



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 281 905**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **96937224 .2**

(86) Fecha de presentación : **24.10.1996**

(87) Número de publicación de la solicitud: **0857211**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **12.08.1998**

(54) Título: **Promotor homólogo intenso obtenido de hámster.**

(30) Prioridad: **24.10.1995 DE 195 39 493**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.10.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.10.2007

(73) Titular/es:
Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG.
Binger Strasse 173
55216 Ingelheim am Rhein, DE

(72) Inventor/es: **Enenkel, Barbara;**
Gannon, Frank;
Bergemann, Klaus y
Noe, Wolfgang

(74) Agente: **Isern Jara, Jorge**

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

Promotor homólogo intenso obtenido de hámster.

5 La invención se refiere a un promotor homólogo intenso obtenido de hámster, a los ácidos nucleicos, que contienen las secuencias de promotor y/o reguladoras del gen S27a de la ubiquitina, así como a procedimientos para la obtención de productos genéticos heterólogos empleando dichos ácidos nucleicos.

10 Para la fabricación económicamente importante de proteínas mediante la expresión de genes recombinantes en células hospedantes eucariotas, por ejemplo células CHO, se han empleado hasta ahora sistemas de expresión heterólogos, es decir, que por ejemplo los elementos promotor/intensificador y de terminación son de origen vírico. El uso de promotores no víricos en lugar de secuencias víricas en sistemas de expresión sería ventajoso con respecto a la actitud de la opinión pública frente a la tecnología genética y biológica y además contribuiría a la bioseguridad de los sistemas de vectores, que se emplean para la expresión de genes en cultivos celulares de animales.

15 La ubiquitina es polipéptido muy conservado que tiene 76 aminoácidos, que se encuentra en gran número en todas las células eucariotas y que se codifica con un diverso grupo de genes (ver una recensión en: Jentsch y col., 1991; Schlesinger & Bond, 1987). Con la modificación de proteínas diana, la ubiquitina desempeña un papel importante en un gran número de procesos biológicos, p. ej. en la degradación de proteínas dependiente del ATP a través de la vía de las proteosomas de ubiquitina (Ciechanover, 1994). En función de su estructura, los genes de la ubiquitina pueden subdividirse en dos grupos. En el cebador grupo se contemplan los genes de poliubiquitina, en los que se alinean las unidades codificadoras de ubiquitina de un tamaño de 228 bp (= 76 aminoácidos) en un ordenamiento de cabeza a cola (Jentsch y col., 1991; Schlesinger & Bond, 1987). El número de unidades varía de una especie a otra, pero en la mayor parte de organismos se encuentran dos genes de poliubiquitina de diferente longitud (Fornace y col., 1989; Wiborg y col., 1985). Las regiones de promotor de estos genes contiene una caja ("box") TATA y elementos promotor/intensificador para un inductor de choque térmico (Schlesinger & Bond, 1987).

30 Los genes de fusión de la ubiquitina se incluyen en el segundo grupo. Se trata de fusiones entre una unidad de ubiquitina y una proteína ribosómica (Jentsch y col., 1991; Schlesinger & Bond, 1987). Los dos genes de fusión conocidos de la ubiquitina pueden identificarse gracias a las diferencias en la longitud y secuencia de la proteína ribosómica. En este caso se trata de una proteína ribosómica de la subunidad ribosómica grande que tiene una longitud de 52 aminoácidos (Baker y col., 1991) y en el otro caso se trata de una proteína ribosómica de la subunidad pequeña (que en los mamíferos se llama proteína S27a) que tiene una longitud, variable según las especies, comprendida entre 35 76 y 81 aminoácidos (Redman & Rechsteiner, 1989). La porción de ubiquitina en estas proteínas de fusión favorece al parecer la integración eficiente de las proteínas ribosómicas en el ribosoma (Finley y col., 1989).

Los genes individuales de ubiquitina se expresan en diversos grados en los tejidos más diversos de un organismo y en los diversos estadios de desarrollo. Los genes de poliubiquitina, por ejemplo, se expresan constitutivamente en un nivel bajo, que solamente se eleva de modo considerable cuando interviene el estrés (Fornace y col., 1989; Schlesinger & Bond, 1987). Los genes de fusión de la ubiquitina se potencian sobre todo en la fase de crecimiento exponencial. En cambio, en las células de diferenciación terminal y de crecimiento interrumpido, la expresión se regula a la baja (Schlesinger & Bond, 1987; Shimbara y col., 1993; Wong y col., 1993).

45 El cometido, que se pretende abordar con la presente invención, consiste en el desarrollo de promotores intensos no víricos para el procedimiento de obtención de productos genéticos heterólogos en cultivos celulares, en especial en células de hámster.

De modo sorprendente se ha encontrado un promotor de un gen, que tiene actividad equivalente al promotor vírico SV40, sobre todo en células CHO. Este gen codifica a la proteína de fusión de la ubiquitina Ub/S27a. El promotor de la Ub/S27a de un hámster es un objeto de esta invención.

55 Otro objeto de la presente invención es una molécula de ácido nucleico, que contiene las secuencias de promotor y/u otras secuencias reguladoras del gen Ub/S27a. Estas secuencias de promotor y/u otras secuencias reguladoras se derivan del gen Ub/27a del hámster. Es objeto de la invención en particular una molécula de ácido nucleico recombinante, que contiene las secuencias de promotor y/u otras secuencias reguladoras, que forman parte de la secuencia representada en la figura 5.

60 Constituyen un objeto preferido de la invención las moléculas de ácido nucleico, que contienen secuencias de la región, que corresponde a las posiciones de -161 a -45 de la figura 5. Es incumbencia de los expertos la obtención de moléculas de ácido nucleico con los métodos que se describen en el ejemplo 4, que contienen secuencias parciales de las secuencias de la invención, en especial una secuencia parcial de la región de -161 a -45, que pueden conferir también una intensa actividad de promotor. Estas secuencias parciales son también objeto de la invención.

65 Es también incumbencia de los expertos modificar la secuencia de promotor mediante la sustitución, inserción, delección o adición de una, dos o tres bases con respecto a la secuencia de la figura 5, sin por ello reducir significativamente la actividad del promotor, que puede medirse con el método descrito en el ejemplo 4. Se entiende por reducción significativa de la actividad del promotor una reducción del valor en más del 50%, valor que se obtiene para el frag-

mento de delección 272 bp de la tabla 1 en el ensayo CAT del ejemplo 4 en condiciones comparables. Tales variantes de la secuencia del promotor están contempladas, por tanto, dentro del alcance de las reivindicaciones de la invención.

En las moléculas de ácido nucleico de la invención, las secuencias de promotor y/o reguladoras se hallan con ventaja unidas funcionalmente a un gen, de modo que este gen pueda expresarse bajo el control de estas secuencias. Tal gen puede codificar por ejemplo a un activador de plasminógeno en tejidos (EP 0093619), un activador de plasminógeno de segunda generación, p. ej. tnk-t-PA (WO 93/24635), un interferón, p. ej. interferón α (EP 0595241), interferón β (EP 0041313, EP 0287075), interferón γ (EP 0146354) o interferón ω (EP 0170204), un factor de necrosis tumoral (EP 0168214), la eritropoyetina (WO 86/03520), el factor de estimulación de colonias de granulocitos (EP 0220520, EP 0237545) o la dismutasa de superóxido de manganeso (EP 0282899), que ya son conocidos por el estado de la técnica. Puede ser también un gen que codifique a una cadena de inmunoglobulina, a un dominio variable de una cadena de inmunoglobulina, a un anticuerpo humanizado (EP 0230400, EP 0451216), a un anticuerpo de cadena simple, etc. Dicho gen puede en especial codificar a una cadena de inmunoglobulina humanizada, que sea específica del CD44 variante (WO 95/33771). De modo conveniente, tal molécula de ácido nucleico puede ser un vector de expresión (Sambrook y col., 16.3-16.29, 1989). Son objeto de la invención en especial aquellos vectores de expresión, que, después de la introducción en una célula hospedante eucariota, se integran en su genoma.

Otro aspecto de la presente invención es una célula hospedante, en la que se haya introducido una de las moléculas de ácido nucleico mencionadas. En tal célula hospedante se introduce con preferencia un vector de expresión, que contiene el gen para obtener un producto genético heterólogo en combinación con el promotor del gen Ub/S27a y/u otras secuencias reguladoras. La célula hospedante de la presente invención es con preferencia una célula de mamífero. La célula hospedante puede ser con preferencia una célula de hámster, p. ej. una célula CHO (CHO = Chinese hamster ovary; Urlaub y Chasin, 1980; véase también Kaufman, 1987 y las referencias que contiene, así como Sambrook y col., 16.28-16.29, 1989), una célula BHK (BHK = Baby hamster kidney) o una célula de hibridoma, con preferencia especial una célula CHO.

Otro aspecto de la presente invención es un procedimiento para la obtención de un producto genético heterólogo en una célula hospedante eucariota, con preferencia en una célula de hámster, con preferencia en una célula CHO, caracterizado porque una de las moléculas de ácido nucleico mencionadas se introduce en la célula hospedante eucariota, se cultiva la célula hospedante y se aísla el producto genético sintetizado. Con el procedimiento de la invención, el producto genético heterólogo se expresa bajo el control de las secuencias de promotor y/u secuencias reguladoras del gen Ub/S27a, con preferencia procedentes del hámster. Para semejante procedimiento pueden utilizarse con ventaja las moléculas de ácido nucleico, que contienen las secuencias de promotor y/u otras secuencias reguladoras representadas en la figura 5. Es preferido en particular un procedimiento, en el que las secuencias de promotor están contenidas dentro de la secuencia que corresponde a las posiciones de -161 a -45 de la figura 5. También en este caso es incumbencia de los expertos la obtención de secuencias parciales que tengan actividad del promotor o variantes equivalentes de las secuencias publicadas.

De este modo se prepara por cebadora vez un promotor homólogo intenso del hámster, que es muy ventajoso para la obtención de productos genéticos heterólogos en células de hámster, en especial en células CHO. La invención se refiere en particular a un promotor homólogo intenso del hámster, que en las células CHO en un ensayo CAT descrito en el ejemplo 4 despliega una actividad mayor que el promotor de timidina-quinasa procedente del *Herpes simplex*. Tal promotor presenta con ventaja una actividad de transcripción, que es por lo menos del mismo orden que la del promotor SV40. Del mismo orden significa en este caso que el promotor de la invención tiene por lo menos el 50%, mejor todavía por lo menos el 80%, con mayor preferencia por lo menos el 90% de la actividad del promotor SV40 en el ensayo CAT descrito en el ejemplo 4. Con preferencia, tal promotor está caracterizado porque tiene por lo menos una de las propiedades siguientes: región de secuencia con abundancia de GC, sitio de unión Sp1, elemento de polipirimidina, ausencia de una caja TATA. Es preferido en especial un promotor, que presenta un sitio de unión Sp1 y ausencia de caja TATA. Es también preferido un promotor que se active constitutivamente y sea activo de igual manera en condiciones de cultivo celular con suero, con poco contenido de suero y sin suero. En otra forma de ejecución se trata de un promotor inducible, en especial de un promotor, que se activa con la privación de suero. Una forma de ejecución especialmente preferida es un promotor que tiene una secuencia descrita en la figura 5. Es preferida en especial una secuencia contenida en la secuencia que corresponde a las posiciones de -161 a -45 de la figura 5.

Otro aspecto de la presente invención es un procedimiento para la expresión de un producto genético heterólogo en células de hámster dentro del alcance de las reivindicaciones, con preferencia células CHO, que está caracterizado porque el producto genético se expresa bajo el control de un promotor homólogo intenso de hámster. En las formas preferidas de ejecución, tal promotor se distingue por las características definidas en el párrafo precedente.

Otro aspecto de la presente invención es el uso de un promotor, descrito en lo que antecede, para la obtención de un producto genético heterólogo en células de hámster, con preferencia en células CHO o BHK.

Las secuencias de promotor descritas pueden alojarse en un cassette de expresión en relación funcional con otras secuencias reguladoras. Por ejemplo pueden unirse funcionalmente con secuencias de intensificador (enhancer) y de este modo incrementar la actividad de transcripción. Puede ser uno o varios intensificadores y/u varias copias de una secuencia de intensificador. Por ejemplo, puede emplearse un intensificador CMV- o SV40. El intensificador CMV humano pertenece a los intensificadores más potentes identificados hasta el momento. Un ejemplo de intensificador inducible es el intensificador de metalotioneína, que puede estimularse con glucocorticoides o metales pesados. Otra

posible modificación sería p. ej. la introducción de múltiples sitios de unión Sp1. Las secuencias de promotor pueden combinarse además con secuencias reguladoras, que permiten un control/regulación de la actividad de transcripción. De este modo puede hacerse que un promotor se reprime/inducible. Esto puede efectuarse por ejemplo uniendo secuencias, que constituyen sitios de unión para factores de transcripción reguladores positivos o negativos. Por ejemplo, el factor de transcripción SP-1 ya mencionado tiene una influencia positiva en la actividad de transcripción. Otro ejemplo es el sitio de unión de la proteína de activador AP-1, que puede desplegar un efecto en la transcripción tanto de modo positivo como negativo. La actividad de la AP-1 puede regularse con los factores más diversos, p. ej. factores de crecimiento, citocinas y suero, (Faisst y Meyer, 1992, y referencias que allí se citan). La eficacia de la transcripción puede incrementarse también modificando la secuencia de promotor con una mutación (sustitución, inserción, delección) de una, dos, tres o más bases y después midiendo con el ensayo CAT descrito en el ejemplo 4, si con ello ha aumentado la actividad del promotor. Con las medidas descritas en este párrafo se puede obtener un cassette de expresión optimizado, que es muy útil para la expresión de productos genéticos heterólogos, en especial en células CHO. Es también objeto de la invención un cassette de expresión obtenido con la aplicación de una o varias medidas de este tipo.

Con los análisis "footprint" de la DNasa I y de mutación puede estudiarse que factores influyen en la expresión y si la actividad del promotor puede incrementarse todavía mediante la delección de los elementos de control negativos eventualmente existentes y mediante la introducción de otros elementos positivos de control. Además, los estudios realizados por otros grupos de trabajo han puesto de manifiesto que la expresión del gen Ub/S27a puede regularse evidentemente con factores diversos. El grupo de Shimbara ha puesto de manifiesto, por ejemplo, que en el caso de la diferenciación terminal "in vitro" de líneas celulares de leucemia humana (HL-60, K562, U937, THO1) puede regularse a la baja la expresión del gen Ub/S27a (Shimbara y col., 1993) con la adición de diversas sustancias, por ejemplo el TPA (12-O-tetra-decanoilforfol-13-acetato), DMSO, ácido retínico y la 1,25-dihidroxivitamina D3, al medio de cultivo. Y el grupo de Wong constató la sobreexpresión del gen Ub/S27a en células de carcinoma del intestino recto (Wong y col., 1993). La expresión genética guarda buena relación con los estadios tumorales clínicos de expresión elevada en el caso de cáncer avanzado.

La ejecución de la invención es posible para los expertos que conozcan el contenido publicado en esta solicitud, los métodos de por sí conocidos y los descritos en los ejemplos.

El gen Ub/S27a completo, la región 5' no traducida del gen Ub/S27a y los fragmentos seleccionados del mismo pueden obtenerse por diversos métodos estándar conociendo las secuencias representadas en las figuras 1, 2 y 5. A partir de la secuencia de la figura 5 puede sintetizarse químicamente un fragmento idóneo y una sonda de oligonucleótido, que tenga la secuencia de este fragmento (Sambrook y col., 11.3-11.44, 1989). Con semejante sonda y mediante la hibridación de una biblioteca genómica del hámster (Sambrook y col., 9.4-9.62, 11.45-11.61, 1989) puede clonarse el gen Ub/S27a o su región no traducida. La región 5' no traducida o fragmentos especiales de la misma pueden obtenerse también fácilmente por amplificación PCR con los cebadores correspondientes a partir de una biblioteca genómica (Sambrook y col., 14.5-14.35, 1989). Este método es idóneo en especial para la obtención de fragmentos seleccionados de la región del promotor, por ejemplo la región de -161 a -45 o un fragmento de esta región. Los fragmentos de la región 5' sin traducir, por ejemplo los recogidos en la tabla 1, pueden obtenerse también por digestión limitada de la exonucleasa III a partir de fragmentos mayores de DNA (Sambrook y col., 15.14-15.19; 5.84-5.85, 1989). Tales moléculas de DNA pueden sintetizarse también químicamente o pueden generarse por ligación a partir de fragmentos sintetizados químicamente. El gen Ub/S27a de otra especie, con preferencia de una especie de mamífero, o su región 5' sin traducir puede aislarse por hibridación cruzada con sondas de con de sondas de la porción S27a del gen Ub/S27a de hámster.

En el estado de la técnica se dispone de un gran número de vectores de expresión que pueden emplearse en relación con de la presente invención. Las secuencias de promotor y/o reguladoras de la presente invención pueden integrarse al sitio que ocupan los elementos de promotor existentes en estos vectores y, de este modo, regular la expresión del gen correspondiente, que va a expresarse con este vector. Los vectores comercialmente disponibles, que son idóneos para la integración del promotor de la invención, son por ejemplo el vector pCAT-Basic (Promega; secuencia compilada accesible a través del número de registro X65322 de EMBL) o el vector intensificador pCAT, que contiene además un intensificador SV40 (Promega; secuencia compilada accesible a través del número de registro X65319 de EMBL). Un ejemplo de vector sin promotor es el plásmido pBL-CAT6 (Boshart y col., 1992; ver también Luckow y Schütz, 1987). Las secuencias de promotor de la invención pueden ligarse a los sitios de restricción HindIII, SphI, PstI, SalI, XbaI, BamHI, BglII o XhoI de este vector y, de este modo, unirse funcionalmente con el gen de cloranfenicol-transferasa (CAT) existente en este vector. En lugar del gen de la CAT puede integrarse también en este vector otro gen, por ejemplo de activador de plasminógeno de tejidos. El gen de la CAT puede eliminarse del vector pBL-CAT6 p. ej. por doble digestión con las enzimas de restricción XhoI y ClaI. La región 3' no traducida de SV40, que de este modo sufre delección y que contiene la secuencia de intrón y la señal de poliadenilación, puede eventualmente (es decir, en el supuesto de que su función no haya sido asumida por las secuencias 3' propias del gen) integrarse de nuevo a continuación, para ello p. ej. se amplifica esta región SV40 mediante PCR y al mismo tiempo se dota de los sitios de restricción idóneos en ambos extremos, con lo cual se facilitan las reclonaciones posteriores, p. ej. con introducción de otro gen que se desee. Otra estrategia para el intercambio del gen CAT por otro gen consiste en que en primer lugar se introduce mediante una PCR y oligonucleótidos mutágenos idóneos un sitio de restricción singular del extremo 5' de la región SV40 en el vector pBL-CAT6, lo cual permite seguidamente eliminar selectivamente el gen de la CAT. Otra posibilidad consiste en el uso del vector pLUC, que en principio tiene la misma estructura que el pBL-CAT6, pero en lugar del gen CAT contiene un gen informante (reporter) de luciferasa. Este puede eliminarse fácilmente por doble digestión con XhoI/EcoNI, con lo cual la secuencia SV40 permanece en el vector.

Para la generación de líneas celulares estables, con alta expresión del gen heterólogo, se elige con ventaja un vector que permita la selección de los transformandos, que han integrado al vector en su cromosoma y han amplificado al gen integrado heterólogo. Los vectores de tales procedimientos de selección/amplificación, como es el procedimiento de DHFR/metotrexato en las líneas celulares deficientes de DHFR (p. ej. CHO-DUKX) son también del estado de la técnica (Sambrook y col., 16.9-16.15; 16.28-16.29, 1989).

Los expertos en la materia podrán consultar los procedimientos para la inserción de los vectores obtenidos en las células hospedantes así como la selección y el cultivo de los transformandos en los manuales correspondientes (p. ej. Sambrook y col., 16.3-16.81, 1989).

Prescindiendo de la optimización del promotor, existir además un aspecto totalmente diferente de la mejora del rendimiento en producto, a saber, a través del efecto de la dosis del gen (número de veces que el gen está presente en el núcleo de una célula). A medida que aumenta el número de copias del constructo del vector integrado en el genoma, debería aumentar también la cantidad de transcritos producidos. Se puede conseguir una amplificación espontánea de los constructos introducidos, que da lugar a una integración estable de un gran número de copias, mediante el uso de una secuencia que tenga propiedades favorables a la amplificación, son las llamadas "amplification promoting sequences". Una secuencia de este tipo, que posee un contenido muy elevado de AT, se ha aislado p. ej. a partir de la región inter-genes no transcrita de los genes ribosómicos de ratón (Wegner y col., 1989) y ya se ha empleado con éxito para la inhibición estable y eficiente de la replicación del HIV-1 mediante un RNA antisentido (Meyer y col., 1993). Un segmento de la secuencia, de un tamaño de 49 bp, de la región 5' no traducida del gen Ub/S27a 5' (posiciones de -1477 a -1429; figura 4) con un contenido elevado de AT, a saber del 88%, presenta una gran homología con las secuencias que favorecen la amplificación, recién descritas, del ratón. Que este segmento de la secuencia de CHO posee también estas propiedades, puede demostrarse con el uso de constructos de promotor de Ub/S27a, cuya secuencia CHO ocupa una posición previa.

Descripción de las figuras

Figura 1

Comparación de la secuencia del DNA del clon de cDNA completo del gen S27a de la ubiquitina de células CHO con la secuencia del cDNA humano

Comparación de la secuencia del cDNA del CHO Ub/S27a con la secuencia del cDNA humano (Adams y col., 1992). Se señalan las identidades dentro de la secuencia con un asterisco "*". Se marca la porción de ubiquitina con doble línea a lo largo de la secuencia. Se marcan las posiciones de los tres intrones con triángulos.

___ señal de poli-A ::: codón de inicio +++ codón de paro

Figura 2

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de la ubiquitina Ub/S27a

Comparación de la secuencia de aminoácidos Ub/S27a derivada de la secuencia de cDNA de CHO con la secuencia humana de aminoácidos (Adams y col., 1992). Se señalan las identidades dentro de la secuencia con un asterisco "*". La unidad de ubiquitina de 76 aminoácidos se destaca con doble línea a lo largo de la secuencia.

Figura 3

Análisis del nivel de transcripción del Ub/S27a en células CHO

En un gel de agarosa que contiene formaldehído se separa por electroforesis el RNA total citoplasmático desnaturizado (10 µg) de células CHO cultivadas con y sin suero y se transfiere a una membrana de poliamida (Nylon). Como sonda de hibridación se utiliza el cDNA de Ub/S27a marcado con P (508 bp) procedente de CHO. El tiempo de exposición de la película radiológica es de 3 horas.

1 + 3 células CHO cultivadas con suero

2 + 4 células CHO cultivadas sin suero

5 células CHO cultivadas con suero, después se cultivan en medio sin suero durante 24 horas

6 células CHO cultivadas sin suero, después se cultivan en un medio que contiene suero durante 24 horas

ES 2 281 905 T3

Figura 4

Estrategia de secuenciación de la región 5' sin traducir del Ub/S27a

- 5 Se representa esquemáticamente la región 5' sin traducir del gen Ub/S27a, que tiene un tamaño de 2,5 kb. Se secuencian tanto los fragmentos de restricción subclonados, como los clones de delección generados por digestión con exonucleasa III. Se indica el grado y la dirección de las secuenciaciones con una flecha.

10 Figura 5

Secuencia de DNA genómico de la región 5' sin traducir del Ub/S27a

- 15 ————— sitio de restricción
-> extremo 5' del clon de delección del promotor
* extremo 3' del clon de delección del promotor
20 ^^^^^ homología de las secuencias que favorecen la amplificación
'''''''' segmento de secuencia con abundancia de polipirimidina
::: codón de inicio
25 +1, +13 sitios de inicio de transcripción determinados por mapeado de nucleasa S1
+85 extremo 5' obtenido por extensión de cebador
30 >>>>> sitio de unión Sp1

- Se numeran los nucleótidos en relación al sitio de inicio de la transcripción, que se indica con +1. Se destacan de la secuencia con un subrayado los sitios de restricción de SacII y EagI, que son específicos de segmentos de secuencia ricos en GC, así como los sitios de restricción requeridos para fines de subclonación de la EcoRI, HincII y HindIII. Se emplean letras minúsculas para marcar la secuencia del intrón. Se reproduce la secuencia de aminoácidos debajo de la secuencia del DNA.

40 Figura 6

Determinación del punto de inicio de la transcripción con la extensión de cebador

- El análisis de la extensión del cebador se realiza con 5 μ g de RNA citoplasmático total de células CHO cultivadas en suero (pista 1). Como control se emplean 5 μ g de levadura tRNA (pista 2). El cebador, cuyo extremo se ha marcado con P³², se hibrida con la porción S27a del mRNA de Ub/S27a (nucleótidos de +256 a +276 de la secuencia del cDNA). Se separan los productos de la extensión en un gel de poliacrilamida desnaturalizada del 6%. Como marcador de tamaño se emplea una reacción de secuenciación. La longitud del producto de extensión, cuya posición se marca con una flecha, fue de 304 nucleótidos.

50

Figura 7

Determinación del punto de inicio de la transcripción con un mapeado de la nucleasa S1

- 55 Se hibrida una sonda de hebra simple, cuyo extremo se ha marcado con P³², correspondiente a la secuencia de la hebra opuesta, que abarca la totalidad del segmento de la región 5' sin traducir (de -2289 a +176), se hibrida con 5 μ g de RNA total (pista 2) o bien con RNA citoplasmático total (pista 3) células CHO cultivadas en suero. Como control se emplean 5 μ g de levadura tRNA (pista 1). En un gel de poliacrilamida desnaturalizada del 8% se separan los fragmentos protegidos de la degradación con la nucleasa S1. Como marcador de tamaño se emplea una reacción de secuenciación, en la que se secuencia la hebra de DNA que es complementaria de la sonda de hibridación empleada. El cebador empleado para la secuenciación se hibridó con la secuencia de nucleótidos de +157 a +176. En la secuencia destacada se marcan con una flecha los fragmentos de DNA protegidos contra la degradación. La posición de nucleótido +1 se subordina al punto distal de inicio de la transcripción.

65

Figura 8

Análisis funcional de la actividad del promotor Ub/S27a

Los constructos vectoriales, en los que se han fusionado delecciones en serie de la región que flanquea a 5' del gen Ub/S27a en ambas orientaciones con gen informante de la CAT, se emplean para la transfección transitoria de células de CHO cultivadas en suero. Como control se emplean plásmidos, en los que el gen informante de CAT se halla bajo el control de un promotor vírico. En total se realizan cuatro ensayos de transfección, independientes entre sí.

La actividad CAT relativa de los diversos constructos vectoriales se indica en forma de porcentaje de la actividad CAT en células CHO transfectadas en pCMVtkCAT, a las que se atribuye el valor 100%, y se presenta el valor promedio (desviación estándar en todos los casos $\leq 5\%$) de los cuatro ensayos de transfección. Las actividades totales de CAT se corrigen atendiendo a la cantidad de proteína empleada y a la eficacia de la transfección, que se determina con la medición de la actividad de la galactosidasa β del plásmido de control co-transfectado pCMVtklacZ.

- 20
- plásmido de control: sin promotor ni promotores víricos (tk, SV40)
 - región 5' sin traducir del Ub/S27a: orientación 5'-3' en pBL-CAT6
 - ▒ región 5' sin traducir del Ub/S27a: orientación 3'-5' en pBL-CAT6

Figura 9

Análisis funcional de la actividad del promotor Ub/S27a en células BHK transfectadas transitoriamente (BHK21)

- 30 ☐ plásmido de control: sin promotor ni promotores víricos (tk, SV40)
☒ región 5' sin traducir del Ub/S27a: orientación 5'-3' en pBL-CAT6

Figura 10

35 *Análisis funcional de la actividad del promotor Ub/Sb27a en células CHO transfectadas de modo estable (I)*

Se representa la actividad CAT en células que se han transfectado de modo estable con el vector pCMVtkCAT (tk-promotor/CMV-intensificador) o con el vector pBL-CAT5 (tk-promotor) (véase ejemplos/plásmidos, ejemplo 6). Se presentan en cada caso varios clones distintos. La actividad CAT se normaliza con respecto a la actividad del clon pCMVtkCAT6, que presenta la actividad máxima (que se toma como el 100%). La gráfica se emplea para comparar las figura 11 y 12.

Figura 11

Análisis funcional de la actividad del promotor Ub/Sb27a en células CHO transfectadas de modo estable (II)

Se representa la actividad CAT de diversos constructos vectoriales en forma de porcentaje de la actividad CAT del clon 6 de las células CHO transfectadas con pCMVtkCAT de la figura 10. Los fragmentos de la región del promotor según la tabla 1 se integran en el pBL-CAT6 en una orientación 5'→3'. Las abscisas indican qué fragmento se ha empleado. Se representa la actividad de varios clones distintos.

Figura 12

Análisis funcional de la actividad del promotor Ub/Sb27a en células CHO transfectadas de modo estable (III)

Se representa la actividad CAT de diversos constructos vectoriales en forma de porcentaje de la actividad CAT del clon 6 de las células CHO transfectadas con pCMVtkCAT de la figura 10. Los fragmentos de la región del promotor según la tabla 1 se integran en el pBL-CAT6 en una orientación 5'→3'. Las abscisas indican qué fragmento se ha empleado. Se representa la actividad de varios clones distintos.

Figura 13

Análisis funcional de la actividad del promotor Ub/Sb27a en células CHO transfectadas de modo estable (IV)

Esta figura contiene una recopilación de datos de las figuras de 10 a 12. Se presentan los clones de células con la expresión CAT máxima y mínima de cada constructo vectorial, que se haya empleado en el ensayo (solamente plásmidos del promotor Ub/S27a que tienen la orientación 5'→3').

Ejemplos

Plásmidos

Para la realización del conjunto de manipulaciones genéticas se emplea el vector pBluescript SK (Stratagene Cloning Systems, Stratagene GmbH, Heidelberg, Alemania). Para el análisis de expresión se emplean vectores de expresión eucariotas, que, como gen informante, contienen el gen de la cloranfenicol-acetiltransferasa bacteriana (CAT). El gen CAT se fusiona para ello con diversos promotores víricos. En el pBL-CAT5 es el promotor de la timidina-quinasa (tk) del virus del *Herpes simplex* (Boshart y col., 1992; secuencia compilada accesible a través del número M80483 del Gen-Bank), en el pCMVtkCAT el promotor tk en combinación con un intensificador del virus de la citomegalia humana (CMV) (Christoph Winkler, Würzburg) y en el pKSSV2CAT el promotor SV40 (Tsonis y col., 1988). El pBL-CAT6 se utiliza como control negativo y contiene un gen CAT sin promotor (Boshart y col., 1992; secuencia compilada accesible a través del número M80484 del Gen-Bank). En el vector pCMVtklacZ, la expresión del gen de la β -galactosidasa bacteriana está controlada por una combinación de intensificador CMV/promotor tk (Christoph Winkler, Würzburg).

Cultivo celular

Se suplementan las células CHO-DUKX (Urlaub y Chasin, 1980) en un medio del tipo mezcla 1:1 de medio Dulbecco's Modified Eagle's/medio Ham's F12 con un 5% de suero bovino fetal, en frascos Roux, en un armario de incubación que puede gasearse con CO₂ y tiene una humedad ambiental del 90%, 37°C y un 5% de CO₂. Para el cultivo sin suero se emplean células CHO-DUKX, que se habían adaptado lentamente al cultivo en un medio sin suero y ahora se cultivan de modo permanente en un medio sin suero. Estas células se cultivan en suspensión en frascos de Spinner en un medio del tipo mezcla 1:1 de medio Iscove's Modified Dulbecco's/medio Ham's F12, suplementado con peptona de bajo peso molecular (Aldag, Hamburgo), insulina y transferrina (Canada Packers).

Ejemplo 1

Hibridación diferencial de bancos genéticos de cDNA de CHO recombinantes

Empleando mRNA poliadenilados de células CHO, que se han cultivado en suero o sin suero, se preparan en primer lugar dos bancos genéticos de cDNA en λ ZAPII, que constan de $4,2 \times 10^6$ ó $2,9 \times 10^5$ clones de fagos recombinantes.

El RNA citoplasmático se prepara de células lisadas en NP40 y purificadas con extracciones de fenol/cloroformo (Nicolaidis y Stoeckert, 1990). El mRNA poliadenilado de células CHO, cultivadas con o sin suero, se obtiene por cromatografía de afinidad en una columna Oligo(dT)-Celulosa (Sambrook y col., 1989). Para obtener el cDNA se emplea el kit de síntesis de cDNA de Pharmacia LKB, empleando para la síntesis de la primera hebra un cebador del tipo Oligo (dT). Se clona el cDNA con el vector λ ZAPII digerido en EcoRI (Stratagene Cloning Systems). Se exploran mediante hibridación diferencial los duplicados de filtro del banco genético de cDNA de CHO no amplificadas procedentes de células CHO cultivadas sin suero. Como sonda se utiliza el cDNA total de células CHO cultivadas con suero y cultivadas sin suero, que se habían marcado mediante "random priming" (Prime a Gene labelling Kit; Promega Cooperation, Promega Biotec, Madison, WI, USA) con dCTP (α -P³²) (6000 Ci/mmol; Amersham International plc, Amersham-Buchler, Braunschweig, Alemania). La hibridación se realiza del modo descrito en el análisis Northern Blot (véase entre otros el ejemplo 2). Se aíslan las placas de fagos, que presentan hibridación intensa con las dos sondas de cDNA, y se someten de nuevo a una hibridación diferencial. De los fagos λ ZAPII recombinantes se obtienen fagémidos por escisión "in vivo" empleando el fago auxiliar R408 (instrucciones de uso del λ ZAPII cloning kit; Stratagene Cloning Systems).

De este modo se exploran unos 6000 clones de fago. Se aíslan un total de 12 clones de fago recombinantes, que presentan una hibridación especialmente intensa con las dos sondas de cDNA total.

Las secuencias de DNA se determinan por el método dideoxi empleando el kit de secuenciación T7 de Pharmacia LKB. Como cebador se emplean tanto los cebadores de promotor T3 y T7 como cebadores específicos de genes. En todos los casos se marcan las sonda de DNA con dATP [α -S³⁵] o con dCTP [α -S³⁵] (10 μ Ci; Amersham International plc). Los productos de la reacción se separan por electroforesis a través de un gel de secuenciación de poliácridamida del 6%. Para el análisis de las secuencias se emplean los bancos de datos GenBank y EMBL.

Uno de los clones de cDNA aislado codifica a una proteína de fusión, la Ub/S27a, que consta de una unidad monómera de ubiquitina y una proteína ribosómica de la subunidad pequeña, S27a (figura 1). La mayor homología es la existente con la secuencia de la Ub/S27a humana (Adams y col., 1992) que tiene una homología del 92,2% en

ES 2 281 905 T3

el plano del cDNA y una homología del 100% en el plano de los aminoácidos. El cDNA aislado de CHO Ub/S27a tiene un tamaño de 508 bp y abarca la totalidad de la región de codificador así como una señal de poliadenilación en la región 3' no traducida y dos elementos de iniciación de traducción que se solapan mutuamente en la región 5' no traducida (figura 1). En base a la secuencia de cDNA se pone también de manifiesto que se trata de un verdadero gen de fusión, es decir, ambas porciones de proteína se codifican con un único gen. La secuencia de la proteína de fusión resultante está muy conservada, los primeros 76 aminoácidos de la proteína que tiene un tamaño de 156 aminoácidos abarcan la porción de la ubiquitina (figura 2).

Ejemplo 2

Análisis de la expresión genética del Ub/S27a

Se estudia el grado de la expresión del gen Ub/S27a mediante ensayos Northern Blot, en los que se emplea el RNA citoplasmático total de las células CHO cultivadas con suero y cultivadas sin suero.

El RNA citoplasmático se prepara a partir de células lisadas con NP40 y se purifica con extracciones de fenol/cloroformo (Nicolaidis y Stoeckert, 1990). Se separa el RNA (10 µg) por electroforesis en un gel de agarosa-formaldehído, se transfiere a una membrana de poliamida (Hybond N, Amersham International plc) (Sambrook y col., 1989) y se reticula con la membrana con formación de un enlace covalente mediante una irradiación UV (254 nm) de 5 minutos. Se hibridan los filtros de RNA a 65°C durante una noche en una solución que contiene 4 x SSC, 10 x Denhardt, 0,1% SDS y 1 x 10⁶ cpm/ml de sonda de cDNA marcada con P³². Se marcan los fragmentos de cDNA empleando un "random primer" (cebador aleatorio) (Prime a Gene labeling kit; Promega Corporation), la actividad específica de las sondas de DNA es de 4-8 x 10⁸ cpm/µg de DNA. Después de la hibridación se lavan los filtros dos veces con 0,2 x SSC/0,1% SDS a 65°C durante 20 minutos. Sobre los filtros envueltos con una lámina doméstica se coloca una película radiológica (Curix; Agfa-Gevaert N.V.) y se efectúa una autorradiografía a -70°C durante 3 horas.

Tanto en las células CHO cultivadas con suero en condiciones estándar como en las células CHO adaptadas al cultivo en un medio sin suero se han podido detectar transcritos de Ub/S27a de una longitud de aproximadamente 600 nucleótidos, en gran número y cantidades iguales (figura 3). Los dos transcritos adicionales de aprox. 1500 y 2800 nucleótidos son transcritos de poliubiquitina, en los que se han fusionado entre sí varias unidades monómeras de ubiquitina. Los transcritos de poliubiquitina, que en estas condiciones de cultivo se expresan en un nivel notablemente inferior, se hibridan con la porción de ubiquitina del cDNA de Ub/S27a empleado como sonda en los análisis Northern Blot. El nivel de transcritos de Ub/S27a continúa siendo invariablemente alto, cuando las células de CHO, que fueron cultivadas en medio sin suero, se cultivan durante 24 h en un medio que contiene suero (figura 3). Un resultado diferente es el que se obtiene cuando las células de CHO cultivadas en suero en condiciones estándar se trasladan a un medio sin suero durante 24 h. El número de transcritos de Ub/S27a disminuye considerablemente (figura 3). Esto se debe a que la mayor parte de las células CHO ya no se dividen durante esta fase de cultivo de 24 horas en un medio sin suero, presentando además una reducción de su volumen celular. En las células que alcanzan este estadio tiene lugar solamente una escasa transcripción, suponiendo que se dé.

Ejemplo 3

Aislamiento y análisis de la región del promotor Ub/S27a

Para aislar la región de promotor del gen Ub/S27a se prepara en primer lugar un banco genético de CHO genómico con un millón de clones de fagos recombinantes, empleando para ello el DNA genómico de células CHO cultivadas en suero.

Se obtiene el DNA genómico de células lisadas con NP40 con arreglo al método propuesto por Nicolaidis y Stoeckert (Nicolaidis & Stoeckert, 1990). A diferencia del método descrito de precipitación por salificación, después de la digestión con la proteinasa K1 se extrae el DNA tres veces con fenol/cloroformo.

Los extremos del DNA genómico parcialmente digerido con Sau3AI, que tienen un tamaño medio de fragmento de 20 kb, se rellenan por media cara empleando dGTP y dATP y se ligan con el vector λGEM-12 digerido con XhoI (extremos de DNA rellenos por media cara con dTTP y dCTP; Promega Corporation). Para la encapsidación se emplean extractos comerciales (Gigapack II Plus packaging extracts; Stratagene Cloning Systems).

Este banco de genes genómicos se hibrida solamente con la fracción S27a del cDNA de Ub/S27a, con el fin de evitar la hibridación cruzada con los genes de la poliubiquitina. Uno de los clones genómicos aislados, de una longitud total de 14 kb, contiene entre otras la región codificadora completa y una región 5' no traducida de 2,5 kb. La región codificadora se interrumpe con tres intrones de secuencias correctas de consenso en las zonas de transición exón/intrón e intrón/exón (Breathnach & Chambon, 1981), dos de estos intrones están localizados en la porción de la ubiquitina y el tercer intrón se halla en la porción del S27a (figura 1).

Las dos hebras de DNA de la región 5' sin traducir se secuencian por completo (método: véase ejemplo 1). Esto se realiza por secuenciación de los fragmentos de restricción subclonados y por secuenciación de los clones de delección solapados, que se generan por digestión con la exonucleasa III (figura 4). La región del promotor potencial no contiene ninguna caja TATA, pero sí una región de secuencia rica en CpG (67% de GC de -144 a +129), en la que existen también

ES 2 281 905 T3

los sitios de unión singulares para el factor de transcripción Sp1 (Dyner & Tjian, 1983) y en cada caso un sitio de restricción para EagI y SacII, que son específicos de tales regiones ricas en GC, así como regiones de secuencia ricas en polipirimidina (figura 5).

Para la localización del punto de inicio de la transcripción se realizan tanto la extensión del cebador como un mapeado de la nucleasa S1 en RNA total de células CHO cultivadas en suero. Para evitar la extensión de transcritos de poliubiquitina se emplea un cebador para la extensión, que se hibrida con la porción S27a del mRNA de Ub/S27a (complementaria de los nucleótidos +256-276 bp de la secuencia del cDNA).

Se hibrida un oligonucleótido de secuencia 5'-GTGGTGTAGGACTTCTTCTTC-3', complementaria de los nucleótidos de +256 a +276 de la secuencia del cDNA del Ub/S27a, con 5 µg de RNA citoplasmático total de células CHO cultivadas en suero y se prolonga (Ausubel y col., 1987).

Se obtiene por PCR del modo descrito a continuación la sonda de hebra simple utilizada para el mapeado de la nucleasa S1, sonda que abarca la región de -2289 a +176 de la secuencia genómica del Ub/S27a. Se clona la región 5' sin traducir de la secuencia genómica del Ub/S27a (de -2289 a +240) en la orientación 5'-3' en el vector pBluescript SK - (Stratagene Cloning Systems). Se emplea este plásmido híbrido como molde para la PCR. Para la amplificación se emplea un cebador promotor T3 biotinilado y un cebador específico de Ub/S27a marcado con ATP [γ -P³²] (5'-CTCGAGCGTGATCGTTTTCC-3', complementario de los nucleótidos de +157 a +176 de la secuencia genómica del Ub/S27a). La obtención de la hebra simple, complementaria de la secuencia de RNA, se realiza por desnaturalización alcalina del producto de PCR fijado sobre esferillas magnéticas de estreptavidina (instrucciones de uso de las Dynabeads M-280 Streptavidin; Dynal A.S., Noruega). Se hibridan 2 x 10⁵ cpm de la sonda de hebra simple con 5 µg de RNA total de células CHO cultivadas en suero a 55°C durante una noche y a continuación se tratan los productos de la hibridación con nucleasa S1 (Ausubel y col., 1987).

El producto obtenido por extensión con cebador presenta una longitud de 304 nucleótidos (figura 6), por lo cual el punto de inicio de la transcripción estaría situado 44 bp en sentido ascendente (de 5' a 3') del codón de inicio dentro de un elemento de polipirimidina (figura 5). Sin embargo, este punto de inicio no se ha podido verificar con el mapeado de nucleasa S1. Con el mapeado de la nucleasa S1 se han hallado dos puntos de inicio de transcripción (figura 7), que están situados 128 bp y 116 bp en sentido ascendente del codón de inicio dentro de la secuencia de polipirimidina y sus posiciones se indican a continuación como posición +1 y +13 (figura 5, figura 7). La explicación más verosímil de la discrepancia observada entre los dos métodos de mapeado estriba en la terminación prematura de la reacción de extensión del cebador. Debido a la posición del cebador en la secuencia S27a, la longitud del producto de extensión esperado es superior a 300 bases y por ello se sitúa por encima de la longitud óptima, cifrada en torno a 100 bases. Cuanto mayor es la distancia entre la posición del cebador y el punto de inicio de transcripción deseado, tanto mayor será la probabilidad de la interrupción prematura de la transcripción inversa causada por secuencias ricas en GC y formaciones estructurales secundarias dentro del mRNA. En cambio, para el mapeado de la nucleasa S1 se emplea una sonda de hebra simple que abarca la región total 5' no traducida (región de secuencia de +2289 a +176; figura 5), que se obtiene a partir de un producto de PCR, con lo cual se soslayan los problemas que aparecen en la extensión de cebador durante la transcripción inversa de secuencias ricas en GC.

Nuestros estudios de la región 5' no traducida, de un tamaño de 2,5 kb, indican que el posible promotor no posee una caja TATA ni una caja CAAT. La secuencia situada en sentido ascendente (de 5' a 3') del codón de inicio se caracteriza por un alto contenido en GC. Dentro de esta secuencia se encuentra un sitio de unión singular para el factor de transcripción Sp1. Con el mapeado de nucleasa S1 se identifican dos puntos prominentes de inicio de transcripción, situados dentro de una secuencia de polipirimidina 128 y 116 bp en sentido ascendente del codón de inicio.

Ejemplo 4

Identificación y delimitación de la región de secuencia que tiene actividad del promotor

Obtención de clones de delección por digestión con exonucleasa III

Por digestión con exonucleasa III se obtiene una serie de clones de delección 5' (tabla 1). Para ello se clona en ambas direcciones la región 5' sin traducir del gen Ub/S27a (de -2289 a +240) en el sitio de restricción HincII del vector pBluescript SK (Stratagene Cloning Systems). Para la introducción de delecciones unidireccionales se digieren estos plásmidos híbridos con KpnI y XhoI y se tratan con la exonucleasa III, del modo descrito en las instrucciones de uso de los kits "Erase-a-base" (Promega Corporation). Los fragmentos de DNA resultantes se integran como fragmentos BamHI en el sitio de restricción singular BamHI del vector pBL-CAT6.

Antes de iniciar la digestión con la exonucleasa III puede modificarse el vector pBluescript Sk, incluso con la introducción de adaptadores, que contengan sitios de restricción idóneos, con el fin de facilitar los siguientes ensayos de clonación de genes. Pueden utilizarse por ejemplo, además del BamHI, otros sitios de restricción enzimática para fines de clonación, p. ej. según el esquema:

NotI-XbaI-SpeI-SmaI-EcoRI-extremo 3'.....extremo 5'-SalI/HincII-BamHI

fragmento de delección 5'

TABLA 1

Recopilación de clones de delección 5' obtenidos por digestión con exonucleasa III de la región 5' no traducida de Ub/S27a

fragmento de delección 5'	extremo 5' del fragmento	extremo 3' del fragmento
1612 bp	posición -1501	posición +111
806 bp	posición -695	posición +111
483 bp	posición -372	posición +111
272 bp	posición -161	posición +111
156 bp	posición -45	posición +111

La indicación de la posición se refiere a la numeración de la secuencia genómica de Ub/S27a representada en la figura 5.

Todos los clones de delección tienen un extremo 3' común (posición +111), situado entre los sitios de inicio de transcripción y el codón de inicio (figura 5). El fragmento mayor abarca 1,7 kb y el fragmento menor 150 bp (tabla 1). Este último es el único fragmento que no contiene el sitio de unión singular Sp1. Antes que el gen CAT sin promotor, que actúa como gen informante, se clonan estas regiones de promotor potencial en el vector eucariota de expresión pBL-CAT6 y se utilizan para la transfección transitoria de células CHO cultivadas en suero.

Transfección de células mediada por DNA y ensayo CAT

El día antes de la transfección se siembran 2×10^5 células en cada placa de 20 cm². Se transfectan las células con 10 µg de DNA plásmido (construido de informante CAT) y 500 ng del plásmido pCMVtklacZ empleando un método modificado de precipitación con fosfato cálcico (Chen & Okayama, 1987). Se recurre a la actividad de la β-galactosidasa para determinar la eficacia de la transfección. Después de una incubación a 37°C y 5% de CO₂ durante 4 horas se elimina el exceso de DNA precipitado por lavado con PBS.

Después de un período de incubación de 48 horas se lavan las células en primer lugar con PBS. Después se añaden en cada caso 1 ml del tampón NTE enfriado con hielo (0,1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,8, 1 mM EDTA) a las placas, se sueltan las células de las placas con un rascador y se trasladan a un matraz Eppendorf. Se centrifugan las células a 9000 rpm durante 3 minutos, se obtiene un culote que se suspende de nuevo en 70 µl de 0,25 M Tris-HCl, de pH = 7,8, y se almacenan a -70°C. Para la determinación de la actividad de la cloranfenicol-acetiltransferasa por el método de Sleight se emplean en cada caso 30 µl de la suspensión celular (Sleight, 1986). Se efectúa la normalización de la actividad CAT relativa de cada transfección en base a la actividad de la β-galactosidasa determinada por el método de Norton y Coffin (Norton & Coffin, 1985). Para este ensayo se emplean en cada caso 10 µl de la suspensión celular. En todos los casos se realiza también una corrección teniendo en cuenta la cantidad de proteína utilizada. Esta concentración de proteína se determina por el método de Bradford (Ausubel y col. 1987).

En el histograma de la figura 8 se representan los resultados de cuatro ensayos de expresión transitoria realizados con independencia entre sí. Para el control se emplean plásmidos, en los que la expresión del gen CAT se regula con un promotor vírico constitutivo. En el pBL-CAT5, se emplea el promotor de la timidina-quinasa del virus del *Herpes simplex*. En el pCMVtkCAT se emplea este promotor en combinación con un intensificador del virus de la citomegalia humana y en el pKSSV2CAT se emplea el promotor SV40. El pBL-CAT6 se emplea como control negativo y contiene el gen CAT sin promotor.

Con excepción del fragmento de 156 bp, todos los fragmentos de Ub/S27a, clonados en orientación 5'-3' antes del gen CAT sin promotor, presentan una intensa actividad de promotor, que es de 2,5 a 3 mayor que la del promotor tk del virus del *Herpes simplex* (figura 8). La actividad más intensa de promotor, que es comparable con la del promotor SV40 en el pKSSV2CAT, es la que presentan los fragmentos de 483 bp y 272 bp. Solamente la combinación de intensificador CMV/promotor tk en el pCMVtkCAT da lugar a una actividad CAT todavía mayor, del orden del 10%. Con una delección que alcanza hasta la posición -45 (fragmento de 156 bp), que abarca también el sitio singular de unión Sp1, ya no se detecta ninguna actividad CAT (figura 8). La región 5' no traducida del Ub/S27a 5', suficiente para conferir una intensa actividad de promotor, puede delimitarse, pues, a la región comprendida entre -161 del extremo 5' del fragmento de 272 bp y -45 del extremo 5' del fragmento de 156 bp. Dentro de esta región, que comprende 117 bp, existe también un sitio de unión Sp1 singular.

Un resultado inesperado fue la observación de que los fragmentos más cortos de la orientación 3'-5' presentan también actividad de promotor (figura 8). De todos modos, este promotor localizado en la hebra opuesta no es tan intenso como el promotor Ub/S27a, sino que tiene una reducción del 42%. También en este caso, los fragmentos de 482 bp y 272 bp son los que presentan la actividad mayor. Esta actividad es comparable con la del promotor tk en el pBL-CAT5. El gen en cuestión, cuya expresión se regula desde este promotor de la hebra opuesta, no ha podido identificarse hasta la fecha presente. La región de promotor de 117 bp mencionada antes podría ser incluso una región de promotor bidireccional.

Resumiendo se puede decir que el promotor Ub/S27a aislado de las células CHO por los inventores de la presente invención se dispone por primera vez de un promotor homólogo constitutivo muy intenso del hámster. Los estudios de células CHO cultivadas en suero y transfectadas de modo estable confirman que el promotor Ub/S27a es extraordinariamente activo incluso después de su integración en el genoma celular y favorece una expresión muy intensa del gen informante CAT.

Ejemplo 5

Expresión transitoria de un gen informante bajo el control del promotor Ub/S27a en células BHK

Los constructos de informante CAT, que contienen diversos fragmentos de la región de promotor del Ub/S27a, se integran en células BHK-21 (ATCC CCL 10) y se determina la actividad CAT de los transfectantes. En la figura 9 se representa que con las secuencias de promotor de la invención pueden conseguirse grados de expresión extraordinariamente altos incluso en células BHK.

Ejemplo 6

Expresión estable de un gen informante bajo el control de un promotor Ub/S27a en células CHO

Se preparan transfectantes estables del modo siguiente. El día previo a la transfección se siembran 200.000 células en cada placa de 20 cm². Se transfectan las células con 10 µg de DNA plásmido (constructo de informante CAT) y 500 ng del plásmido pSV2pac (Vara y col., 1986) empleando un método modificado de precipitación con fosfato cálcico (Chen & Okayama, 1987). El plásmido pSV2pac lleva el gen que codifica a la puromicina-N-acetil-transferasa (pac) y confiere por tanto resistencia contra el antibiótico que inhibe la biosíntesis de la proteína. Después de una incubación a 37°C y 5% de CO₂ durante 4 horas se elimina el precipitado de DNA en exceso por lavado con PBS. Después de 24 horas más se inicia la selección de los transfectantes por adición de 10 µg/ml de puromicina. Cada dos o tres días se efectúa el cambio de medio por un medio que contiene puromicina. Después de la clonación en dilución de los transfectantes seleccionados se obtienen los clones individuales.

En las figuras 10-12 se representan los grados de expresión CAT de diversos clones de transfectantes estables con respecto al clon 6 de pCMVtkCAT (clon 6 es el clon celular transfectado con pCMVtkCAT que tiene la mayor actividad CAT).

Bibliografía técnica

- Adams, S.M., Sharp, M.G., Walker, R.A., Brammar, W.J. & Varley, J.M. (1992)
Differential expression of translation-associated genes in benign and malignant human breast tumours
Br. J. Cancer 65, 65-71
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Smith, J.A., Seidman, J.G. & Struhl, K. (1987)
Current protocols in molecular biology
Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience

ES 2 281 905 T3

Baker, R.T. & Board, P.G. (1991)

The human ubiquitin-52 amino acid fusion protein gene shares several structural features with mammalian ribosomal protein genes

Nucleic Acids Research 19, 1035-1040

Boshart, M., Klüppel, M., Schmidt, A., Schütz, G. & Luckow, B. (1992)

Reporter constructs with low background activity utilizing the cat gene

Gene 110, 129-130

Breathnach, R. & Chambon, P. (1981)

Organization and expression of eukaryotic split genes coding for proteins

Ann. Rev. Biochem. 50, 349-383

Chen, C. & Okayama, H. (1987)

High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA

J. Mol. Cell. Biol. 7, 2745-2752

Ciechanover, A. (1994)

The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway

Cell 79, 13-21

Dynan, W.S. & Tjian, R. (1983)

The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter

Cell 35, 79-87

Faisst, S. & Meyer, S. (1992)

Compilation of vertebrate-encoded transcription factors

Nucleic Acids Research 20, 3-26

Finley, D., Bartel, B. & Varshavsky, A. (1989)

The tails of ubiquitin precursors are ribosomal proteins whose fusion to ubiquitin facilitates ribosome biogenesis

Nature 333, 394-401

Fornace, A.J., Alama, I., Hollander, M.C. & Lamoreaux, E. (1989)

Ubiquitin mRNA is a major stress-induced transcript in mammalian cells

Nucleic Acids Research 17, 1215-1230

ES 2 281 905 T3

Huxley, C. & Fried, M. (1990)

The mouse rpL7a gene is typical of other ribosomal protein genes in its 5' region but differs in being located in a tight cluster of CpG-rich islands

Nucleic Acids Research 18, 5353-5357

Jentsch, S., Seufert, W. & Hauser, H.-P. (1991)

Genetic analysis of the ubiquitin system

Biochimica et Biophysica Acta 1089, 127-139

Kaufman, R. J. (1987)

High level production of proteins in mammalian cells In: Genetic Engineering: Principles and methods (coordinator: J.K. Setlow), tomo 9, página 155

Plenum Publishing, Nueva York

Luckow, B., Schütz, G. (1987)

CAT constructions with multiple unique restriction sites for the functional analysis of eucaryotic promoters and regulatory elements

Nucleic Acids Res. 15, 5490

Luo, X. & Kim, K.-H. (1990)

An enhancer element in the house-keeping promoter for acetyl-CoA carboxylase gene

Nucleic Acids Research 18, 3249-3254

Meyer, J., Nick, S., Stamminger, T., Grummt, F., Jahn, G. & Lipps, H.J. (1993)

Inhibition of HIV-1 replication by a high-copy-number vector expressing antisense RNA for reverse transcriptase

Gene 129, 263-268

Nicolaides, N.C. & Stoeckert, C.J. (1990)

A simple, efficient method for the separate isolation of RNA and DNA from the same cells

BioTechniques 8, 154-155

Norton, P.A. & Coffin, J.M. (1985)

Bacterial β -galactosidase as a marker of Rous Sarcoma virus gene expression and replication

Mol. Cell. Biol. 5, 281-290

Redman, K.L. & Rechsteiner, M. (1989)

Identification of the long ubiquitin extension as ribosomal protein S27a

Nature 338, 438-440

Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989)

Molecular cloning: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY

Schlesinger, M.J. & Bond, U. (1987)

Ubiquitin genes

Oxf. Survey Euk. Genes 4, 77-91

Shimbara, N., Sato, C., Takashina, M., Tanaka, T., Tanaka, K. & Ichihara, A. (1993)

Down-regulation of ubiquitin gene expression during differentiation of human leukemia cells

FEBS Letters 322, 235-239

Sleigh, M.J. (1986)

A nonchromatographic assay for expression of the chloramphenicol acetyl transferase gene in eukaryotic cells

Anal. Biochem. 156, 252-256

Urlaub, G. & Chasin, L.A. (1980)

Isolation of chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4216-4220

Tsonis, P.A., Manes, T., Millan, J.L. & Goetinck, P.F. (1988)

CAT constructs with convenient sites for cloning and generating deletions

Nucleic Acids Research 16, 7745

Vara, J.A., Portela, A., Ortin, J. & Jiménez, A (1986)

Expression in mammalian cells of a gene from *Streptomyces alboniger* conferring puromycin resistance

Nucleic Acids Research 14, 4617-4624

Wegner, M., Zastrow, G., Klavinius, A., Schwender, S., Müller, F., Luksza, H., Hoppe, J., Wienberg, J. & Grummt, F. (1989)

Cis-acting sequences from mouse rDNA promote plasmid DNA amplification and persistence in mouse cells: implication of HMG-I in their function

Nucleic Acids Research 17, 9909-9932

Wiborg, O., Pedersen, M.S., Wind, A., Berglund, L.E., Marcker, K.A. & Vuust, J. (1985)

The human ubiquitina multigene family: some genes contain multiple directly repeated ubiquitin coding sequences

EMBO J. 4, 755-759

Wong, J.M., Mafune, K., Yow, H., Rivers, E.N., Ravikumar, T.S., Steele, G.D. & Chen, L.B. (1993)

Ubiquitin-ribosomal protein S27a gene overexpressed in human colorectal carcinoma is an early growth response gene

Cancer Research 53, 1916-1920

REIVINDICACIONES

- 5 1. Molécula de ácido nucleico que contiene la secuencia de promotor del gen Ubiquitina-S27a del hámster de la posición 2129 a 2400 según la SEQ ID NO: 5 o una secuencia que, por sustitución, inserción o delección de una, dos o tres bases, pueda derivarse de esta, sin que por la sustitución, inserción o delección la actividad del promotor sufra una merma de más de un 50% del valor que se obtiene para un promotor que posee la secuencia de la posición 2129 a 2400 según la SEQ ID NO: 5.
- 10 2. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1, **caracterizada** porque contiene la secuencia de promotor del gen de ubiquitina-S27a del hámster de la posición 1918 a 2400 según la SEQ ID NO: 5 o una secuencia que, por sustitución, inserción o delección de una, dos o tres bases, pueda derivarse de esta, sin que por la sustitución, inserción o delección la actividad del promotor sufra una merma de más de un 50% del valor que se obtiene para un promotor que posee la secuencia de la posición 2129 a 2400 según la SEQ ID NO: 5.
- 15 3. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizada** porque contiene la secuencia de promotor del gen de ubiquitina-S27a del hámster según la SEQ ID NO: 5 o una secuencia que, por sustitución, inserción o delección de una, dos o tres bases, pueda derivarse de esta, sin que por la sustitución, inserción o delección la actividad del promotor sufra una merma de más de un 50% del valor que se obtiene para un promotor que posee la secuencia de la posición 2129 a 2400 según la SEQ ID NO: 5.
- 20 4. Molécula de ácido nucleico según una de las reivindicaciones de 1 a 3, **caracterizada** porque contiene uno o varios intensificadores, que está o están unidos funcionalmente con la secuencia de promotor del gen de ubiquitina-S27a del hámster.
- 25 5. Molécula de ácido nucleico según una de las reivindicaciones de 1 a 4, **caracterizada** porque las secuencias del promotor están unidas funcionalmente con un gen.
- 30 6. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 5, **caracterizada** porque dicho gen se expresa bajo el control de las secuencias de promotor.
- 35 7. Molécula de ácido nucleico según una de las reivindicaciones 5 ó 6, **caracterizada** porque dicho gen codifica a un activador de plasminógeno de tejidos, un activador de plasminógeno de segunda generación, un interferón, un factor de necrosis tumoral la eritropoyetina, el factor de estimulación de colonias de granulocitos, la dismutasa de superóxido de manganeso, una cadena de inmunoglobulina, la región variable de una cadena de inmunoglobulina, una cadena de inmunoglobulina humanizada, la región variable de una cadena de inmunoglobulina humanizada, un anticuerpo de cadena simple y/o un anticuerpo que es específico de un CD44 variable.
- 40 8. Molécula de ácido nucleico según una de las reivindicaciones de 1 a 7, **caracterizada** porque es un vector de expresión.
- 45 9. Célula hospedante, en la que se introduce una molécula de ácido nucleico según una de las reivindicaciones de 1 a 8.
10. Procedimiento para la obtención de un producto genético heterólogo en una célula hospedante eucariota, **caracterizado** porque se introduce una molécula de ácido nucleico según una de las reivindicaciones de 1 a 8 en la célula hospedante eucariota, se cultiva la célula hospedante y se aísla el producto genético sintetizado.
- 50 11. Procedimiento según la reivindicación 10, **caracterizado** porque la célula hospedante es una célula de hámster.
12. Procedimiento según la reivindicación 11, **caracterizado** porque la célula de hámster es una célula CHO.
- 55 13. Procedimiento según una de las reivindicaciones de 10 a 12, **caracterizado** porque el gen heterólogo codifica a un activador de plasminógeno de tejidos, un activador de plasminógeno de segunda generación, un interferón, un factor de necrosis tumoral la eritropoyetina, el factor de estimulación de colonias de granulocitos, la dismutasa de superóxido de manganeso, una cadena de inmunoglobulina, la región variable de una cadena de inmunoglobulina, una cadena de inmunoglobulina humanizada, la región variable de una cadena de inmunoglobulina humanizada, un anticuerpo de cadena simple y/o un anticuerpo que es específico de un CD44 variable.
- 60 14. Uso de una molécula de ácido nucleico que contiene una secuencia de promotor según una de las reivindicaciones de 1 a 8 para la obtención de un producto genético heterólogo en células cultivadas de hámster, con preferencia en células CHO.

ES 2 281 905 T3

Hombre	TGGAGCCGCAACCAAAATGCAGATTTTCGTGAAAACCCCTTACGGGGAAGACCATCACCCCT	82
CHO	TGGAACCGCCGCCAAGATGCAGATTTTCGTGAAGACCCCTTACGGGGAAGACCATCACCCCT	60
	: : :	
Hombre	CGAGGTTGAACCCCTCGGATACGATAGAAAATGTAAAGGCCAAGATCCAGGATAAGGAAGG	142
CHO	CGAGGTTGAACCCCTCGGACACTATAGAAAATGTAAAGGCCAAGATCCAGGATAAGGAAGG	120
	▲	
Hombre	AATTCCTCCTGATCAGCAGAGACTGATCTTTGCTGGCAAGCAGCTAGAAGATGGACGTAC	202
CHO	AATTCCTCCTGACCAGCAGAGGCTGATCTTTGCTGGTAAGCAACTGGAAGATGGCCGTAC	180
	=====	
Hombre	TTTGTCTGACTACAATATTCAAAGGAGTCTACTCTTCATCTTGTGTTGAGACTTCGTGG	262
CHO	TTTGTCTGACTACAACATCCAAAAGGAGTCCACCCCTTCATCTTGTGTTGAGACTTCGTGG	240
	▲	
Hombre	TGGTGCTAAGAAAAGGAAGAAGAAGTCTTACACCACTCCCAAGAAGAATAAGCACAAGAG	322
CHO	TGGTGCTAAGAAAGAGGAAGAAGAAGTCTTACACCACTCCCAAGAAGAATAAGCATAAGAG	300
	=====	
Hombre	AAAGAAGGTTAAGCTGGCTGTCTGAAATATTATAAGGTGGATGAGAATGGCAAAATTAG	382
CHO	AAAGAAGGTTAAGTTGGCTGTCTGAAGTACTATAAGGTGGATGAAAATGGCAAAATTAG	360
	▲	
Hombre	TCGCCTTCGTCGAGAGTGCCCTTCTGATGAATGTGGTGCTGGGGTGTATTATGGCAAGTCA	442
CHO	TCGCCTTCGTCGAGAGTGCCATCTGATGAGTGTGGTGCTGGAGTTTTCATGGCTAGCCA	420
	=====	
Hombre	CTTTGACAGACATTATTGTGGCAAATGTTGTCTGACTTACTGTTTCAACAAACCAGAAGA	502
CHO	TTTTGACAGACATTACTGTGGCAAAGTGTGTCTGACTTACTGCTTCAACAAACCAGAAGA	480
	+++	
Hombre	CAAGTAA	509
CHO	CAAGTAGTTGTGTATGAATAAATAAAAA	508

92.2% de homología

_____ señal de poli-A : : : codón de inicio +++ codón de paro

Figura 1

Hombre	MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEG *****	35
CHO	MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEG	35
Hombre	IPPDQQRLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLV *****	70
CHO	IPPDQQRLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLV	70
Hombre	LRLRGGAKKRKKKSYPKKNKHKRKKVKLAVLKY *****	105
CHO	LRLRGGAKKRKKKSYPKKNKHKRKKVKLAVLKY	105
Hombre	YKVDENGKISRLRRECPSDECGAGVFMASHFDRHY *****	140
CHO	YKVDENGKISRLRRECPSDECGAGVFMASHFDRHY	140
Hombre	CGKCCLTYCFNKPEDK *****	156
CHO	CGKCCLTYCFNKPEDK	156

100% de homología

Figura 2

ES 2 281 905 T3

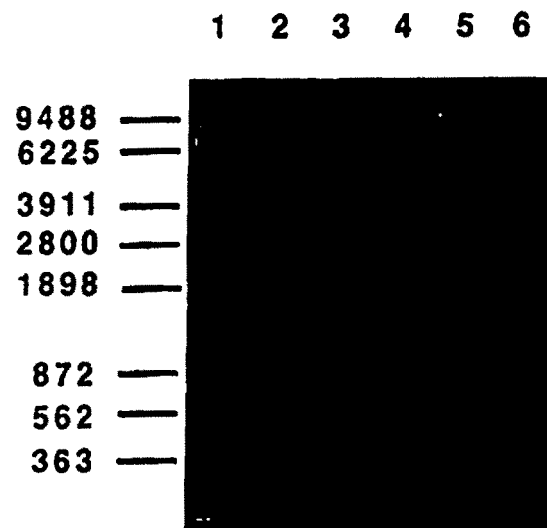


Figura 3

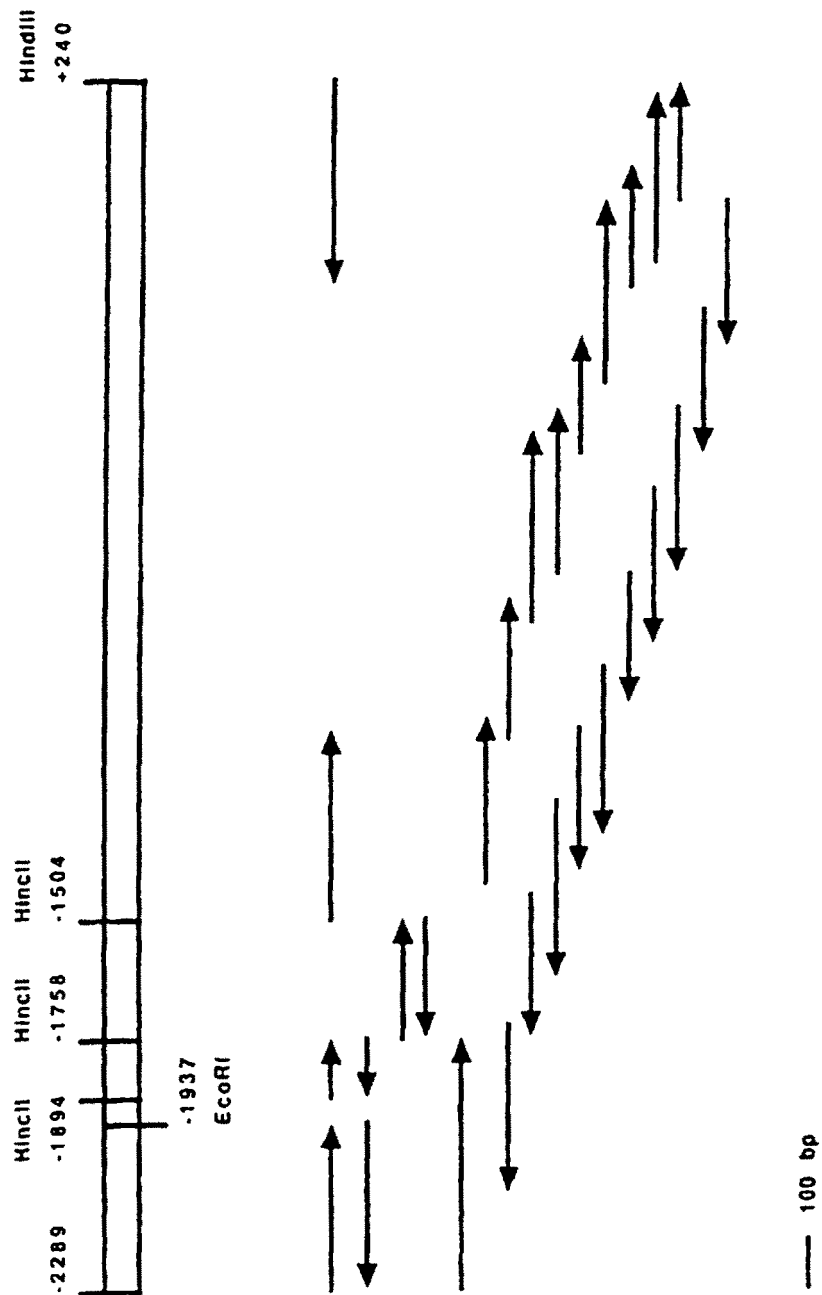


Figura 4

ES 2 281 905 T3

GATCTCCAGGACAGCCATGGCTATTACACAGAGAAACCCTGTCTGGAAAA	- 2240
ACAAAAAATTAGTGTCATGTGTAAATGTGTGGAGTATGCTTGTTCATGCC	- 2190
ACATACAGAGGTAGAGGGCAGTTTATGGGAGTCAGTTCCTATTCTTCCTT	- 2140
TATGGGGGACCTGGGGACTGAACTCAGGTCATCAGGCTTGGCAGAAAGTG	- 2090
CATTAGCTCACGGAGCCTTATCATTTGGCGAAAGCTCTCTCAAGTAGAAAA	- 2040
TCAATGTGTTTGTCTCATAGTGCAATCATTATGTTTCGAGAGGGGAAGGGT	- 1990
ACAATCGTTGGGGCATGTGTGGTCACATCTGAATAGCAGTAGCTCCCTAG	- 1940
<u>GAGAATTCCAAGTTCTTTGGTGGTGTATCAATGCCCTTAAAGGGGTCAAC</u>	- 1890
EcoRI	HincII
AACTTTTTTTCCCTCTGACAAACTATCTTCTTATGTCCTTGTCCCTCAT	- 1840
ATTTGAAGTATTTTATTCTTTGCAGTGTTGAATATCAATTCTAGCACCTC	- 1790
AGACATGTTAGGTAAGTACCCTACAACCTCAGGTTAACTAATTTAATTTAA	- 1740
HincII	
CTAATTTAACCCCAACACTTTTTCTTTGTTTATCCACATTTGTGGAGTGT	- 1690
GT	- 1640
GTGTGTGTGCCGCGCGCGCTCGGATCATCTACCTTTTGTTTAAAAAATG	- 1590
TTAGTCCAGGGGTGGGGTGCACTGTGAAAGTCTGAGGGTAACTTGCTGGG	- 1540
-> 1612 bp	
GTCAGTTCTTTCCACTATAGGACAGA ² CTCCAGGTGTCAACTCTTTACTG	- 1490
HincII	
ACAGAACCATCCAAATAGCCCTATCTAATTTTAGTTTTTTTATTTATTTAT	- 1440

TTTTTGTTTTTCGAGACAGGGTTTCTCTGTGGCTTTGGAGGCTGTCCTGG	- 1390

AACTAGCTCTTGTAGACCAGGCTGGTCTCGAACTCAGAGATCCACCTGCC	- 1340
TCTGCCTCCTGAGTGCTGGGATTAAAGGCATGCGCCACCAACGCTTGGCT	- 1290
CTACCTAATTTTAAAAGAGATTGTGTGTCACAAGGGTGTCTATGTCGCCCT	- 1240
GCAACCAACCCCCCCCCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTTCACTGAAGCTGA	- 1190
AGCACGATGATTTGGTTACTCTGGCTGGCCAATGAGCTCTAGGGAGTCTC	- 1140
CTGTCAAACAGAATCTCAACAGGCGCAGCAGTCTTTTTTAAAGTGGGGTT	- 1090
ACAACACAGGTTTTTGCATATCAGGCATTTTATCTAAGCTATTTCCCAGC	- 1040
CAAAAATGTGTATTTTGGAGGCAGCAGAGCTAATAGATTAAAATGAGGGA	- 990
AGAGCCCAACAGGTTATTAGGAAGATAAGCATCTTCTTTATATAAAACA	- 940
AAACCAAACCAAACCTGGAGGAGGTCTACCTTTAGGGATGGAAGAAAAGAC	- 890
ATTTAGAGGGTGCAATAGAAAGGGCACTGAGTTTGTGAGGTGGAGGACTG	- 840
GGAGAGGGCGCAACCGCTTTAACTGTCTCTGTTTTTGCCTATTTTTTGGGGA	- 790

Figura 5a

ES 2 281 905 T3

[illegible]

Figura 5b

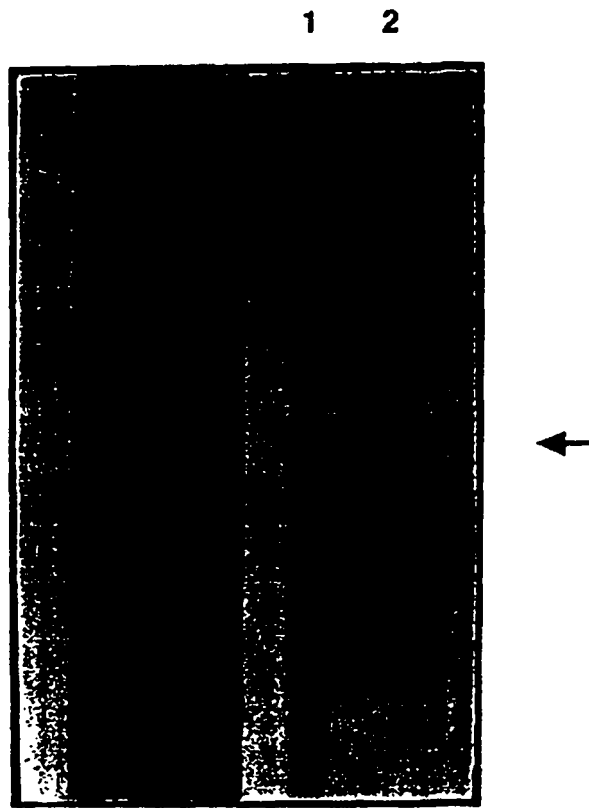


Figura 6

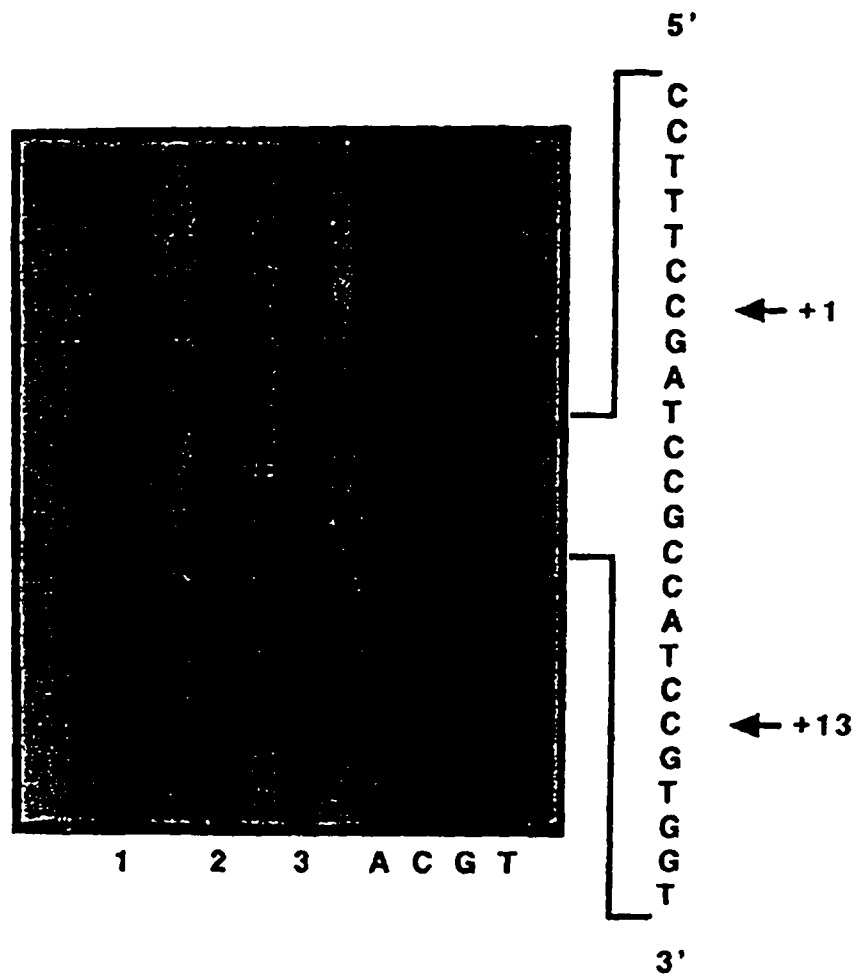


Figura 7



Figura 8

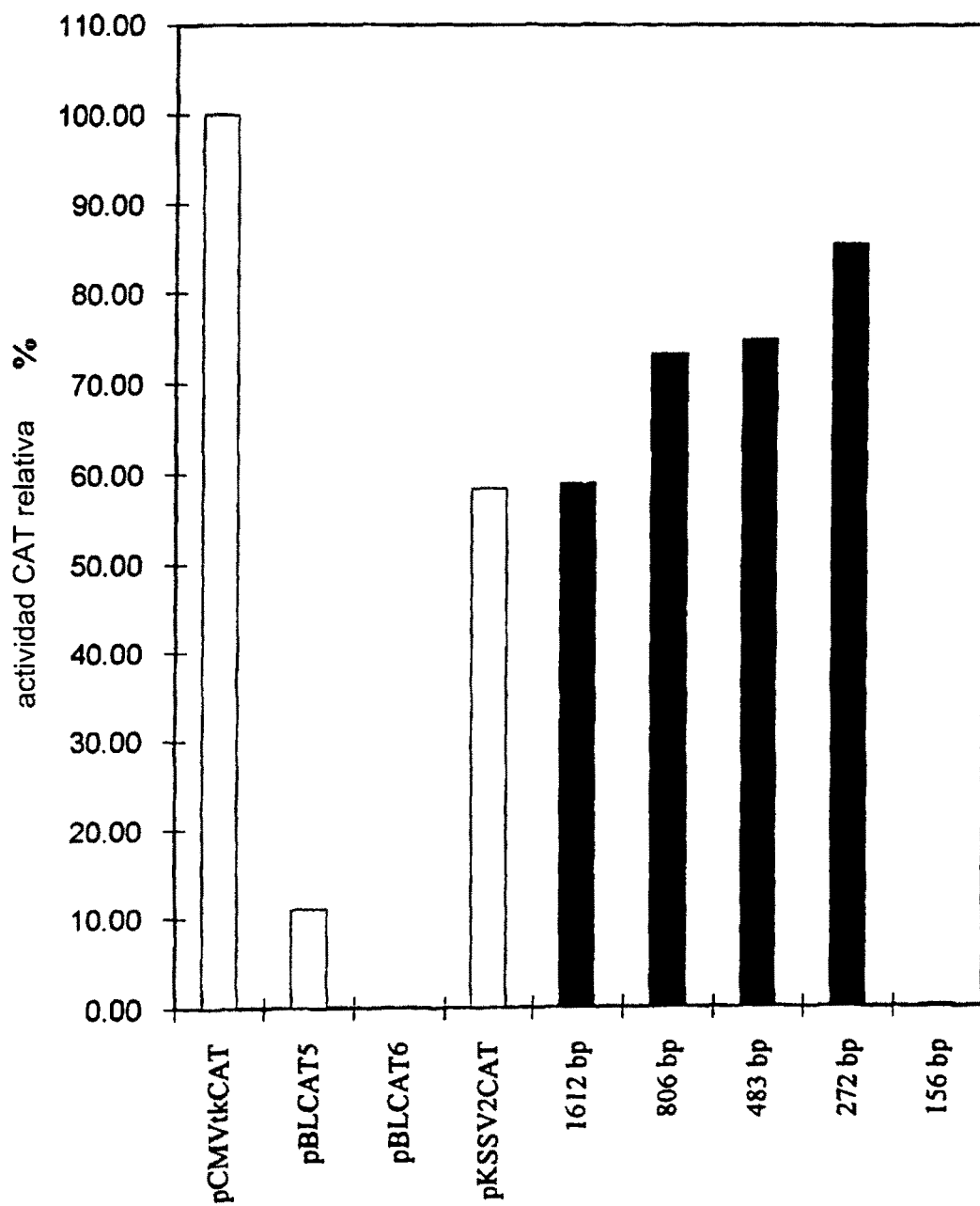


Figura 9

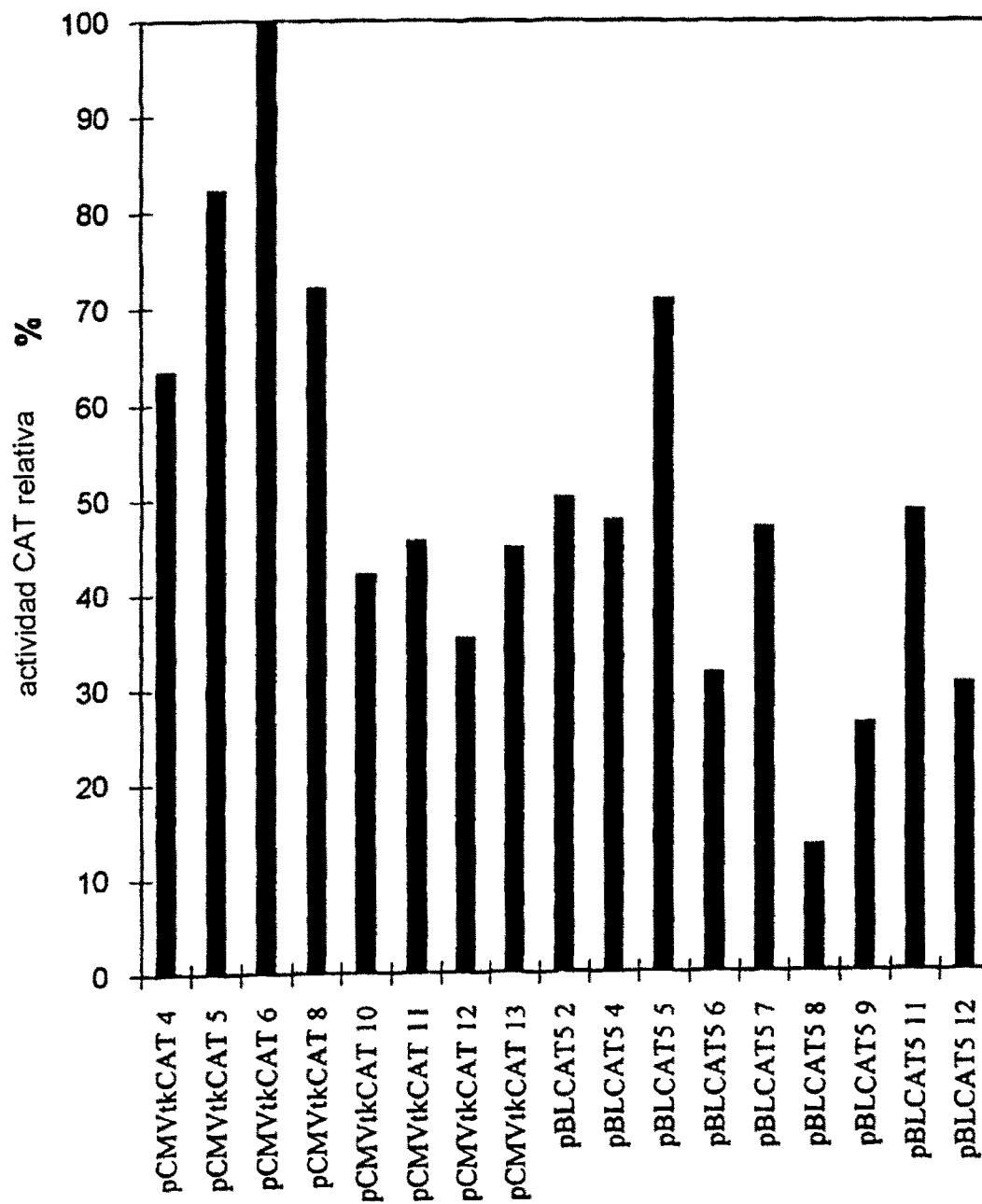


Figura 10

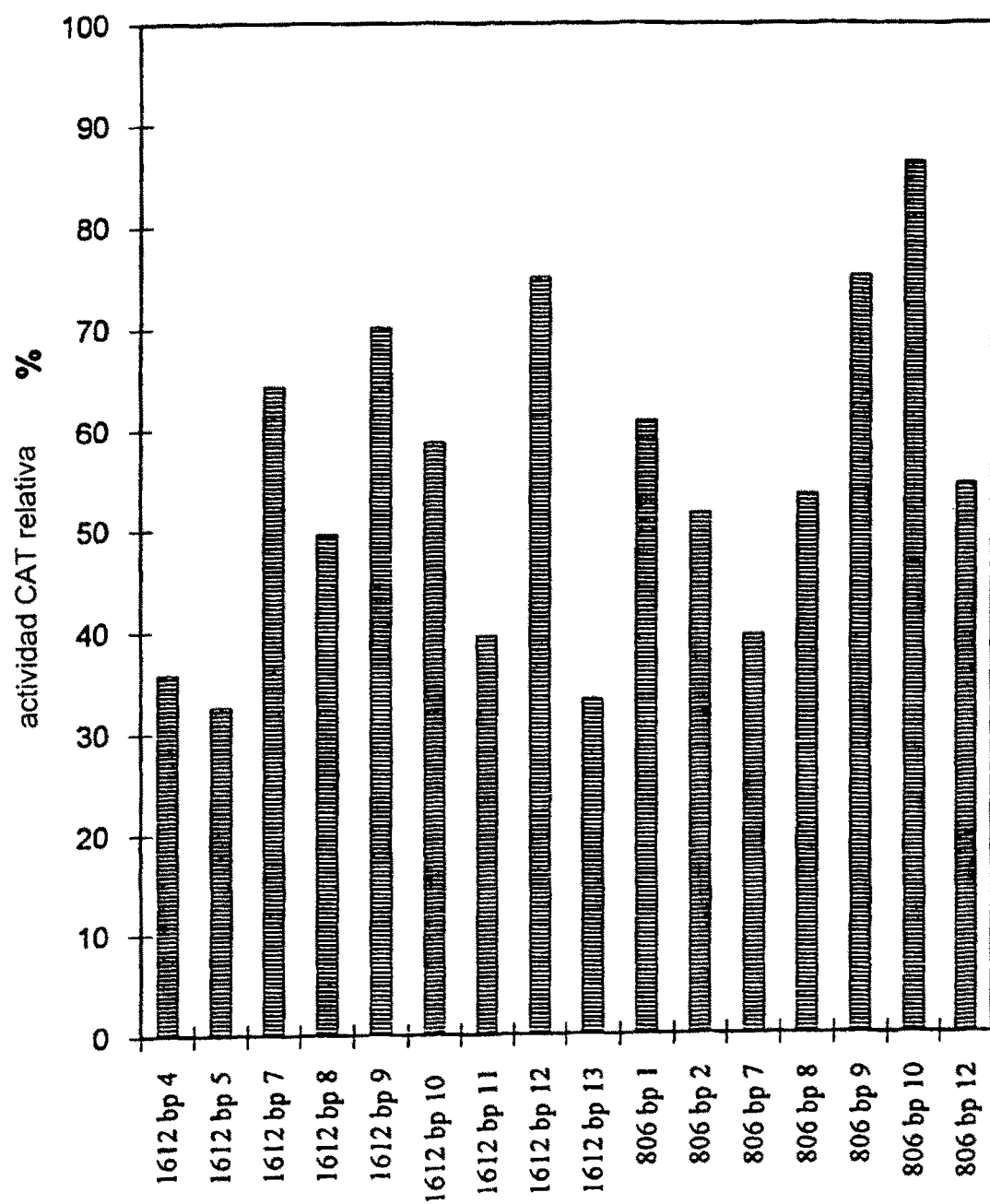


Figura 11

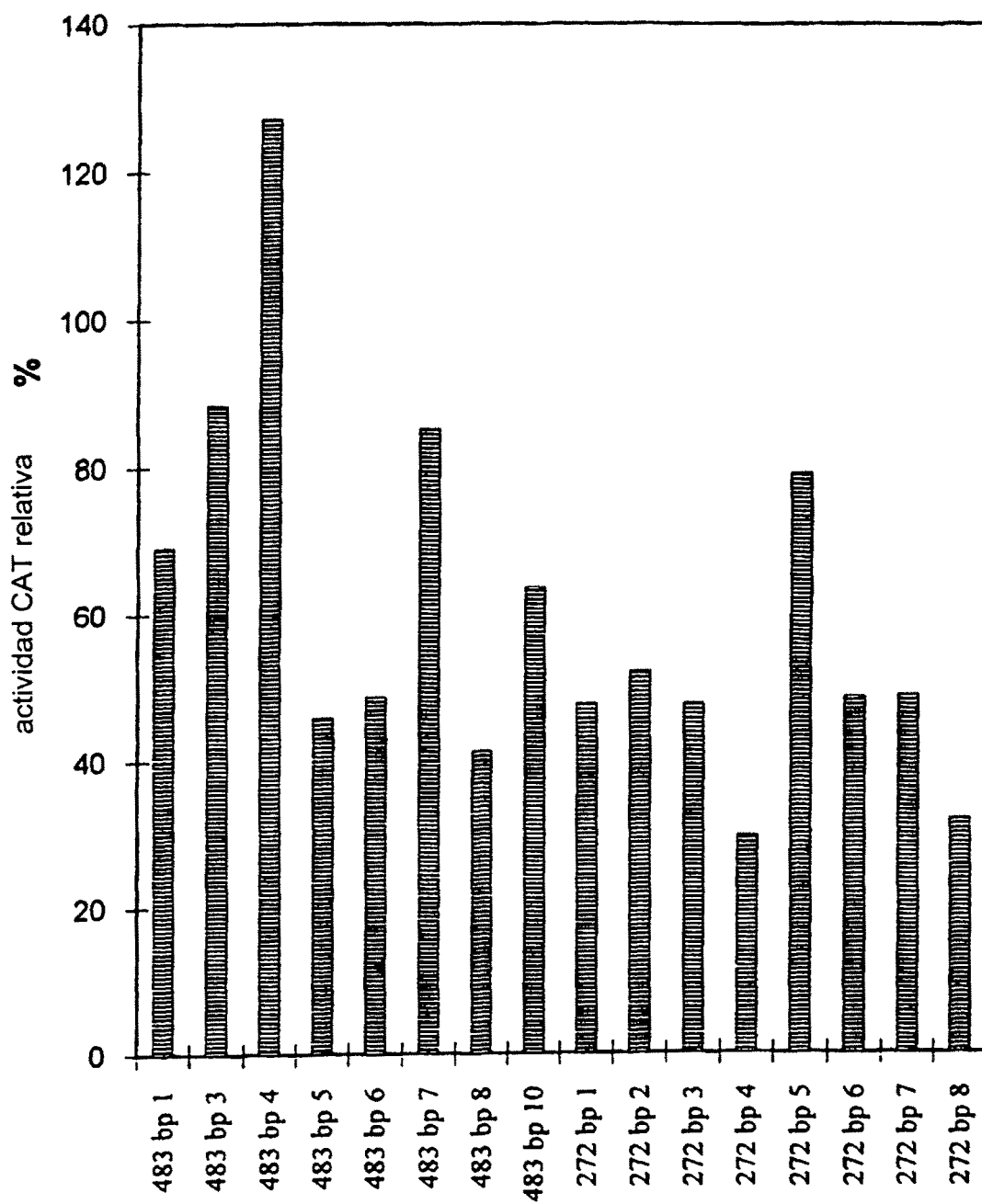


Figura 12

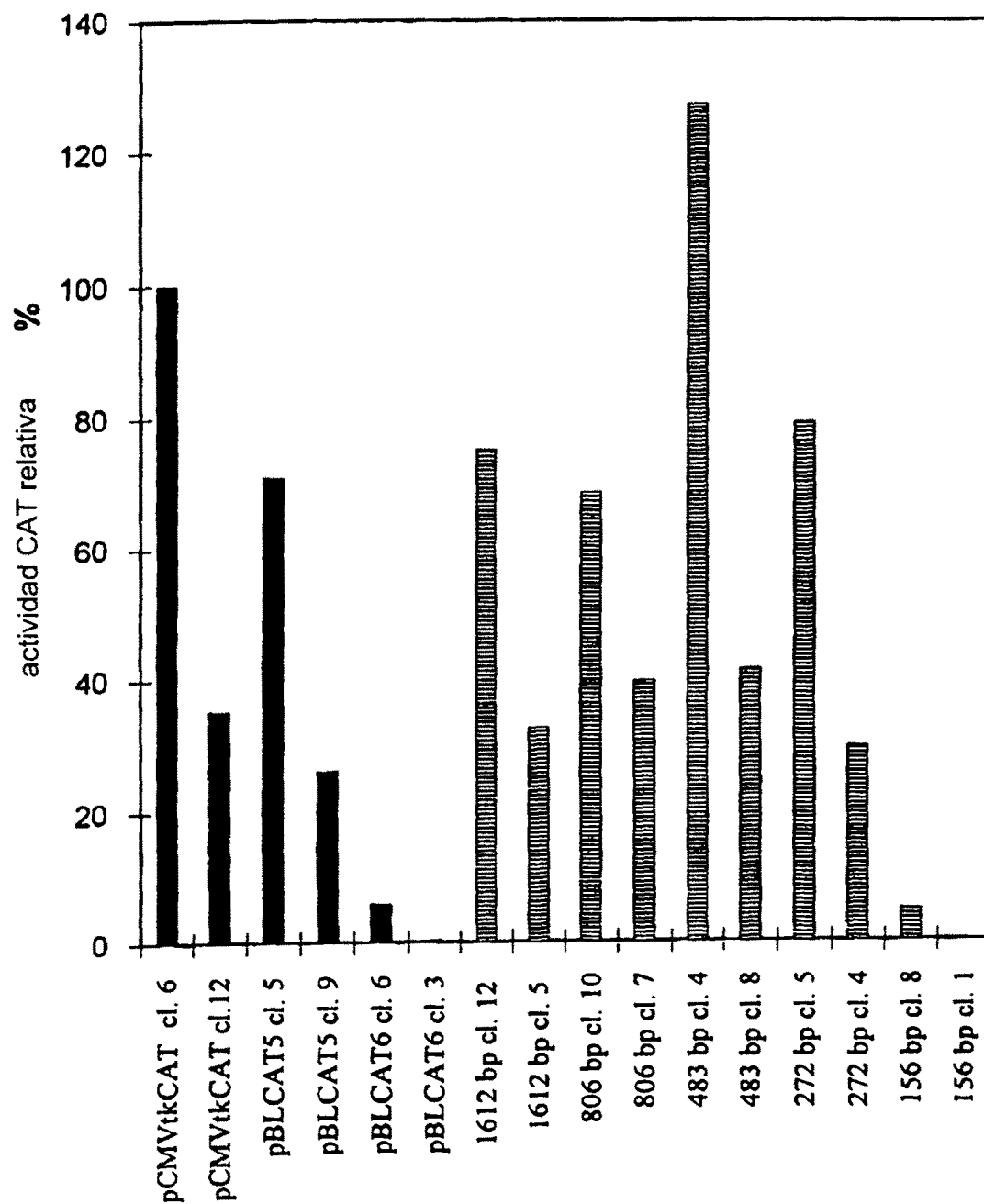


Figura 13

ES 2 281 905 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) DATOS GENERALES

(I) SOLICITANTE:

(A) NOMBRE: Boehringer Ingelheim International GmbH

(B) CALLE: Binger Str.

(C) CIUDAD: Ingelheim

(E) PAÍS: Alemania

(F) CÓDIGO POSTAL: 55216

(G) TELÉFONO: 06132-772770

(H) TELEFAX: 06132-774377

(ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Promotor homólogo intenso obtenido de hámster

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 8

(iv) VERSIÓN LEÍBLE CON ORDENADOR:

(A) SOPORTE DE DATOS: disquete

(B) ORDENADOR: IBM PC compatible

(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS

(D) PROGRAMA INFORMÁTICO: PatentIn Release #1.0, version # 1.30 (EPA)

(2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 1

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 508 pares de bases

(B) TIPO: nucleótido

(C) FORMA DE HEBRA: doble

(D) TOPOLOGÍA: doble

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA a mRNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEQ ID NO: 1

```
TGGAACCGCC GCCAAGATGC AGATTTTCGT GAAGACCCTT ACGGGGAAAA CGATCACGCT 60
CGAGGTTGAA CCCTCGGACA CTATAGAAAA TGTAAAGGCC AAGATCCAGG ATAAGGAAGG 120
AATTCCTCCT GACCAGCAGA GGCTGATCTT TGCTGGTAAG CAACTGGAAG ATGGCCGTAC 180
TTTGTCTGAC TACAACATCC AAAAGGAGTC CACCCTTCAT CTTGTGTTGA GACTTCGTGG 240
TG GTGCTAAG AAGAGGAAGA AGAAGTCCTA CACCACTCCC AAGAAGAATA AGCATAAGAG 300
AAAGAAGGTT AAGTTGGCTG TGCTGAAGTA CTATAAGGTG GATGAAAATG GCAAATTAG 360
TCGCCTTCGT CGAGAGTGTC CATCTGATGA GTGTGGTGCT GGAGTTTTCA TGGCTAGCCA 420
TTTTGACAGA CATTACTGTG GCAAGTGTG TCTGACTTAC TGCTTCAACA AACCAGAAGA 480
CAAGTAGTTG TGTATGAATA AATAAAAA 508
```

(2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 2

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 487 pares de bases

ES 2 281 905 T3

- (B) TIPO: nucleótido
- (C) FORMA DE HEBRA: doble
- (D) TOPOLOGÍA: doble

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEQ ID NO: 2

```
TGGAGCCGCA ACCAAAATGC AGATTTTCGT GAAAACCCTT ACGGGGAAGA CCATCACCCCT 60
CGAGGTTGAA CCCTCGGATA CGATAGAAAA TGTAAGGCC AAGATCCAGG ATAAGGAAGG 120
AATTCCTCCT GATCAGCAGA GACTGATCTT TGCTGGCAAG CAGCTAGAAG ATGGACGTAC 180
TTTGTCTGAC TACAATATTC AAAAGGAGTC TACTCTTCAT CTTGTGTTGA GACTTCGTGG 240
TGGTGCTAAG AAAAGGAAGA AGAAGTCTTA CACCACTCCC AAGAAGAATA AGCACAAGAG 300
AAAGAAGGTT AAGCTGGCTG TCCTGAAATA TTATAAGGTG GATGAGAATG GCAAATTAG 360
TCGCCTTCGT CGAGAGTGCC CTTCTGATGA ATGTGGTGCT GGGGTGTTTA TGGCAAGTCA 420
CTTTGACAGA CATTATTGTG GCAAATGTTG TCTGACTTAC TGTTTCAACA AACCAGAAGA 480
CAAGTAA 487
```

(2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 3

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

- (A) LONGITUD: 156 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) FORMA DE HEBRA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEQ ID NO: 3

ES 2 281 905 T3

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

(2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 4

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

- (A) LONGITUD: 156 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) FORMA DE HEBRA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEQ ID NO: 4

ES 2 281 905 T3

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

40 (2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 5

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 2529 pares de bases

45 (B) TIPO: nucleótido

(C) FORMA DE HEBRA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

50 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA genómico

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEQ ID NO: 5

55

60

65

ES 2 281 905 T3

GATCTCCAGG ACAGCCATGG CTATTACACA GAGAAACCCT GTCTGGAAAA ACAAAAATT 60
 AGTGTCCATG TGTAAATGTG TGGAGTATGC TTGTCATGCC ACATACAGAG GTAGAGGGCA 120
 5 GTTTATGGGA GTCAGTTCCT ATTCTTCCTT TATGGGGGAC CTGGGGACTG AACTCAGGTC 180
 ATCAGGCTTG GCAGAAAGTG CATTAGCTCA CGGAGCCTTA TCATTGGCGA AAGCTCTCTC 240
 10 AAGTAGAAAA TCAATGTGTT TGCTCATAGT GCAATCATT TGTTCGAGA GGGGAAGGGT 300
 ACAATCGTTG GGGCATGTGT GGTACATCT GAATAGCAGT AGCTCCCTAG GAGAATTCCA 360
 15 AGTTCTTTGG TGGTGTATCA ATGCCCTTAA AGGGGTCAAC AACTTTTTTT CCCTCTGACA 420
 AAATATCTT CTTATGTCCT TGTCCCTCAT ATTTGAAGTA TTTTATTCTT TGCAGTGTG 480
 AATATCAATT CTAGCACCTC AGACATGTTA GGTAAGTACC CTACAACTCA GGTAACTAA 540
 20 TTTAATTTAA CTAATTTAAC CCCAACACTT TTTCTTTGTT TATCCACATT TGTGGAGTGT 600
 GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGC 660
 25 CGCGCGCGCT CGGATCATTC TACCTTTTGT TAAAAAATG TTAGTCCAGG GGTGGGGTGC 720
 ACTGTGAAAG TCTGAGGGTA ACTTGCTGGG GTCAGTTCTT TCCACTATAG GACAGAACTC 780
 30 CAGGTGTCAA CTCTTTACTG ACAGAACCAT CCAAATAGCC CTATCTAATT TTAGTTTTTT 840
 ATTTATTTAT TTTTGTGTTT TCGAGACAGG GTTCTCTGT GGCTTTGGAG GCTGTCCTGG 900
 AACTAGCTCT TGTAGACCAG GCTGGTCTCG AACTCAGAGA TCCACCTGCC TCTGCCTCCT 960
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

ES 2 281 905 T3

```

GAGTGCTGGG ATTAAAGGCA TGCGCCACCA ACGCTTGGCT CTACCTAATT TTAAAGAGA 1020
TTGTGTGTCA CAAGGGTGTG ATGTCGCCCT GCAACCACCC CCCCCC AAAA 1080
AAAACTTCA CTGAAGCTGA AGCACGATGA TTTGGTTACT CTGGCTGGCC AATGAGCTCT 1140
AGGGAGTCTC CTGTCAAACA GAATCTCAAC AGGCGCAGCA GTCTTTT TTA AAGTGGGGTT 1200
ACAACACAGG TTTTGCATA TCAGGCATTT TATCTAAGCT ATTTCCCAGC CAAAATGTG 1260
TATTTTGGAG GCAGCAGAGC TAATAGATTA AAATGAGGGA AGAGCCCACA CAGGTTATTA 1320
GGAAGATAAG CATCTTCTTT ATATAAACA AAACCAAACC AAATGGAGG AGGTCTACCT 1380
TTAGGGATGG AAGAAAAGAC ATTTAGAGGG TGCAATAGAA AGGGCACTGA GTTTGTGAGG 1440
TGGAGGACTG GGAGAGGGCG CAACCGCTTT AACTGTCCTG TTTTGCCTAT TTTTGGGGA 1500
CAGCACATGT TCCTATTTTT CCCAGGATGG GCAATCTCCA CGTCCAAACT TCGGGTCGAG 1560
GACTACAGTC ATTTTGCAGG TTTCTTACT GTATGGCTTT TAAAACGTGC AAAGGTGACC 1620
ATTAACCGTT TCACGCTGGG AGGGCACGTG CGGCTCAGAT GCTTCCTCTG ACTGAGGGCC 1680
AGGAGGGGGC TACACGGAAG AGGCCACACC CGCACTTGGG AAGACTCGAT TTGGGCTTCA 1740
GCTGGCTGAG ACGCCCCAGC AGGCTCCTCG GCTACACCTT CAGCCCCGAA TGCCTTCCGG 1800
CCCATAACCC TTCCCTTCTA GGCATTTCCG GCGAGGACCC ACCCTCGCGC CAAACATTCG 1860
GCCCCATCCC CCGGTCCTCA CCTGAATCTC TAACTCTGGA CTCCAGAGTT TAGAGACTAT 1920
AACCAGATAG CCCGGATGTG TGGAACTGCA TCTTGGGACG AGTAGTTTTA GCAAAAAGAA 1980
AGCGACGAAA AACTACAATT CCCAGACAGA CTTGTGTTAC CTCTCTTCTC ATGCTAAACA 2040
AGCCCCCTTT AAAGGAAAGC CCCTCTTAGT CGCATCGACT GTGTAAGAAA GGCGTTTGAA 2100
ACATTTTAAT GTTGGGCACA CCGTTTCGAG GACCGAAATG AGAAAGAGCA TAGGGAAACG 2160
GAGCGCCCGA GCTAGTCTGG CACTGCGTTA GACAGCCGCG GTCGTTGCAG CGGGCAGGCA 2220
CTTGCGTGGA CGCCAAGGGG CGGGTCTTTC GGCCGGGAAG CCCCCTTGGT CCGCGCGGCT 2280
CTTCCTTTCC GATCCGCCAT CCGTGGTGAG TGTGTGCTGC GGGCTGCCGC TCCGGCTTGG 2340
GGCTTCCCGC GTCGCTCTCA CCCTGGTCGG CGGCTCTAAT CCGTCTCTTT TCGAATGTAG 2400
GTGGAACCGC CGCCAAGATG CAGATTTTCG TGAAGACCCT TACGGGGAAA ACGATCACGC 2460
TCGAGGTACG AACCAGGTGG CGTGAGAAGC GAAGGCCTGC CAGAGGCCCT CTATGCTCGC 2520
TTAAAGCTT 2529

```

(2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 6

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 117 pares de bases

(B) TIPO: nucleótido

(C) FORMA DE HEBRA: doble

ES 2 281 905 T3

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA genómico

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEQ ID NO: 6

AGGACCGAAA TGAGAAAGAG CATAGGGAAA CGGAGCGCCC GAGCTAGTCT GGCAGTGCCT 60
 TAGACAGCCG CGGTCGTTGC AGCGGGCAGG CACTTGCGTG GACGCCAAGG GGCGGGT 117

(2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 7

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 21 pares de bases

(B) TIPO: nucleótido

(C) FORMA DE HEBRA: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ácidos nucleicos diversos

(A) DESCRIPCIÓN: /desc. = "primer"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEQ ID NO: 7

GTGGTGTAGG ACTTCTTCTT C 21

(2) DATOS DE LA SEQ ID NO: 8

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: nucleótido

(C) FORMA DE HEBRA: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ácidos nucleicos diversos

(A) DESCRIPCIÓN: /desc. = "primer"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEQ ID NO: 8

CTCGAGCGTG ATCGTTTTCC 20