



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 354 160**

51 Int. Cl.:
C12N 15/63 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04791263 .9**

96 Fecha de presentación : **20.10.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1675956**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.07.2006**

54 Título: **Secuencia de ADN mínima que actúa como un aislante de cromatina, y su uso en la expresión de proteínas.**

30 Prioridad: **21.10.2003 EP 03103890**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.03.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.03.2011

73 Titular/es: **MERCK SERONO S.A.**
Centre Industriel
1267 Coinsins, Vaud, CH

72 Inventor/es: **Imhof, Markus y**
Chatellard, Philippe

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 354 160 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Campo de la invención

5 La invención se refiere al uso de vectores de expresión que comprenden una secuencia de ADN de 146 pb capaz de actuar como aislante de la cromatina, a células huésped CHO que contienen tales vectores y a un método de producción de un polipéptido deseado en células CHO usando vectores que contienen dicha secuencia.

Antecedentes de la invención

10 La introducción de genes en células de mamíferos por transfección conduce a su integración estable en el genoma de las células huésped. Normalmente, este evento de integración es raro (<0,01%) y ocurre de una manera aleatoria con respecto al locus de integración. La expresión del transgén integrado depende del entorno local. Esto significa que potenciadores o silenciadores cercanos pueden afectar a la expresión, y los genes pueden llegar a ser inactivados por extensión de heterocromatina (efecto de la posición de la cromatina, CPE por sus siglas en inglés, también llamado silenciamiento).

15 Durante los últimos años, estudios que empezaron en *Drosophila* y ahora se extienden a vertebrados, han identificado elementos de secuencias de ADN llamados aislantes que parecen funcionar como "barrera", impidiendo el CPE, y/o como "bloqueante de potenciadores", teniendo la capacidad de proteger a un promotor frente a la acción de un potenciador distal sin impedir que el potenciador funcione sobre un promotor proximal. Por tanto, los aislantes son elementos de secuencias de ADN que protegen regiones transcritas de secuencias regulatorias no relacionadas distantes.

20 Las primeras secuencias de ADN descritas por tener las propiedades de un aislante fueron elementos scs (estructuras de cromosoma especializadas) de *Drosophila*. Chung y Felsenfeld describieron un elemento, 5'HS4 (Sitio Hipersensible a Dnasa I), que actúa como aislante contenido dentro de un fragmento de ADN de 1,2 kb derivado del extremo 5' del locus de la B-globina de pollo (Chung et al., 1993, patente de EE.UU. 5610053). Se demostró que gran parte de la actividad del aislante estaba contenida en un fragmento de 250 pb, la región "central", que está incluido en la secuencia del 5'HS4 (Chung et al., 1997). El ADN de la región central se diseccionó adicionalmente en cinco regiones marcadas con huella (FI-FV) y se demostró que era rico en GC con las propiedades de una "isla CpG", pero no pareció funcionar como un promotor. Los experimentos demostraron que sólo era necesaria una región, FI, para la propiedad de bloqueo del potenciador, y la purificación de sus proteínas de unión reveló que la unión de CTCF (factor de unión a CCCTC) era la responsable de su actividad (Bell et al., 1999).

35 En otro estudio, la utilidad del elemento aislante de beta globina de 1,2 kb completo en la protección de mensajeros frente al CPE ha sido demostrada en ensayos in vivo que incluyeron ratones transgénicos (Ciana et al., 2001). En líneas celulares CHO, Izumi y Gilbert demostraron que la presencia de secuencias aislantes de la cromatina mejoró moderadamente la estabilidad pero no fue suficiente para producir transformantes homogéneos (Izumi y Gilbert, 1999).

40 En una publicación reciente (Recillas-Targa et al., 2002) se revisó la actividad funcional de un elemento aislante de 1,2 kb del gen de la beta-globina de pollo. Además de funcionar como una barrera eficaz frente a la actividad de potenciadores o silenciadores cercanos, se demostró que el elemento central de 250 pb era suficiente para conferir protección contra el silenciamiento de genes causado por el CPE y proporcionar una expresión estable a largo plazo. Dos copias de fragmentos más pequeños de la secuencia central de 250 pb desprovistas esencialmente de la región huella II, en cada lado del gen mensajero, fueron suficientes para conferir protección frente al CPE, pero no bloqueo de potenciadores, en células 6C2 pre-eritroides de pollo.

45 Dado que los tamaños de los vectores preferiblemente no deben exceder de 10 kb, hay una necesidad de reducir el tamaño de los elementos regulatorios presentes en estos vectores. Por ejemplo, la estabilidad de los vectores aumenta según se reduce el tamaño de su ADN. Vectores más pequeños pueden albergar segmentos más grandes de insertos. Además, los elementos pequeños simplifican la modificación de los vectores de expresión y permiten construcciones donde la longitud total del inserto debe ser limitada.

50 Es por tanto un objeto de esta invención proporcionar el uso de un elemento de ADN corto que tiene actividad aislante cuando se usa en vectores para la expresión de un gen de interés en células CHO.

Compendio de la invención

55 La presente invención se basa en el descubrimiento de que un elemento de ADN corto de 146 pb, que tiene la secuencia de SEQ ID No: 1, es capaz de actuar como aislante de la cromatina. En lo que sigue, el aislante se llama "el aislante". El número de clones transfectados que expresaron el gen de interés se elevó cuando los constructos usados incluyeron el aislante. Se demostró que la producción del polipéptido de interés era más alta en clones expresantes que contenían el aislante de la invención y se demostró que la expresión a largo plazo era estable.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere al uso de un vector que comprende uno o más aislantes de la cromatina que consisten en la SEQ ID NO:1 para la expresión de un gen de interés en una célula CHO.

5 Un segundo aspecto de la invención se refiere a una célula huésped CHO que comprende un vector acorde con la invención.

Un tercer aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para la producción de un polipéptido de interés que comprende la etapa de transfectar una célula huésped CHO con un vector acorde con la invención.

10 Se describe el uso de un vector de la invención para la fabricación de un medicamento para uso en terapia basada en plásmidos o ADN o terapia génica.

Breve descripción de los dibujos

Fig. 1 muestra un alineamiento del aislante de la SEQ ID NO:1 (A) con la región aislante central de 250 pb de la técnica anterior (B) de la región aislante 5'HS4 de la beta-globina de pollo.

15 Fig. 2 muestra dos constructos mensajeros bidireccionales para la expresión de IL18BP. A: El gen IL18BP se muestra como una línea en negrita y los promotores mCMV-IE1 y mCMV-IE2 se indican como flechas. El triángulo representa el intrón A de la región IE de hCMV y el óvalo representa la señal de poliadenilación. El aislante (círculo relleno), designado como INS, flanquea como repetición en tándem cada extremo de la caja de expresión. B: mismo constructo desprovisto de secuencias aislantes.

20 Fig. 3 muestra la unidad de expresión para la Luciferasa. A: El gen de la luciferasa se muestra como una línea en negrita y el promotor CMV humano (hCMVp) está indicado como una flecha. La forma oval representa la señal de poliadenilación. El aislante (círculo relleno), designado como INS, flanquea como repetición en tándem cada extremo de la caja de expresión. B: mismo constructo desprovisto de secuencias aislantes.

25 Fig. 4 muestra la expresión de luciferasa medida como ULR (unidades de luz relativas) en grupos estables de células CHO-S transfectadas en SFM a los 3 meses después de la transfección con constructos aislados con aislante (l.hCMV Luc.I, Fig. 3A) o no aislados (hCMV Luc, Fig. 3B) en presencia o ausencia de puromicina (puro). 96 clones individuales escogidos al azar para cada una de las cuatro condiciones fueron clasificados y representados gráficamente por niveles crecientes de expresión de luciferasa (cada incremento en el eje X representa un clon).

30 Fig. 5 muestra la expresión de luciferasa medida como ULR (unidades de luz relativas) en células CHO-S transfectadas de manera transiente con los constructos plns(2)-SV-Luc, plns(2)revSV-Luc, pSV-Luc, pGL3-ctrl, o transfectadas como control ("mock").

Descripción detallada de la invención

35 La presente invención se basa en el descubrimiento de que un elemento de ADN corto de 146 pb, que tiene la secuencia de SEQ ID No: 1, es capaz de actuar eficazmente como aislante de la cromatina cuando se duplica e inserta corriente arriba y corriente abajo de una unidad de expresión. La presencia del aislante en vectores de transfección aumentó significativamente el número de clones que expresaban un gen marcador. Además, los grupos que comprenden la caja de expresión aislada tenían una productividad significativamente elevada en comparación con el grupo de control. Además de eso, la posibilidad de obtener clones expresantes estables a largo plazo también aumentó en presencia del aislante.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere al uso de un vector que comprende uno o más aislantes de la cromatina que consisten en la SEQ ID NO:1 para la expresión de un gen de interés en una célula CHO.

45 El término "vector" se refiere a cualquier portador de ADN exógeno o ARN que sea útil para transferir ADN exógeno a una célula huésped para la replicación y/o expresión apropiada del ADN exógeno por la célula huésped, tal como, p.ej. plásmidos, vectores de expresión, vectores virales, etc.

Preferiblemente, el vector comprende además un elemento de ADN seleccionado de:

- 50
- a. un potenciador, o un fragmento potenciador de la expresión funcional del mismo;
 - b. un dominio promotor o un fragmento promotor de la expresión funcional del mismo;
 - c. una secuencia de ADN que codifica uno o más polipéptidos de interés.

55 Una "región potenciadora" se refiere a una región de ADN cuya función es aumentar o incrementar la transcripción de uno o más genes. Los potenciadores pueden funcionar normalmente en cualquier orientación y a diversas distancias del gen, o incluso dentro del gen. La persona experta en la técnica apreciará además que los términos "promotor" (véase más adelante) y "potenciador" no están definidos de manera exacta, y que por tanto el promotor puede comprender regiones potenciadoras, o

regiones del potenciador pueden comprender regiones promotoras, dependiendo de la nomenclatura y el contexto.

5 El término "promotor", como se emplea en la presente memoria, se refiere a una región de ADN que tiene como función controlar la transcripción de una o más secuencias de ADN, y que está identificada estructuralmente por la presencia de un sitio de unión para ARN-polimerasa dependiente de ADN y de otras secuencias de ADN, que interactúan para regular la función del promotor. Como se mencionó anteriormente, una región del potenciador puede comprender todo o parte de un promotor también.

10 Un "fragmento promotor de la expresión funcional", como se emplea en la presente memoria, de un promotor o un potenciador es una secuencia de un promotor o potenciador acortada o truncada que retiene la actividad como promotor o potenciador. La actividad del promotor o potenciador se puede medir en cualquiera de los ensayos conocidos en la técnica, p.ej. en un ensayo de mensajeros usando Luciferasa como gen mensajero (de Wet et al., 1985; Wood et al., 1984), o disponible en el mercado en Promega®.

15 En una realización preferida, el vector comprende elementos adicionales que regulan o influyen en la transcripción o traslación. Tales elementos pueden afectar al propio proceso de transcripción, el procesamiento, la estabilidad o la eficacia de traslación del ARN. Los ejemplos de elementos adecuados se seleccionan p.ej. del grupo que consiste en 5'UTRs, intrones, 3'UTRs (Mazumder et al., 2003), secuencias procesadoras del extremo 3' de ARNm, p.ej. sitios de poliadenilación, y secuencias de IRES para expresión policistrónica (Mountford y Smith, 2003).

20

Se prefiere usar un elemento IRES para la expresión de ARNms policistrónicos, en los que las secuencias codificantes están separadas por el IRES. La ventaja es que se pueden expresar varios péptidos de interés a partir del mismo ARNm y por tanto a partir del mismo promotor.

25 En una realización preferida adicional, el vector comprende además secuencias promotoras de la expresión tales como elementos frontera, LCRs (p.ej. descritos por Blackwood y Kadonaga, 1998) o regiones de unión matriz/andamio (p.ej. descritas por Li et al., 1999) y elementos para recombinación e intercambio de cajas.

30 En aún una realización preferida adicional, el promotor comprendido en el vector de la presente invención puede ser de cualquier origen celular o viral/fago, tales como SV40, hCMV, mCMV-IE1, mCMV-IE2, RSV, T7, T3, o un fragmento promotor de la expresión funcional de los mismos.

35 Se pueden expresar muchos polipéptidos de interés usando un vector de la invención. El polipéptido de interés puede ser cualquier polipéptido para el cual se desea la producción. Por ejemplo, el polipéptido de interés puede ser, p.ej., una proteína secretada de manera natural, una proteína normalmente citoplasmática, una proteína normalmente transmembranal, o un anticuerpo humano o humanizado. Cuando la proteína de interés es una proteína normalmente citoplasmática o normalmente transmembranal, la proteína ha sido preferiblemente manipulada por ingeniería con el fin de hacerla soluble. El polipéptido de interés puede ser de cualquier origen. Los polipéptidos de interés preferidos son de origen humano.

40 En realizaciones preferidas, el polipéptido se selecciona del grupo que consiste en gonadotropina coriónica (CG), hormona estimulante del folículo (FSH), hormona lutropina-coriogonadotrópica (LH), hormona estimulante del tiroides (TSH), hormona del crecimiento (GH), receptores del interferón (p.ej., IFNAR1, receptor del interferón gamma), receptores de TNF p55 (proteína de unión al TNF I, TBP I) y p75 (proteína de unión al TNF II, TBP II), interleucinas (p.ej., IL-6), proteínas de unión a interleucinas (p.ej., IL-18BP), factor inhibitorio de la leucemia (LIF), anticuerpos anti-CD11a, o muteínas, fragmentos, formas solubles, derivados funcionales, proteínas de fusión de los mismos.

45

50 El "interferón" o interferones son una subclase de citocinas que exhiben actividad antiinflamatoria, antiviral y antiproliferativa. En base a las propiedades bioquímicas e inmunológicas, los interferones humanos naturales se agrupan en tres clases: interferón alfa (leucocito), interferón beta (fibroblasto) e interferón gamma (inmune). El interferón alfa está aprobado actualmente en los Estados Unidos y otros países para el tratamiento de leucemia de células pilosas, verrugas venéreas, Sarcoma de Kaposi (un cáncer que afecta normalmente a pacientes que sufren del Síndrome de Inmuno Deficiencia Adquirida (SIDA)), y hepatitis crónica no A, no B.

55 El interferón gamma es una proteína dimérica con subunidades de 146 aminoácidos. Tiene actividades antivirales y antiparasíticas y también inhibe la proliferación de varias células normales y transformadas.

En particular, el interferón de fibroblasto humano (IFN- β) tiene actividad antiviral y puede estimular también a los linfocitos citotóxicos naturales contra las células neoplásicas. Es un polipéptido de 166 aminoácidos de largo y aproximadamente 20 kDa. Rebif® (Interferón β humano recombinante) es el desarrollo más reciente en la terapia con interferón para la esclerosis múltiple (EM), y representa un

avance significativo en el tratamiento. Rebi® es interferón (IFN)-beta 1a, producido a partir de líneas celulares de mamíferos y virtualmente idéntico a la molécula humana natural.

5 En una realización preferida adicional, otros polipéptidos de interés incluyen, p.ej., eritropoyetina (EPO), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), hormonas peptídicas pituitarias, gonadotropina menopáusica, factores de crecimiento similares a insulina (p.ej., somatomedina-C), factor de crecimiento de queratinocitos, factor neurotrófico derivado de líneas celulares gliales, trombosmodulina, factor de crecimiento de fibroblastos básicos, insulina, un factor de la coagulación (p.ej. Factor VIII), somatropina, proteína-2 morfogenética de los huesos, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, hirudina, epoyetina, una integrina (p.ej. LFA), proteína de fusión LFA-3/IgG1 recombinante, glucocerebrosidasa, una cadena de un anticuerpo humanizado o humano, una citocina, etanercept, tPA, y muteínas, fragmentos, formas solubles, derivados funcionales, proteínas de fusión de los mismos.

15 Ejemplos adicionales adecuados de acuerdo con la presente invención se refieren a proteínas marcadoras, tales como marcadores de selección negativa o positiva, o genes amplificables. Los ejemplos incluyen proteínas seleccionadas entre adenosina desaminasa (ADA), aminoglicósido fosfotransferasa (neo), dihidrofolato reductasa (DHFR), higromicina-B-fosfotransferasa (HPH), timidina quinasa (tk), xantina-guanina fosforribosiltransferasa (gpt), gen de resistencia múltiple a los fármacos (MDR), ornitina descarboxilasa (ODC) y gen de resistencia a N-(fosfonacetil)-L-aspartato (CAD), o puromicina actiltransferasa (PAC). Los ejemplos adicionales incluyen genes usados para la selección mediante el uso de rutas metabólicas particulares, tales como galactosidasa (Schumperli et al., 1982), el receptor de folato (Zhu et al., 2001), o portador de folato reducido (Assaraf et al., 1992). En aún una realización preferida adicional el polipéptido de interés es un gen mensajero. Los ejemplos se seleccionan entre luciferasa, proteína fluorescente verde, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa o peroxidasa de rábano picante o combinaciones intramoleculares de las mismas o con otras proteínas, tales como p.ej. la Proteína Fluorescente Verde (GFP) o GFP potenciada (EGFP) con la puromicina acetil transferasa (Abbate et al., 2001).

25 Preferiblemente, el aislante está posicionado corriente arriba (es decir, en la región flanqueante 5') y/o corriente abajo (es decir, en la región flanqueante 3') de una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de interés, respectivamente.

30 En una realización preferida, al menos dos aislantes están posicionados corriente arriba y corriente abajo de una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de interés, respectivamente.

En una realización preferida adicional, al menos dos secuencias codificantes están posicionadas entre los aislantes.

35 En aún una realización preferida adicional, las dos secuencias codificantes codifican subunidades de una proteína multimérica.

40 La expresión conjunta de dos subunidades de la misma proteína es particularmente ventajosa, dado que la expresión a partir de ambos promotores puede dar como resultado la producción de cantidades similares de subunidades, o de proporciones predeterminadas de ambos polipéptidos, dependiendo de la fuerza de los promotores usados. Las subunidades pueden ensamblarse después en la misma célula para formar una proteína madura.

45 Los ejemplos preferidos para proteínas diméricas adecuadas para ser expresadas usando un vector de la invención son la cadena alfa y la cadena beta de una hormona peptídica tal como FSH humana, LH humana, TSH humana y CG humana. La persona experta en la técnica apreciará que también se pueden usar igualmente hormonas de otras especies de acuerdo con la presente invención, tales como hormonas equinas, porcinas, bovinas, por ejemplo, dependiendo del uso pretendido del polipéptido recombinante.

50 En otra realización de la invención, la primera subunidad es la cadena pesada, y la segunda subunidad es la cadena ligera de una inmunoglobulina, o viceversa. Un ejemplo preferido de una inmunoglobulina adecuada es una IgG. Tales inmunoglobulinas pueden ser, p.ej., anticuerpos humanizados o humanos para uso terapéutico. Un ejemplo sumamente preferido para tal anticuerpo humanizado es un anticuerpo anti-CD11 humanizado que tiene el nombre comercial Raptiva®.

En otra realización de la invención, un gen de interés se expresa conjuntamente con un gen marcador o un gen de selección (p.ej. gen para IL-18BP y gen para PAC o luciferasa).

Se describe una célula huésped que comprende el aislante de la invención.

55 En un segundo aspecto de la invención, se transfecta una célula huésped CHO con al menos un vector descrito anteriormente. La persona experta apreciará que la célula huésped puede igualmente ser transfectada conjuntamente con dos o más vectores de acuerdo con la presente invención.

La célula huésped y el aislante proceden de diferentes especies. El aislante procede de ADN de pollo, pero se ha demostrado que es funcional en células que proceden de otras especies, tales como células de Ovario de Hámster Chino (CHO).

5 Están descritas muchas células huésped, tales como líneas celulares primarias o establecidas de una amplia variedad de eucariotes, que incluyen células vegetales y animales, ejemplificadas por CHO, BHK, HEK293 u otras células inmortalizadas y/o transformadas.

La célula huésped es una célula CHO, y más preferiblemente una célula CHO-S, descrita p.ej. por Shotwell et al. (Shotwell et al., 1982).

10 En un tercer aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para la producción de un polipéptido de interés que comprende la etapa de transfectar una célula huésped CHO con un vector acorde con la invención. Dependiendo de la naturaleza del polipéptido de interés, el procedimiento acorde con la invención conduce a una proteína secretada que puede ser recogida del sobrenadante del cultivo celular, o a una proteína de la membrana celular o una proteína intracelular que puede ser aislada de las células. Dependiendo del uso pretendido, la propia célula que tiene el polipéptido integrado puede ser el producto del procedimiento acorde con la invención.

15 En una realización preferida adicional, la invención se refiere a un procedimiento para la producción de un polipéptido de interés que comprende la etapa de transfectar una célula huésped CHO de acuerdo con la invención.

20 En aún una realización preferida adicional, el procedimiento comprende además la etapa de aislar el polipéptido de interés de las células huésped. Esta etapa es particularmente ventajosa y fácil de llevar a cabo para proteínas secretadas, que pueden ser aisladas simplemente del sobrenadante del cultivo celular. Sin embargo, esta etapa se aplica igualmente al aislamiento de polipéptidos de membranas celulares, o de compartimentos intracelulares.

25 El procedimiento de la invención se puede usar en sistemas de expresión transientes, estables, episomales o virales. Como se muestra en los Ejemplos más adelante, el vector de la invención dio como resultado una expresión particularmente fuerte de la proteína deseada si se usa en un sistema de expresión estable. Por tanto, en una realización preferida la transfección es transfección estable.

El uso del vector para la expresión simultánea de dos o más genes o cADNs de interés también es preferido.

30 También se describe el uso de un vector para la fabricación de un medicamento para uso en terapia basada en plásmidos o ADN o terapia génica.

Ejemplos

Ejemplo 1: Construcción del aislante y los vectores

Aislante

35 El aislante es de 146 pb y tiene la SEQ ID No:1. Comprende 146 pb de la secuencia central de 250 pb (SEQ ID No: 2) de la región aislante de 1,2 kb del locus 5'HS4 de la b-globina de pollo, como se muestra en la Figura 1, y además está ausente un par de bases (alrededor de la posición 107 en el alineamiento). Fue ensamblado por clonación de oligonucleótidos. El fragmento resultante tiene extremos artificiales para una subclonación conveniente.

40 Vectores

El fragmento de 146 pb se duplicó primero y se clonó después en dos matrices tándem separadas por un sitio de clonación múltiple, en el vector de clonación comercial pBluescript II SK + de Stratagene (cat no. 212205-01).

IL-18BP

45 Una primera caja de expresión para un gen marcador (IL18BP), expresado en dos copias desde un promotor bidireccional (mCMV-IE1 y mCMV-IE2), fue insertada entre los dos tándems aislantes como se muestra en la Figura 2A. En paralelo, y por lo demás idéntico, se construyó un vector de control desprovisto de los aislantes como se muestra en la Figura 2B.

Luciferasa

50 En un segundo método, una caja transgénica con el gen de la luciferasa de luciérnaga expresado desde un promotor CMV humano se insertó entre los tándems aislantes (Figura 3A). De nuevo, se construyó un vector de control sin los elementos aislantes insertando la caja de expresión en el vector troncal original (pBluescript II SK +, Stratagene, cat no. 212205-01) como se muestra en la Figura 3B.

Ejemplo 2: Actividad del aislante en grupos de células CHO transfectadas de manera estable (IL-18BP)

Se transfectaron células CHO-S con constructos mensajeros bidireccionales para expresión de IL18BP según la Figura 2A y B.

Materiales y Métodos

5 Células: células CHO-S de Invitrogen (Cat no:11619). Agente de transfección: DMRIE-C, Invitrogen, Cat. No. 10459-014.

Vectores:

- vector de expresión IL18BP aislado y no aislado descrito en el Ejemplo 1.
- vector que confiere resistencia a la puomicina (puro)
- plásmido que codifica el marcador de selección DHFR.

10 Las cantidades de los vectores usados se muestran en la siguiente tabla:

TABLA 1

	Aislado	No aislado
vector de expresión IL-18BP	33,6 µg	30 µg
Plásmido de selección - resistencia a la puomicina	3 µg	3 µg
Plásmido de selección - DHFR	3 µg	3 µg

Protocolo de transfección

15 Se transfectaron de manera estable células CHO-S (Invitrogen, Cat no:11619) usando DMRIE-C (Invitrogen, Cat. No. 10459-014). Brevemente, se expusieron células de 40 Mio durante cuatro horas a una mezcla de transfección que contenía el respectivo vector de expresión para IL18BP y un vector que confería resistencia a la puomicina, así como un plásmido que codifica DHFR. La mezcla de transfección contenía el vector de expresión IL18BP aislado, y el vector que confería resistencia a la puomicina, así como el que codificaba DHFR en una relación molar 10:1:1 respectivamente. La cantidad correspondiente es 33,6 µg, 3 µg y 3 µg (véase la Tabla 1).

20 En el caso del vector de expresión IL18 BP no aislado, se usaron relaciones molares similares, que corresponden a una cantidad de 30 µg, 3 µg y 3 µg (véase la Tabla 1). Todos los vectores usados fueron previamente linealizados con una enzima de restricción, PvuI para ambos vectores de expresión IL18BP y SspI para ambos plásmidos de selección, puro y DHFR. Después de la sedimentación, se retiró el sobrenadante, y las células se diluyeron en medio de cultivo exento de suero ProCHO-5 (Cambrex) y se incubaron a 37°C durante 48 horas. Después se añadió puomicina a una concentración de 10 µg/ml para seleccionar las células transfectadas de manera estable. Se sembraron alícuotas de control en medios que contenían suero bovino fetal al 10% para evaluar el número total de transfectantes estables en el grupo contando las colonias que crecían pegadas a la superficie de plástico. Los grupos para ambos constructos representan aproximadamente 200'000 transfectantes estables independientes.

25 Se mantuvo una presión selectiva durante 41 días con el fin de eliminar todos los transfectantes con sitios de integración inestables. Después se retiró la presión selectiva y se tomaron muestras para las medidas de IL18BP después de mantener las células 14 días sin puomicina.

Medida de la expresión de IL-18BP

35 La expresión de IL18BP se midió exponiendo células de aproximadamente 1 mio a medio fresco durante 24 horas. Después se filtró el medio para retirar las células y se cuantificó el IL18BP mediante un ensayo ELISA estándar por triplicado. Los títulos de IL18BP resultantes se usaron para calcular las productividades específicas por célula (picogramo por célula y día, pcd).

Resultados

40 El grupo transfectado con la caja de expresión aislada tuvo una productividad que fue más de tres veces más elevada (3,7 pcd) en comparación con el grupo de control (1,1 pcd).

Ejemplo 3: Actividad del aislante en clones de CHO transfectados de manera estable (Luciferasa)

Materiales y Métodos

45 Se transfectaron de manera estable células CHO-S (Invitrogen, Cat no:11619) con los constructos mensajeros de luciferasa mencionados anteriormente (véase el Ejemplo 1) usando DMRIE-C

como agente de transfección. Se transfectó conjuntamente un plásmido que expresaba el gen de la resistencia a la puomicina usando el mismo protocolo que el descrito en el Ejemplo 2. Se establecieron dos grupos usando 10 ug/ml de puomicina. Los grupos estables se mantuvieron bajo presión selectiva durante 40 días con el fin de eliminar las células con sitios de integración inestables (fase I). Los grupos se midieron en cuanto a la actividad de luciferasa (datos no mostrados) antes de sembrar en placas de 384 pocillos usando dilución limitante. Para cada grupo la siembra se realizó tanto en ausencia como en presencia de puomicina en el medio. Después se escogieron al azar clones individuales y se redistribuyó en matrices en placas de 96 pocillos para obtener 2 placas para cada constructo. Después estos clones se cultivaron con o sin puomicina durante otros dos meses hasta un total de tres meses después de la dilución limitante con el objetivo de analizar 96 clones para cada constructo y condición (fase II).

Medición de la luciferasa

La expresión de luciferasa se midió como ULR (unidades de luz relativas) en grupos estables transfectados con constructos aislados (l.hCMV Luc.I) o no aislados (hCMV Luc) en presencia o ausencia de puomicina (puro). Se usó el sistema de ensayo de Luciferasa Bright-Glo™, de Promega, Cat No E2610, según las directrices del fabricante. Brevemente, 5 ul de suspensión de células se lisaron con 50 ul de reactivo Bright-Glo y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. Después la actividad de luciferasa se midió en un Luminómetro durante 5 segundos/pocillo.

Resultados

Para cada una de las condiciones ensayadas, l.hCMV Luc.I con puro, l.hCMV Luc.I sin puro, hCMV Luc con puro, hCMV Luc sin puro, 96 clones individuales se clasificaron y se representaron gráficamente por niveles crecientes de expresión de luciferasa (véase la Figura 4).

La evaluación de los clones expresantes se resume en la Tabla 2 para las 4 condiciones ensayadas. Los números de clones expresantes (Número de expresores) se contaron y la expresión media sobre los clones expresantes seleccionados, así como el clon de expresión más alta, también se indican.

Tabla 2

Condición	Número de clones ensayados	Número de expresores	Expresión media en ULR	Expresión más alta en ULR
hCMV Luc con puro	96	9	86k	327k
l.hCMV Luc.I con puro	96	41	647k	4690k
hCMV Luc sin puro	96	11	135k	438k
l.hCMV Luc.I sin puro	96	25	456k	2290k

La expresión de luciferasa media medida como nivel de ULR en clones con el aislante (l.hCMV Luc.I) es de media 5 veces más alta que en los clones sin el aislante. El clon expresante más alto l.hCMV Luc.I con puomicina expresa 14 veces más Luciferasa que el mejor clon de hCMV Luc con puomicina.

Usar el aislante en el constructo aumenta el número de clones expresantes, el nivel medio de expresión y el nivel de expresión del expresor más alto de las series respectivas. En ausencia de selección durante la fase II, el aislante aumenta la probabilidad de identificar clones expresantes con expresión estable a largo plazo y elevada.

Ejemplo 4: Evaluación de una función potenciadora putativa

Un potenciador debe ser capaz de potenciar la expresión de un promotor heterólogo independientemente de la orientación y posición relativa al promotor. Se siguió esta definición para evaluar una función potenciadora putativa del aislante.

Construcción de vectores

pSV-Luc

Este vector, que contiene sólo el promotor SV40 y luciferasa, fue derivado de pGL3-Ctrl (Promega, E 1741), que contenía el promotor SV40 que maneja el gen de la Luciferasa, y potenciador del SV40 localizado en 3' del gen, y pGL3-Basic (Promega, E1751), que carecía tanto de promotor como de potenciador. Brevemente, se cortó el pGL3-ctrl mediante NotI/ XbaI, para aislar un fragmento que contenía el promotor SV40, seguido del gen de la Luciferasa.

De manera similar, se cortó el pGL3-basic mediante NotI/ XbaI y se aisló el tronco del vector que contenía la región poli A, sin el potenciador en 3. Se obtuvo pSV-Luc combinando ambos fragmentos.

pBS(2Ins)2.2

5 Brevemente, se diseñaron oligonucleótidos en base al aislante y el fragmento resultante se digirió mediante XbaI/SpeI y se clonó en pBluescript II SK +, Stratagene (cat no. 212205-01), también digirido mediante XbaI/SpeI (etapa 1). Se clonó una repetición en tándem del fragmento aislante abriendo el vector obtenido en la etapa 1, mediante XbaI, e insertando un segundo fragmento aislante digirido mediante XbaI/SpeI (etapa 2). La secuencia y orientación fueron comprobadas antes de la duplicación de la repetición en tándem del aislante. La segunda repetición en tándem se clonó en el sitio Acc65I, desafilado en el extremo mediante enzima de Klenow del vector obtenido en la etapa 2. Después se obtuvo el aislante digiriendo el vector de la etapa 2 mediante XbaI/SpeI, desafilado en el extremo mediante enzima de Klenow. El vector obtenido se llama pBS(2Ins)2.2.

pIns(2) SV-Luc y su versión orientada al revés, pIns(2)revSV-Luc

15 Se aisló una unidad de la secuencia del aislante, que comprende una repetición en tándem (2 x aislante), digiriendo pBS(2Ins)2.2 mediante SpeI/XbaI. El vector receptor es pSV-Luc abierto mediante NheI. Como los sitios usados para la digestión son compatibles, la reacción de clonación da vectores con ambas orientaciones.

Transfección transienteMateriales y Métodos

CHO-S, Invitrogen (Cat no:11619).

20 Se aislaron los ADNs plásmidos enumerados a continuación (véase la sección anterior para la construcción de vectores) a partir de un cultivo estándar que creció durante una noche con el kit Nucleobond PC 500 (Macherey-Nagel Cat.No:740 574) según el protocolo proporcionado por el fabricante:

- ADNs a ser evaluados: pIns(2)-SV-Luc y su versión orientada al revés, pIns(2)revSV-Luc
 - ADNs control
- 25
- pSV-Luc: expresión a partir del promotor SV40 en ausencia de ninguna secuencia potenciadora, o pGL3-ctrl: expresión a partir del promotor SV40 así como el potenciador del SV40
 - localizado en 3' del gen.

Transfección

30 Lipofectamina (Invitrogen, Cat No:18324-012)

Formato: placas de 24 pocillos.

35 Células: CHO-S en fase de crecimiento exponencial, para asegurar que las células están en buena forma, son sometidas a un pase (subcultivo) 24 h antes de la transfección. Para evitar una fase estacionaria a baja densidad celular, las células se diluyen hasta $0,75 \times 10^6$ células/ml. La cantidad total de células a ser transfectadas es $1,5 \times 10^5$, resuspendidas en 100 μ l de ProCho5, (Cambrex, Cat No: B-12766Q) por pocillo, en placa de 24 pocillos.

Las Mezclas de Transfección fueron como sigue: (para 1 pocillo nótese que se hace una mezcla maestra tomando 3,3x los volúmenes indicados a continuación, de tal modo que se pueden realizar ensayos por triplicado)

- 40
- A) Lipofectamina: 2 μ l
Medio ProCho5:48 μ l
El volumen total es 50 μ l.
- B) ADNs: 1 μ g,
Medio ProCho5: complemento hasta 50 μ l.

45 Las disoluciones A y B se mezclaron y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. Esta mezcla se añadió a los 100 μ l de medio ProCho5 que contienen $1,5 \times 10^5$ células. Se volvieron a poner las células en un incubador y se incubaron a 37°C, 5% de CO₂, durante 3 horas. Después, se añadieron 400 μ l de medio ProCho5 con el fin de diluir la Lipofectamina. Se incubaron las células durante otras 48 horas antes de tomar muestras para el análisis. Todas las transfecciones se llevaron a cabo por triplicado.

50 Transfección de control ("mock"): Corresponde a células no transfectadas y da una indicación del nivel de fondo.

Medición de la luciferasa

Se usó el sistema de ensayo Bright-Glo Luciferasa de Promega (Cat No: E2610) según las directrices del fabricante.

5 Brevemente, la suspensión de células se homogeneizó pipeteando hacia arriba y hacia abajo varias veces, y se tomó una alícuota de 50 µl y se puso en una placa blanca de 96 pocillos (Nunc, Cat no: 236108). Se añadieron directamente 50 µl de Reactivo Bright-Glo reconstituido y la mezcla se incubó 5 min a temperatura ambiente. La emisión de luz se midió en un luminómetro Centra LB 960 (Berthold Technologies) durante 5 segundos de tiempo de adquisición. La normalización mediante un control interno o el nivel de proteínas totales no se hizo, pero la variación dentro de los triplicados proporciona suficiente indicación para la eficacia de transfección comparable.

10 Resultados

Los resultados de la expresión de luciferasa impulsada por los diferentes ADNs plásmidos se presentan en la Fig. 5.

15 Los datos indican claramente que no hay función potenciadora dentro de la secuencia del aislante. No se observa un aumento significativo en el nivel de expresión cuando se añade el aislante al pSV-Luc, en orientación directa o inversa.

Conclusiones

A partir de los ejemplos anteriores, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- 20
- El aislante muestra una fuerte actividad aislante en células CHO;
 - El número de clones expresantes es más alto (posibilidad/probabilidad 5 veces aumentada de identificar clones expresantes);
 - El nivel de expresión de los clones expresantes es alto;
 - La presencia del aislante aumenta las posibilidades de obtener una expresión estable a largo plazo.
 - El aislante no contiene actividad potenciadora.

25

Lista de referencias

- Abbate, J., Lacayo, J.C., Prichard, M., Pari, G., y McVoy, M.A. (2001). Bifunctional protein conferring enhanced green fluorescence and puromycin resistance. *Biotechniques* 31, 336-340.
- 5 Assaraf, Y.G., Feder, J.N., Sharma, R.C., Wright, J.E., Rosowsky, A., Shane, B., y Schimke, R.T. (1992). Characterization of the coexisting multiple mechanisms of methotrexate resistance in mouse 3T6 R50 fibroblasts. *J Biol Chem* 267, 5776-5784.
- Bell, A.C., West, A.G., y Felsenfeld, G. (1999). The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity of vertebrate insulators. *Cell* 98, 387-396.
- 10 Blackwood, E.M. y Kadonaga, J.T. (1998). Going the distance: a current view of enhancer action. *Science* 281, 61-63.
- Chung, J.H., Bell, A.C, y Felsenfeld, G. (1997). Characterization of the chicken beta-globin insulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 575-580.
- Chung, J.H., Whiteley, M., y Felsenfeld, G. (1993). A 5' element of the chicken beta-globin domain serves as an insulator in human erythroid cells and protects against position effect in *Drosophila*. *Cell* 74, 505-514.
- 15 Ciana, P., Di Luccio, G., Belcredito, S., Pollio, G., Vegeto, E., Tatangelo, L., Tiveron, C., y Maggi, A. (2001). Engineering of a mouse for the in vi vo profiling of estrogen receptor activity. *Mol Endocrinol.* 15,1104-1113.
- de Wet, J.R., Wood, K.V., Helinski, D.R., y DeLuca, M. (1985). Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 7870-7873.
- 20 Izumi, M. y Gilbert, D.M. (1999). Homogeneous tetracycline-regulatable gene expression in mammalian fibroblasts. *J Cell Biochem* 76,280-289.
- Li, Q., Harju, S., y Peterson, K.R. (1999). Locus control regions: coming of age at a decade plus. *Trends Genet.* 15, 403-408.
- 25 Mazumder, B., Seshadri, V., y Fox, P.L (2003). Translational control by the 3'-UTR: the ends specify the means. *Trends Biochem Sci* 28, 91-98.
- Mountford, P.S. y Smith, A.G. (2003). Translational control by the 3'-UTR: the ends specify the means Internal ribosome entry sites and dicistronic RNAs in mammalian transgenesis. *Trends Genet.* 28, 91-98.
- 30 Recillas-Targa, F., Pikaart, M.J., Burgess-Beusse, B., Bell, A.C, Litt, M.D., West, A.G., Gaszner, M., y Felsenfeld, G. (2002). Position-effect protection and enhancer blocking by the chicken beta-globin insulator are separable activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 6883-6888.
- Schumperli, D., Howard, B.H., y Rosenberg, M. (1982). Efficient expression of *Escherichia coli* galactokinase gene in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 257-261.
- 35 Shotwell, MA, Mattes, P.M., Jayme, D.W., y Oxender, D.L. (1982). Regulation of amino acid transport system L in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 257,2974-2980.
- Wood, K.V., de Wet, J.R., Dewji, N., y DeLuca, M. (1984). Synthesis of active firefly luciferase by in vitro translation of RNA obtained from adult lanterns. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 124, 592-596.
- Zhu, W.Y., Alliegro, M.A., y Melera, P.W. (2001). The rate of folate receptor alpha (FR alpha) synthesis in folate depleted CHL cells is regulated by a translational mechanism sensitive to media folate levels, while stable overexpression of its mRNA is mediated by gene amplification and an increase in transcript half-life. *J Cell Biochem* 81,205-219.
- 40

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Applied Research Systems ARS Holding N.V.

5 <120> AISLANTE MÍNIMO Y SU USO EN EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS

<130> 874 WO

<160 > 2

10

<170 > PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211 > 146

15

<212> ADN

<213> Gallus gallus

<400> 1

gctccggtcc ggcgctcccc ccgcatcccc gagccggcag cgtgcgggga cagcccgggc 60
 20 acggggaagg tggcacggga tcgcttcct ctgaacgct ctcgctgtct ttgagcctgc 120
 agacacctgg gggatacggg gaaaaa 146

<210> 2

<211 > 250

25

<212> ADN

<213> Gallus gallus

<400> 2

gagctcagg ggacagcccc cccccaaagc cccagggat gtaattacgt ccctccccg 60
 30 ctagggggca gcagcgagcc gcccgggct ccgctccggt ccggcgctcc cccgcatcc 120
 ccgagccggc agcgtgcggg gacagcccgg gcacggggaa ggtggcacgg gatcgcttc 180
 ctctgaacgc ttctcgtgc tctttgagcc tcagacacc tgggggatac ggggaaaaag 240
 cttlaggctg 250

35

REIVINDICACIONES

1. Uso de un vector que comprende uno o más aislantes de la cromatina que consisten en la SEQ ID NO: 1 para la expresión de un gen de interés en una célula CHO.
- 5 2. El uso según la reivindicación 1, en el que dicho vector comprende además al menos un elemento de ADN seleccionado de:
 - a. un potenciador, o un fragmento potenciador de la expresión funcional del mismo;
 - b. un dominio promotor o un fragmento promotor de la expresión funcional del mismo; y
 - c. una secuencia de ADN que codifica uno o más polipéptidos de interés.
- 10 3. El uso según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho vector comprende además una o más secuencias de ADN que codifican elementos regulatorios seleccionados entre 5'UTRs, intrones, 3'UTRs, secuencias procesadoras del extremo 3' de ARNm, sitios de poliadenilación y secuencias de entrada interna al ribosoma (IRES).
- 15 4. El uso según la reivindicación 2 ó 3, en el que la secuencia de ADN codifica más que un polipéptido de interés mediante un ARNm policistrónico.
- 15 5. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho vector comprende además uno o más elementos de ADN seleccionados entre elementos frontera, regiones de control del locus (LCRs), regiones de unión a la matriz (MARS), y elementos para la recombinación e intercambio de cajas.
- 20 6. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el promotor se selecciona entre promotores celulares o virales/fagos tales como mCMV-IE1, mCMV-IE2, hCMV, SV40, RSV, T7, T3, o un fragmento promotor de la expresión funcional de los mismos.
- 20 7. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el polipéptido de interés se selecciona entre FSH, LH, CG, TSH, hormona del crecimiento, interferón, proteína de unión al TNF I, proteína de unión al TNF II, IL-18BP, IL-6, IFNAR1, LIF o muteínas, fragmentos, derivados funcionales, proteínas de fusión de los mismos.
- 25 8. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el polipéptido de interés se selecciona entre EPO, G-CSF, GM-CSF, una cadena de un anticuerpo humanizado, una citocina, un factor de coagulación, etanercept, tPA, una integrina o muteínas, fragmentos, derivados funcionales, proteínas de fusión de los mismos.
- 30 9. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el polipéptido de interés se selecciona entre adenosina desaminasa (ADA), aminoglicósido fosfotransferasa (neo), dihidrofolato reductasa (DHFR), higromicina-B-fosfotransferasa (HPH), timidina quinasa (tk), xantina-guanina fosforribosiltransferasa (gpt), gen de resistencia múltiple a los fármacos (MDR), ornitina descarboxilasa (ODC) y gen de resistencia al N-(fosfonacetil)-L-aspartato (CAD), puromicina actiltransferasa (PAC), galactoquinasa, receptor de folato humano, o portadores de folato reducido.
- 35 10. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el polipéptido de interés se selecciona entre luciferasa, proteína fluorescente verde, fosfatasa alcalina y peroxidasa de rábano picante o combinaciones de las mismas.
- 40 11. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que un aislante está posicionado corriente arriba y un aislante está posicionado corriente abajo de la secuencia de ADN que codifica un polipéptido de interés.
- 40 12. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que al menos dos aislantes están posicionados corriente arriba y corriente abajo de una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de interés, respectivamente.
- 45 13. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 11 ó 12, en el que al menos dos secuencias codificantes están posicionadas entre los aislantes.
- 45 14. El uso según la reivindicación 13, en el que las al menos dos secuencias codificantes codifican subunidades de una proteína multimérica.
- 50 15. El uso según la reivindicación 14, en el que la primera subunidad es la cadena alfa y la segunda subunidad es la cadena beta de una hormona seleccionada entre FSH humana, LH humana, TSH humana y CG humana.
- 50 16. El uso según la reivindicación 14, en el que la primera subunidad es la cadena beta y la segunda subunidad es la cadena alfa de una hormona seleccionada entre FSH humana, LH humana, TSH humana y CG humana.
- 55 17. El uso según la reivindicación 14, en el que la primera subunidad es la cadena pesada y la segunda subunidad es la cadena ligera de una inmunoglobulina.

18. El uso según la reivindicación 14, en el que la primera subunidad es la cadena ligera y la segunda subunidad es la cadena pesada de una inmunoglobulina.
19. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 para la expresión simultánea de dos o más genes o ADNs de interés.
- 5 20. Una célula CHO transfectada con un vector como el definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19.
21. Un procedimiento para la producción de un polipéptido de interés, que comprende la etapa de transfectar una célula CHO con al menos un vector como el definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18.
- 10 22. Un procedimiento para la producción de un polipéptido de interés, que comprende la etapa de cultivar una célula CHO acorde con la reivindicación 20.
23. El procedimiento según la reivindicación 21 ó 22, que comprende además la etapa de aislar el polipéptido de interés de las células CHO.
- 15 24. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23, en el que la transfección es transfección estable.

A
B

GAGCTCACGGGGACAGCCCCCCCCAAAGCCCCCAGGGATGTAATTACGTCCCTCCCCG

A
B
-----GCTCCGGTCCGGCGCTCCCCCGCATCC
CTAGGGGGCAGCAGCGAGCCGCCGGGGCTCCGCTCCGGTCCGGCGCTCCCCCGCATCC

A
B
CCGAGCCGGCAGCGTGCGGGGACAGCCCGGGCACGGGGAAGGTGGCACGGGATCGCTTTC
CCGAGCCGGCAGCGTGCGGGGACAGCCCGGGCACGGGGAAGGTGGCACGGGATCGCTTTC

A
B
CTCTGAACGCTTCTCGCTG-TCTTTGAGCCTGCAGACACCTGGGGGATACGGGGAAAAA-
CTCTGAACGCTTCTCGCTGCTCTTTGAGCCTGCAGACACCTGGGGGATACGGGGAAAAAG

A
B

CTTTAGGCTG

Fig. 1

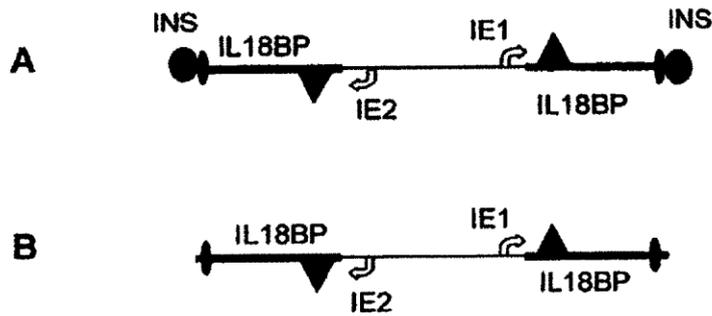


Fig. 2

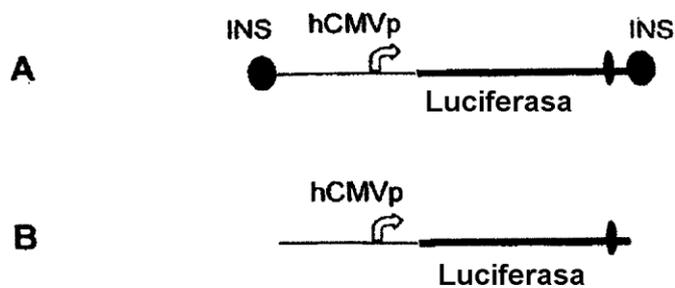


Fig. 3

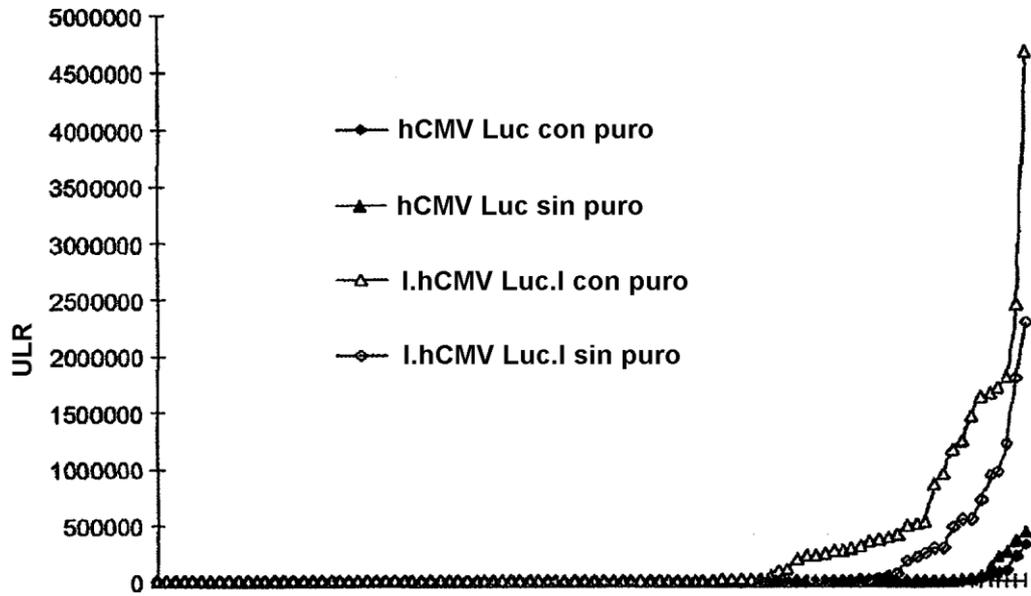


Fig. 4

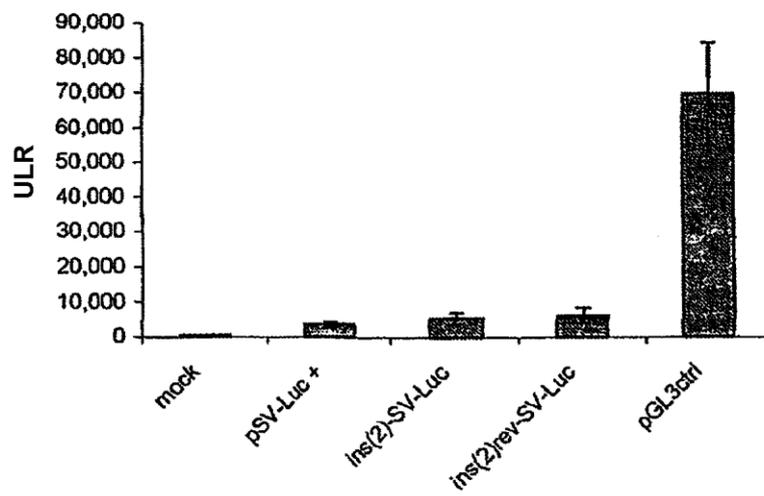


Fig. 5