



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 292 251**

(51) Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **99940710 .9**

(86) Fecha de presentación : **16.08.1999**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1104490**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **06.06.2001**

(54) Título: **Procedimiento de detección de una secuencia de ADN, procedimiento de preparación de una construcción de ADN y uso de los mismos.**

(30) Prioridad: **14.08.1998 NL 1009862**
27.11.1998 NL 1010670

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2008

(73) Titular/es: **ChromaGenics B.V.**
Archimedesweg 4
2333 CN Leiden, NL

(72) Inventor/es: **Otte, Arie, Pieter**

(74) Agente: **Arias Sanz, Juan**

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

Procedimiento de detección de una secuencia de ADN, procedimiento de preparación de una construcción de ADN y uso de los mismos.

La presente descripción se refiere a un procedimiento de detección, y opcionalmente selección, de una secuencia de ADN.

No es fácil detectar una secuencia de ADN específica de la cual no se conoce la secuencia de nucleótidos. A pesar del hecho de que la manipulación genética se ha empleado durante décadas, es un problema conseguir la expresión de un gen de manera predecible en una planta, animal u otro organismo eucariota genéticamente modificado. Aunque muchos procedimientos microbiológicos de producción están meramente orientados a la máxima expresión posible, en plantas o animales el nivel exacto de expresión de un gen es de gran importancia para numerosas aplicaciones. Una expresión demasiado alta así como una expresión demasiado baja puede dar lugar a que no se consiga el resultado deseado. Además, la experiencia ha demostrado que después de la reproducción sexual la capacidad de expresión a menudo se pierde nuevamente en la siguiente generación. También es difícil controlar el momento en el tiempo y en la localización de la expresión en el organismo (especificidad de tejido).

Es el objeto de la descripción proporcionar un procedimiento del tipo mencionado en el preámbulo, que hace posible seleccionar y, si se desea, aislar una secuencia de ADN, por lo que se pueden evitar los problemas anteriormente mencionados.

Para este fin el procedimiento según el preámbulo se caracteriza porque la secuencia de ADN que se va a detectar posee una cualidad que potencia la expresión estable, comprendiendo el procedimiento las etapas de

1) clonar en un vector fragmentos de ADN con un tamaño de < 5000 pares de bases entre i) una secuencia de ADN involucrada en la inducción de la transcripción genética reprimida por la cromatina, y ii) un gen informador que comprende un promotor, que da como resultado una variedad de vectores que comprenden un fragmento, en el que la distancia entre la secuencia de ADN involucrada en la inducción de la transcripción que reprime la cromatina y el gen informador es inferior a 5000 pares de bases;

2) introducir los vectores en células hospedadoras, pudiendo el promotor ser activo en dichas células hospedadoras, pero la inducción de la transcripción de la cromatina en los vectores da como resultado la represión de la transcripción del gen informador; y

3) someter a las células hospedadoras a una selección para identificar una célula hospedadora que presente actividad del gen informador.

Esto proporciona un procedimiento fiable de detección de secuencias de ADN con una cualidad que potencia la expresión estable. Si se desea, esta secuencia se puede aislar e insertar delante de otro gen. Como en el ADN de la etapa 1, por ejemplo, se usa un ADN escindido con una enzima de restricción de un organismo eucariota, en particular una planta o un vertebrado, en el que el tamaño de los fragmentos de ADN está por debajo de los 5000 pares de bases.

Claramente, cuando surja la ocasión será posible distinguir fácilmente por una parte la secuencia que potencia la expresión ("potenciador"), que en casos extremos será capaz de neutralizar el efecto de la represión de la transcripción de la cromatina, y por otra parte el fragmento de ADN que potencia la expresión estable. En el primer caso el gen informador en un organismo se transforma con un vector que comprende el promotor junto con el gen informador pero sin que la secuencia de represión de la transcripción se exprese a un nivel más alto que en un organismo transformado con un vector que comprende un fragmento de ADN que potencia la expresión estable junto con el gen informador, y asimismo, sin la secuencia de represión de la transcripción.

Según una primera forma de realización preferida, la selección en la etapa 3) se produce usando un gen informador que proporciona resistencia a un inhibidor del crecimiento y las células hospedadoras se cultivan en presencia del inhibidor del crecimiento.

Esto inhibe el crecimiento de las células hospedadoras que, sin un gen de resistencia activo, no son resistentes al inhibidor del crecimiento, y permite la selección de aquellas células hospedadoras que poseen una secuencia de ADN que potencia la expresión estable.

Preferentemente, el inhibidor del crecimiento está presente en una concentración suficientemente elevada para matar a las células hospedadoras en las cuales no está activo el gen que proporciona resistencia al inhibidor del crecimiento.

Esto asegura en gran medida que los organismos que crecen contendrán un vector con la secuencia de ADN deseada.

De manera muy conveniente se usa un antibiótico como inhibidor del crecimiento y el gen informador es un gen que proporciona resistencia al antibiótico.

En la técnica hay disponibles un gran surtido de genes que proporcionan resistencia a antibióticos, haciendo sencillo escoger un gen adecuado para la célula hospedadora. A continuación se escoge un gen que proporciona resistencia a un inhibidor del crecimiento al cual la célula hospedadora todavía no es resistente por sí misma.

5 De acuerdo con una segunda forma de realización el gen informador codifica la proteína verde fluorescente.

Mediante la medida de la fluorescencia es posible detectar y aislar células hospedadoras con el vector que comprende el ADN deseado.

10 Según una forma de realización preferida, las células hospedadoras fluorescentes se separan de células hospedadoras no fluorescentes por medio de un clasificador de células activado por fluorescencia (FACS).

Según una tercera forma de realización el gen informador es la luciferasa. Con ayuda de la luciferasa es posible llevar a cabo la medición (semi)-cuantitativa de la expresión.

15 En la etapa 1) se prefiere que los fragmentos tengan sustancialmente un tamaño de entre 2000-3000 pares de bases.

Los fragmentos de ese tamaño permiten una localización más precisa de la secuencia que se va a detectar sin que el número de células hospedadoras que se van a seleccionar en la etapa 3) se haga tan grande que esto llegue a suponer una carga de trabajo innecesaria.

De manera conveniente, la secuencia de ADN involucrada en la inducción de la transcripción de la cromatina que reprime la transcripción es una secuencia de ADN que es reconocida por una proteína de unión a la heterocromatina que comprende la HP1 (proteína de unión a la heterocromatina 1), expresándose el complejo que comprende la HP1 en la célula hospedadora. Según un procedimiento alternativo, la secuencia de ADN es reconocida por un complejo que comprende una proteína del grupo Polcomb (Pc-G), y el complejo que comprende la proteína del grupo Polcomb se expresa en la célula hospedadora. Según otra forma de realización más, la secuencia de ADN es reconocida por un complejo que posee una actividad desacetilasa de histonas, y el complejo que posee actividad desacetilasa de histonas se expresa en la célula hospedadora. Finalmente, según una forma de realización más, la secuencia de ADN involucrada en la inducción de la transcripción genética que reprime la cromatina es una secuencia de ADN reconocida por un complejo de proteínas que comprende la MeCP2 (proteína de unión a metil-CpG 2), y el complejo que comprende la MeCP2 se expresa en la célula hospedadora.

De esta manera se proporcionan cuatro complejos adecuados que reconocen secuencias de ADN, aunque nótese que en el caso de que el complejo no se exprese en la célula hospedadora, esto no dará como resultado falsos positivos y meramente limitará la eficacia con la cual se detectan las secuencias de ADN buscadas.

De manera conveniente, el complejo de proteínas comprende una proteína de fusión, ese complejo de proteínas en el que la primera parte es una parte que se une al sitio de unión al ADN del LexA-ADN o el GAL4-ADN.

40 Los sitios de unión al ADN adecuados de este tipo son conocidos en la técnica y se obtienen de bacterias o levaduras.

El organismo de la etapa 1) preferentemente se escoge entre el grupo que comprende una planta o un vertebrado tal como, más particularmente, un mamífero.

Para estos organismos se aplica que, parcialmente debido a la gran cantidad de ADN cromosómico, es prácticamente imposible encontrar la secuencia de ADN que se va a detectar sin el procedimiento de la presente descripción, puesto que de hecho se desconoce su secuencia base.

50 Según una forma de realización adicional preferida, el vector es un vector de replicación episomal, convenientemente tal como un vector que comprende un origen de replicación del virus de Epstein-Barr (EBV), OriP, y un antígeno nuclear (EBNA1).

55 Estos vectores son fáciles de manipular, se pueden manipular genéticamente y son vectores que forman una estructura de cromatina en la que se reprime la expresión.

Una secuencia de ADN, siendo la secuencia de ADN una secuencia que inhibe la represión, que se puede detectar, seleccionar y opcionalmente clonar mediante el procedimiento según la presente descripción, se puede seleccionar de i) una secuencia de ADN aislada a partir de una planta o un vertebrado, o sus derivados, y ii) una secuencia de ADN sintética o una construcción por medio de ingeniería genética.

Las secuencias de ADN que se va a detectar según la descripción difieren de las secuencias de ADN conocidas en que no son un potenciador o un silenciador.

65 Las secuencias de ADN sintéticas se pueden preparar de acuerdo con técnicas conocidas de manera general en la técnica. En particular, es posible preparar un gran número de secuencias de ADN diferentes, y esas secuencias están disponibles comercialmente (por ejemplo en: Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). No obstante, esas secuencias de

ES 2 292 251 T3

ADN sintéticas tienen que ser adecuadas para su clonación en un plásmido. Esto se conoce de manera general en la técnica y se realiza, por ejemplo, con ADNs de unión que comprenden un sitio de escisión por restricción.

Claramente, la presente descripción también se refiere a un procedimiento de preparación de una construcción de ADN que comprende un gen que se debe expresar de manera estable, en el que una secuencia de ADN que potencia la expresión estable, seleccionada con la ayuda del procedimiento según la invención se inserta a menos de 2000 pb del gen.

Esta es una manera más estable y predecible de expresar un gen.

Preferentemente, la secuencia de ADN que potencia la expresión estable se inserta tanto aguas arriba como aguas abajo del gen.

Se cree que esto incrementa adicionalmente la probabilidad de una expresión estable del gen.

La presente descripción ahora se aclarará adicionalmente con referencia a las siguientes formas de realización ejemplares.

Ejemplo I

Para ilustrar el principio de los trabajos del procedimiento según la descripción, se usa scs, que es un fragmento de ADN de *Drosophila melanogaster* que es conocido por ser un elemento aislador de la cromatina. Como se puede observar en el ejemplo a continuación, la scs se puede usar para bloquear los siguientes represores: HP1, proteínas del grupo Polcomb y MeCP2. De la misma forma, se han probado fragmentos de ADN del fago lambda como control negativo. La scs (estructura especial de la cromatina) se aisló originalmente como una secuencia de ADN que flanquea el locus de choque térmico (hsp70) en *Drosophila* (Kellum, R. y P. Schedl. 1991, Cell 64: 941-950). Ellos encontraron que cuando la scs se sitúa alrededor de un gen informador y se reintroduce en *Drosophila*, la expresión del gen informador es menos variable. Ni informaron ni sugirieron que la scs se podía usar para prevenir la represión mediante otros represores, en particular, los represores anteriormente mencionados. Además, Kellum y col. ni informaron ni sugirieron que la scs se podría usar en sistemas distintos a *Drosophila* para hacer la expresión transgénica menos variable.

Para probar las propiedades de eliminación de la represión de una secuencia de ADN, se construyen dos tipos de vectores.

El primer tipo de vector comprende en la secuencia 5'-3': cuatro sitios de unión a LexA, la secuencia scs a probar, el promotor inducible del factor de choque térmico humano, y el gen de la luciferasa como gen informador. Como control se prepara un vector similar que en lugar de la secuencia scs conocida comprende un fragmento aleatorio (del fago lambda) de una longitud comparable (ambos descritos en el punto 1 a continuación).

Para conseguir la represión del gen informador en la célula transformada, el segundo tipo de vector comprende un gen que codifica una proteína de fusión de LexA y los represores anteriormente mencionados. Un vector de este segundo tipo comprende el gen que codifica solamente para LexA, o un vector que comprende el gen que codifica LexA-HP1, etc. (descrito en el punto 2 a continuación).

1 Un vector que codifica EBNA-1 (un antígeno nuclear) es el gen de resistencia a la higromicina que comprende el vector pREP4 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, EE.UU.). La secuencia EBNA-1 está presente para asegurar que el vector no se integre (de manera estable) en el genoma, pero que se replique episomalmente. El promotor (Prsv) de este vector se ha eliminado por digestión con la encima de restricción SalI y se ha sustituido por una secuencia sintetizada con cuatro sitios de unión para LexA de *E. coli*. Esta secuencia es de 5'-3': **GTCGACTGCTGTATATAAAAC-CAGTGGTTATATGTACAGTACTTGTACTGTACATATAACCACTGGTTTTATATACAGCAAGCTTGGATCCGTCGA.**

El extremo 5' de esta secuencia comprende un sitio SalI, y el extremo 3' un sitio HindIII-BamHI-SalI (todos en negrita). Aguas abajo de los sitios de unión a LexA en los sitios HindIII y BamHI, el promotor inducible del factor de choque térmico humano (fragmento HindIII/NcoI de 0,29 kpb) y el gen informador de la luciferasa que incluye la señal de poliadenilación de SV40 (fragmento HindIII/NcoI de 1,9 kpb) están clonados en una ligación de tres formas. El promotor inducible del factor de choque térmico humano (hsp70; números de registro M59828 y M34267; nucleótidos 52 a 244) se puede obtener por medio de amplificación por PCR de ADN genómico humano (Nº de cat. 6550-1; Clontech, Palo Alto, EE.UU.). Como cebadores de la PCR, se pueden considerar el cebador sentido 5'-3': **AAGCTTGGGAGTCGAAACTTCTGGAATATTTCCCGAACTTTTCAGCCGACGACTTATAAACGCCAGGGGCAAGC.**

y como cebador antisentido 5'-3': **CCATGGTTTAGCTTCCTTAGCTCCTGAAAATCGCCAAGCTCCCGGGTCCGCGAGAAGAGCTCGGTCCTTCCGG.**

El cebador sentido comprende un sitio HindIII, el cebador antisentido comprende un sitio NcoI (en negrita). El gen informador de la luciferasa que incluye señales de poliadenilación de SV40 se obtuvo por digestión con NcoI/BamHI del vector control pGL3 (Nº de cat. E1741, Promega, Madison, EE.UU.). En el vector obtenido de esta manera, en el

sitio HindIII entre los sitios de unión a LexA y el promotor de choque térmico, se clona un fragmento HindIII de 2,1 kpb del fago lambda (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) o un fragmento HindIII de la scs de 1,7 kpb. El fragmento de ADN de la scs de 1,7 kpb se aísla de ADN genómico de *Drosophila* (Nº de cat. 6940-1, Clontech, Palo Alto, EE.UU.) con la ayuda de los cebadores de PCR (cebador sentido 5'-3': **GATCAAGCTTATGATCTGCGTATGATACCAAATTTCTG**; cebador antisentido 5'-3': **GACAAGCTTACATTGCTGGGCGAGCTGCGCCAATCG**). En los extremos de estos cebadores están localizados los sitios de la enzima de restricción HindIII. El vector con el fragmento Lambda (control) está indicado como construcción informadora a, y el vector con el fragmento scs como construcción informadora b. Las digestiones con la enzima de restricción, las amplificaciones por PCR y las clonaciones se llevan a cabo mediante procedimientos clásicos como se describe en Sambrook y col., Molecular Cloning; A laboratory manual, 2ª edición.

2 El dominio de unión a ADN de la proteína LexA (aa 1-202) (Nº de cat. 6183-1, Clontech, Palo Alto, EE.UU.) se clona en el sitio HindIII del vector pREP9 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, EE.UU.) que comprende el gen de resistencia a la neomicina. Aguas abajo y en el marco de lectura con el gen de LexA, se clona un gen por vector que codifica un represor. Los represores usados son: la parte larga codificante de 1674 pb del gen del grupo Polcomb humano HPC2 (número de registro del Genbank: AAB80718), la parte larga codificante de 1131 pb del gen del grupo Polcomb humano RING1 (número de registro del Genbank: Z14000), la parte larga codificante de 4098 pb del gen del grupo Polcomb de *Drosophila* SU(z)2 (número de registro del Genbank: CAA41965), la parte codificante de 558 pb de M31 (mHP1) (número de registro del Genbank: P23197), o la parte codificante de 1478 pb de MeCP2 (número de registro del Genbank: A41907). Estas construcciones codifican para las proteínas de fusión LexA-HPC2, LexA-RING1, LexA-SU(z)2, LexA-mHP1 y LexA-MeCP2, o los represores de LexA. Éstos se unen a los sitios de unión de LexA (véase el punto 1).

3 Los vectores informadores a y b y los vectores que codifican el represor LexA se expresan en células OS (osteosarcoma) U-2 humanas obtenidas del ATTC (número de registro HTB-96). La transfección de las células con las construcciones de ADN se lleva a cabo usando el procedimiento del fosfato de calcio de acuerdo con las instrucciones del fabricante del kit de transfección (Nº de cat. 18306-019, Gibco BRL, Gaithersburg, EE.UU.). Las células de osteosarcoma crecen en presencia de 100 µg/ml de neomicina (G418: Nº de cat. 1464981; Boehringer/Roche, Suiza). Tres días después de la transfección se aplica un choque térmico (43°C durante 1 hora, seguido de un periodo de recuperación de 6 horas a 37°C). Este tratamiento activa el gen de la luciferasa y provoca la producción de la proteína informadora luciferasa. La actividad enzimática de esta proteína luciferasa es una medida de la inducción de la transcripción que se ha inducido. Las células se purifican y se mide la actividad de la enzima luciferasa, todo de acuerdo con las instrucciones del fabricante para el kit de ensayo del gen informador luciferasa normal (Nº de cat. 1814036; Boehringer/Roche, Suiza).

Resultados

4 En células en las que se expresa la construcción informadora a (con el fragmento Lambda), pero no los represores de LexA, el gen de la luciferasa se expresa después del choque térmico. Este es el valor del 100%.

5 En células en las que se expresa la construcción informadora b (con el fragmento scs), pero no los represores de LexA, el gen de la luciferasa se expresa después del choque térmico hasta un valor del 100%. Puesto que este valor no excede el 100% demuestra, como se ha explicado anteriormente, que no es una secuencia que incrementa la expresión.

6 En células en las que se expresa la construcción informadora a (con el fragmento Lambda), y también se expresan los represores de LexA, la expresión del gen de la luciferasa después del choque térmico se reprime hasta una media del 20%.

7 En células en las que se expresa la construcción informadora b (con el fragmento scs), y al mismo tiempo los represores de LexA, la expresión del gen de la luciferasa después del choque térmico alcanza un valor del 100%. Esto demuestra que la inducción de la actividad del represor se puede reprimir con la scs.

Ejemplo II

En lugar de la luciferasa como gen informador, según la presente descripción también es posible usar otro gen informador. Además es posible usar otros promotores.

8 En las construcciones informadoras a y b el gen informador de la luciferasa se ha sustituido por el gen de resistencia a zeocina. El promotor de choque térmico se ha sustituido por el promotor constitutivo de SV40 (pSV40/CEO; Nº de cat. V502-20; Invitrogen, Carlsbad, EE.UU.). Después de la transfección las células de OS U-2 se crecen en 250 µg/ml de zeocina (Nº de cat. R250-01; Invitrogen, Carlsbad, EE.UU.) y 100 µg/ml de neomicina (G418: Nº de cat. 1464981; Boehringer/Roche, Suiza).

9 Las células que se han transfectado con la construcción de selección que comprende un fragmento Lambda de 2,1 kpb y también con una construcción que expresa un represor de LexA, mueren después de 20-30 días. Esto demuestra que el fragmento Lambda no es capaz de compensar la represión del gen con el cual se consigue la resistencia a antibióticos.

ES 2 292 251 T3

10 Las células que se transfectan con la construcción de selección que comprenden el fragmento scs y también con una construcción que expresa un represor de LexA, no mueren sino que siguen creciendo. Esto también demuestra que con el elemento aislador de la scs la represión se puede compensar y que el procedimiento según la presente descripción se puede emplear usando una variedad de promotores y genes informadores.

Ejemplo III

Las secuencias encontradas y seleccionadas mediante el procedimiento según la descripción se pueden usar para combatir la represión en un organismo distinto del cual procede la secuencia.

11 Se preparan dos nuevas construcciones, c y d, denominadas construcciones de ADN-T, que son adecuadas para la transformación de plantas.

12 La construcción c comprende un casete con el gen NPTII (neomicin fosfotransferasa II) para la selección por resistencia con kanamicina y el gen informador GUS (β -glucuronidasa). El gen NPTII está regulado por el promotor constitutivo de la nos y el gen informador GUS por el promotor constitutivo de CaMV 35S (Mlynarova, L. y col., 1995. The Plant Cell 7: 599-609).

13 La construcción d es la construcción c en la que se clona un fragmento de scs inmediatamente aguas arriba del casete GUS-CaMV/nos-NPTII y un fragmento de scs inmediatamente aguas abajo del casete.

14 *Agrobacterium tumefaciens* se transforma con la construcción c o d. Plantas de *Arabidopsis* se suspenden en una suspensión (cultivo) de *Agrobacterium tumefaciens* con la construcción c y en una suspensión de *Agrobacterium tumefaciens* con la construcción d (Clough y col., 1998. The Plant J. 16: 735-743).

15 40 plantas individuales de *Arabidopsis* con la construcción c o d se crecen y se recogen las semillas de las plantas. Las semillas se siembran en un medio que contiene kanamicina (Nº de cat. 106801; Boehringer/Roche, Suiza) y la actividad del gen informador GUS se mide en las hojas de las plantas desarrolladas.

16 La actividad GUS en plantas con la construcción c es muy variable (7 elevada; 6 intermedia; 11 baja; 16 cero); la actividad GUS en plantas con la construcción d es sistemáticamente superior y se reduce la variabilidad (26 elevada; 4 intermedia; 5 baja; 5 cero).

17 Esto demuestra que un gen se puede expresar de manera más estable con un elemento aislador de la cromatina, incluso si este elemento aislador de la cromatina no procede del mismo organismo.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de detección, y opcionalmente selección, de una secuencia de ADN, en la que la secuencia de ADN que se va a detectar posee una cualidad que potencia la expresión estable, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

1) clonar en un vector fragmentos de ADN con un tamaño de < 5000 pares de bases en una localización entre i) una secuencia de ADN reconocida por un complejo de proteínas represoras, estando el complejo de proteínas represoras involucrado en la inducción de la cromatina que reprime la transcripción genética, y ii) un gen informador que comprende un promotor, que da como resultado una variedad de vectores que comprenden un fragmento, en el que la distancia entre la secuencia de ADN reconocida por un complejo de proteínas represoras y el gen informador es inferior a 5000 pares de bases;

2) introducir los vectores en células hospedadoras, y en los que el complejo de proteínas represoras se expresa en las células hospedadoras, y pudiendo ser activo el promotor en dichas células hospedadoras, pero la inducción de la cromatina que reprime la transcripción genética en los vectores da como resultado la represión de la transcripción del gen informador; y

3) someter a las células hospedadoras a una etapa de selección para identificar una célula hospedadora que presente actividad del gen informador.

2. Un procedimiento según la reivindicación 1, que comprende adicionalmente la etapa de: 4) aislar la secuencia de ADN con una calidad potenciadora de la expresión estable.

3. Un procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque la etapa de selección en 3) ocurre usando un gen informador que proporciona resistencia a un inhibidor del crecimiento y las células hospedadoras se cultivan en presencia del inhibidor del crecimiento.

4. Un procedimiento según la reivindicación 3, **caracterizado** porque el inhibidor del crecimiento está presente en una concentración suficientemente elevada para matar las células hospedadoras en las que no está activo el gen que proporciona resistencia al inhibidor del crecimiento.

5. Un procedimiento según la reivindicación 3 ó 4, **caracterizado** porque se usa un antibiótico como inhibidor del crecimiento y el gen informador es un gen que proporciona resistencia al antibiótico.

6. Un procedimiento según la reivindicación 5, en el que el antibiótico es zeocina.

7. Un procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el gen informador codifica la proteína verde fluorescente.

8. Un procedimiento según la reivindicación 7, **caracterizado** porque las células hospedadoras fluorescentes se separan de células hospedadoras no fluorescentes por medio de un clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS).

9. Un procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el gen informador es el de la luciferasa.

10. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque los fragmentos tienen un tamaño de entre 2000-3000 pares de bases.

11. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque el complejo de proteínas represoras comprende la proteína de unión a heterocromatina 1 (HP1).

12. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, **caracterizado** porque el complejo de proteínas represoras comprende una proteína del grupo Polycomb (Pc-G).

13. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, **caracterizado** porque el complejo de proteínas represoras posee actividad desacetilasa de histonas.

14. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, **caracterizado** porque el complejo de proteínas represoras comprende la proteína de unión a metil-CpG 2 (MeCP2).

15. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque la secuencia de ADN reconocida por un complejo de proteínas represoras es una secuencia de ADN que es reconocida de manera selectiva por al menos una proteína de unión a ADN y la célula hospedadora también expresa un complejo de proteínas que comprende i) una primera parte que une selectivamente la secuencia de ADN que es reconocida de manera selectiva, y ii) una segunda parte que induce la formación de cromatina en la que se reprime la transcripción.

ES 2 292 251 T3

16. Un procedimiento según la reivindicación 15, **caracterizado** porque el complejo de proteínas represoras comprende una proteína de fusión.

5 17. Un procedimiento según la reivindicación 16, **caracterizado** porque la primera parte es la parte de unión al sitio de unión al ADN del LexA-ADN o el GAL4-ADN.

18. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque los fragmentos de ADN de la etapa 1) se aíslan de una planta o de un vertebrado.

10 19. Un procedimiento según la reivindicación 17, **caracterizado** porque el vertebrado es un mamífero.

20. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque el vector es un vector de replicación episomal.

15 21. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque el vector comprende un origen de replicación del virus de Epstein-Barr (EBV), OriP, y un antígeno nuclear (EBNA1).

20 22. Un procedimiento para la preparación de una construcción de ADN que comprende un gen que se debe expresar de manera estable, dicho procedimiento que comprende el procedimiento según la reivindicación 2, y que comprende adicionalmente la etapa de: 5) la inserción de la secuencia de ADN aislada con una calidad potenciadora de la expresión estable a menos de 2000 pb del gen.

25 23. Un procedimiento según la reivindicación 22, **caracterizado** porque la secuencia de ADN aislada con una calidad potenciadora de la expresión estable se inserta tanto aguas arriba como aguas abajo del gen.

30

35

40

45

50

55

60

65