incluyen en sus extremos 3’ un nucleótido de guanosina (“G”) adicional, que representa el sitio de iniciación de la transcripción.

La **Figura 4** muestra una comparación de las concentraciones de mAb cB72.3 producido en líneas de CHO estables donde la expresión génica de las secuencias del mAb estaba bajo el control de las construcciones quiméricas 1 a 5 (que no forman parte de la presente invención), como se ilustra en la Figura 3. La determinación se realizó por HPLC con proteína A después de 15 días de crecimiento en 50 mL de medio de cultivo en un matraz E250 con agitación utilizando un protocolo de sobrecrecimiento alimentado en lotes (abreviadamente FOG, por la expresión inglesa *Fed Batch Overgrow*). Para cada una de las construcciones quiméricas, n = 4, que representa análisis de lotes alimentados por duplicado para las transfecciones por duplicado, con la excepción de la construcción 4, donde n = 6 (análisis FOG duplicados para las transfecciones por triplicado) y pRY57 (mCMV original), donde n = 8, combinándose los puntos de datos de los experimentos 1 y 2.

La **Figura 5** muestra una comparación de las concentraciones del mAb cB72.3 producidas en líneas de CHO estables en donde la expresión génica de las secuencias del mAb estaba bajo el control de las construcciones quiméricas 6 y 7, como se ilustra en la Figura 3. La determinación se realizó por HPLC con proteína A después de 7 días de crecimiento en 30 mL de medio de cultivo en un matraz E125 con agitación utilizando un protocolo de sobrecrecimiento en lotes (abreviadamente BOG por la expresión inglesa *Batch OverGrow*). Para mCMV y la construcción 7, n = 6 (análisis de lotes por duplicado para transfecciones por triplicado), y para la construcción 6, n = 4 (análisis de lotes por duplicado para transfecciones por duplicado).

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento inesperado de que los vectores de expresión de mamíferos que comprenden secuencias reguladoras del promotor quimérico (es decir, híbridas) que están compuestas de una secuencia promotora de IE1 de hCMV particular en unión operativa al sitio de iniciación de la transcripción de la secuencia de ácidos nucleicos que se ha de expresar y una secuencia potenciadora de IE1 de sCMV o de IE1 de sCMV/hCMV que está localizada en 5' y unida operativamente a la secuencia promotora de mCMV o de hCMV dio como resultado tasas de expresión génica significativamente mejoradas en comparación con los sistemas de expresión existentes solo basados en secuencias promotoras de mCMV, y por tanto también con rendimientos mucho mayores (hasta un aumento de casi 3 veces) de las proteínas recombinantes producidas.

Por consiguiente, los vectores de expresión de mamíferos como se definen en la presente memoria representan herramientas moleculares superiores para la producción de proteínas recombinantes, particularmente a escala industrial.

Cuando el término "que comprende" se usa en la presente descripción y en las reivindicaciones, no excluye otros elementos o etapas. Para los fines de la presente invención, el término "que consiste en" se considera que es una realización preferida del término "que comprende". Si en lo sucesivo un grupo se define como que comprende al menos cierto número de realizaciones, también debe entenderse que describe un grupo, que consiste preferiblemente solo en estas realizaciones.

Cuando se usa un artículo indefinido o definido en referencia a un sustantivo singular, por ejemplo, "un", "una" o "el", incluye un plural de ese sustantivo a menos que se especifique lo contrario.

En el caso de que en el contexto de la presente invención se indiquen valores numéricos, el experto en la técnica entenderá que el efecto técnico de la característica en cuestión se garantiza dentro de un intervalo de precisión, que abarca típicamente una desviación del valor numérico dado de $\pm 10\%$, y preferiblemente de $\pm 5\%$.

Además, los términos primero, segundo, tercero, (a), (b), (c) y similares, en la descripción y en las reivindicaciones, se usan para distinguir entre elementos similares y no necesariamente para describir un orden secuencial o cronológico. Debe entenderse que los términos utilizados de esta manera son intercambiables en circunstancias apropiadas y que las realizaciones de la invención descritas en la presente memoria son capaces de funcionar en otras secuencias distintas de las descritas o ilustradas en la presente memoria.

A continuación, se darán definiciones adicionales de un término en el contexto en el que se usan los términos. Los siguientes términos o definiciones se proporcionan únicamente para ayudar en la comprensión de la invención. Estas definiciones no se deben considerar de modo que tengan un alcance menor que el que entiende una persona con experiencia ordinaria en la técnica.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un vector de expresión para la expresión heteróloga de una secuencia de ácidos nucleicos de interés en células de mamífero, comprendiendo el vector una primera secuencia reguladora del promotor quimérico que está unida operativamente a una primera secuencia de ácidos nucleicos que se ha de expresar, en donde la secuencia reguladora del promotor quimérico comprende:

i) una secuencia promotora del promotor de IE1 de citomegalovirus humano que consiste en la SEQ ID NO: 5 y que está unida operativamente al sitio de iniciación de la transcripción de la secuencia de ácidos nucleicos que se ha de expresar; y

ii) una secuencia potenciadora de la región IE1 del citomegalovirus de simio o que representa una quimera de las regiones IE1 del citomegalovirus humano y de simio, estando localizada en 5' la secuencia potenciadora y unida operativamente a la secuencia promotora humana, en donde la secuencia potenciadora comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 6.

En otras palabras, la disposición de que la secuencia reguladora del promotor quimérico, como se define en la presente memoria, comprende elementos de secuencia tanto del citomegalovirus humano como del citomegalovirus de simio asegura que el objeto reivindicado no incluye ninguna construcción quimérica derivada únicamente del citomegalovirus humano.

El término "vector de expresión", como se usa en la presente memoria, denota un vehículo de ácidos nucleicos (plásmido) que se caracteriza por la presencia de al menos un "casete de expresión". El término "casete de expresión", como se usa en la presente memoria, se refiere a una construcción genética que es capaz de permitir la expresión génica de una secuencia de ácidos nucleicos de interés (es decir, una secuencia de ácidos nucleicos "heteróloga"). Esto requiere que dicho casete de expresión comprenda elementos de secuencia reguladores que contienen información con relación a la regulación transcripcional y/o traduccional, y que dichas secuencias reguladoras estén "unidas operativamente" a la secuencia de ácidos nucleicos de interés. Una unión operativa es una unión en la que los elementos de secuencia reguladores y la secuencia de ácidos nucleicos que se ha de expresar están conectados de modo que se permita la expresión génica.

La naturaleza precisa de las regiones reguladoras de un “casete de expresión” que son necesarias para controlar y dirigir la expresión génica puede variar entre especies, pero en general estas regiones comprenden secuencias reguladoras del promotor (es decir, una región de secuencia localizada en 5’ (“aguas arriba”) de la secuencia de ácidos nucleicos de interés) y secuencias reguladoras no traducidas en 3’ (es decir, una región de secuencia localizada en 3’ (“aguas abajo”) de la secuencia de ácidos nucleicos de interés).

El término “promotor”, (también denominado “promotor mínimo”), como se usa en la presente memoria, denota elementos de secuencia que dirigen *per se* la iniciación de la transcripción (por ejemplo, sitios de unión para factores de transcripción y para RNA-polimerasa dependiente de DNA, caja TATA, secuencias CAAT y elementos protectores de 5’). Siempre que esta funcionalidad de promover la iniciación de la transcripción sea retenida o sustancialmente retenida (por ejemplo, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 95% de la actividad de tipo natural, es decir, la actividad de una secuencia de longitud completa), cualquier variante truncada, mutada o modificada de cualquier otra manera de una secuencia promotora de tipo natural (que existe en la naturaleza) también está dentro de la definición anterior. Como se usa en la presente memoria, el término “promotor mínimo” se refiere a una secuencia de longitud mínima que retiene la actividad del promotor. Como se usa en la presente memoria, la secuencia promotora está unida operativamente al sitio de iniciación de la transcripción de la secuencia de ácidos nucleicos que se ha de expresar.

Los vectores de expresión de la presente invención, como se especifica en la reivindicación 1, comprenden (como parte de un casete de expresión) una primera secuencia reguladora del promotor (quimérico) (es decir, al menos una de dichas secuencias), que, a su vez, abarca una secuencia promotora (mínima) particular del promotor de IE1 del citomegalovirus humano (hCMV) (You, C.Y. et al., (1992) *Intervirology* **34**, 94-104; Klucher, K.M. et al., (1993) *Mol. Cell. Biol.* **13**, 1238-1250).

El promotor de IE1 de hCMV es muy conocido en la técnica y puede obtenerse fácilmente del genoma de hCMV depositado en la base de datos de genomas virales de NCBI con el número de registro NC_006273 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/GenomesHome>; *supra*).

La secuencia del promotor de IE1 de hCMV comprendida en los vectores de expresión definidos en la presente memoria tiene (es decir, consiste en) una secuencia de ácidos nucleicos con una longitud de 117 pb (también denominada “promotor mínimo”) como se muestra en la SEQ ID NO: 5.

```
1 gcaccaaatt caacgggact ttccaaatg tcgtaacaac tccgccccat
51 tgacgcaaatt gggcggtagg cgtgtacggt gggaggtcta tataagcaga
101 gctcggttag tgaaccg
```

La SEQ ID NO: 5 incluye en su extremo 3’ un nucleótido de guanosina (“G”) adicional, que representa el sitio de iniciación de la transcripción.

Además, las secuencias reguladoras del promotor de un casete de expresión comprenden generalmente una secuencia “potenciadora”. El término “potenciadora”, como se usa en la presente memoria, denota elementos de secuencia que aumentan, perfeccionan o mejoran la transcripción de una secuencia de ácidos nucleicos independientemente de su localización y orientación con relación a la secuencia de ácidos nucleicos que se ha de expresar. Un potenciador puede potenciar la transcripción a partir de un solo promotor o simultáneamente a partir de más de un promotor. Siempre que esta funcionalidad de mejora de la transcripción sea retenida o sustancialmente retenida (por ejemplo, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 95% de la actividad de tipo natural, es decir, la actividad de una secuencia de longitud completa), cualquier variante truncada, mutada o modificada de otra manera de una secuencia potenciadora de tipo natural (que existe en la naturaleza) también se encuentra dentro de la definición anterior.

Los vectores de expresión de la presente invención, como se especifica en la reivindicación 1, comprenden (como parte de un casete de expresión) en su primera secuencia reguladora del promotor (quimérico) respectiva una secuencia potenciadora particular procedente de la región IE del citomegalovirus de simio (sCMV) o que representa una quimera de las regiones IE1 del citomegalovirus humano (hCMV) y del citomegalovirus de simio (sCMV) (Meier, J.L. and Stinski, M.F. (1996) *Intervirology* **39**, 331-342; Kim, G.Y. et al., (2011) *Biotechnol. Lett.* **33**, 1319-1326). En otras palabras, dentro de la presente invención, la secuencia reguladora del promotor puede comprender una secuencia potenciadora únicamente procedente de sCMV o una secuencia potenciadora quimérica compuesta de secuencias procedentes de hCMV y sCMV. Dentro de la secuencia reguladora del promotor, las secuencias potenciadoras están localizadas en 5’ (es decir, “aguas arriba”) de las secuencias del promotor (mínimo) de hCMV y están unidas operativamente a la secuencia del promotor humano. Típicamente, las secuencias potenciadoras están dispuestas en la misma orientación que las secuencias promotoras. Sin embargo, en realizaciones específicas, las secuencias de la región aguas arriba y/o potenciadoras están dispuestas en orientación inversa con relación a las secuencias promotoras.

Las secuencias potenciadoras de IE1 de hCMV y/o sCMV son muy conocidas en la técnica y pueden obtenerse fácilmente de los genomas de hCMV y sCMV depositados en la base de datos de genomas virales del NCBI bajo los números de registro X17403.1 y U38308.1, respectivamente.

- 5 La secuencia potenciadora comprendida en los vectores de expresión como se especifica en la reivindicación 1, comprende la secuencia de nucleótidos con una longitud de 452 pb, como se muestra en la SEQ ID NO: 6, que procede de la región potenciadora de IE1 de sCMV.

```

1  gaccatagcc aattcaatat ggcgatatatg gactcatgcc aattcaatat
51  ggtggatctg gacctgtgcc aattcaatat ggcgatatatg gactcgtgcc
101 aattcaatat ggtggatctg gaccccagcc aattcaatat ggcggaacttg
151 gcaccatgcc aattcaatat ggcggaacttg gactgtgcc aactggggag
201 gggctacttt ggcacggtgc caagtttgag gaggggtctt ggccctgtgc
251 caagtccgcc atattgaatt ggcattggtgc caataatggc ggccatattg
301 gctatatgcc aggatcaata tataggcaat atccaatatg gccctatgcc
351 aatatggcta ttggccaggt tcaatactat gtattggccc tatgccatat
401 agtattccat atatgggttt tcctattgac gtagatagcc cctcccaatg
451 gg

```

- 10 En algunas realizaciones, la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 6 es una parte integral de un elemento de secuencia más largo procedente de la región IE1 de sCMV (véase, por ejemplo, SEQ ID NO: 13). En algunas otras realizaciones, el elemento de secuencia procedente de la región IE1 de sCMV que tiene la secuencia SEQ ID NO: 6 está presente en combinación con un elemento de secuencia adicional procedente de la región IE1 de hCMV (véase, por ejemplo, SEQ ID NO: 12).

En realizaciones particularmente preferidas, la secuencia reguladora del promotor quimérico comprende una secuencia de nucleótidos que se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13.

- 15 La secuencia reguladora del promotor quimérico de acuerdo con SEQ ID NO: 7 (en la presente memoria también denominada "construcción 1", que no forma parte de la presente invención) tiene una longitud total de 1074 pb y está compuesta por una secuencia potenciadora de IE1 de hCMV de 582 pb y una secuencia potenciadora de IE1 de mCMV (mostradas en cursiva) y una secuencia promotora de IE1 de mCMV de 492 pb (también denominada SEQ ID NO: 3).

ES 2 694 778 T3

1 *ctgcagtgaa taataaaatg tgtgtttgtc cgaaatacgc gttttgagat*
51 *ttctgtcgcc gactaaattc atgtcgcgcg atagtgggtgt ttatcgccga*
101 *tagagatggc gatattggaa aaatcgatat ttgaaaatat ggcatattga*
151 *aaatgtcgcc gatgtgagtt tctgtgtaac tgatatcgcc atttttccaa*
201 *aagtgatttt tgggcatacg cgatatctgg cgatagcgct tatatcgttt*
251 *acgggggatg gcgatatagc acttttgtga cttgggcat tctgtgtgtc*
301 *gcaaatatcg cagtttcgat ataggtgaca gacgatatga ggctatatcg*
351 *ccgalagagg cgacalcaag clggcacalg gccaalgal alcgalclal*
401 *acattgaatc aatattggcc attagccata ttattcattg gttatatagc*
451 *ataaatcaat attggctatt ggccattgca tacgttgtat ccatatcata*
501 *atatgtacat ttatattggc tcatgtccaa cattaccgcc atgttgacat*
551 *tgattattga ctagttatta atagtaatca attactgagt cattagggac*
601 *tttccaatgg gttttgcca gtacataagg tcaatagggg tgaatcaaca*
651 *ggaagtgccc attggagcca agtacactga gtcaataggg actttccatt*
701 *gggttttgcc cagtacaaaa ggtcaatagg gggtgagtca atgggttttt*
751 *cccattattg gcacgtacat aaggtaata ggggtgagtc attgggtttt*
801 *tccagccaat ttaattaaaa cgccatgtac tttcccacca ttgacgtcaa*
851 *tgggctattg aaactaatgc aacgtgacct ttaaacggta ctttcccata*
901 *gctgattaat gggaaagtac cgttctcgag ccaatacacg tcaatgggaa*
951 *gtgaaagggc agccaaaacg taacaccgcc ccggttttcc cctggaaatt*
1001 *ccatattggc acgcattcta ttggctgagc tgcgttctac gtgggtataa*
1051 *gaggcgcgac cagcgtcggt accg*

La secuencia reguladora del promotor quimérico de acuerdo con SEQ ID NO: 8 (también denominada en la presente memoria "construcción 2", que no forma parte de la presente invención) tiene una longitud total de 1128 pb y está compuesta por una secuencia potenciadora de IE1 de hCMV de 1026 pb (mostrada en cursiva) y una secuencia promotora "mínima" de IE1 de mCMV de 102 pb (también denominada SEQ ID NO: 4).

1 *ctgcagtga taataaaatg tgtgtttgtc cgaaatacgc gttttgagat*
51 *ttctgtcgcc gaactaaattc atgtcgcgcg atagtgggtgt ttatcgccga*
101 *tagagatggc gatattggaa aaatcgatat ttgaaaatat ggcatattga*
151 *aaatgtcgcc gatgtgagtt tctgtgtaac tgatatcgcc atttttccaa*
201 *aagtgat tttt tgggcatacg cgatatctgg cgatagcgct tataatcg ttt*
251 *acgggggatg gcgatagacg actttgggtga cttgggcat tctgtgtgtc*
301 *gcaaataatcg cagtttcgat ataggtgaca gacgatatga ggctatatcg*
351 *ccgatagagg cgacatcaag ctggcacatg gccaatgcat atcgatctat*
401 *acattgaatc aatattggcc attagccata ttattcattg gttatatagc*
451 *ataaatcaat attggctatt ggccattgca taogttgtat ccataatcata*
501 *atatgtacat ttatatggc tcatgtccaa cattaccgcc atgttgacat*
551 *tgattattga ctagttatta atagtaatca attacggggt cattagtcca*
601 *tagcccatat atggagttcc gcgttacata acttacggta aatggcccg*
651 *ctggctgacc gcccaacgac ccccgcccat tgacgtcaat aatgacgtat*
701 *gttcccatag taacgccaat agggactttc cattgacgtc aatgggtgga*
751 *gtatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagt tatcatatgc*
801 *caagtacgcc ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgccctggcat*
851 *tatgcccagt acatgacctt atgggacttt cctacttggc agtacatcta*
901 *cgtattagtc atcgctatta ccatggtgat gcggttttgg cagtacatca*
951 *atgggcgtgg atagcggttt gactcacggg gatttccaag tctccacccc*
1001 *attgacgtca atgggagttt gttttgacac cgccccggtt tccccctgga*
1051 *aattccatat tggcacgcat tctattggct gagctgcgtt ctacgtgggt*
1101 *ataagaggcg cgaccagcgt cggtagcg*

La secuencia reguladora del promotor quimérico de acuerdo con SEQ ID NO: 9 (también denominada en la presente memoria “construcción 3”, que no forma parte de la presente invención) tiene una longitud total de 509 pb y está compuesta por una secuencia potenciadora de IE1 de hCMV de 407 pb (mostrada en cursiva) y una secuencia promotora “mínima” de IE1 de mCMV de 102 pb (también denominada SEQ ID NO: 4).

5

1 *cgcgttacat aacttacggt aaatggcccg cctggctgac cgcccaacga*
51 *ccccgcgcca ttgacgtcaa taatgacgta tgttcccata gtaacgcca*
101 *tagggacttt ccattgacgt caatgggtgg agtatttacg gtaaaactgcc*
151 *cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg ccaagtacgc cccctattga*
201 *cgtcaatgac ggtaaatggc ccgcctggca ttatgccag tacatgacct*
251 *tatgggactt tcctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt*
301 *accatggtga tgcggttttg gcagtacatc aatgggcgtg gatagcggtt*
351 *tgactcacgg ggatttccaa gtctccaccc cattgacgtc aatgggagtt*
401 *tgttttgaca ccgccccggt tttccccctgg aaattccata ttggcacgca*
451 *ttctattggc tgagctgcgt tctacgtggg tataagaggc gcgaccagcg*
501 *tcggtaccg*

La secuencia reguladora del promotor quimérico de acuerdo con SEQ ID NO: 10 (también denominada en la presente memoria “construcción 4”, que no forma parte de la presente invención) tiene una longitud total de 961 pb y está compuesta por una secuencia potenciadora de IE1 de sCMV de 452 pb (mostrada en negrita; SEQ ID NO: 6),

una secuencia potenciadora de IE1 de hCMV de 407 pb (mostrada en cursiva) y una secuencia promotora “mínima” de IE1 de mCMV de 102 pb (también denominada SEQ ID NO: 4).

```

1  gaccatagcc aattcaatat ggcgtatatg gactcatgcc aattcaatat
51 ggtggatctg gacctgtgcc aattcaatat ggcgtatatg gacctgtgcc
101 aattcaatat ggtggatctg gaccccagcc aattcaatat ggcggacttg
151 gcaccatgcc aattcaatat ggcggacctg gcactgtgcc aactggggag
201 gggtctactt ggcacggtgc caagtttgag gaggggtctt ggcctgtgc
251 caagtcgcc atattgaatt ggcattggtgc caataatggc ggccatattg
301 gctatatgcc aggatcaata tataggcaat atccaatatg gccctatgcc
351 aatatggcta ttggccaggt tcaatactat gtattggccc tatgccatat
401 agtattccat atatggggtt tctattgac gtagatagcc cctcccaatg
451 ggcgcgttac ataacttacg gtaaattggcc cgcctggctg accgcccac
501 gacccccgcc cattgacgtc aataatgacg tatgttccca tagtaacgcc
551 aatagggact ttccattgac gtcaatgggt ggagtattta cggtaaactg
601 cccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtac gcccctatt
651 gacgtcaatg acggtaaatg gccgcctgg cattatgcc agtacatgac
701 cttatgggac tttcctactt ggcagtacat ctacgtatta gtcacgcta
751 ttaccatggt gatgcggttt tggcagtaca tcaatgggcg tggatagcgg
801 tttgactcac ggggatttcc aagtctccac ccattgacg tcaatgggag
851 tttgttttga caccgccccg gttttcccct ggaaattcca tattggcacg
901 cattctattg gctgagctgc gttctacgtg ggtataagag gcgcgaccag
951 cgtcggtacc g

```

5

La secuencia reguladora del promotor quimérico de acuerdo con SEQ ID NO: 11 (también denominada en la presente memoria “construcción 5”, que no forma parte de la presente invención) tiene una longitud total de 909 pb y está compuesta por una secuencia potenciadora de IE1 de sCMV de 807 pb (mostrada en negrita; estando subrayado el elemento de secuencia de SEQ ID NO: 6) y una secuencia promotora “mínima” de IE1 de mCMV de 102 pb (también denominada SEQ ID NO: 4).

10

1 gaccatagcc aattcaatat ggcgatatatg gactcatgcc aattcaatat
 51 ggtggatctg gacctgtgcc aattcaatat ggcgatatatg gactcgtgcc
 101 aattcaatat ggtggatctg gacccagcc aattcaatat ggaggacttg
 151 gcaccatgcc aattcaatat ggaggacctg gactgtgcc aactggggag
 201 gggtctactt ggacggtgc caagtttgag gaggggtctt ggccctgtgc
 251 caagtccgcc atattgaatt ggcatggtgc caataatggc ggccatattg
 301 gctatatgcc aggatcaata tataggcaat atccaatatg gccctatgcc
 351 aatatggcta ttggccaggt tcaatactat gtattggccc tatgccatat
 401 agtattccat atatgggttt tcctattgac gtagatagcc cctcccaatg
 451 ggcgggtccca tataccatat atggggcttc ctaataccgc ccatagccac
 501 tccccattg acgtcaatgg tctctatata tggcttttcc tattgacgtc
 551 atatggggcg tcctattgac gtatatggcg cctcccccat tgacgtcaat
 601 tacggtaaat ggccgcctg gctcaatgcc cattgacgtc aataggacca
 651 cccaccattg acgtcaatgg gatggctcat tgcccattca tatccgttct
 701 cacggcccct attgacgtca atgacggtaa atggcccact tggcagtaca
 751 tcaatatcta ttaatagtaa cttggcaagt acattactat tggaagtacg
 801 **ccagggt**aca cggccccggt ttccccctgg aaattccata ttggcacgca
 851 ttctattggc tgagctgcgt totacgtggg tataagaggc gcgaccagcg
 901 tcggtaccg

La secuencia reguladora del promotor quimérico de acuerdo con SEQ ID NO: 12 (también denominada en la presente memoria “construcción 6”) tiene una longitud total de 976 pb y está compuesta por una secuencia potenciadora de IE1 de sCMV de 452 pb (mostrada en negrita; y que tiene SEQ ID NO: 6), una secuencia potenciadora de IE1 de hCMV de 407 pb (mostrada en cursiva) y una secuencia promotora “mínima” de mCMV de 117 pb (también denominada SEQ ID NO: 5).

5

1 **gaccatagcc aattcaatat ggcgatatatg gactcatgcc aattcaatat**
 51 **ggtggatctg gacctgtgcc aattcaatat ggcgatatatg gactcgtgcc**
 101 **aattcaatat ggtggatctg gacccagcc aattcaatat ggcggacttg**
 151 **gcaccatgcc aattcaatat ggcggacctg gactgtgcc aactggggag**
 201 **gggtctactt ggcacggtgc caagtttgag gaggggtctt ggccctgtgc**
 251 **caagtccgcc atattgaatt ggcatggtgc caataatggc ggccatattg**
 301 **gctatatgcc aggatcaata tataggcaat atccaatatg gccctatgcc**
 351 **aatatggcta ttggccaggt tcaatactat gtattggccc tatgccatat**
 401 **agtattccat atatgggttt tcctattgac gtagatagcc cctcccaatg**
 451 **ggcgcggttac** *ataacttacg gtaaattggcc cgcttggtg accgccaac*
 501 *gacccccgcc cattgacgtc aataatgacg tatgttccca tagtaacgcc*
 551 *aatagggact ttccattgac gtcaatgggt ggagtattta cggtaaactg*
 601 *cccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtac gcccctatt*
 651 *gacgtcaatg acggtaaatg gcccgctgg cattatgcc agtacatgac*
 701 *cttatgggac tttcctactt ggcagtacat ctacgtatta gtcacgcta*
 751 *ttaccatggt gatgcggttt tggcagtaca tcaatgggcg tggatagcgg*
 801 *tttgactcac ggggatttcc aagtctccac ccattgacg tcaatgggag*
 851 *tttgttttgg* *cacaaaaatc aacgggactt tccaaaatgt cgtaacaact*
 901 *ccgccccatt gacgcaaatg ggcggtaggc gtgtacggtg ggaggtctat*
 951 *ataagcagag ctcgtttagt gaaccg*

La secuencia reguladora del promotor quimérico de acuerdo con SEQ ID NO: 13 (también denominada en la presente memoria “construcción 7”) tiene una longitud total de 924 pb y está compuesta por una secuencia potenciadora de IE1 de sCMV de 807 pb (mostrada en negrita; estando subrayada la porción que tiene SEQ ID NO: 6) y una secuencia promotora “mínima” de mCMV de 117 pb (también denominada SEQ ID NO: 5).

1 gaccatagcc aattcaatat ggcgtatatg gactcatgcc aattcaatat
 51 ggtggatctg gacctgtgcc aattcaatat ggcgtatatg gactcgtgcc
 101 aattcaatat ggtggatctg gacccagcc aattcaatat ggcggacttg
 151 gcaccatgcc aattcaatat ggcggacctg gactgtgcc aactggggag
 201 gggtctactt ggcacggtgc caagtttgag gaggggtctt ggccctgtgc
 251 caagtccgcc atattgaatt ggcatggtgc caataatggc ggccatattg
 301 gctatatgcc aggatcaata tataggcaat atccaatatg gccctatgcc
 351 aatatggcta ttggccagggt tcaatactat gtattggccc tatgccatat
 401 agtattccat atatgggttt tcctattgac gtagatagcc cctcccaatg
 451 ggcgggtcca tataccatat atggggcttc ctaataccgc ccatagccac
 501 tccccattg acgtcaatgg tctctatata tggcttttcc tattgacgtc
 551 atatgggagg tcctattgac gtatatggcg cctcccccat tgacgtcaat
 601 tacggtaaat ggccgcctg gctcaatgcc cattgacgtc aataggacca
 651 cccaccattg acgtcaatgg gatggctcat tgccattca tatccgttct
 701 cacgccccct attgacgtca atgacggtaa atggcccact tggcagtaca
 751 tcaatatcta ttaatagtaa cttggcaagt acattactat tggaagtacg
 801 ccagggtgca ccaaaatcaa cgggactttc caaaatgtcg taacaactcc
 851 gccccattga cgcaaattgg cggtaggcgt gtacggtggg aggtctatat
 901 aagcagagct cgtttagtga accg

Las secuencias reguladoras en 3' de un "casete de expresión" tal como se definen en la presente memoria abarcan típicamente elementos reguladores implicados en la terminación transcripcional, la poliadenilación, o similares. Sin embargo, si estas secuencias de terminación no son satisfactoriamente funcionales en una célula hospedante particular, entonces pueden ser sustituidas por señales funcionales en dicha célula.

Otros elementos reguladores comprendidos en dicho "casete de expresión" incluyen, entre otros, sitios internos de entrada al ribosoma (abreviadamente IRES por la expresión inglesa *Internal Ribosome Entry Sites*); que permiten la expresión de secuencias de ácidos nucleicos "policistrónicos"), así como también secuencias señal traducidas para dirigir el polipéptido natural a un compartimento específico de una célula hospedante. Las secuencias señal ilustrativas adecuadas para células de CHO se describen, por ejemplo, en el documento WO 2008/148519 A2. El experto en la técnica también conoce bien todos estos elementos reguladores y cómo seleccionar dichos elementos adecuados para la expresión de una secuencia de ácidos nucleicos en un entorno celular particular.

El vector de expresión de la presente invención puede ser, por ejemplo, un plásmido, cósmido, fagémido, cromosoma artificial u otro vehículo comúnmente utilizado en ingeniería genética.

Dichos vectores de expresión incluyen típicamente, además de uno o más "casetes de expresión" que abarcan las secuencias reguladoras descritas anteriormente, uno o más sitios de clonación múltiple con el fin de facilitar la inserción y/o la eliminación de secuencias de ácidos nucleicos. Los sitios de clonación múltiples pueden estar localizados aguas arriba y aguas abajo de los casetes de expresión descritos anteriormente, permitiendo así la sustitución del casete completo. También pueden estar localizados sitios de clonación múltiples dentro de dicho casete de expresión aguas abajo de las secuencias reguladoras del promotor y aguas arriba de las secuencias reguladoras en 3', permitiendo así que se exprese la inserción o sustitución de una secuencia de ácidos nucleicos. Para las transfecciones estables (véase a continuación), los vectores de expresión pueden comprender además secuencias de reconocimiento para integrasas o recombinasas específicas del sitio con el fin de facilitar la recombinación e integración estable en el genoma de la célula hospedante.

Además, los vectores de expresión como se definen en la presente memoria comprenden típicamente al menos un origen de replicación, así como secuencias de control procedentes de una especie compatible con la célula hospedante empleada con el fin de asegurar la replicación autónoma/mantenimiento episomal del vector de expresión (en particular, para uso en transfecciones transitorias; véase a continuación). Los orígenes de replicación ilustrativos en mamíferos incluyen el origen de replicación de SV40 o de EBV. Los vectores de expresión diseñados específicamente (es decir, vectores lanzadera) que comprenden más de un origen de replicación permiten el

traslado entre diferentes hospedantes, tal como entre células bacterianas y de animales. Los orígenes de replicación adecuados para células procariotas incluyen, por ejemplo, los orígenes de replicación de ColE1 y M13.

Además, un vector de expresión como se define en la presente memoria puede comprender uno o más marcadores de selección que confieren un fenotipo seleccionable a las células transfectadas. Los marcadores de selección adecuados incluyen, entre otros, el gen de la higromicina B fosfatasa, el gen de la timidina quinasa, el gen de la ornitina descarboxilasa, el gen de la dihidrofolato reductasa y el gen de la glutamina sintasa. Preferiblemente, se emplea el gen de la glutamina sintasa (GS) (Cockett, D. K. et al., (1990) *Bio/Technology* **8**, 662-667; Bebbington, C.R. et al., (1992) *Bio/Technology* **10**:169-175).

Numerosos métodos que se pueden usar para diseñar y/o modificar vectores de expresión recombinantes están bien establecidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook, J., and Russel, D.W. (2001), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd Ed.) Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F.M. et al., (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley & Sons, Hoboken, NJ, USA). Un gran número de vectores de expresión de mamíferos adecuados también están disponibles comercialmente y son bien conocidos por los expertos en la técnica que también pueden determinar qué vectores son adecuados para expresar una molécula de ácidos nucleicos de interés en un entorno dado. Los ejemplos de dichos vectores incluyen, entre otros, pcDNA3, pFRT, pTARGET, pSV2-dhfr, así como también derivados de los vectores pRY42 (SEQ ID NO: 1) y pRY57 (SEQ ID NO: 2) descritos a continuación en la presente memoria.

Las secuencias de ácidos nucleicos que se ha de expresar empleando los vectores de expresión de la invención pueden ser monocistrónicas (es decir, codifican un único polipéptido o proteína incluyendo proteínas de fusión) o policistrónicas (es decir, codifican dos o más polipéptidos o proteínas individuales).

En realizaciones particulares, el vector de expresión comprende una única (es decir, primera) secuencia reguladora del promotor quimérico que está unida operativamente a una (primera) secuencia de ácidos nucleicos que se ha de expresar.

En otras realizaciones particulares, el vector de expresión comprende además una segunda secuencia reguladora del promotor quimérico que está unida operativamente a una segunda secuencia de ácidos nucleicos que se ha de expresar, en donde la segunda secuencia reguladora del promotor quimérico es idéntica a la primera secuencia reguladora del promotor quimérico.

En realizaciones particulares alternativas, el vector de expresión comprende además una segunda secuencia reguladora del promotor quimérico que está unida operativamente a una segunda secuencia de ácidos nucleicos que se ha de expresar, en donde la segunda secuencia reguladora del promotor quimérico es diferente de la primera secuencia reguladora del promotor quimérico.

En realizaciones específicas, el vector de expresión comprende una tercera secuencia reguladora del promotor quimérico que está unida operativamente a una tercera secuencia de ácidos nucleicos que se ha de expresar, en donde la tercera secuencia reguladora del promotor quimérico puede ser idéntica a la primera y/o segunda secuencias reguladoras del promotor o puede ser diferente tanto de la primera como de la segunda secuencias reguladoras del promotor quimérico. En realizaciones específicas adicionales, el vector de expresión comprende más de tres secuencias reguladoras del promotor quimérico.

Las secuencias de ácidos nucleicos que se han de expresar empleando los vectores de expresión de la presente invención pueden codificar cualesquiera polipéptidos o proteínas de interés, en particular polipéptidos o proteínas que tienen una aplicabilidad en diagnóstico o terapéutica, tales como, entre otros, factores de crecimiento, citoquinas (interferones, interleuquinas), hormonas, tirosina quinasas, receptores (GPCR), integrinas, factores de transcripción, factores de coagulación sanguínea, anticuerpos monocatenarios, fragmentos de anticuerpos o moléculas similares a anticuerpos (anticlinalinas) y similares.

En el caso de vectores de expresión, como se definen en la presente memoria, que comprenden dos secuencias reguladoras del promotor quimérico (como parte de los casetes de expresión), la primera y la segunda secuencias de ácidos nucleicos que se han de expresar codifican diferentes polipéptidos (o proteínas). En realizaciones específicas, los diferentes polipéptidos representan subunidades de una proteína dimérica o multimérica, tales como, entre otras, moléculas receptoras homómeras o heterómeras, hormonas peptídicas, DNA/RNA polimerasas, hemoglobinas, vacunas y similares.

En realizaciones particularmente preferibles, la proteína dimérica o multimérica es una molécula de anticuerpo "clásica" que comprende la cadena ligera como la primera subunidad y la cadena pesada como la segunda subunidad. La molécula de anticuerpo puede ser un anticuerpo que existe en la naturaleza o genéticamente modificado, ya sea un anticuerpo de longitud completa o una de sus variantes truncada (tal como fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab')₂). Se prefieren particularmente los anticuerpos inmunoglobulinas IgG. Dependiendo de la aplicación específica, las moléculas de anticuerpos pueden ser quiméricas (por ejemplo, de murino/humanas), humanizadas o completamente humanas.

En otras realizaciones que emplean vectores de expresión que comprenden dos secuencias reguladoras del promotor quimérico, la primera y segunda secuencias de ácidos nucleicos que se han de expresar codifican una "proteína diana" que se ha de analizar y una proteína indicadora correspondiente (tales como proteína verde fluorescente, luciferasa, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa y peroxidasa de rábano picante) para controlar, por ejemplo, la localización celular o la actividad funcional de la proteína diana.

Cuando se usan dos (o más) secuencias reguladoras del promotor quimérico que presentan diferentes tasas de expresión génica, puede ser posible producir ciertas relaciones molares de las correspondientes proteínas de interés.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una célula hospedante de mamífero transfectada con un vector de expresión como se ha definido anteriormente en la presente memoria.

Las células hospedantes adecuadas incluyen cualquier tipo de células de mamífero, siendo las células de origen humano o no humano. Las células de mamífero de origen no humano incluyen, entre otras, células procedentes de ratón, rata, hámster, conejo, gato, perro, cerdo, vaca, caballo o mono.

Las células hospedantes de mamífero adecuadas incluyen líneas celulares inmortalizadas, tales como Hela humana, fibroblastos MRC5, melanoma 983M, HEK293, H9, MCF7 y células Jurkat; células renales caninas MDCK; fibroblastos de pulmón de rata cultivados en RF aislados de ratas Sprague-Dawley; células de mastocitomas NIH3T3, C127, P815 de mûridos, de adenocarcinomas mamario MT1A2 y células L; células COS1 y COS7 de simio, células QC1-3 de codorniz; y células o líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO).

En realizaciones preferidas, las células hospedantes empleadas son células de CHO o líneas celulares de CHO.

Las líneas celulares de CHO adecuadas incluyen, entre otras, CHO KI (Tjio, J.T. and Puck, T.T. (1958) *J. Exp. Med.* **108**, 945-955), CHO pro3-, CHO DG44, CHO P12, DUK-B11 negativas a dhfr (Urlaub, G. and Chasin L.A. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 4216-4220) y particularmente CHOK1 SV (Lonza Ltd. Basilea, Suiza). CHOK1 SV es un derivado de CHOK1 adaptado exento de proteínas en suspensión que utiliza el sistema de expresión del gen de la glutamina sintetasa (GS): los transfectantes positivos se obtuvieron con selección doble de metionina sulfoximina y medios exentos de glutamina.

Todas estas células o líneas celulares hospedantes se pueden obtener de entidades de depósito tales como la American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) o la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Alemania), así como también de varios proveedores comerciales. También dentro de la presente invención se encuentran células de mamíferos primarias, es decir, células obtenidas directamente de un organismo (en cualquier etapa de desarrollo, incluidos, entre otros, blastocitos, embriones, estadios larvales y adultos). Los ejemplos de células primarias adecuadas comprenden cardiomiocitos, hepatocitos primarios, fibroblastos, células neuronales, así como también células madre. También dentro de la presente invención se encuentran líneas celulares estables inmortalizadas procedentes de células primarias.

En algunas realizaciones, la célula hospedante de la presente invención constituye una parte de un organismo multicelular.

En la presente invención, el vector de expresión introducido se puede propagar y mantener en la célula hospedante como una unidad genética independiente (es decir, episomalmente) (también denominada en la presente memoria "transfección transitoria") o los fragmentos de vectores pueden llegar a integrarse establemente en el genoma de la célula hospedante (también denominada en la presente memoria "transfección estable"). Dicha recombinación puede producirse en posiciones aleatorias del genoma por recombinación no homóloga o en posiciones específicas del genoma por recombinación homóloga o por integrasas específicas del sitio. Preferiblemente, los fragmentos de vector (incluyendo las secuencias de ácidos nucleicos heterólogos que se han de expresar) llegan a integrarse en el genoma de la célula hospedante como una sola copia.

Para introducir los vectores de expresión como se definen en la presente memoria en una célula hospedante de mamífero se puede emplear cualquier técnica de transfección que sea apropiada para el tipo de células particular empleado. Numerosos métodos de transfección están bien establecidos en la técnica, entre otros, la electroporación, coprecipitación con fosfato de calcio, transfección química (por ejemplo, ciclodextrina, DEAE-dextrano, polietilenimina), lipofección, magnetofección y "pistola génica" (véase, por ejemplo, Sambrook, J., and Russel, D.W. (2001), *supra*; Ausubel, F.M. et al., (2001), *supra*).

Incluso en otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para la expresión heteróloga de una secuencia de ácidos nucleicos de interés en una célula hospedante de mamífero, que comprende:

- i) transfectar la célula hospedante de mamífero con un vector de expresión como se ha definido anteriormente en la presente memoria; y
- ii) cultivar la célula hospedante de mamífero transfectada en condiciones que permitan la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos de interés.

En otras palabras, la presente invención también se refiere a un procedimiento para la producción recombinante (es decir, heteróloga) de polipéptidos o proteínas de interés en células hospedantes de mamíferos que son transfectadas con un vector de expresión, como se define en la presente memoria, que comprende las secuencias de ácidos nucleicos correspondientes que codifican dichos polipéptidos o proteínas. La transfección se puede realizar con un solo vector de expresión o, como una cotransfección, con dos o más vectores de expresión diferentes.

Como ya se describió anteriormente, hay disponibles numerosos métodos para la transfección transitoria o estable de una célula hospedante de mamífero. En realizaciones preferidas, la transfección es una transfección estable con el fin de establecer células o líneas celulares que expresan continuamente las secuencias de ácidos nucleicos heterólogas que codifican los polipéptidos o proteínas de interés.

En algunas realizaciones, el método comprende además la etapa de recolectar (y opcionalmente purificar) los polipéptidos o proteínas recombinantes producidos. Dependiendo de la naturaleza de dichos polipéptidos o proteínas, pueden llegar a segregarse en el líquido sobrenadante del cultivo celular, integrarse en la membrana de la célula hospedante o permanecer en un compartimento intracelular.

Típicamente, si se emplea una célula hospedante de mamífero unicelular, el experto en la técnica puede volver a una variedad de condiciones de cultivo celular que permiten la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos de interés. Convenientemente, los polipéptidos o proteínas producidos se recolectan (y opcionalmente purifican) del medio de cultivo, de lisados o extractos de las células cultivadas o de membranas (biológicas) aisladas por técnicas establecidas, tales como, entre otras, precipitación fraccionada con sales o disolventes orgánicos, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía en gel, cromatografía de exclusión por tamaños, HPLC, cromatografía de afinidad (véase, por ejemplo, Sambrook, J., and Russel, D.W. (2001), *supra*). En caso de que la célula hospedante sea parte de un organismo multicelular, una fracción de estas células puede servir como fuente para aislar el péptido de la invención.

Los medios y las condiciones de cultivo apropiados para las células hospedantes descritas anteriormente son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Fresney, R.I. (2000) *Culture of Animal Cells. A manual (4th Ed.)* Wiley-Liss, Nueva York). Dependiendo de los requisitos específicos de crecimiento de la célula hospedante empleada, se puede realizar un cultivo de células de mamíferos, por ejemplo, en medio RPMI 1640, medio F12 de Ham o DMEM (Medio de Eagle modificado por Dulbecco). Alternativamente, se puede usar un medio de crecimiento con una concentración de suero reducida, tal como OptiMEM. Los medios se pueden suplementar opcionalmente con FCS (suero fetal de ternero) al 10% (v/v), diversos factores de crecimiento, aminoácidos, antibióticos y otros aditivos. Los medios de cultivo celular especialmente adaptados para células de CHO están descritos en, por ejemplo, las patentes EP 0481791 B1 y EP 1525320 B1. Las células hospedantes de mamífero transfectadas se pueden incubar a 37°C en una atmósfera saturada de agua con CO₂ al 5%. Los medios de crecimiento, kits y reactivos respectivos están disponibles comercialmente de varios proveedores.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de un vector de expresión, como se ha definido anteriormente en la presente memoria, para la expresión heteróloga *in vitro* de una secuencia de ácidos nucleicos de interés en una célula hospedante de mamífero. Preferiblemente, la secuencia de ácidos nucleicos de interés puede codificar un polipéptido o proteína destinada a aplicaciones de diagnóstico o terapéuticas.

En realizaciones preferidas, el vector de expresión se usa para la expresión concomitante *in vitro* de dos o más secuencias de ácidos nucleicos de interés que se insertan en el vector de expresión bajo el control de secuencias reguladoras separadas de promotores quiméricos. Por ejemplo, un vector de expresión se puede usar para la expresión de un gen de interés junto con un gen indicador para controlar el direccionamiento celular y/o la funcionalidad del gen de interés.

En particular preferiblemente, el vector de expresión se usa para la expresión concomitante de dos o más secuencias de ácidos nucleicos de interés que codifican subunidades de una proteína dimérica o multimérica, por ejemplo, cadenas ligera y pesada de una molécula de anticuerpo o subunidades de una vacuna. Empleando diferentes secuencias reguladoras de promotores quiméricos que dan como resultado diferentes tasas de expresión génica, se puede usar un vector de expresión como se define en la presente memoria para la expresión de dos o más secuencias de ácidos nucleicos de interés en una relación (molar) particular.

En una realización específica, los vectores de expresión, como se definen en la presente memoria, son para uso como medicamentos (o como partes de un medicamento o de un kit de piezas) para terapia génica.

La invención se describe además por las figuras y los siguientes ejemplos, que tienen únicamente la finalidad de ilustrar realizaciones específicas de esta invención, y no deben interpretarse que limitan de ninguna manera el alcance de la invención.

Ejemplos

Fundamento:

Se generaron siete secuencias reguladoras diferentes de promotores quiméricos, como se especifica en las reivindicaciones, basadas en secuencias de los genomas de citomegalovirus humano y de simio (hCMV y sCMV) (véase la **Tabla 1**, **Figura 3**). Estas construcciones se analizaron para determinar su eficacia en el control de la expresión génica heteróloga de las cadenas ligera y pesada (CL y CP) de un anticuerpo monoclonal en células de ovario de hámster chino (CHO).

Ejemplo 1: Construcción de vectores

Se usó la síntesis de genes para generar las siete construcciones reguladoras diferentes de promotores quiméricos empleadas en la presente memoria (es decir, las construcciones "1-7", en donde las construcciones 1-5 no forman parte de la presente invención). Las construcciones se proporcionaron listas para la clonación en el vector de direccionamiento "vacío" pRY42 (véase la **Figura 1**, SEQ ID NO: 1), con el fin de reemplazar los promotores originales del citomegalovirus de múrido (mCMV) (SEQ ID NO: 3) contenidos en el mismo. El vector precursor pRY42 comprende dos casetes de expresión, cada uno bajo el control de una secuencia reguladora del promotor (originalmente procedente de mCMV).

Se sintetizaron las construcciones quiméricas (véase la **Tabla 1**, **Figura 3**, SEQ ID NO: 7 a SEQ ID NO: 13, en donde la SEQ ID NO: 7 a SEQ ID NO: 11 no forman parte de la presente invención) para que incluyeran secuencias de DNA adicionales en los extremos 5' y 3' que flanquean las secuencias reguladoras del promotor, permitiendo así la incorporación de sitios de restricción de endonucleasas (es decir, también presentes en pRY42) con el fin de facilitar el intercambio de fragmentos de ácidos nucleicos.

La **Tabla 1** ilustra los diversos elementos de secuencia comprendidos en las construcciones 1-7 reguladoras del promotor quimérico descritas en la presente memoria, en donde las construcciones 1-5 no forman parte de la presente invención. Se muestran las longitudes respectivas y las localizaciones genéticas de las secuencias reguladoras individuales, como se indica en la base de datos de genomas virales del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/GenomesHome>; Bao, Y. et al., (2004) *J. Virol.* **78**, 7291-7298). Notablemente, todas las secuencias promotoras de mCMV o hCMV empleadas en la presente memoria incluyen en su extremo 3' un nucleótido de guanosina ("G") adicional, que representa el sitio de iniciación de la transcripción.

Construcción	Longitud del sCMV	Nº de registro del genoma viral en NCBI	Coordenadas	Longitud del hCMV	Nº de registro del genoma viral en NCBI	Coordenadas
1	-	-	-	582	X17403.1	174292-174873
2	-	-	-	1026	X17403.1	173848-174873
3	-	-	-	407	X17403.1	173848-174254
4	452	U38308.1	3873-4324	407	X17403.1	173848-174254
5	807	U38308.1	3873-4679	-	-	-
6	452	U38308.1	3873-4324	524	X17403.1	173731-174254
7	807	U38308.1	3873-4679	117	X17403.1	173731-173847

Construcción	Longitud del mCMV	Nº de registro del genoma viral en NCBI	Coordenadas
1	492	U68299.1	182895-183386
2	102	U68299.1	182895-182996
3	102	U68299.1	182895-182996
4	102	U68299.1	182895-182996
5	102	U68299.1	182895-182996

- 5 Los nuevos vectores que comprenden las construcciones quiméricas 1-7 (no formando las construcciones 1-5 parte de la presente invención) fueron contruidos cada uno por una reacción de ligación de cuatro vías de acuerdo con el esquema ilustrado en la **Tabla 2**. La secuencia reguladora del promotor quimérico para la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos de la cadena ligera del anticuerpo se insertó en 3' (es decir, "aguas abajo") del sitio FRT (diana de reconocimiento de flipasa) mutado (F5-mFRT) de pRY42, seguido de un fragmento entre cadenas y la secuencia reguladora del promotor quimérico para la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos de la cadena pesada del anticuerpo.
- 10 Las reacciones de ligación se realizaron utilizando el *Rapid DNA Ligation Kit* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los vectores plasmídicos resultantes se transformaron en células competentes DH5α de *E. coli* (Invitrogen/Life Technologies GmbH; Darmstadt, Alemania). Las muestras se colocaron en placas sobre agar-agar de Luria-Bertani (LB) suplementado con 50 µg/mL de ampicilina y se incubaron durante una noche a 37°C. Se usaron colonias individuales para inocular matraces en agitación de 500 mL que
- 15 contenían 200 mL de medio líquido LB más 50 µg/mL de ampicilina. Los matraces se incubaron durante una noche en una incubadora con agitación a 37°C y 200 rpm. Los cultivos resultantes se utilizaron para la preparación del DNA plasmídico utilizando un Nucleobond Maxi Kit (Macherey-Nagel GmbH, Düren, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los plásmidos producidos se verificaron por digestión con enzimas de restricción para diagnóstico.
- 20 La **Tabla 2** muestra el esquema de clonación para generar las construcciones 1-7 de la secuencia reguladora del promotor quimérico, en donde las construcciones 1-5 no forman parte de la presente invención.

Construcción	Elemento regulador de la CL	Fragmento entre cadenas (procedente de pRY42)	Elemento regulador de la CP	Cadena principal del vector (procedente de pRY42)
1	AatII-PacI	PacI-EcoRI	EcoRI-XhoI	XhoI-AatII
2	PvuI-SacII	SacII-EcoRI	EcoRI-Bsu36I	Bsu36I-PvuI
3	SspI-SacII	SacII-EcoRI	EcoRI-Bsu36I	Bsu36I-SspI
4	SspI-SacII	SacII-EcoRI	EcoRI-Bsu36I	Bsu36I-SspI
5	SspI-SacII	SacII-EcoRI	EcoRI-Bsu36I	Bsu36I-SspI
6	SspI-SacII	SacII-EcoRI	EcoRI-Bsu36I	Bsu36I-SspI
7	SspI-SacII	SacII-EcoRI	EcoRI-Bsu36I	Bsu36I-SspI

- 25 En una etapa posterior, se clonaron la cadena ligera (CL) y la cadena pesada (CP) del anticuerpo monoclonal IgG4 cB72.3 (Whittle, N. et al., (1987) *Protein Eng.* 1, 499-505) en cada uno de los siete vectores que comprendían las construcciones quiméricas 1-7 (no formando las construcciones 1 a 5 parte de la presente invención). Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las cadenas del anticuerpo se obtuvieron del vector pRY57 (**Figura 2**, SEQ ID NO: 2) como fragmentos de restricción EcoRI/HindIII (CL) y BamHI/NruI (CP) y se clonaron secuencialmente

en los vectores para cada construcción del promotor, utilizando las mismas endonucleasas de restricción. Los métodos utilizados fueron los descritos anteriormente. Los vectores plasmídicos resultantes se verificaron por digestión con enzimas de restricción para diagnóstico y secuenciación de DNA de las regiones promotoras, respectivamente.

5 Ejemplo 2: Transfección y construcción de una línea celular

Se utilizó una línea celular procedente de la línea celular de ovario de hámster chino adaptada en suspensión CHOK1SV para todos los experimentos (Lonza Ltd., Basilea, Suiza). En esta línea celular, las construcciones de expresión de ácidos nucleicos se insertan en un locus genómico específico de la célula hospedante y en un número de copias definido por medio de un sistema de integración específico del sitio (SSI).

- 10 La selección positiva para la integración se realiza por restauración funcional de un casete de resistencia a higromicina B presente en el sitio SSI. La integración de la construcción de expresión en el genoma del hospedante elimina también una copia del gen de la timidina quinasa, que convierte el profármaco ganciclovir en un análogo de nucleótido fosforilado, tóxico. Por tanto, la adición de higromicina B y ganciclovir durante la construcción de la línea celular proporciona presiones de selección positivas y negativas, respectivamente, para la integración en el locus genómico diana.

La línea celular hospedante se reanimó a partir de los viales crioconservados y se subcultivó. Todos los cultivos celulares se realizaron en medio CD-CHO (Invitrogen/Life Technologies GmbH; Darmstadt, Alemania). 48 horas antes de la transfección, las células se sembraron en 30 mL de medio CD-CHO, a una concentración final de $0,3 \times 10^6$ células/mL.

- 20 El día de la transfección, $1,2 \times 10^7$ células se sedimentaron y volvieron a poner en suspensión en 1 mL de CD-CHO antes de la cotransfección con 45 µg de plásmido pOG44 (Invitrogen/Life Technologies GmbH; Darmstadt, Alemania) y se prepararon 5 µg de cada vector de direccionamiento (que comprendía las construcciones quiméricas 1-7, respectivamente) utilizando electroporación en una cubeta Bio-Rad GenePulser Xcell de 0,4 cm (un solo impulso de 300 V/900 µF, constante de tiempo 12-16 milisegundos). El plásmido pOG44 abarca un casete de expresión para la recombinasa FLP (flipasa) de levadura requerida para facilitar la recombinación en los sitios FRT presentes en el locus diana. Todos los experimentos de transfección se realizaron al menos por duplicado.

- 25 Cada muestra de electroporación se transfirió a 20 mL de medio CD-CHO en un matraz T75 (BD Biosciences, Heidelberg, Alemania) y se incubó en modo estático a 36,5°C, en una incubadora humidificada (CO₂ al 5% (v/v) en aire). 48 horas después de la transfección, las células se sedimentaron (150 x g, 5 min) y se volvieron a poner en suspensión en 20 mL de medio CD-CHO que contenía 200 µg/mL de higromicina B (selección positiva). El cultivo se mantuvo en modo estático y, después de 72 horas, el medio se intercambió con CD-CHO recién preparado que contenía 200 µg/mL de higromicina B.

- 30 Posteriormente, cada 72 horas se determinó la concentración de células viables y el medio se intercambió con 20 mL de CD-CHO recién preparado que contenía 200 µg/mL de higromicina B y ganciclovir 3 µM (selección negativa). Una vez que el cultivo en el matraz T75 alcanzó una concentración de células total de 9×10^6 células/mL, el cultivo se ajustó hasta un volumen final de 30 mL de CD-CHO que contenía 200 µg/mL de higromicina B y ganciclovir 3 µM. Cada cultivo diluido se transfirió luego a un matraz E125 con agitación.

- 35 **Ejemplo 3: Cultivo en suspensión de sobrecrecimiento alimentado en lotes (FOG) para determinar la concentración de anticuerpo monoclonal producido utilizando las “construcciones de promotor 1-5” (que no forman parte de la presente invención)**

El análisis en un matraz con agitación del sobrecrecimiento alimentado en lotes (FOG) se realizó como se ha descrito en la publicación de patente internacional WO 2008/148519 A2. Todos los experimentos de FOG para un cultivo en suspensión de células transfectadas dado se realizaron al menos por duplicado.

- 45 En resumen, las células transfectadas se sembraron a una concentración de 2×10^5 células/mL en matraces con agitación de 250 mL, conteniendo cada uno 50 mL de medio de crecimiento CM42/SPE (Lonza Ltd., Basilea, Suiza) y se incubaron a 37°C en una incubadora humidificada de agitación orbital (CO₂ al 5% (v/v) en aire) a 140 rpm. Las células se alimentaron, comenzando el día 3 del cultivo, con una alimentación que consistía en una mezcla de aminoácidos y oligoelementos. Las viabilidades diarias y las concentraciones de células viables se determinaron utilizando un analizador automatizado de viabilidad celular Cedex (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania).
- 50 La concentración de anticuerpo en el medio se determinó por HPLC con proteína A el día 15 de cultivo (cosecha de los cultivos “sobrecrecidos”).

Ejemplo 4: Determinación de la concentración del anticuerpo monoclonal producido por medio de HPLC con proteína A (usando las “construcciones de promotor 1-5”, que no forman parte de la presente invención)

- 55 Las concentraciones del anticuerpo monoclonal (mAb) cB72.3 IgG4 producido por las líneas celulares respectivas que albergan los casetes de expresión génica de CL/CP bajo el control de las diferentes construcciones quiméricas 1-5 y segregadas al medio de cultivo celular se determinaron por cromatografía de líquidos de alta resolución

(HPLC) con proteína A. Los líquidos sobrenadantes libres de células (pasados a través de una unidad de filtración de 0,22 µm) se cargaron en una columna de inmunodetección con proteína A POROS (Applied Biosystems Inc., Foster City, Ca, USA), conectada a un HPLC Agilent 1200. La columna se lavó y el mAb unido se eluyó disminuyendo el pH del disolvente.

- 5 La concentración del mAb se determinó por comparación con una curva estándar generada con diluciones en serie de cB72.3 IgG4 de MabSelect SuRe-purified (GE Healthcare GmbH, Freiburg, Alemania) (intervalo de la curva estándar: 1025 ng/µL a 200 ng/µL).

- 10 Los resultados de los experimentos anteriores se resumen en la **Tabla 3** y la **Figura 4**, respectivamente: para cada una de las construcciones quiméricas empleadas en la presente invención, $n = 4$, que representan análisis de FOG por duplicado para transfecciones por duplicado, con la excepción de la construcción 4, donde $n = 6$ (análisis de FOG por duplicado para transfecciones por triplicado) y pRY57 (mCMV original), donde $n = 8$, estando combinados los puntos de datos de los experimentos 1 y 2. Los cálculos de los parámetros del cultivo celular se realizaron como se había descrito anteriormente (Porter et al., (2010) *Biotechnol. Progr.* **26**, 1446-1454).

- 15 De la **Figura 4**, es evidente que el día de la recolección del cultivo (es decir, el día 15), el uso de una cualquiera de las construcciones quiméricas números 2-5 dio como resultado la producción de mayores concentraciones de anticuerpos que con el uso de la secuencia promotora de mCMV original (es decir, el vector pRY57). El uso de la construcción quimérica número 1 también dio como resultado una mayor concentración de anticuerpos que con el promotor de mCMV (un factor de 1,31), aunque el resultado no alcanza significación estadística, en donde las construcciones 1-5 no forman parte de la presente invención.

- 20 Los mejores resultados se obtuvieron con la construcción quimérica número 4, lo que dio como resultado una expresión génica aproximadamente 2,88 veces mayor en comparación con el promotor de mCMV, seguido (en orden descendente) por la construcción quimérica número 5 (factor de aproximadamente 2,54), la construcción quimérica número 2 (factor de aproximadamente 1,80) y la construcción quimérica número 3 (factor de aproximadamente 1,45).

- 25 La **Tabla 3** ilustra las tasas de crecimiento y las cantidades de mAb producidas por las diferentes líneas celulares hospedantes transfectadas empleadas en la presente invención (que comprenden las secuencias/construcciones reguladoras del promotor quimérico 1-5, que no forman parte de la presente invención).

Grupo transfectante/FOG		Max. (10^6 células/mL)	μ (1/h)	IVC (10^6 células.h/mL)	p_p (pg/célula.h)	[mAb](mg/L)
Experimento 1	mCMV	$9,36 \pm 1,02$	$0,0183 \pm 0,0018$	$1523,35 \pm 164,78$	$0,29 \pm 0,02$	$439,74 \pm 23,51$
	Construcción 1	$8,5 \pm 0,75$	$0,0206 \pm 0,0013$	$1445,11 \pm 70,55$	$0,46 \pm 0,07$	$638,87 \pm 110,18$
	Construcción 2	$7,97 \pm 0,41$	$0,0198 \pm 0,0008$	$1409,29 \pm 87,92$	$0,71 \pm 0,06$	$883,10 \pm 109,78$
	Construcción 3	$11,17 \pm 1,02$	$0,0191 \pm 0,0009$	$1873,58 \pm 250,14$	$0,40 \pm 0,03$	$707,98 \pm 80,28$
Experimento 2	mCMV	$9,29 \pm 0,82$	$0,0143 \pm 0,0013$	$1790,34 \pm 104,97$	$0,29 \pm 0,05$	$539,31 \pm 76,24$
	Construcción 4	$10,39 \pm 0,90$	$0,0165 \pm 0,0023$	$1848,05 \pm 306,29$	$0,73 \pm 0,22$	$1408,44 \pm 337,47$
	Construcción 5	$11,58 \pm 0,46$	$0,0139 \pm 0,0028$	$2261,28 \pm 50,84$	$0,46 \pm 0,03$	$1244,15 \pm 74,90$

- 30 **Leyenda:** Max. - concentración máxima de células viables (10^6 células/mL); μ - tasa de crecimiento específica (1/h); IVC: tiempo integral de la concentración de células viables (10^6 células.h/mL); p_p - tasa de producción específica del mAb (pg/célula.h); y [mAb] - concentración del mAb producido en la cosecha (mg/L).

Los datos anteriores muestran que el uso de secuencias reguladoras del promotor quimérico que comprenden la región aguas arriba y/o elementos potenciadores de sCMV y/o hCMV en combinación con elementos promotores de mCMV representan herramientas genéticas superiores para obtener sistemas de expresión génica heteróloga altamente eficaces para células de mamíferos.

5 Ejemplo 5: Cultivo en suspensión de sobrecrecimiento en lotes (BOG) para determinar la concentración del anticuerpo monoclonal producido utilizando las “construcciones de promotor 6-7”

Los cultivos en lotes se realizaron en matraces E125 ventilados que contenían 30 mL de CD-CHO en modo de suspensión (incubadora de 4 niveles Kühner, 36,5°C, CO₂ al 5% (v/v) en aire y 85% de humedad (v/v)). En resumen, las células transfectadas se sembraron a una concentración de 2×10^5 células/mL y se controlaron las concentraciones de células viables durante el cultivo. Se tomaron muestras del medio el día siete de cultivo (alta viabilidad de cultivo) para la determinación de la concentración de cB72.3 en el medio usando HPLC con proteína A. Todos los experimentos de BOG para un cultivo en suspensión de células transfectadas dado se realizaron al menos por duplicado.

15 Ejemplo 6: Determinación de la concentración del anticuerpo monoclonal producido por medio de HPLC con proteína A (usando las “construcciones de promotor 6-7”)

Las concentraciones del anticuerpo monoclonal (mAb) cB72.3 IgG4 producido por las respectivas líneas celulares que alojan los casetes de expresión génica de CL/CP bajo el control de las diferentes construcciones quiméricas 6-7 y segregadas al medio de cultivo celular se determinaron por Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) con proteína A. Los líquidos sobrenadantes libres de células (pasados a través de una unidad de filtración de 0,22 µm) se cargaron en una columna de inmunodetección con proteína A POROS (Applied Biosystems Inc., Foster City, Ca, USA), conectada a un HPLC Agilent 1100. La columna se lavó y el mAb unido se eluyó disminuyendo el pH del disolvente.

La concentración del mAb se determinó por comparación con una curva estándar generada con diluciones en serie de cB72.3 IgG4 de MabSelect SuRe-purified (GE Healthcare GmbH, Freiburg, Alemania) (intervalo de la curva estándar: 1025 ng/µL a 64 ng/µL).

Los resultados de los experimentos anteriores se resumen en la **Figura 5**: Para mCMV y la construcción 7, n = 6 (análisis de lotes por duplicado para transfecciones por triplicado) y para la construcción 6, n = 4 (análisis de lotes por duplicado para transfecciones por duplicado).

De la **Figura 5**, es evidente que el día 7 del cultivo, el uso de una cualquiera de las construcciones quiméricas 6 y 7 dio como resultado la producción de mayores concentraciones de anticuerpos que con el uso de la secuencia promotora de mCMV original (es decir, el vector pRY57).

Los mejores resultados se obtuvieron con la construcción del promotor quimérico 6, lo que dio como resultado productividades de mAb aproximadamente 2,27 veces mayores en comparación con el promotor de mCMV.

Los datos anteriores muestran que el uso de secuencias reguladoras de promotores quiméricos que comprenden la región aguas arriba y/o elementos potenciadores de sCMV y/o hCMV en combinación con elementos promotores mínimos de hCMV representan herramientas genéticas superiores para obtener sistemas de expresión génica heterólogos altamente eficaces para células de mamíferos.

Listado de secuencias

<110> Lonza Biologics PLC

40 <120> Vectores de expresión que comprenden secuencias promotoras y potenciadoras quiméricas de citomegalovirus

<130> 827-1 PCT

<140> no asignado todavía

<141> 23-09-2013

45 <150> EP12185728.8

<151> 2012-09-24

<160> 15

<170> BiSSAP Version 1.1

<210> 1

50 <211> 5908

<212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> vector plásmido pRY42
 5 <220>
 <221> Señal_polyA
 <222> (7)...(245)
 <223> Señal_polyA SV40
 <220>
 10 <221> promotor
 <222> (266)...(756)
 <223> fragmento promotor mCMV-MIE (IE1)
 <220>
 <221> 5'UTR
 15 <222> (758)...(791)
 <223> parte de mCMV-MIE (IE1) 5'UTR exón 1
 <220>
 <221> 5'UTR
 <222> (803)...(884)
 20 <223> parte de hCMV-MIE (IE1) 5'UTR exón 1
 <220>
 <221> intrón
 <222> (885)...(1711)
 <223> intrón A hCMV-MIE (IE1)
 25 <220>
 <221> 5'UTR
 <222> (1712)...(1729)
 <223> hCMV-MIE (IE1) 5'UTR exón 2
 <220>
 30 <221> Señal_polyA
 <222> (1767)...(2005)
 <223> Señal polyA SV40
 <220>
 <221> promotor
 35 <222> (2019)...(2345)
 <223> promotor temprano SV40, derivado de pFRT/lacZeo (Invitrogen)
 <220>
 <221> fuente
 <222> (2350)...(2354)
 40 <223> secuencia que contiene sitio ATG encontrado aguas arriba del tipo salvaje FRT en pFRT/lacZeo (Invitrogen)
 <220>
 <221> recomb_misc
 <222> (2355)...(2402)
 45 <223> sitio diana de reconocimiento de flippasa tipo salvaje (FRT), derivada de pcADN5-Frt (Invitrogen)
 <220>
 <221> fuente
 <222> (3183)...(4043)
 50 <223> complemento inverso CDS del gen beta-lactamasa
 <220>
 <221> recomb_misc
 <222> (4319)...(4366)
 <223> sitio diana de reconocimiento de flippasa tipo salvaje (FRT)

<220>
 <221> promotor
 <222> (4410)...(4900)
 <223> fragmento promotor mCMV-MIE (IE1)

5 <220>
 <221> 5'UTR
 <222> (4902)...(4935)
 <223> parte de mCMV-MIE (IE1) 5'UTR exón 1

10 <220>
 <221> 5'UTR
 <222> (4947)...(5028)
 <223> parte de hCMV-MIE (IE1) 5'UTR exón 1

15 <220>
 <221> intrón
 <222> (5029)...(5855)
 <223> hCMV-MIE (IE1) intrón A

20 <220>
 <221> 5'UTR
 <222> (5856)...(5873)
 <223> hCMV-MIE (IE1)5'UTR exón 2

<400> 1
 gaattcattg atcataatca gccataccac atttgtagag gttttacttg ctttaaaaaa 60
 cctccacac ctcccctga acctgaaaca taaaatgaat gcaattgttg ttgttaactt 120
 gtttattgca gcttataatg gttacaaata aagcaatagc atcacaaatt tcacaaataa 180
 agcatttttt tcactgcatt ctagttgtgg tttgtccaaa ctcataaatg tatcttatca 240
 tgtctggcgg ccgctgaggc gcgcctactg agtcattagg gactttccaa tgggttttgc 300
 ccagtacata aggtcaatag ggggtgaatca acaggaaaagt cccattggag ccaagtacac 360
 tgagtcaata gggactttcc attgggtttt gcccagtaca aaagggtcaat aggggggtgag 420
 tcaatggggt tttcccatta ttggcacgta cataagggtca ataggggtga gtcattgggt 480
 tttccagcc aatttaatta aaacgccatg tactttccca ccattgacgt caatgggcta 540
 ttgaaactaa tgcaacgtga cttttaaacg gtactttccc atagctgatt aatgggaaag 600

taccgtttctc	gagccaatac	acgtcaatgg	gaagtgaaga	ggcagccaaa	acgtaacacc	660
gccccggttt	tcccctggaa	attccatatt	ggcacgcatt	ctattggctg	agctgcgttc	720
tacgtgggta	taagaggcgc	gaccagcgtc	ggtaccgctg	cagtcttcgg	tctgaccacc	780
gtagaacgca	gcctcaggac	ctccatagaa	gacaccggga	ccgatccagc	ctccgcggcc	840
gggaacgggt	cattggaacg	cggattcccc	gtgccaaag	tgacgtaagt	accgcctata	900
gagtcctatg	gccccacccc	ttggcttctt	atgcatgcta	tactgttttt	ggcttggggt	960
ctatacaccc	ccgcttcctc	atgttatagg	tgtaggatata	gcttagccta	taggtgtggg	1020
ttattgacca	ttattgacca	ctccccattt	ggtgacgata	ctttccatta	ctaattccata	1080
acatggctct	ttgccacaac	tctctttatt	ggctatatgc	caatacactg	tccttcagag	1140
actgacacgg	actctgtatt	tttacaggat	gggtgtctcat	ttattattta	caaattcaca	1200
tatacaaac	caccgtcccc	agtgtcccga	gtttttatta	aacataacgt	gggatctcca	1260
cgcgaattct	gggtacgtgt	tccggacatg	ggctcttctc	cggtagcggc	ggagcttcta	1320
catccgagcc	ctgtctccat	gcctccagcg	actcatggtc	gctcggcagc	tccttgctcc	1380
taacagtgga	ggccagactt	aggcacagca	cgtatgccac	caccaccagt	gtgccgcaca	1440
aggccgtggc	ggtagggtat	gtgtctgaaa	atgagctcgg	ggagcgggct	tgcaccgctg	1500
acgcaatttg	taccgttcag	gcagcggcag	aagaagtatg	aggcagctga	gttggtgtgt	1560
tctgataaga	gtcagaggta	actcccgttg	cgggtgctgt	aacgggtggg	ggcagtgtag	1620
tctgagcagt	actcgttgct	gccgcgcgcg	ccaccagaca	taatagctga	cagactaaca	1680
gactgttctc	ttccatgggt	cttttctgca	gtcaccgtcc	ttgacacggg	atccggcgcg	1740
ccccatgggg	tactcttaca	tcgcgaattg	atcataatca	gccataccac	atttgtagag	1800
gttttacttg	cttttaaaaa	cctcccacac	ctccccctga	acctgaaaca	taaaaatgaat	1860
gcaattgttg	ttgttaactt	gtttattgca	gcttataatg	gttacaataa	aagcaatagc	1920
atcacaaatt	tcacaaataa	agcatttttt	tcactgcatt	ctagtgtgtg	tttgtccaaa	1980
ctcatcaatg	tattcttatca	tgtctggaac	agcttgagca	gctgtggaat	gtgtgtcagt	2040
taggggtgtg	aaagtcccca	ggctccccag	caggcagaag	tatgcaaagc	atgcatctca	2100
attagtcagc	aaccaggtgt	ggaaagtccc	caggctcccc	agcaggcaga	agtatgcaaa	2160
gcatgcatct	caattagtca	gcaaccatag	tcccggccct	aactccgccc	atcccggccc	2220
taactccgcc	cagttccgcc	cattctccgc	ccataggctg	actaattttt	tttatttatg	2280
cagaggccga	ggccgcctcg	gcctctgagc	tattccagaa	gtagttagga	ggcttttttg	2340
gaggctacca	tggagaagtt	actattccga	agttcctatt	ctctagaaag	tataggaact	2400
tctcgggccc	cgttgctggc	gtttttccat	aggctccgcc	cccctgacga	gcatcacaaa	2460
aatcagacgt	caagtacag	gtggcgaaac	ccgacaggac	tataaagata	ccaggcgttt	2520
ccccctggaa	gctccctcgt	gcgctctcct	gttccgaccc	tgccgcttac	cggatacctg	2580
tccgcctttc	tcccttcggg	aagcgtggcg	ctttctcata	gctcacgctg	taggtatctc	2640
agttcgggtg	aggtcgctcg	ctccaagctg	ggctgtgtgc	acgaaccccc	cgttcagccc	2700
gaccgtctgc	ccttatccgc	taactatcgt	cttgagtcca	accgggtaag	acacgactta	2760
tcgccactgg	cagcagccac	tggtaacagg	attagcagag	cagaggtatg	aggcgggtgt	2820
acagagttct	tgaagtgggt	gcctaactac	ggctacacta	gaagaacagt	atttggtatc	2880
tgcgctctgc	tgaagccagt	taccttcgga	aaaagagttg	gtagctcttg	atccggcaaa	2940
caaacacccg	ctggttagcg	tggttttttt	gtttgcaagc	agcagattac	gcgcagaaaa	3000
aaaggatctc	aagaagatcc	tttgatcttt	tctacggggg	ctgacgctca	gtggaacgaa	3060
aactcacgtt	aagggatttt	ggctcatgaga	ttatcaaaaa	ggatcttcac	ctagatcctt	3120
ttaaatataa	aatgaagttt	taaatcaatc	taaagtatat	atgagtaaac	ttggtctgac	3180
agttaccaat	gcttaatcag	tgaggcacct	atctcagcga	tctgtctatt	tcgttcaccc	3240
atagttgcct	gactccccgt	cgtgtagata	actacgatac	gggagggtct	accatctggc	3300
cccagtgctg	caatgatacc	gcgagaccca	cgctcaccgg	ctccagattt	atcagcaata	3360
aaccagccag	ccggaagggc	cgagcgcaga	agtggctctg	caactttatc	cgcctccatc	3420
cagtctatta	attgttgccg	ggaagctaga	gtaagtagtt	cgccagttaa	tagtttgccg	3480
aacgttggtg	ccattgctac	aggcatcggt	gtgtcacgct	cgtcgttttg	tatggcttca	3540
ttcagctccg	gttcccaacg	atcaaggcga	gttacatgat	cccccatggt	gtgcaaaaaa	3600
gcggttagct	ccttcgggtc	tccgatcggt	gtcagaagta	agttggccgc	agtgttatca	3660
ctcatgggta	tggcagcaat	gcataattct	cttactgtca	tgccatccgt	aagatgcttt	3720
tctgtgactg	gtgagtactc	aaccaagtca	ttctgagaat	agtgtatgct	gcgaccgagt	3780
tgctcttgcc	cggcgctaat	acggggataa	accgcgcacc	atagcagaac	tttaaaagtg	3840
ctcatcattg	gaaaacgttc	ttcggggcga	aaactctcaa	ggatcttacc	gctgttgaga	3900
tccagttcga	tgtaacccac	tcgtgcaccc	aactgatctt	cagcatcttt	tactttcacc	3960
agcgtttctg	ggtgagcaaa	aacaggaagg	caaaatgccg	caaaaaaggg	aataagggag	4020
acacggaaat	gttgaaatac	catactcttc	ctttttcaat	attattgaag	catttatcag	4080
ggttatgtgc	tcatgagcgg	atacatattt	gaatgtattt	agaaaaataa	acaaataggg	4140
gttccgcgca	catttccccc	aaaagtgcga	cctgacgtct	aagaaaccat	tattatcatg	4200
acattaacct	ataaaaaatg	gcgtatcacg	aggccctgat	ggctctttgc	ggcaccatc	4260
gttcgtaatg	ttccgtggca	ccgaggacaa	ccctcaagag	aaaaatgtaat	cacactggga	4320
agttcctatt	ccgaagttcc	tattcttcaa	aaggtatagg	aacttcctgc	agtgaataat	4380

```

aaaatgtgtg tttgtccgaa atacgcgcct actgagtcac tagggacttt ccaatgggtt 4440
ttgccagta cataagggtca ataggggtga atcaacagga aagtcccatt ggagccaagt 4500
acactgagtc aataggggact ttccattggg ttttgcccag tacaaaagggt caataggggg 4560
tgagtcaatg gggtttttccc attattggca cgtacataag gtcaatagggt gtgagtcatt 4620
gggttttttc agccaattta attaaaacgc catgtacttt cccaccattg acgtcaatgg 4680
gctattgaaa ctaatgcaac gtgaccttta aacggtactt tcccatagct gattaatggg 4740
aaagtaccgt tctcgagcca atacacgtca atgggaagtg aaagggcagc caaaacgtaa 4800
caccgccccg gttttcccct ggaaattcca tattggcacg cattctattg gctgagctgc 4860
gttctacgtg ggtataagag gcgcgaccag cgtcgggtacc gtcgcagctc tcggtctgac 4920
caccgtagaa cgcagcctca ggacctccat agaagacacc gggaccgatc cagcctccgc 4980
ggccgggaac ggtgcattgg aacgcggatt ccccggtgcca agagtgcagt aagtaccgcc 5040
tataagagtct ataggccac ccccttggct tcttatgcat gctatactgt ttttggcttg 5100
gggtctatata acccccgtt cctcatgtta taggtgatgg tatagcttag cctatagggtg 5160
tggtgtattg accattattg accactcccc tattgggtgac gatactttcc attactaatc 5220
catacatagg ctctttgcca caactctctt tattggctat atgccaatac actgtccttc 5280
agagactgac acggactctg tatttttaca ggtgggggtc tcatttatta tttacaaatt 5340
cacatatata acaccacgt ccccggtgcc cgcagttttt attaaacata acgtggggtc 5400
tccacgcgaa tctcgggtac gtgttccgga catggggtct tctccggtag cggcggagct 5460
tctacatccg agccctgctc ccatgcctcc agcgactcat ggtcgtcgcg cagctccttg 5520
ctcctaacag tggaggccag acttaggcac agcacgatgc ccaccaccac cagtgtgtccg 5580
cacaaggccg tggcggtagg gtatgtgtct gaaaatgagc tcggggagcg ggcttgacc 5640
gctgacgcat ttggaagact taaggcagcg gcagaagaag atgcaggcag ctgagttgtt 5700
gtgttctgat aagagtcaga ggtaactccc gttgcggtgc tgtaacgggt ggagggcagt 5760
gtagtctgag cagtactcgt tgctgcccgc cgcgccacca gacataatag ctgacagact 5820
aacagactgt tcctttccat gggctctttc tgcagtcacc gtccttgaca cgaagcttac 5880
cggtagatct gctagcacat gtaggcct 5908

```

<210> 2

<211> 7948

<212> ADN

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> vector plásmido pRY57

<220>

<221> CDS

10 <222> (67)...(713)

<223> cadena ligera de gen optimizado cB72.3 kappa

<220>

<221> Señal_polyA

<222> (720)...(958)

15 <223> Señal polyA SV40

<220>

<221> promotor

<222> (979)...(1470)

<223> fragmento promotor mCMV-MIE (IE1)

20 <220>

<221> 5'UTR

<222> (1471)...(1504)

<223> parte de mCMV-MIE (IE1) 5'UTR exón 1

<220>

25 <221> 5'UTR

<222> (1516)...(1601)

<223> parte de hCMV-MIE (IE1) 5'UTR exón 1

<220>

<221> intrón

30 <222> (1598)...(2424)

<223> hCMV-MIE (IE1) intrón A

<220>

<221> 5'UTR

<222> (2425)...(2441)

35 <223> hCMV-MIE (IE1) 5'UTR exón 2

<220>
 <221> CDS
 <222> (2508)...(3836)
 <223> Cadena pesada gen optimizado cB72.3 gamma-4

5 <220>
 <221> Señal_polyA
 <222> (3843)...(4081)
 <223> Señal polyA SV40

10 <220>
 <221> promotor
 <222> (4095)...(4421)
 <223> SV40 early promotor, derived from pFRT/lacZeo (Invitrogen)

15 <220>
 <221> fuente
 <222> (4426)...(4430)
 <223> secuencia que contiene el sitio ATG encontrado aguas arriba de FRT de tipo salvaje en pFRT/lacZeo (Invitrogen)

20 <220>
 <221> recomb_misc
 <222> (4431)...(4478)
 <223> sitio diana de reconocimiento (FRT) de flipasa de tipo salvaje, derivado de pcADN5-Frt (Invitrogen)

25 <220>
 <221> fuente
 <222> (5259)...(6119)
 <223> complemento inverso CDS del gen beta-lactamasa

30 <220>
 <221> recomb_misc
 <222> (6395)...(6442)
 <223> sitio diana de reconocimiento (FRT) de flipasa mutante

35 <220>
 <221> promotor
 <222> (6486)...(6977)
 <223> fragmento promotor mCMV-MIE (IE1)

40 <220>
 <221> 5'UTR
 <222> (6978)...(7011)
 <223> parte de mCMV-MIE (IE1) 5'UTR exón 1

45 <220>
 <221> 5'UTR
 <222> (7023)...(7108)
 <223> parte de hCMV-MIE (IE1) 5'UTR exón 1

45 <220>
 <221> intrón
 <222> (7105)...(7931)
 <223> hCMV-MIE (IE1) intrón A

50 <220>
 <221> 5'UTR
 <222> (7932)...(7948)
 <223> hCMV-MIE (IE1) 5'UTR exón 2

ES 2 694 778 T3

<400> 2	
aagcttgccg ccaccatgat gcggcctatc gtgctgggtgc tgctgttcgc cacctctgcc	60
ctggcc gac atc cag atg acc cag tcc ccc gcc tcc ctg tct gtg tcc	108
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser	
1 5 10	
gtg ggc gag aca gtg acc atc acc tgt cgg gcc tcc gag aac atc tac	156
Val Gly Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr	
15 20 25 30	
tcc aac ctg gcc tgg tat cag cag aag cag ggc aag tcc cct cag ctg	204
Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu	
35 40 45	
ctg gtg tac gcc gcc acc aac ctg gct gac ggc gtg ccc tcc agg ttc	252
Leu Val Tyr Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe	
50 55 60	
tcc ggc tct ggc tcc ggc acc cag tac tcc ctg aag atc aac tcc ctg	300
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu	
65 70 75	
cag tcc gag gac ttc ggc tcc tac tac tgc cag cac ttc tgg ggc acc	348
Gln Ser Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr	
80 85 90	
cct tac acc ttc ggc gga ggc acc cgg ctg gaa atc aag cgg acc gtg	396
Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val	
95 100 105 110	
gcc gct cct tcc gtg ttc atc ttc cca cct tcc gac gag cag ctg aag	444
Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys	
115 120 125	
tcc ggc acc gcc tct gtg gtg tgc ctg ctg aac aac ttc tac cct cgg	492
Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg	
130 135 140	
gag gcc aag gtg cag tgg aag gtg gac aac gcc ctg cag agc ggc aac	540
Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn	
145 150 155	
tcc cag gaa tcc gtc acc gag cag gac tcc aag gac tct acc tac tcc	588
Ser Gln Asp Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser	
160 165 170	
ctg tcc tcc acc ctg acc ctg tcc aag gcc gac tac gag aag cac aag	636
Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys	
175 180 185 190	
gtg tac gcc tgc gaa gtg acc cac cag ggc ctg tcc agc cct gtg acc	684
Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr	
195 200 205	
aag tcc ttc aac cgg ggc gag tgc tga tag aattcattga tcataatcag	734
Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Xaa Xaa	
210 215	
ccataaccaca tttgttagagg ttttacttgc tttaaaaaac ctccacacacc tccccctgaa	794
cctgaaacat aaaatgaatg caattgttgt tgtaaacttg tttattgcag cttataatgg	854
ttacaaataa agcaatagca tcacaaatct cacaataaaa gcattttttt cactgcattc	914
tagttgtggt ttgtccaaac tcatcaatgt atcttatcat gtctggcggc cgctgaggcg	974
cgcctactga gtcattaggg actttccaat gggttttgcc cagtacataa ggtcaatagg	1034
gggtgaatcaa caggaaagtc ccattggagc caagtacact gagtcaatag ggactttcca	1094
ttgggttttg ccagtagcaa aaggtcaata ggggggtgagt caatgggttt ttcccattat	1154
tggcacgtac ataaggtcaa taggggtgag tcattgggtt ttccagcca atttaattaa	1214
aacgccatgt actttccac cattgacgtc aatgggctat tgaaactaat gcaacgtgac	1274
ctttaaacgg tactttcca tagctgatta atgggaaagt accgttctcg agccaatata	1334
cgtcaatggg aagtgaagg gcagccaaaa cgtaacaccg ccccggtttt cccctggaaa	1394
ttccatattg gcacgcattc tattggctga gctgcgttct acgtgggtat aagaggcgcg	1454

ES 2 694 778 T3

accagcgctgc	gtaccgctgc	agtcttcggt	ctgaccaccg	tagaacgcag	cctcaggacc	1514
tccatagaag	acaccgggac	cgatccagcc	tccgcggccg	ggaacgggtgc	attggaacgc	1574
ggattccccc	tgccaagagt	gacgtaagta	ccgcctatag	agtctatagg	cccaccccct	1634
tggcttctta	tgcatgctat	actgtttttg	gcttggggtc	tatacacccc	cgcttcctca	1694
tgttataggt	gatggtatag	cttagcctat	aggtgtgggt	tattgaccat	tattgaccac	1754
tccccctattg	gtgacgatac	tttccattac	taatccataa	catggctctt	tgccacaact	1814
ctctttattg	gctatatgcc	aatacactgt	ccttcagaga	ctgacacgga	ctctgtattt	1874
ttacaggatg	gggtctcatt	tattattttac	aaattcacat	atacaacacc	accgtcccca	1934
gtgcccgcag	tttttattaa	acataacgtg	ggatctccac	gcgaatctcg	ggtacgtggt	1994
ccggacatgg	gctcttctcc	ggtagcggcg	gagcttctac	atccgagccc	tgctcccatg	2054
cctccagcga	ctcatggctg	ctcggcagct	ccttgctcct	aacagtggag	gccagactta	2114
ggcacagcac	gatgcccacc	accaccagt	tgccgcacaa	ggccgtggcg	gtagggtatg	2174
tgtctgaaaa	tgagctcggg	gagcgggctt	gcaccgctga	cgcatcttga	agacttaagg	2234
cagcggcaga	agaagatgca	ggcagctgag	ttgttgtgtt	ctgataagag	tcagaggtaa	2294
ctcccgttgc	ggtgctgtta	acggtggagg	gcagtgtagt	ctgagcagta	ctcgttgctg	2354
ccgcgcgcgc	caccagacat	aatagctgac	agactaacag	actgttcctt	tccatgggtc	2414
ttttctgcag	tcaccgtcct	tgacacggga	tccgcgcgca	ccatgatgcg	gcctatcgtg	2474
ctggtgctgc	tgttcgccac	aagcgctctg	gct cag gtg	cag ctg cag	cag agc	2528
			Gln Val	Gln Leu	Gln Gln Ser	
			1	5		
gac gcc gag ctg gtg aag cct ggc gct agc gtg aag atc agc tgc aag	2576					
Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys						
10						
gac gcc gag ctg gtg aag cct ggc gct agc gtg aag atc agc tgc aag	2624					
Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His Ala Ile His Trp Ala Lys Gln						
25						
aag gcc gag ctg gtg aag cct ggc gct agc gtg aag atc agc tgc aag	2672					
Lys pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Asn						
40						
gac gcc gag ctg gtg aag cct ggc gct agc gtg aag atc agc tgc aag	2720					
Asp Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr						
60						
gac gcc gag ctg gtg aag cct ggc gct agc gtg aag atc agc tgc aag	2768					
Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr						
75						
gac gcc gag ctg gtg aag cct ggc gct agc gtg aag atc agc tgc aag	2816					
Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Lys Arg Ser Tyr Tyr Gly His						
90						
gac gcc gag ctg gtg aag cct ggc gct agc gtg aag atc agc tgc aag	2864					
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly						
105						
gac gcc gag ctg gtg aag cct ggc gct agc gtg aag atc agc tgc aag	2912					
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser						
120						
gac gcc gag ctg gtg aag cct ggc gct agc gtg aag atc agc tgc aag	2960					
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Glu Tyr Phe Pro Glu Pro Val						
140						
gac gcc gag ctg gtg aag cct ggc gct agc gtg aag atc agc tgc aag	3008					
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe						
155						
gac gcc gag ctg gtg aag cct ggc gct agc gtg aag atc agc tgc aag	3056					
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val						
170						
gac gcc gag ctg gtg aag cct ggc gct agc gtg aag atc agc tgc aag	3104					
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr cys Asn Val						
185						
gac gcc gag ctg gtg aag cct ggc gct agc gtg aag atc agc tgc aag	3152					
Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys						
200						
gac gcc gag ctg gtg aag cct ggc gct agc gtg aag atc agc tgc aag	3200					
Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Glu Leu Gly Gly						
220						
gac gcc gag ctg gtg aag cct ggc gct agc gtg aag atc agc tgc aag	3248					
ccc tca gtg ttt ctg ttc cca ccc aag ccc aag gat acc ctg atg atc						
225						
gac gcc gag ctg gtg aag cct ggc gct agc gtg aag atc agc tgc aag						
230						

ES 2 694 778 T3

Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	
agc	cgg	acc	cct	gaa	gtg	acc	tgc	gtg	gtg	gtg	gat	gtg	agc	cag	gag	3296
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	
		250					255					260				
gac	ccc	gaa	gtc	cag	ttc	aat	tgg	tac	gtg	gac	ggc	gtg	gaa	gtg	cac	3344
Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	
	265					270					275					
aac	gcc	aag	acc	aag	ccc	aga	gag	gag	cag	ttc	aac	agc	acc	tac	cgc	3392
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	
	280				285					290					295	
gtg	gtg	tct	gtg	ctg	acc	gtg	ctg	cac	cag	gat	tgg	ctg	aac	ggc	aaa	3440
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	
				300					305					310		
gag	tac	aag	tgc	aag	gtc	tcc	aac	aag	ggc	ctg	cct	agc	agc	atc	gag	3488
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	
			315					320					325			
aaa	acc	atc	agc	aag	gcc	aag	ggc	cag	cca	cgc	gag	ccc	cag	gtg	tac	3536
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	
		330					335					340				
acc	ctg	ccc	ccc	agc	caa	gag	gag	atg	acc	aag	aac	cag	gtg	tcc	ctg	3584
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	
	345					350					355					
acc	tgt	ctg	gtg	aag	ggc	ttc	tac	ccc	agc	gac	atc	gcc	gtg	gag	tgg	3632
Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	
	360				365					370					375	
gag	agc	aac	ggc	cag	ccc	gag	aac	aac	tac	aag	acc	acc	ccc	cct	gtg	3680
Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	pro	Pro	Val	
				380					385					390		
ctg	gac	agc	gat	ggc	agc	ttc	ttc	ctg	tac	tca	cgg	ctg	acc	gtg	gat	3728
Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	
			395					400					405			
aag	agc	aga	tgg	caa	gag	ggc	aat	gtc	ttt	agc	tgc	agc	gtg	atg	cac	3776
Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	
		410					415					420				
gag	gcc	ctg	cac	aat	cct	aca	ccc	aga	aga	gcc	tga	gcctgtcc				3820
Glu	Ala	Leu	His	Asn	Pro	Thr	Pro	Arg	Arg	Ala	Xaa					
	425					430										
cctgggcaag	tgatagtcgc	gaattgatca	taatcagcca	taccacattt	gtagaggttt											3880
tacttgcttt	aaaaaacctc	ccacacctcc	cctgaaact	gaaacataaa	atgaatgcaa											3940
ttgttgttgt	taacttgctt	attgcagctt	ataatggtta	caaataaagc	aatagcatca											4000
caaatttcac	aaataaagca	ttttttcac	tgcatcttag	ttgtgggttg	tccaaactca											4060
tcaatgtatc	ttatcatgtc	tggatcagct	tgagcagctg	tggaatgtgt	gtcagtttagg											4120
gtgtggaaaag	tccccaggct	ccccagcagg	cagaagtatg	caaagcatgc	atctcaatta											4180
gtcagcaacc	aggtgtggaa	agtccccagg	ctccccagca	ggcagaagta	tgcaaagcat											4240
gcatctcaat	tagtcagcaa	ccatagctcc	gcccctaact	ccgcccattcc	cgcccctaac											4300
tccgcccagt	tccgcccatt	ctccgcccc	tggtgacta	atTTTTTTT	tttatgcaga											4360
ggccgaggcc	gcctcgccct	ctgagctatt	ccagaagtag	tgaggaggct	TTTTTggagg											4420
ctaccatgga	gaagtacta	ttccgaagtt	cctatttctt	agaaagtata	ggaacttctc											4480
gggcccgcgtt	gctggcggtt	ttccataggc	tccgcccccc	tgacgagcat	cacaaaaatc											4540
gacgctcaag	tcagaggtgg	cgaaaccga	caggactata	aagataccag	gcgtttcccc											4600
ctggaagctc	cctcgctgcg	tctcctgttc	cgaccctgcc	gcttaccgga	tacctgtccg											4660
cctttctccc	ttcgggaagc	gtggcgcttt	ctcatagctc	acgctgtagg	tatctcagtt											4720
cggtgtaggt	cgttcgtctc	aagctgggct	gtgtgcacga	acccccggt	cagcccagcc											4780
gctgcccctt	atccgtaac	tatcgtcttg	agtccaaccc	ggtaagacac	gacttatcgc											4840
cactggcagg	agccactggg	aacaggatta	gcagagcgag	gtatgtaggc	ggtgctacag											4900
agttcttgaa	gtggtggcct	aactacggct	acactagaag	aacagtattt	ggtatctgcg											4960
ctctgctgaa	gccagtacc	ttcggaaaaa	gagttggtag	ctctgatcc	ggcaaaacaa											5020
ccaccgctgg	tagcggtggg	ttttttgttt	gcaagcagca	gattacgcgc	agaaaaaaag											5080
gatctcaaga	agatcctttg	atcttttcta	cggggtctga	cgctcagtg	aacgaaaact											5140
cacgttaagg	gattttggtc	atgagattat	caaaaaggat	cttcacctag	atccttttaa											5200
attaaaaatg	aagttttaaa	tcaatctaaa	gtatatatga	gtaaaccttg	tctgacagtt											5260
accaatgctt	aatcagtgag	gcacctatct	cagcgatctg	tctatttctg	tcatccatag											5320

ttgcctgact	ccccgtcgtg	tagataacta	cgatacggga	gggcttacca	tctggcccca	5380
gtgctgcaat	gataccgcga	gacccacgct	caccggctcc	agatttatca	gcaataaacc	5440
agccagccgg	aagggccgag	cgcagaagtg	gtcctgcaac	tttatccgcc	tccatccagt	5500
ctattaattg	ttgccgggaa	gctagagtaa	gtagtccgcc	agttaatagt	ttgcgcaacg	5560
ttgttgccat	tgctacaggc	atcgtgggtg	cagcctcgtc	gtttggtatg	gcttcattca	5620
gctccggttc	ccaacgatca	aggcgagtta	catgatcccc	catgttgtgc	aaaaaagcgg	5680
ttagctcctt	cggtcctccg	atcgtttgtc	gaagtaagtt	ggccgcagtg	ttatcactca	5740
tggttatggc	agcactgcat	aattctctta	ctgtcatgcc	atccgtaaga	tgcttttctg	5800
tgactgggtg	gtactcaacc	aagtcattct	gagaatagtg	tatgcggcga	ccgagttgct	5860
cttgcggcgc	gtcaatacgg	gataatacgc	cgccacatag	cagaacttta	aaagtgtctc	5920
tcattggaaa	acgttctctg	gggcgaaaac	tctcaaggat	cttaccgctg	ttgagatcca	5980
gttcgatgta	acccactcgt	gcacccaact	gatcttcagc	atcttttact	ttcaccagcg	6040
tttctgggtg	aaataaaaac	ggaaggcaaa	atgcgcgaaa	aaagggaaata	agggcgacac	6100
ggaaatgttg	aatactcata	ctcttccttt	ttcaatatta	ttgaagcatt	tatcagggtt	6160
attgtctcat	gagcggatac	atattttgaat	gtattttagaa	aaataaaca	ataggggttc	6220
cgcgacacat	tccccgaaa	gtgccacctg	acgtctaaga	aaccattatt	atcatgacat	6280
taacctataa	aaatagcggt	atcacgagcg	ccttgatggct	ctttgcggca	cccacgtctc	6340
gtaatgtttc	gtggcaccga	ggacaaccct	caagagaaaa	tgtaatcaca	ctgggaagtt	6400
cctattccga	agttcttatt	cttcaaaaag	tataaggaact	tcctgcagtg	aataataaaa	6460
tgtgtgtttg	tccgaaatac	gcgcctactg	agtcattagg	gactttccaa	tgggttttgc	6520
ccagtacata	aggtaaatga	gggtgaatca	acagggaaagt	ccatttggag	ccaagtacac	6580
tgagtcaata	gggactttcc	attgggtttt	gccaggtaca	aaaggtcaat	aggggttgag	6640
tcaatggggt	tttcccataa	ttggcacgta	cataaggtca	ataggggtga	gtcattgggt	6700
ttttccagcc	aatttaatta	aaacgccatg	tactttccca	ccattgacgt	caatgggcta	6760
ttgaaactaa	tgcaacgtga	cctttaaaac	gtactttccc	atagctgatt	aatgggaaag	6820
taccgttctc	gagccaatac	acgtcaatgg	gaagtgaag	ggcagccaaa	acgtaacacc	6880
gccccgggtt	tcccctggaa	atcccatatt	ggcacgcatt	ctattggctg	agctgcgttc	6940
tacgtgggta	taagaggcgc	gaccagcgct	ggtaccgtcg	cagtcctcgg	tctgaccacc	7000
gtagaacgca	gcctcaggac	ctccatagaa	gacaccggga	ccgatccagc	ctccgcggcc	7060
gggaacgggt	cattggaaac	cggattcccc	gtgccaagag	tgacgtaagt	accgcctata	7120
gagtcctatg	gcccaccccc	ttggcttctt	atgcattgta	tactgttttt	ggcttggggt	7180
ctatacaccc	ccgcttcctc	atgttatagg	tgatgggtata	gcttagccta	taggtgtggg	7240
ttattgacca	ttattgacca	ctccccatt	ggtgacgata	ctttccatta	ctaattccata	7300
acatggctct	ttgccacaac	tctctttatt	ggctatatgc	caatacactg	tccttcagag	7360
actgacacgg	actctgtatt	tttacaggat	ggggtctcat	ttattattta	caaattcaca	7420
tatacaacac	caccgtcccc	agtgcccgca	gtttttatta	aacataacgt	gggatctcca	7480
cgcgaaatct	gggtacgtgt	tccggacatg	ggctcttctc	cggtagcggc	ggagcttcta	7540
catccgagcc	ctgctcccat	gctccagcg	actcatggtc	gctcggcagc	tccttgctcc	7600
taacagtggg	ggccagactt	aggcacagca	cgatgcccac	caccaccagt	gtgccgcaca	7660
aggccgtggc	ggtaggggat	gtgtctgaaa	atgagctcgg	ggagcgggct	tgaccgcctg	7720
acgcatttgg	aagacttaag	gcagcggcag	aagaagatgc	aggcagctga	gttgttgtgt	7780
tctgataaga	gtcagaggta	actcccgttg	cggtgctgtt	aacggtggag	ggcagtgtag	7840
tctgagcagt	actcgttgct	gccgcgcgcg	ccaccagaca	taatagctga	cagactaaca	7900
gactgttctt	ttccatgggt	cttttctgca	gtcaccgtcc	ttgacacg		7948

<210> 3

<211> 492

<212> ADN

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> fragmento de la secuencia promotora mCMV IE1

<400> 3

tactgagtca	ttagggactt	tccaatgggt	tttggccagt	acataagggtc	aataggggtg	60
aatcaacagg	aaagtcccat	tgagagccaag	tacactgagt	caatagggac	tttccattgg	120
gttttgccca	gtacaaaagg	tcaatagggg	gtgagtcaat	gggttttttc	cattattggc	180
acgtacataa	ggtcaatagg	ggtgagtcatt	tggttttttc	cagccaattt	aattaaaacg	240
ccatgtactt	tcccaccatt	gacgtcaatg	ggctattgaa	actaatgcaa	cgtgaccttt	300
aaacgggtact	ttcccatagc	tgattaatgg	gaaagtaccg	ttctcgagcc	aatacacgtc	360
aatgggaagt	gaaagggcag	ccaaaacgta	acaccgcccc	ggttttcccc	tggaaattcc	420

10

atattggcac	gcatttctatt	ggctgagctg	cggttctacgt	gggtataaga	ggcgcgacca	480
gcgtcggtag	cg					492

<210> 4

<211> 102

<212> ADN

15 <213> secuencia artificial

<220>

<223> fragmento de la secuencia promotora mCMV IE1 ("promotor núcleo")

ES 2 694 778 T3

	<400> 4	
	acaccgcccc gggttttcccc tggaaattcc atattggcac gcattctatt ggctgagctg	60
	cgttctacgt gggataaaga ggcgcgacca gcgtcggtag cg	102
	<210> 5	
	<211> 117	
5	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> fragmento de la secuencia promotora hCMV IE1 ("promotor núcleo")	
	<400> 5	
10	gcacaaaat caacgggact ttccaaaatg tcgtaacaac tccgccccat tgacgcaa	60
	ggcggttagg cgtgtacggg gggaggtcta tataagcaga gtcgttttag tgaaccg	117
	<210> 6	
	<211> 452	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> fragmento de la secuencia potenciadora sCMV IE1	
	<400> 6	
	gaccatagcc aattcaatat ggcgtatatg gactcatgcc aattcaatat ggtggatctg	60
	gacctgtgcc aattcaatat ggcgtatatg gactcgtgcc aattcaatat ggtggatctg	120
	gacccagcc aattcaatat ggcggacttg gcaccatgcc aattcaatat ggcggacctg	180
	gcactgtgcc aactggggag gggcttactt ggcacgggtgc caagtttgag gaggggtctt	240
	ggccctgtgc caagtccgcc atattgaatt ggcatgggtgc caataatggc ggccatattg	300
	gctatatgcc aggatcaata tataggcaat atccaatatg gccctatgcc aatatggcta	360
	ttggccagggt tcaatactat gtattggccc tatgccatat agtattccat atatgggttt	420
	tcctattgac gtagatagcc cctcccaatg gg	452
	<210> 7	
20	<211> 1074	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> secuencia reguladora quimérica 5'-sin traducir ("construcción 1")	
25	<220>	
	<221> potenciador	
	<222> (1)...(582)	
	<223> fragmento de hCMV IE1 y secuencia potenciadora mCMV IE	
	<220>	
30	<221> promotor	
	<222> (583)...(1074)	
	<223> fragmento de secuencia promotora mCMV IE1	

<400> 7		
	ctgcagtgaa taataaaatg tgtgtttgtc cgaaatacgc gttttgagat ttctgtcgcc	60
	gactaaattc atgtcgcgcg atagtgggtg ttatcgccga tagagatggc gatattggaa	120
	aaatcgatat ttgaaaatat ggcatattga aaatgtcgcc gatgtgagtt tctgtgtaac	180
	tgatattcgcc atttttccaa aagtgatttt tgggcatacg cgatatctgg cgatagcgct	240
	tatatcgttt acgggggatg gcgatagacg actttgggtga cttgggcgat tctgtgtgtc	300
	gcaaatatcg cagtttcgat ataggtgaca gacgatatga ggctatatcg ccgatagagg	360
	cgacatcaag ctggcacatg gccaatgcat atcgatctat acattgaatc aatattggcc	420
	attagccata ttattcattg gttatatagc ataaatcaat attggctatt ggccattgca	480
	tacgttgtat ccataatcata atagtacat ttatattggc tcatgtccaa cattaccgcc	540
	atgttgacat tgattattga ctagtattta atagtaatca attactgagt cattagggac	600
	tttccaatgg gttttgccc gtacataagg tcaatagggg tgaatcaaca ggaaagtccc	660
	attggagcca agtacactga tccaataggg actttccatt gggttttgcc cagtacaaaa	720
	gggtcaatagg gggtgagtc atgggttttt ccattatttg gcacgtacat aagggtcaata	780
	gggtgagtc attgggtttt tccagccaat ttaattaaac cgccatgtac ttcccacca	840
	ttgacgtcaa tgggtctattg aaactaatgc aacgtgacct ttaaaccggt ctttccata	900
	gctgattaat gggaagtagc cgttctcgag ccaataacac tcaatgggaa gtgaaagggc	960
	agccaaaacg taacaccgcc ccgggttttc ccattattggc acgcattcta	1020
	ttggctgagc tgcgttctac gtgggtataa gaggcgcgac cagcgtcggg accg	1074
<210> 8		
<211> 1128		
5	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
<220>		
	<223> secuencia reguladora quimérica 5'-sin traducir ("construcción 2")	
<220>		
10	<221> potenciador	
	<222> (1)...(1026)	
	<223> fragmento de secuencia potenciadora hCMV IE1	
<220>		
	<221> promotor	
15	<222> (1027)...(1128)	
	<223> fragmento de secuencia promotora mCMV IE1 ("promotor núcleo")	
<400> 8		
	ctgcagtgaa taataaaatg tgtgtttgtc cgaaatacgc gttttgagat ttctgtcgcc	60
	gactaaattc atgtcgcgcg atagtgggtg ttatcgccga tagagatggc gatattggaa	120
	aaatcgatat ttgaaaatat ggcatattga aaatgtcgcc gatgtgagtt tctgtgtaac	180
	tgatattcgcc atttttccaa aagtgatttt tgggcatacg cgatatctgg cgatagcgct	240
	tatatcgttt acgggggatg gcgatagacg actttgggtga cttgggcgat tctgtgtgtc	300
	gcaaatatcg cagtttcgat ataggtgaca gacgatatga ggctatatcg ccgatagagg	360
	cgacatcaag ctggcacatg gccaatgcat atcgatctat acattgaatc aatattggcc	420
	attagccata ttattcattg gttatatagc ataaatcaat attggctatt ggccattgca	480
	tacgttgtat ccataatcata atagtacat ttatattggc tcatgtccaa cattaccgcc	540
	atgttgacat tgattattga ctagtattta atagtaatca attacggggt cattagtcca	600
	tagcccatat atggagttcc gcgttacata acttacggta aatggcccgc ctggctgacc	660
	gccaacgac ccccgcccat tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag taacgccaat	720
	agggactttt cattgacgtc aatgggtgga gtatttacgg taaactgccc acttggcagt	780
	acatcaagtg tatcatatgc caagtacgcc ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc	840
	cgctggcat tatgcccagt acatgacctt atgggacctt cctacttggc agtacatcta	900
	cgtattagtc atcgctatta ccatggtgat gcgggttttg cagtacatca atgggcgtgg	960
	atagcggttt gactcacggg gatttccaag tctccacccc attgacgtca atgggagttt	1020
	gttttgacac cgccccggtt ttcccctgga aattccatat tggcacgcat tctattggct	1080
20	gagctgcggt ctacgtgggt ataagaggcg cgaccagcgt cgggtaccg	1128
<210> 9		
<211> 509		
<212> ADN		
<213> secuencia artificial		
<220>		
	<223> secuencia reguladora quimérica 5'-sin traducir ("construcción 3")	
<220>		
25	<221> potenciador	

	<222> (1)...(407)	
	<223> fragmento de secuencia potenciadora hCMV IE1	
	<220>	
	<221> promotor	
5	<222> (408)...(509)	
	<223> fragmento de secuencia promotora mCMV IE1 ("promotor núcleo")	
	<400> 9	
	cgcggttacat aacttacggt aaatggcccg cctggctgac cgcccaacga ccccgccca	60
	ttgacgtcaa taatgacgta tgttcccata gtaacgcaa tagggacttt ccattgacgt	120
	caatgggtgg agtatttacg gtaaacgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcataatg	180
	ccaagtacgc cccctattga cgtcaatgac ggtaaatggc ccgcctggca ttatgccag	240
	tacatgacct tatgggactt tcctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt	300
	accatggtga tgcgggtttg gcagtacatc aatgggcgtg gatagcgggt tgactcacgg	360
	ggatttccaa gtctccacc cattgacgtc aatgggagtt tgttttgaca ccgccccggt	420
	tttcccttg aaattccata ttggcacgca ttctattggc tgagctgcgt tctacgtggg	480
	tataagaggc gcgaccagcg tcggtaccg	509
	<210> 10	
10	<211> 961	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> secuencia reguladora quimérica 5'-sin traducir ("construcción 4")	
15	<220>	
	<221> potenciador	
	<222> (1)...(452)	
	<223> fragmento de secuencia potenciadora sCMV IE1	
	<220>	
20	<221> potenciador	
	<222> (453)...(859)	
	<223> fragmento de secuencia potenciadora hCMV IE1	
	<220>	
	<221> promotor	
25	<222> (860)...(961)	
	<223> fragmento de secuencia potenciadora mCMV IE1 ("promotor núcleo")	
	<400> 10	
	gaccatagcc aattcaatat ggcgtatatg gactcatgcc aattcaatat ggtggatctg	60
	gacctgtgcc aattcaatat ggcgtatatg gactcgtgcc aattcaatat ggtggatctg	120
	gacccagcc aattcaatat ggcggacttg gcaccatgcc aattcaatat ggcggacctg	180
	gacctgtgcc aactggggag ggggtctactt ggcacgggtgc caagtgtgag gaggggtctt	240
	ggccctgtgc caagtccgcc atattgaatt ggcattggtgc caataatggc ggccatattg	300
	gctatatgcc aggatcaata tataggcaat atccaatatg gccctatgcc aatatggcta	360
	ttggccagggt tcaatactat gtattggccc tatgccatat agtattccat atatgggttt	420
	tcctattgac gtagatagcc cctcccaatg ggcgcgttac ataacttacg gtaaatggcc	480
	cgccctggctg accgccaac gacccccgcc cattgacgtc aataatgacg tatgttccca	540
	tagtaacgcc aatagggact ttccattgac gtcaatgggt ggagtattta cggtaaaactg	600
	ccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtac gccccctatt gacgtcaatg	660
	acggtaaatg gcccgcctgg cattatgcc agtacatgac cttatgggac ttctctactt	720
	ggcagtacat ctacgtatta gtcatcgcta ttaccatggt gatgcgggtt tggcagtaca	780
	tcaatgggag tggatagcgg ttgactcac ggggatttcc aagtctccac ccattgacg	840
	tcaatgggag ttgttttga caccgccccg gtttccctt ggaaattcca tattggcacg	900
	cattctattg gctgagctgc gttctacgtg ggtataagag gcgcgaccag cgtcggtacc	960
30	g	961
	<210> 11	
	<211> 909	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> secuencia reguladora quimérica 5'-sin traducir ("construcción 5")	

	<220>					
	<221> potenciador					
	<222> (1)...(807)					
	<223> fragmento de secuencia potenciadora sCMV IE1					
5	<220>					
	<221> promotor					
	<222> (808)...(909)					
	<223> fragmento de secuencia promotora mCMV IE1 ("promotor núcleo")					
	<400> 11					
	gaccatagcc aattcaatat ggcgtatatg gactcatgcc aattcaatat ggtggatctg	60				
	gacctgtgcc aattcaatat ggcgtatatg gactcgtgcc aattcaatat ggtggatctg	120				
	gacccagcc aattcaatat ggcggacttg gcaccatgcc aattcaatat ggcggacctg	180				
	gacctgtgcc aactggggag gggctctactt ggcacggtgc caagtttgag gaggggtctt	240				
	ggccctgtgc caagtccgcc atattgaatt ggcattggtgc caataatggc ggccatattg	300				
	gctatatgcc aggatcaata tataggcaat atccaatatg gccctatgcc aatatggcta	360				
	ttggccaggt tcaatactat gtattggccc tatgccatat agtattccat atatgggttt	420				
	tcctattgac gtagatagcc cctcccaatg ggcggtccca tataccatat atggggcttc	480				
	ctaataccgc ccatagccac tccccattg acgtcaatgg tctctatata tggctcttcc	540				
	tattgacgtc atatgggcgg tcctattgac gtatatggcg cctcccccat tgacgtcaat	600				
	tacggtaaat ggcccgcctg gctcaatgcc cattgacgtc aataggacca cccaccattg	660				
	acgtcaatgg gatggctcat tgcccattca tatcgtttct cagcggccct attgacgtca	720				
	atgacggtaa atggcccatc tggcagtaca tcaatatcta ttaatagtaa cttggcaagt	780				
	acattactat tggaaagtac ccagggtaca ccgcccgggt tttcccctgg aaattccata	840				
	ttggcacgca ttctattggc tgagctgcgt tctacgtggg tataagaggc gcgaccagcg	900				
10	tcggtaccg	909				
	<210> 12					
	<211> 976					
	<212> ADN					
	<213> secuencia artificial					
15	<220>					
	<223> secuencia reguladora quimérica 5'-sin traducir ("construcción 6")					
	<220>					
	<221> potenciador					
	<222> (1)...(452)					
20	<223> fragmento de secuencia potenciadora sCMV IE1					
	<220>					
	<221> potenciador					
	<222> (453) (859)					
	<223> fragmento de secuencia potenciadora hCMV IE1					
25	<220>					
	<221> promotor					
	<222> (860)...(976)					
	<223> fragmento de secuencia promotora hCMV IE1 ("promotor núcleo")					
	<400> 12					
	gaccatagcc aattcaatat ggcgtatatg gactcatgcc aattcaatat ggtggatctg	60				
	gacctgtgcc aattcaatat ggcgtatatg gactcgtgcc aattcaatat ggtggatctg	120				
	gacccagcc aattcaatat ggcggacttg gcaccatgcc aattcaatat ggcggacctg	180				
	gacctgtgcc aactggggag gggctctactt ggcacggtgc caagtttgag gaggggtctt	240				
	ggccctgtgc caagtccgcc atattgaatt ggcattggtgc caataatggc ggccatattg	300				
	gctatatgcc aggatcaata tataggcaat atccaatatg gccctatgcc aatatggcta	360				
	ttggccaggt tcaatactat gtattggccc tatgccatat agtattccat atatgggttt	420				
	tcctattgac gtagatagcc cctcccaatg ggcggtttac ataacttacg gtaaatggcc	480				
	cgcctggctg accgccaac gacccccgc cattgacgtc aataatgacg tatgttccca	540				
	tagtaacgcc aataggggact ttccattgac gtcaatgggt ggagtattta cggtaaacctg	600				
	cccacttgcc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtac gccccctatt gacgtcaatg	660				
	acggtaaatg gcccgcttg cattatgccc agtacatgac cttatgggac tttcctactt	720				
	ggcagttacat ctacgtatta gtcatcgcta ttaccatggt gatgcggttt tggcagtaca	780				
	tcaatgggag tggatagcgg ttgactcac ggggatttcc aagtcctccac cccattgacg	840				
	ccgccccatt gacgcaaatg ggcggtaggc gtgtacgggt ggaggtctat ataagcagag	900				
	ctcgtttagt gaaccg	976				
30						

- <210> 13
 <211> 924
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
- 5 <220>
 <223> secuencia reguladora quimérica 5'-sin traducir ("construcción 7")
- <220>
 <221> potenciador
 <222> (1)...(807)
- 10 <223> fragmento de secuencia potenciadora sCMV IE1
- <220>
 <221> promotor
 <222> (808)...(924)
 <223> fragmento de secuencia promotora hCMV IE1 ("promotor núcleo")
- 15 <400> 13
 gaccatagcc aattcaatat ggcgtatatg gactcatgcc aattcaatat ggtggatctg 60
 gacctgtgcc aattcaatat ggcgtatatg gactcgtgcc aattcaatat ggtggatctg 120
 gacccagcc aattcaatat ggcggacttg gcacatgcc aattcaatat ggcggacctg 180
 gactgtgcc aactggggag gggctactt ggcacggtgc caagtttgag gaggggtctt 240
 ggccctgtgc caagtccgcc atattgaatt ggcattgtgc caataatggc ggccatattg 300
 gctatatgcc aggatcaata tataggcaat atccaatatg gccctatgcc aatatggcta 360
 ttggccaggt tcaatactat gtattggccc tatgccatat agtattccat atatggggtt 420
 tcctattgac gtagatagcc cctcccaatg ggcgggtcca tataccatat atggggcttc 480
 ctaataccgc ccatagccac tccccattg acgtcaatgg tctctatata tggcttttcc 540
 tattgacgtc atattggcgg tcctattgac gtatatggcg cctcccccat tgacgtcaat 600
 tacggtaaat ggcccgcctg gctcaatgcc cattgacgtc aataggacca cccaccattg 660
 acgtcaatgg gatggctcat tgccattca tatcgttct cacgccccct attgacgtca 720
 atgacggtaa atggccact tggcagtaca tcaatatcta ttaatagtaa cttggcaagt 780
 acattactat tggaagtacg ccagggtgca ccaaatcaa cgggactttc caaatgtcg 840
 taacaactcc gccccattga cgcaaatggg cggtaggcgt gtacggtggg aggtctatat 900
 aagcagagct cgtttagtga accg 924
- <210> 14
 <211> 214
 <212> PRT
- 20 <213> secuencia artificial
- <220>
 <223> cadena ligera cB72.3 kappa optimizada

<400> 14

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Asp Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 15

<211> 434

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> cadena pesada cB72.3 gamma-4 optimizada

<400> 15

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

ES 2 694 778 T3

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

REIVINDICACIONES

1. Un vector de expresión para la expresión heteróloga de una secuencia de ácidos nucleicos de interés en células de mamífero, el vector comprendiendo una primera secuencia reguladora del promotor quimérico que está unida operativamente a una primera secuencia de ácidos nucleicos que se ha de expresar, en donde la secuencia reguladora del promotor quimérico comprende:
 - 5 i) una secuencia promotora procedente del promotor de IE1 del citomegalovirus humano que consiste en la SEQ ID NO: 5 y que está unida operativamente al sitio de iniciación de la transcripción de la secuencia de ácidos nucleicos que se ha de expresar; y
 - 10 ii) una secuencia potenciadora procedente de la región IE1 del citomegalovirus de simio o que representa una quimera procedente de la región IE1 del citomegalovirus humano y de simio, estando situada la secuencia potenciadora en 5' y unida operativamente a la secuencia promotora humana, en donde la secuencia potenciadora comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 6.
2. El vector de expresión de la reivindicación 1, en donde la secuencia reguladora del promotor quimérico comprende una secuencia de nucleótidos que se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13.
 - 15 3. El vector de expresión de la reivindicación 1 o 2, que comprende además una segunda secuencia reguladora del promotor quimérico que está operativamente unida a una segunda secuencia de ácidos nucleicos que se ha de expresar, en donde la segunda secuencia reguladora del promotor quimérico es idéntica a la primera secuencia reguladora del promotor quimérico.
 - 20 4. El vector de expresión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, que comprende además una segunda secuencia reguladora del promotor quimérico que está unida operativamente a una segunda secuencia de ácidos nucleicos que se ha de expresar, en donde la segunda secuencia reguladora del promotor quimérico es diferente de la primera secuencia reguladora del promotor quimérico.
 - 25 5. El vector de expresión de la reivindicación 3 o 4, en donde las primera y segunda secuencias de ácidos nucleicos que se han de expresar codifican diferentes polipéptidos.
 6. El vector de expresión de la reivindicación 5, en donde los diferentes polipéptidos representan subunidades de una proteína dimérica o multimérica.
 7. El vector de expresión de la reivindicación 6, en donde la proteína dimérica o multimérica es una molécula de anticuerpo.
 - 30 8. Una célula hospedante de mamífero transfectada con un vector de expresión como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
 9. La célula hospedante de mamífero de la reivindicación 8, en donde la célula hospedante es una célula de CHO.
 10. Un método para la expresión heteróloga de una secuencia de ácidos nucleicos de interés en una célula hospedante de mamífero, que comprende:
 - 35 i) transfectar la célula hospedante de mamífero con un vector de expresión como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7; y
 - ii) cultivar la célula hospedante de mamífero transfectada en condiciones que permitan la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos de interés.
 11. El método de la reivindicación 10, en donde la transfección es una transfección estable.
 - 40 12. Uso de un vector de expresión como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para la expresión heteróloga *in vitro* de una secuencia de ácidos nucleicos de interés en una célula hospedante de mamífero.

FIGURA 1

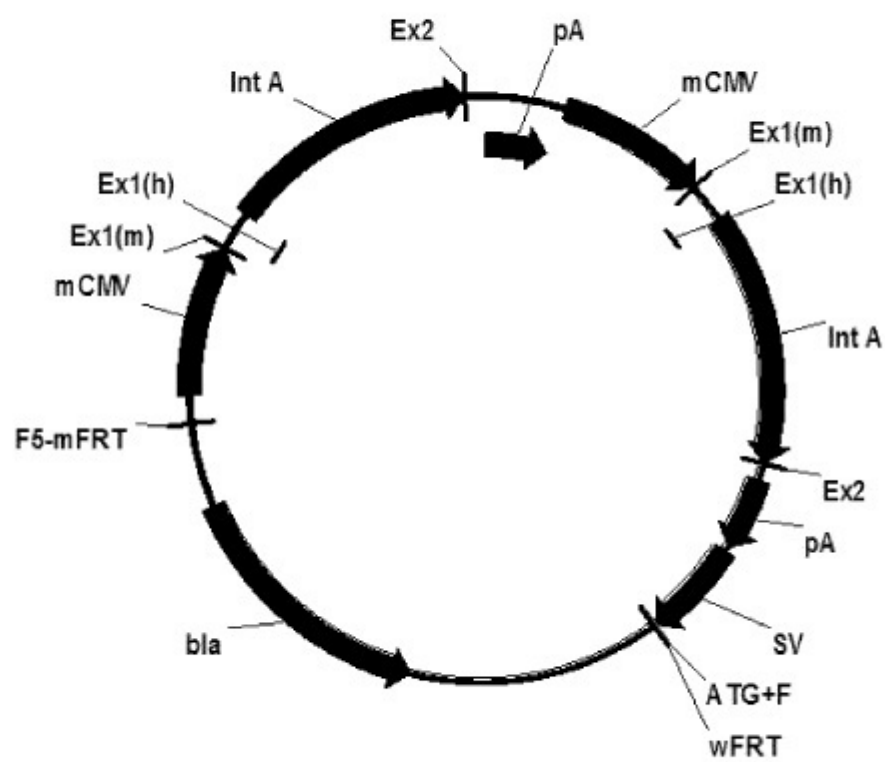


FIGURA 2

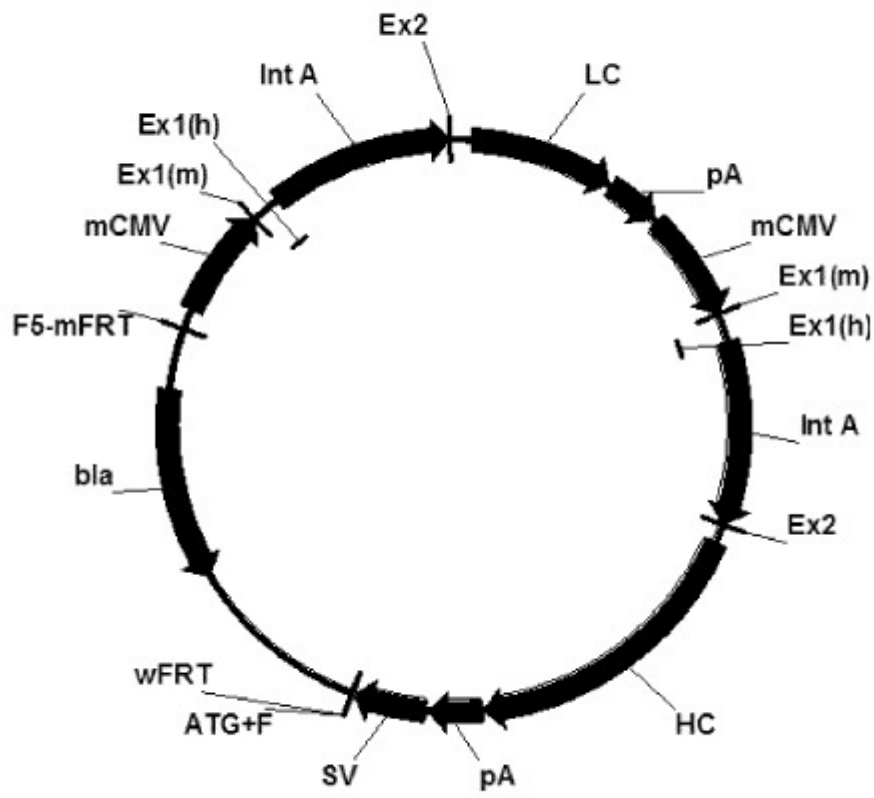


FIGURA 3

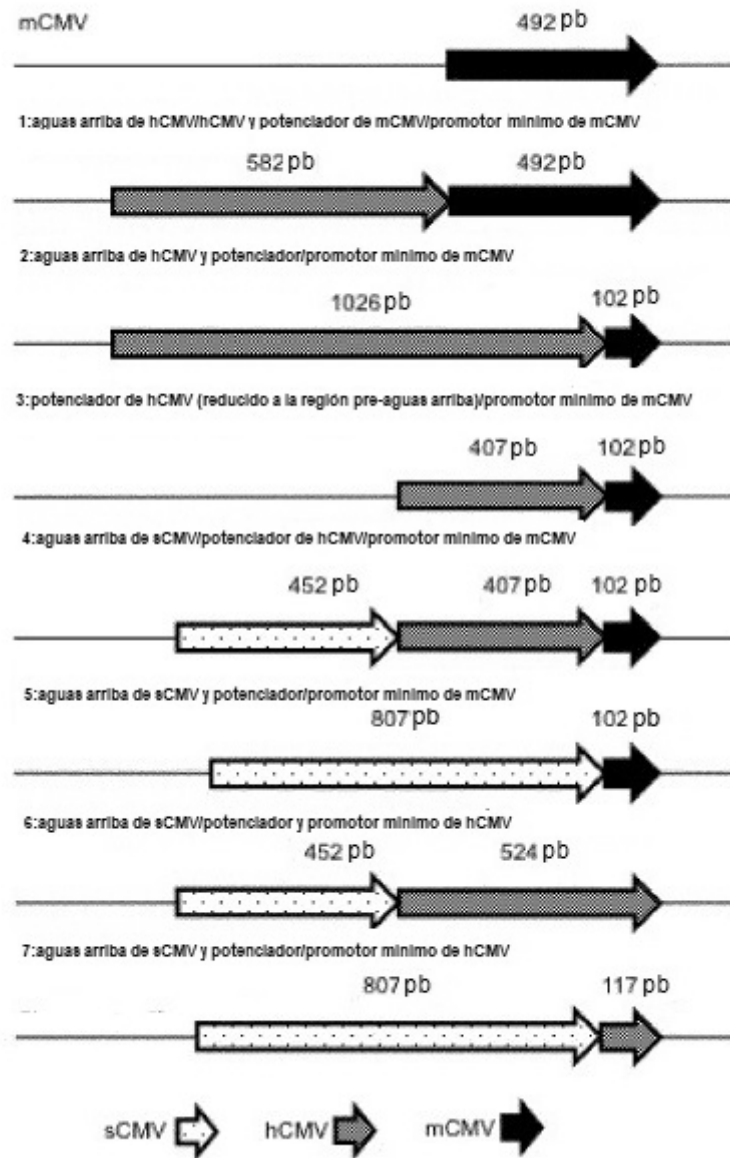


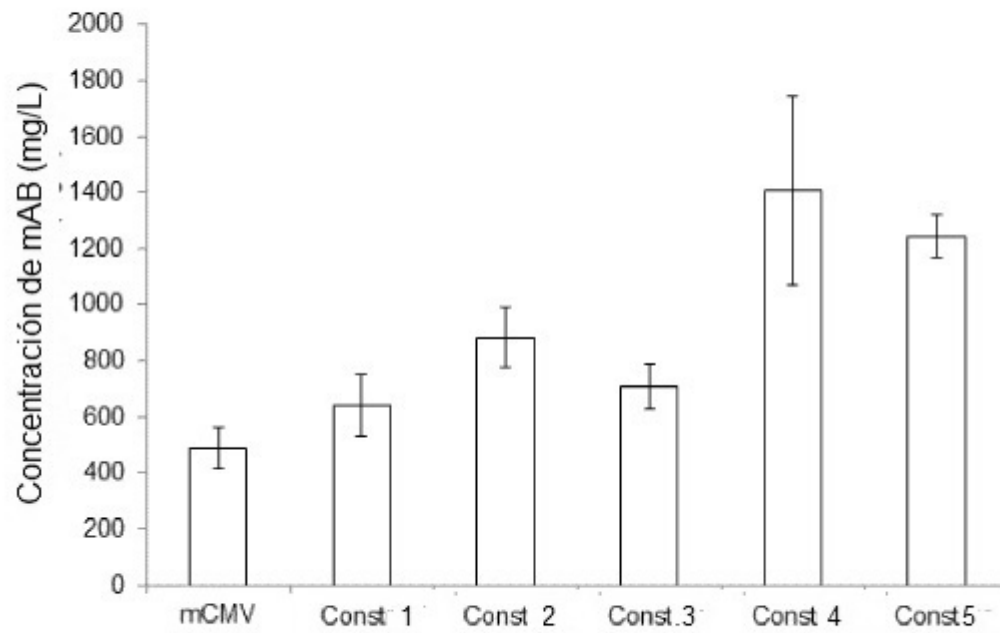
FIGURA 4

FIGURA 5