

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 301 375**

21 Número de solicitud: 200601963

51 Int. Cl.:
C12N 15/79 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **19.07.2006**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **16.06.2008**

Fecha de la concesión: **13.04.2009**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **01.05.2009**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.05.2009

73 Titular/es: **Universidad de Sevilla**
OTRI-Pabellón de Brasil
Paseo de las Delicias, s/n
41012 Sevilla, ES

72 Inventor/es: **Quintero Carrasco, María José;**
Arévalo Rodríguez, Miguel;
Cebolla Ramírez, Ángel y
Chávez de Diego, Sebastián

74 Agente: **No consta**

54 Título: **Procedimiento de expresión regulada de genes en células eucarióticas y elementos para su realización.**

57 Resumen:

Procedimiento de expresión regulada de genes en células eucarióticas y elementos para su realización.

La presente invención consiste en un procedimiento y un conjunto de elementos para la expresión regulada de genes en células eucarióticas en respuesta a una molécula efectora exógena. El procedimiento de regulación se consigue mediante la doble acción inductora de la molécula efectora exógena sobre la actividad de un activador transcripcional y sobre sus niveles intracelulares. El activador regula la expresión del gen diana que se pretende expresar, al activar el promotor bajo cuyo control se sitúa dicho gen diana.

Los campos de aplicación de la presente invención son los del uso de organismos eucarióticos como modelos para el estudio de la función de genes del mismo o diferente organismo, y como herramientas biotecnológicas para la producción de biomoléculas de interés científico, terapéutico o industrial. Especial relevancia tiene la tecnología descrita en la expresión regulada de genes en microorganismos eucarióticos como la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

ES 2 301 375 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de expresión regulada de genes en células eucarióticas y elementos para su realización.

5 Campos de aplicación

La presente invención puede aplicarse a la expresión regulada de genes endógenos o exógenos en células eucarióticas, con el fin de estudiar los efectos biológicos de tal expresión en un organismo, o bien con el fin de obtener los productos codificados por estos genes a una escala que permita su extracción y uso posterior. Los campos de aplicación de la tecnología descrita serán, por tanto, preferentemente los del uso de organismos eucarióticos como modelos para el estudio de la función de genes del mismo o diferente organismo, y como herramientas biotecnológicas para la producción de biomoléculas de interés científico, terapéutico o industrial. Especial relevancia tiene la tecnología descrita en la expresión regulada de genes en microorganismos eucarióticos como la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

15 Estado de la técnica

El estudio de las funciones de los genes constituye una parte preponderante de las investigaciones biológicas que se llevan a cabo en la actualidad. La secuenciación del genoma completo de un elevado número de organismos, incluyendo el ser humano, está proporcionando un creciente volumen de información que precisa de los medios adecuados para ser transformada en conocimiento útil. Entre las herramientas que sirven para analizar la función de los nuevos genes identificados se encuentra la expresión heteróloga, que permite por un lado estudiar los efectos biológicos de la expresión de estos genes, y por otro obtener sus productos, con los cuales realizar todo tipo de ensayos bioquímicos. Estos ensayos requieren a menudo la obtención de una cantidad considerable de proteína, especialmente cuando se necesita cristalizarla para resolver su estructura tridimensional, o cuando ha de administrarse a animales de laboratorio en ensayos farmacológicos. Una vez que una proteína concreta se convierte en producto con valor comercial será necesaria su producción a gran escala para cubrir la demanda del mercado.

En todo sistema de expresión génica, la cantidad de proteína producida vendrá determinada principalmente por la actividad promotora de la transcripción del sistema, que será la responsable de la síntesis del RNA específico de la proteína. La secuencia de DNA que promueve la transcripción del gen a expresar se denomina promotor, y su actividad puede ser constitutiva o regulable, siendo los sistemas regulables los más atractivos al permitir un mayor control sobre la expresión del gen objeto de estudio, o la producción de la proteína de interés. En este sentido, se han desarrollado sistemas de expresión en organismos eucariotas basados en promotores regulables por proteínas quiméricas, como la fusión entre la proteína TetR (que responde al antibiótico tetraciclina) y el dominio de activación transcripcional derivado de la proteína VP16 del virus Herpes simplex (Gossen and Bujard 1992). De manera similar, se ha desarrollado un sistema de expresión eucariota basado en un transactivador quimérico resultante de la fusión entre el receptor nuclear de la hormona de insecto ecdisona y la proteína VP16, que responde a la hormona activando la transcripción de promotores reconocibles por el receptor hormonal (No, Yao *et al.* 1996). Existen varias patentes publicadas que proponen sistemas de expresión eucarióticos basados en activadores transcripcionales quiméricos, formados por módulos de unión a ADN, y de activación de la transcripción que responden a moléculas efectoras exógenas, como el descrito en la patente WO0111037, que incorpora como elementos del transactivador quimérico a la proteína reguladora de *S. cerevisiae* Gal4 y a la ya descrita VP16, o el descrito en la patente US5599904, que incorpora un transactivador modular similar al anterior pero que responde a ácido retinoico. Otros sistemas de expresión eucarióticos objeto de patente utilizan similares elementos de respuesta a moléculas exógenas, como el basado en un transactivador que responde a ácido cúmico (patente US2004205834).

En todos los procesos de producción de proteínas recombinantes, los microorganismos continúan siendo los sistemas de expresión más utilizados, debido principalmente a su fácil manipulación y cultivo, y al alto rendimiento de producción que se consigue con los mismos. Entre estos organismos se encuentra la levadura *S. cerevisiae*, un organismo muy fácil de cultivar, extremadamente manipulable desde el punto de vista genético, y cuyo genoma ha sido secuenciado en su totalidad, circunstancias éstas que permiten utilizarla en investigación biológica como organismo eucariótico modelo para el estudio de funciones celulares, genéticas y moleculares, tanto endógenas como de otros organismos. La levadura es un organismo hospedador tradicionalmente utilizado en la expresión de proteínas, con fines analíticos y también de producción biotecnológica, siendo numerosos los procesos de producción de proteína heteróloga basados en *S. cerevisiae* (Hinnen, Meyhack *et al.* 1989; Goeddel 1990; Gellissen, Melber *et al.* 1992; Hinnen, Buxton *et al.* 1995; Gellissen and Hollenberg 1997; Cereghino and Cregg 1999; Porro, Sauer *et al.* 2005), si bien en los últimos tiempos el uso biotecnológico de las levaduras como sistemas de expresión se ha extendido a otros organismos, como *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida boidinii*, *Arxula adenivorans* y *Yarrowia lipolytica*, entre otros (Bergkamp, Kool *et al.* 1992) (Buckholz and Gleeson 1991) (Gellissen, Weydemann *et al.* 1992; Faber, Harder *et al.* 1995) (Gellissen, Kunze *et al.* 2005) (Reiser, Glumoff *et al.* 1990).

Los sistemas de expresión heteróloga en levaduras están por lo general basados en plásmidos replicativos, en los cuales es posible insertar la secuencia de ADN del gen de la proteína que se pretende expresar, y que pueden ser introducidos por transformación en la cepa de levadura adecuada (Parent, Fenimore *et al.* 1985; Rine 1991; Schneider and Guarente 1991; Romanos, Scorer *et al.* 1992). Estos plásmidos tienen su propio origen de replicación, y cuentan con genes cuya presencia en la cepa hospedadora es necesaria para que ésta sobreviva en determinadas condiciones de cultivo, y que pueden usarse por tanto como marcadores de selección de las cepas transformadas. Además, los plásmidos de expresión incorporan secuencias de ADN promotoras y terminadoras de la transcripción, señales operativas

reconocibles por la maquinaria celular de síntesis de ARN que son necesarias para la expresión de genes procedentes de organismos diferentes a la levadura. Los plásmidos de levaduras portan también secuencias de replicación y selección en *Escherichia coli* que permiten su propagación en esta bacteria, facilitando los procedimientos de donación necesarios.

5 Aunque se pueden utilizar promotores constitutivos, es conveniente usar promotores regulables o inducibles para que la proteína sólo se sobreexpresa cuando está adquiriéndose biomasa en el medio de cultivo. De esta forma se evita que los mutantes que no expresan la proteína recombinante crezcan más rápido por no tener que soportar un lastre metabólico de superproducir todo el tiempo la proteína, ya que esto les haría dominar con rapidez el cultivo, bajando
10 los rendimientos drásticamente. Los promotores con muy bajo nivel basal permiten además la expresión regulada de proteínas que resultan tóxicas para la célula hospedadora. Con este objetivo, se han desarrollado sistemas de expresión en levadura basados en plásmidos con promotores regulables, como el del gen *MET3*, regulado negativamente por el aminoácido metionina (Mountain, Bystrom *et al.* 1991), el del gen *PHO5*, regulado negativamente por fosfato inorgánico (Kramer, DeChiara *et al.* 1984), el del gen *CUP1*, regulado positivamente por iones Cu^{2+} (Macreadie, Horaitis *et al.* 1991), o el de los genes *GAL1* y *GAL10*, que son transcritos de manera divergente a partir una misma
15 región promotora situada entre ambos (West, Yocum *et al.* 1984; Yocum, Hanley *et al.* 1984).

De entre los sistemas con promotores regulables, los basados en *GAL1-10* han demostrado ser los más potentes en cuanto a niveles de expresión obtenibles (Schneider and Guarente 1991). La actividad del promotor *GAL1-10* se
20 activa por la presencia de galactosa en el medio de cultivo, y se reprime por glucosa. En condiciones naturales, la activación del promotor *GAL1-10* depende de la proteína activadora Gal4, producto del gen (*Johnston 1992*). Siendo la galactosa un compuesto caro, y la glucosa difícil de evitar en la mayor parte de los medios de cultivo industriales, la utilización de los sistemas de expresión basados en *GAL1-10* puede resultar poco conveniente fuera del laboratorio. En este sentido, se ha descrito un sistema de expresión en *S. cerevisiae* que utiliza elementos del sistema *GAL* clásico,
25 combinándolos con otros elementos heterólogos descritos anteriormente (un receptor hormonal, la proteína VP16), para configurar un sistema de expresión que responde a la hormona β -estradiol (Louvion, Havaux-Copf *et al.* 1993).

En la presente invención se describe un sistema de expresión derivado de varios de los elementos antes descritos, ensamblados en circuitos regulatorios nuevos que posibilitan la expresión altamente regulada de genes de interés
30 en investigación y biotecnología. Los procedimientos regulatorios de esta invención se basan en la utilización de una molécula efectora exógena que opera en un doble nivel: sobre la actividad de los elementos activadores de la transcripción y sobre sus niveles intracelulares. Se consigue así mejorar los procedimientos anteriormente existentes al reducir la expresión basal e incrementar los niveles de inducción.

35 Breve descripción de la invención

El objeto de la presente invención es un procedimiento para la expresión regulada de genes en células eucarióticas, mediante el uso de una molécula efectora exógena que permite inducir tanto la concentración intracelular como la actividad intrínseca de un regulador positivo de la transcripción que opera sobre una secuencia promotora específica
40 y dirige a su través la expresión del gen que se desea regular. La actividad del promotor depende de que el regulador positivo se encuentre en un estado activado y de la concentración intracelular de dicho regulador positivo; ambos parámetros son dependientes de la presencia de la molécula efectora exógena. El doble efecto de la molécula efectora exógena propicia bajos niveles de expresión basal cuando no está presente en el medio, junto a altos índices de activación cuando sí está presente. El regulador de la transcripción debe ser capaz de reconocer la molécula efectora y
45 unirse a una secuencia específica de ADN para activar la transcripción de los promotores cercanos a dicha secuencia. Esto puede conseguirse mediante la combinación modular de tres dominios proteicos: uno capaz de reconocer una secuencia en el ADN, otro capaz de activar la transcripción, y un tercero capaz de reconocer la molécula efectora y que funcione regulando la actividad de alguno de los otros dos dominios anteriores.

50 Cuando la transcripción de la secuencia que codifica el regulador se coloca bajo su propio control mediante técnicas de ingeniería genética, se obtiene un sistema que se retroalimenta positivamente en respuesta a la molécula efectora. Como la actividad del regulador depende a su vez de la molécula efectora, el resultado es que la cantidad de regulador activo presente en la célula crece en respuesta a la presencia de dicha molécula efectora.

55 Una variante más sofisticada del sistema que aquí se describe utiliza dos reguladores positivos que responden a la misma molécula efectora, pero que reconocen diferentes secuencias en el ADN. Uno de ellos se expresa de manera constitutiva y regula transcripcionalmente la expresión del segundo, que a su vez regula transcripcionalmente la expresión de la proteína de interés; ambos reguladores se activan por la misma molécula efectora. Se consigue así que tanto la cantidad como la actividad del segundo regulador estén controladas por la misma molécula efectora y
60 puedan actuar sinérgicamente. Este sistema permite niveles más elevados de expresión del gen de interés, a partir de niveles basales muy reducidos, sin necesidad de contar con un represor de la transcripción acoplado.

Un desarrollo posible de esta invención utiliza la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y reguladores positivos que responden a la hormona β -estradiol, bien el receptor humano de estrógenos (hER) o bien la proteína quimérica Gal4-ER-VP16, formada por el dominio de unión a ADN de Gal4, el dominio de respuesta a β -estradiol de hER y el dominio de activación de la transcripción derivado de una proteína viral (VP16) (Louvion, Havaux-Copf *et al.* 1993). En presencia de β -estradiol, la proteína resultante promueve fuertemente la transcripción de secuencias de ADN situadas corriente abajo de promotores reconocibles por Gal4, que en condiciones normales activa la expresión de genes de

la levadura responsables de la asimilación de galactosa en medios de cultivo con este azúcar como fuente de carbono (Johnston 1992). La invención es sin embargo aplicable a otros reguladores positivos de la transcripción que reconozcan otras secuencias de ADN y respondan a otras moléculas efectoras.

5 El sistema descrito posee varias ventajas importantes, ya que consigue elevados niveles de inducción de la expresión génica, a partir de expresiones basales muy reducidas, en respuesta a concentraciones muy pequeñas de la molécula efectora, que además no es metabolizada en el proceso. La inducción de la expresión génica se produce con un mínimo de interferencia con el metabolismo general de la levadura, requiere la adición de cantidades muy pequeñas del inductor, y es virtualmente independiente del medio de cultivo utilizado. Los sistemas de expresión que utilizan β -estradiol como molécula efectora pueden combinarse fácilmente con otros, como el reprimible-inducible por tetraciclina (Tet-Off y Tet-On) (Fishman, Kaplan *et al.* 1994; Belli, Gari *et al.* 1998), en estudios de sustitución de funciones celulares del producto de un gen por las del de otro. Además, los sistemas en levadura basados en Gal4-ER-VP16 son compatibles con el uso de construcciones génicas bajo promotores reconocibles por Gal4 obtenidas previamente.

15 Breve descripción de las figuras

Figura 1: Esquema general de la invención. Una molécula efectora exógena induce simultáneamente, bien directamente, bien a través de elementos intermediarios, la actividad transcripcional y los niveles intracelulares de un activador de la transcripción, cuya secuencia codificante se encuentra bajo el control del promotor 1. El activador sensible a la molécula efectora regula, a través del promotor 2, los niveles de expresión del gen diana de la regulación, que se encuentra bajo el control de este segundo promotor.

Figura 2: Esquema de bucle de retroalimentación positiva controlado por una molécula efectora exógena. La molécula efectora exógena desencadena la retroalimentación positiva al activar simultáneamente la actividad del activador y su propia síntesis, lo que se consigue al situar la secuencia codificante del activador bajo su propio control transcripcional.

Figura 3: Aplicación del esquema de la figura 2 a la levadura *S. cerevisiae* mediante el uso del activador quimérico Gal4-ER-VP16 controlado por β -estradiol. El activador es capaz de activar el promotor *GALI* gracias al dominio de unión al ADN del Gal4 y el dominio de activación de la transcripción de VP 16, pero sólo en presencia de β -estradiol, que es detectado por el dominio de unión a hormona del receptor de estrógenos. En presencia de β -estradiol, el activador activa su propia síntesis al estar ésta bajo el control del promotor *GALI*, así como la transcripción del gen diana, que también se encuentra bajo el control del promotor *GALI*.

Figura 4: Esquema de cascada reguladora controlada por una molécula efectora exógena. La molécula efectora exógena induce la actividad de un regulador primario que activa la transcripción del gen diana, a través de un promotor regulable que es reconocido por dicho regulador primario. De manera simultánea, la misma molécula efectora exógena induce un incremento en los niveles intracelulares del activador primario, al activar un activador secundario que regula positivamente el promotor del gen que codifica el activador primario. El activador secundario se encuentra permanentemente expresado en la célula al estar su expresión situada bajo el control de un promotor constitutivo.

Figura 5: Aplicación del esquema de la figura 4 a la levadura *S. cerevisiae* mediante el uso del receptor de estrógenos humano (hER) como activador primario y del activador quimérico Gal4-ER-VP16 como activador secundario. La actividad de ambos reguladores es inducida por β -estradiol. El gen diana de la regulación se encuentra bajo el control de un promotor que contiene uno o varios elementos de respuesta a estrógenos (ERE), lo que permite su reconocimiento por el receptor de estrógenos cuando se encuentra activo. La expresión del receptor de estrógenos se encuentra bajo el control del promotor *GALI*, que a su vez es regulado por el activador quimérico Gal4-ER-VP16, cuya expresión es constitutiva al estar bajo el control del promotor del gen *ADHI*.

Figura 6: Resultados del Ejemplo 1. Cuantificación de las actividades β -galactosidasa de los cultivos de la cepa W303-1A de *Saccharomyces cerevisiae* transformada únicamente con el plásmido reportero p416GAL1lacZ (Sin activador), con el plásmido reportero y el plásmido pADH1-GAL4ERVP16 que expresa constitutivamente el activador quimérico (Con Gal4ERVP16 constitutivo), o con el plásmido reportero y el plásmido que expresa el activador quimérico bajo control del promotor *GALI* (Con Gal4ERVP16 autoregulado). Se muestran los valores correspondientes a las media obtenida a partir de cuatro ensayos de la actividad β -galactosidasa alcanzada por cada cultivo tras 6 generaciones en presencia o ausencia de β -estradiol (11 μ M). Las barras de error indican la desviación estándar.

Figura 7: Resultados del Ejemplo 2. Cuantificación de las actividades β -galactosidasa de los cultivos de la cepa W303-1A de *S. cerevisiae* transformada únicamente con el plásmido reportero pERECYC1lacZ (Sin activador); de cultivos en medio con galactosa de dicha cepa transformada con el plásmido reportero y con el plásmido pGAL1-ER, que en esas condiciones expresa constitutivamente el receptor de estrógenos (Con hER constitutivo); o de cultivos de la cepa Y01044 (carente del activador Gal4 y del represor Gal4-Gal80) transformada con el plásmido reportero, el plásmido pADH1-GAL4ERVP 16, que expresa constitutivamente el activador quimérico, y el plásmido pGAL1-ER, que expresa el receptor de estrógenos cuando se activa el promotor *GALI* (Con Gal4ERVP16 y hER en cascada). Se muestran los valores correspondientes a la media obtenida a partir de cuatro ensayos de la actividad β -galactosidasa alcanzada por cada cultivo tras 6 generaciones en presencia o ausencia de β -estradiol (1 μ M). Las barras de error indican la desviación estándar.

Descripción detallada de la invención

La presente invención consiste en un procedimiento de expresión regulada de genes que comprende:

- 5 1. Una secuencia promotora de la transcripción que dirige la expresión del gen que codifica la proteína de interés. Esta secuencia puede ser un promotor completo del organismo utilizado, que contenga tanto las secuencias de unión del regulador transcripcional como las secuencias que dirigen la iniciación de la transcripción. En el caso de *S. cerevisiae* pueden utilizarse promotores altamente regulados como el de los genes *GALI-GAL10*, cuyas secuencias reguladoras (GAL UAS) son reconocidas simultáneamente por el sistema de represión que mantiene bajos los niveles de transcripción basal y por el regulador positivo. Alternativamente, la secuencia promotora puede consistir en un promotor quimérico que combine secuencias reguladoras y regiones de ensamblaje de la maquinaria transcripcional (*core promoter elements*) de distinta procedencia.
- 15 2. Un regulador positivo de la transcripción o activador, que reconoce específicamente las secuencias reguladoras del promotor regulado antes descrito. Este regulador positivo puede ser un factor transcripcional del organismo utilizado o puede provenir de otro organismo diferente y ser expresado heterológicamente en el organismo de trabajo. También puede consistir en una proteína quimérica que combine dominios proteicos con diferente funcionalidad: dominio de unión al ADN que reconozca la secuencia reguladora, dominio de activación de la transcripción y dominio regulador alostérico que responda a una molécula efectora. En el caso de utilizarse promotores cuyas secuencias reguladoras sean las GAL UAS de *S. cerevisiae*, pueden utilizarse reguladores quiméricos que contengan el dominio de unión al ADN de la proteína Gal4, fusionado a dominios de activación de la transcripción y a dominios reguladores de diferente procedencia, como es el caso de la proteína quimérica Gal4-ER-VP16 (Louvion, Havaux-Copf *et al.* 1993).
- 25 3. Una molécula efectora que modula la actividad del regulador positivo de la transcripción así como la concentración intracelular de éste (Figura 1). La molécula efectora puede regular actuando positivamente sobre la actividad del regulador y sobre su abundancia, o puede hacerlo negativamente, siendo necesario en este caso retirar la molécula efectora para conseguir regular positivamente la expresión de la proteína de interés. La molécula efectora puede modular la actividad del regulador mediante interacción directa con éste, a través de un sitio regulador, o puede hacerlo a través de uno o varios elementos intermediarios que transmitan hasta el regulador la señal originada en la molécula efectora. En el caso de utilizarse como regulador un receptor nuclear, la molécula efectora es el ligando correspondiente, normalmente una hormona, que es reconocida por el dominio de unión a hormona. Éste es también el caso de la proteína quimérica GAL4-ER-VP16, que contiene el dominio de unión a estrógeno del receptor de estrógenos humano, y cuya actividad requiere estrictamente la presencia de estrógenos como el β -estradiol. La molécula efectora controla asimismo los niveles intracelulares del regulador positivo. Para ello la expresión del regulador positivo debe estar bajo el control de la molécula efectora. En el modelo más simple comprendido por la presente invención la expresión del regulador positivo está bajo su propio control, al encontrarse las secuencias reguladoras que reconoce el regulador positivo en el promotor que regula la expresión de éste. El sistema global adopta la forma de un bucle que se retroalimenta positivamente tras ser desencadenado por la presencia de la molécula efectora (Figura 2). Si se utiliza la proteína GAL4-ER-VP16 como activador y el β -estradiol como molécula efectora, la retroalimentación positiva se consigue colocando la expresión de GAL4-ER-VP16 bajo el control de secuencias GAL-UAS como las que contiene el promotor del gen *GALI* de *S. cerevisiae*, que son reconocidas por el propio regulador en presencia de la molécula efectora (Figura 3).

El sistema de bucle retroalimentado positivamente funciona de manera óptima cuando los niveles basales de expresión del activador, en ausencia de la molécula efectora, son bajos, como consecuencia por Ejemplo de la actuación de un represor. La necesidad de que los niveles basales del activador primario sean reducidos disminuye si éste se encuentra bajo el control transcripcional de un segundo activador (activador secundario), que se expresa constitutivamente, pero cuya actividad responde a la presencia de la misma molécula efectora. En este caso, en lugar de un bucle con retroalimentación positiva, disponemos de una cascada regulatoria que depende de la molécula efectora exógena (Figura 4). Si se utiliza β -estradiol como molécula efectora exógena, el regulador primario puede ser el propio receptor de estrógenos humano, con capacidad para reconocer en el ADN la secuencia de los elementos de respuesta a estrógenos (ERE). El promotor que dirige la expresión de la proteína de interés ha de contener por tanto secuencias ERE. La expresión del regulador primario, en este caso el receptor de estrógenos humano, ha de encontrarse bajo el control del activador secundario, que a su vez debe responder también al β -estradiol. Como regulador secundario puede por tanto utilizarse la proteína Gal4-ER-VP 16, siempre que el regulador primario se sitúe bajo el control de las GAL UAS que reconoce el dominio de unión al ADN de Gal4. El activador secundario puede expresarse mediante un promotor constitutivo, como el del gen *ADHI* de *S. cerevisiae*. El resultado global es una cascada regulatoria que responde al β -estradiol amplificando la respuesta al mismo (Figura 5). Dada la gran conservación evolutiva de la maquinaria transcripcional eucariótica y el hecho de que este sistema de regulación en cascada inducido por β -estradiol sea prácticamente independiente de cualquier regulador específico del hospedador, es altamente probable que este sistema pueda ser adaptado con facilidad a otros eucariontes que carezcan de regulación por estrógenos.

Los distintos elementos genéticos que constituyen los sistemas regulatorios descritos, tanto los promotores y secuencias codificantes que dirigen la expresión de los activadores, como los promotores bajo cuya expresión se sitúan los genes diana, pueden expresarse desde uno o varios plásmidos. Estos plásmidos pueden tener carácter no replica-

tivos e introducirse en las células por transfección transitoria, o pueden tener carácter replicativo e introducirse en la célula de manera estable mediante transfección, transformación o conjugación. El número de copias que alcanza cada plásmido en la célula hospedadora pueden ser estable, por Ejemplo de copia única, o puede ser múltiple y variar en función de la fisiología del cultivo. En el caso de que se utilice *S. cerevisiae* como organismo de expresión, los plásmidos estables han de portar secuencias de replicación autónoma, que pueden acompañarse de secuencias centrómeras, o pueden llevar secuencias replicativas derivados del círculo de 2 micras; en el primer caso los plásmidos resultantes tendrán un número de copias estable y próximo a uno, mientras que en el segundo caso el número de copias será múltiple y variable dentro de la población de células del cultivo (Futcher 1988; West 1988). Los plásmidos que contienen los elementos genéticos de los sistemas regulatorios descritos en esta invención pueden contener más de uno de estos elementos. En el caso de utilizarse promotores similares para dirigir la transcripción de más de uno de los elementos del sistema, puede usarse un promotor bidireccional situado en un plásmido y que dirija de manera divergente la transcripción de dos de los genes. En el caso del sistema regulatorio mediante bucle retroalimentado positivamente, el promotor bidireccional puede dirigir la transcripción de la secuencia codificante del activador y, de forma divergente, dirigir la transcripción del gen diana. La aplicación de este esquema a *S. cerevisiae* puede concretarse situando en el plásmido el promotor divergente *GALI-GAL10*, bajo cuyo control quedaria en una dirección la secuencia codificante de un activador que reconozca las secuencias GAL-UAS presentes en dicho promotor y en la dirección opuesta el gen diana objeto de la regulación. Lo descrito para plásmidos centroméricos circulares de *Saccharomyces cerevisiae* es de aplicación también a cromosomas artificiales de levadura (YAC) (Burke 1990).

Alternativamente, los elementos genéticos que conforman los sistemas de regulación génica descritos en esta invención pueden estar integrados en el genoma cromosómico del organismo elegido para realizar la expresión. En este caso sería necesario utilizar técnicas que permitan la integración de las unidades transcripcionales que dirigen la expresión de los activadores y del gen diana, mediante procedimientos de recombinación molecular. Esta recombinación puede ser aleatoria (recombinación ilegítima), puede estar mediada por recombinasas (recombinación específica de sitio) o puede responder a homología de secuencia (recombinación homóloga). En el caso de utilizarse *S. cerevisiae* como organismo de expresión, el procedimiento de integración mediante recombinación homóloga es altamente exitoso. Las unidades transcripcionales que expresan los elementos genéticos del sistema regulatorio pueden por tanto integrarse en esta levadura si se hacen flanquear por secuencias de más de 40 pares de bases de longitud que presenten homología con el locus elegido para la integración (Rose 1990).

La presente invención ha sido desarrollada en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* pero es aplicable a otros organismos eucarióticos usando elementos y factores de transcripción análogos, ya conocidos en el estado de la técnica.

Ejemplos de realización de la invención

Ejemplo 1

*Expresión inducida por β -estradiol de la β -galactosidasa de *E. coli* en *S. cerevisiae* mediante un sistema de bucle retroalimentado positivamente*

El presente Ejemplo muestra la capacidad del procedimiento descrito para inducir la expresión de la β -galactosidasa de la bacteria *Escherichia coli* en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* mediante la adición al medio de concentraciones micromolares de β -estradiol, partiendo de niveles basales de expresión muy reducidos.

Para realizar el Ejemplo se construyó el plásmido pGAL1-GAL4ERVP16 mediante la inserción en el vector centromérico de expresión en levadura p414GAL1 (Mumberg, Muller *et al.* 1994) de los fragmentos de ADN correspondientes al dominio de unión al ADN de la proteína Gal4 de *S. cerevisiae* (93 primeros residuos aminoacídicos del extremo N-terminal), el dominio de unión a hormona del receptor de estrógenos humano (residuos 282 a 756 de la proteína) y el dominio de transactivación de la proteína VP16 del virus Herpes simplex (residuos 424 a 490 de la proteína). Estos tres dominios fueron insertados en fase como una fusión traduccional, entre el promotor *GAL1* y el terminador *CYC1* presentes en el vector. Se construyó asimismo el plásmido pADH1-GAL4ERVP16, mediante la inserción de la fusión traduccional GAL4ERVP16 en el vector p413ADH1, entre el promotor *ADH1* y el terminador *CYC1* presentes en el vector (Mumberg, Muller *et al.* 1995).

Como vector de expresión de la β -galactosidasa se utilizó el plásmido centromérico p416GAL1lacZ, en el que el gen *lacZ* de *E. coli* se sitúa bajo el control del promotor *GAL1* de *S. cerevisiae* (Mumberg, Muller *et al.* 1994).

La estirpe W303-1A (*MATa, ade2, his3, leu2, trp1, ura3*) de *S. cerevisiae* fue transformada con los plásmidos pGAL1-GAL4ERVP16 y p416GAL1lacZ, con pADH1GAL4ERVP16 y p416GAL1lacZ, o sólo con p416GAL1lacZ, mediante procedimientos estándar de manipulación genética de levaduras (Rose 1990). Los transformantes fueron cultivados a 30°C, en medio líquido SC libre de uracilo, triptófano o histidina (según la combinación de plásmidos) para mantener la presión selectiva a favor del mantenimiento de los plásmidos introducidos, y en agitación orbital continua. Como control se utilizaron transformantes que portaban exclusivamente el plásmido p416GAL1lacZ. Los cultivos, de 5 ml, se realizaron en presencia de 1 μ M β -estradiol (SIGMA E-1024-1G), mediante la adición de 2 μ l de una solución 2,5 mM de β -estradiol disuelta en etanol. A los controles sin β -estradiol se les añadió igual volumen de etanol. Tras 6 generaciones de cultivo (aproximadamente 14 horas) y alcanzar una densidad óptica de entre 0,8 y 1,0 (a 600 nm) se procedió a recoger las células por centrifugación. La actividad β -galactosidasa se ensayó siguiendo los procedimientos estándar para levaduras (Guarente 1983). Los experimentos se realizaron por cuadruplicado.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 6. La presencia del regulador positivo bajo el control del bucle retroalimentado positivamente no supuso aumento alguno de la expresión basal de la β -galactosidasa, mientras que la adición de la molécula efectora (β -estradiol) produjo una inducción de 274 veces en el nivel de expresión. Por contra, cuando se expresó constitutivamente el regulador positivo (pADH1GAL4ERV16) la expresión basal en ausencia de β -estradiol fue 27 veces superior y la inducción obtenida al añadir β -estradiol fue sólo de 32 veces.

Ejemplo 2

Expresión inducida por β -estradiol de la β -galactosidasa de *E. coli* en *S. cerevisiae* mediante un sistema regulador con dos activadores transcripcionales situados en cascada

El presente Ejemplo muestra la capacidad del procedimiento descrito para inducir altos niveles de expresión de la β -galactosidasa de la bacteria *E. coli* en la levadura *S. cerevisiae* mediante la adición al medio de concentraciones micromolares de β -estradiol, partiendo de reducidos niveles basales de expresión, en ausencia de mecanismos de represión de la expresión de los reguladores positivos.

Para realizar el Ejemplo se construyó el plásmido pGAL1-ER mediante la inserción del cDNA del receptor de estrógenos humano en el vector centromérico de expresión en levadura p414GAL1, entre el promotor *GAL1* y el terminador *CYC1* presentes en el vector (Mumberg, Muller *et al.* 1995).

Como vector de expresión de la β -galactosidasa se construyó el plásmido centromérico pRECYC1lacZ, en el que el gen *lacZ* de *Escherichia coli* se sitúa bajo el control del promotor quimérico compuesto por una secuencia de respuesta a estrógenos (ERE) y los elementos basales del promotor *CYC1* de *S. cerevisiae*. Para ello se insertó la secuencia ERE en el vector p416CYC1lacZ, aguas arriba del promotor *CYC1* (Mumberg, Muller *et al.* 1995).

La estirpe Y01044 (*MATa, his3, leu2, met15, ura3, gal4*) de *S. cerevisiae*, que carece del activador Gal4 y por tanto del represor Gal4-Gal80, fue transformada con los plásmidos pADH1-GAL4ERV16, pGAL1-ER y pRECYC1lacZ, mediante procedimientos estándar de manipulación genética de levaduras (Rose 1990). Los transformantes fueron cultivados a 30°C, en medio líquido SC libre de uracilo, triptófano o histidina (según la combinación de plásmidos) para mantener la presión selectiva a favor del mantenimiento de los plásmidos introducidos, y en agitación orbital continua. Como control se utilizaron transformantes de la cepa W303-1A que portaban exclusivamente el plásmido pRECYC1lacZ. Como control constitutivo se utilizaron células de la estirpe W303-1A transformada con pRECYC1lacZ y pGAL1-ER, cultivadas en medio con galactosa como única fuente de carbono para conseguir la expresión continua del promotor *GAL1*. Los cultivos, de 5 ml, se realizaron en presencia de 11 μ M β -estradiol, mediante la adición de 2 μ l de una solución 2,5 mM de β -estradiol disuelta en etanol. A los controles sin β -estradiol se les añadió igual volumen de etanol. Tras 6 generaciones de cultivo (aproximadamente 14 horas) y alcanzar una densidad óptica de entre 0,8 y 1,0 (a 600 nm) se procedió a recoger las células por centrifugación. La actividad β -galactosidasa se ensayó siguiendo los procedimientos estándar para levaduras (Guarente 1983). Los experimentos se realizaron por cuadruplicado.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 7. La presencia de los elementos genéticos de la cascada reguladora en ausencia de la molécula efectora no supuso aumento alguno de la expresión basal de la β -galactosidasa, mientras que la adición de la molécula efectora (β -estradiol) produjo una inducción de 135 veces en el nivel de expresión de esta enzima, alcanzándose niveles de β -galactosidasa 16 veces superiores al Ejemplo anterior. Sin embargo, cuando los cultivos expresaban constitutivamente el receptor de estrógenos, la acumulación de β -galactosidasa en ausencia de β -estradiol fue significativamente superior y el nivel de inducción por la molécula efectora no superó las 4 veces.

Referencias bibliograficas

Belli, G., E. Gari, *et al.* (1998). "An activator/repressor dual system allows tight tetracycline-regulated gene expression in budding yeast". *Nucleic Acids Res* **26**(4): 942-7.

Bergkamp, R. J., I. M. Kool, *et al.* (1992). "Multiple-copy integration of the alpha-galactosidase gene from *Cyanothece tetragonoloba* into the ribosomal DNA of *Kluyveromyces lactis*". *Curr Genet* **21**(4-5): 365-70.

Buckholz, R. G. and M. A. Gleeson (1991). "Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins". *Biotechnology (N Y)* **9**(11): 1067-72.

Burke, D. T. (1990). "YAC cloning: options and problems". *Genet Anal Tech Appl* **7**(5): 94-9.

Cereghino, G. P. L. and J. M. Cregg (1999). "Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis". *Current Opinion in Biotechnology* **10**(5): 422-427.

Faber, K. N., W. Harder, *et al.* (1995). "Review: methylotrophic yeasts as factories for the production of foreign proteins". *Yeast* **11**(14): 1331-44.

ES 2 301 375 B1

- Fishman, G. I., M. L. Kaplan, et al. (1994).** "Tetracycline-regulated cardiac gene expression *in vivo*". *J Clin Invest* **93**(4): 1864-8.
- Futcher, A. B. (1988).** "The 2 micron circle plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*". *Yeast* **4**(1): 27-40.
- Gellissen, G. and C. P. Hollenberg (1997).** "Application of yeasts in gene expression studies: a comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis* -- a review". *Gene* **190**(1): 87-97.
- Gellissen, G., G. Kunze, et al. (2005).** "New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adeninivorans* and *Yarrowia lipolytica* - a comparison". *FEMS Yeast Res* **5**(11): 1079-96.
- Gellissen, G., K. Melber, et al. (1992).** "Heterologous protein production in yeast". *Antonie Van Leeuwenhoek* **62**(1-2): 79-93.
- Gellissen, G., U. Weydemann, et al. (1992).** "Progress in developing methylotrophic yeasts as expression systems". *Trends Biotechnol* **10**(12): 413-7.
- Goeddel, D. V. (1990).** "Systems for heterologous gene expression". *Methods Enzymol* **185**: 3-7.
- Gossen, M. and H. Bujard (1992).** "Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters". *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(12): 5547-51.
- Guarente, L. (1983).** "Yeast promoters and lacZ fusions designed to study expression of cloned genes in yeast". *Methods Enzymol* **101**: 181-91.
- Hinnen, A., F. Buxton, et al. (1995).** "Gene expression in recombinant yeast". *Bioprocess Technol* **22**: 121-93.
- Hinnen, A., B. Meyhack, et al. (1989).** "Heterologous gene expression in yeast". *Biotechnology (Reading, Mass.)* **13**: 193-213.
- Johnston, M. a. C., M. (1992).** Regulation of carbon and phosphate utilization. *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*. E. W. Jones, Pringle, J. R. and Broach, J. R. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press. **2**: 193-281.
- Kramer, R. A., T. M. DeChiara, et al. (1984).** "Regulated expression of a human interferon gene in yeast: control by phosphate concentration or temperature". *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(2): 367-70.
- Louvion, J. F., B. Havaux-Copf, et al. (1993).** "Fusion of GAL4-VP16 to a steroid-binding domain provides a tool for gratuitous induction of galactose-responsive genes in yeast". *Gene* **131**(1): 129-34.
- Macreadie, I. G., O. Horaitis, et al. (1991).** "Improved shuttle vectors for cloning and high-level Cu(2+)-mediated expression of foreign genes in yeast". *Gene* **104**(1): 107-11.
- Mountain, H. A., A. S. Bystrom, et al. (1991).** "Four major transcriptional responses in the methionine/threonine biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae*". *Yeast* **7**(8): 781-803.
- Mumberg, D., R. Muller, et al. (1994).** "Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression". *Nucleic Acids Res* **22**(25): 5767-8.
- Mumberg, D., R. Muller, et al. (1995).** "Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds". *Gene* **156**(1): 119-22.
- No, D., T. P. Yao, et al. (1996).** "Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice". *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(8): 3346-51.
- Parent, S. A., C. M. Fenimore, et al. (1985).** "Vector systems for the expression, analysis and cloning of DNA sequences in *S. cerevisiae*". *Yeast* **1**(2): 83-138.
- Porro, D., M. Sauer, et al. (2005).** "Recombinant protein production in yeasts". *Mol Biotechnol* **31**(3): 245-59.
- Reiser, J., V. Glumoff, et al. (1990).** "Transfer and expression of heterologous genes in yeasts other than *Saccharomyces cerevisiae*". *Adv Biochem Eng Biotechnol* **43**: 75-102.
- Rine, J. (1991).** "Gene overexpression in studies of *Saccharomyces cerevisiae*". *Methods Enzymol* **194**: 239-51.
- Romanos, M. A., C. A. Scorer, et al. (1992).** "Foreign gene expression in yeast: a review". *Yeast* **8**(6): 423-88.

ES 2 301 375 B1

Rose, M. D., Winston, F. and Hieter, P. (1990). *Methods in Yeast Genetics: A Laboratory Course Manual*. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

5 **Schneider, J. C. and L. Guarente (1991).** "Vectors for expression of cloned genes in yeast: regulation, overproduction, and underproduction". *Methods Enzymol* **194**: 373-88.

West, R. W., Jr. (1988). "Molecular cloning vectors of *Saccharomyces*: generalized cloning vectors". *Biotechnology* **10**: 387-404.

10 **West, R. W., Jr., R. R. Yocum, et al. (1984).** "*Saccharomyces cerevisiae* GAL1-GAL10 divergent promoter region: location and function of the upstream activating sequence UASG". *Mol Cell Biol* **4**(11): 2467-78.

Yocum, R. R., S. Hanley, et al. (1984). "Use of lacZ fusions to delimit regulatory elements of the inducible divergent GAL1-GAL10 promoter in *Saccharomyces cerevisiae*". *Mol Cell Biol* **4**(10): 1985-98.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la expresión regulada de genes introducidos por tecnología del ADN recombinante en células eucarióticas **caracterizado** por el uso de
- a. al menos un activador transcripcional heterólogo, cuya concentración intracelular y actividad intrínseca son reguladas simultáneamente por una misma molécula efectora exógena.
 - 10 b. un promotor que es diana de dicho activador y que dirige la expresión de dichos genes recombinantes introducidos.
- 15 2. Procedimiento para la expresión regulada de genes según la reivindicación 1 **caracterizado** porque la expresión del activador transcripcional heterólogo está controlada por al menos otro activador transcripcional heterólogo cuya actividad intrínseca está regulada por la misma molécula efectora exógena.
3. Procedimiento para la expresión regulada de genes según la reivindicación 1 **caracterizado** porque la expresión del activador transcripcional heterólogo está controlada por un promotor que es inducible por el mismo activador transcripcional heterólogo en presencia de la molécula efectora exógena.
- 20 4. Procedimiento para la expresión regulada de genes según las reivindicaciones 1 a 3 **caracterizado** porque al menos uno de los activadores transcripcionales heterólogos es un polipéptido quimérico constituido por
- a. Un dominio de unión al ADN
 - 25 b. Un dominio activador de la transcripción
 - c. Un dominio sensor de la molécula efectora exógena que regula la actividad del polipéptido quimérico.
- 30 5. Procedimiento para la expresión regulada de genes según la reivindicación 4 en la que la secuencia de ADN codificante para el polipéptido quimérico comprende una secuencia de ADN codificante para un dominio sensor que proviene de la secuencia del dominio de unión a hormona de un receptor de estrógenos.
- 35 6. Procedimiento para la expresión regulada de genes según la reivindicación 4 en la que la secuencia de ADN codificante para el polipéptido quimérico comprende una secuencia codificante para un dominio de unión a ADN que proviene de la secuencia del gen *GALA* de *Saccharomyces cerevisiae*.
- 40 7. Procedimiento para la expresión regulada de genes según la reivindicación 4 en la que la secuencia de ADN codificante para el polipéptido quimérico comprende una secuencia de ADN codificante para un dominio activador de la transcripción que proviene del gen VP16 del virus Herpes simplex.
- 45 8. Procedimiento para la expresión regulada de genes según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 **caracterizado** porque al menos uno de los activadores transcripcionales heterólogos es un receptor de estrógenos.
9. Procedimiento para la expresión regulada de genes según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3 y 8 **caracterizado** porque al menos uno de los activadores transcripcionales heterólogos es el receptor de estrógenos humano.
- 50 10. Procedimiento para la expresión regulada de genes según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, 8 y 9 **caracterizado** porque la molécula efectora exógena tiene actividad estrogénica.
- 55 11. Procedimiento para la expresión regulada de genes según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, y 8 a 10 **caracterizado** porque la molécula efectora exógena es el β -estradiol o alguno de sus derivados.
12. Procedimiento de la reivindicación 1 a 3 **caracterizado** porque la secuencia del promotor diana de al menos un activador transcripcional heterólogo es derivada del promotor *GALI-GAL10* de *Saccharomyces cerevisiae*.
- 60 13. Procedimiento de las reivindicaciones 1 a 11 **caracterizado** porque el promotor diana de al menos un activador transcripcional heterólogo contiene al menos un elemento de respuesta a estrógenos que le permite ser reconocido por el dominio de unión a ADN del receptor de estrógenos.
- 65 14. Procedimiento para la expresión regulada de genes según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 en la que el promotor o promotores terminales que dirigen la expresión de los genes recombinantes contienen secuencias del promotor *GALI-GAL10* de *Saccharomyces cerevisiae*.
15. Procedimiento para la expresión regulada de genes según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 en la que el promotor o promotores terminales que dirigen la expresión de los genes recombinantes contienen secuencias de al menos un elemento de respuesta a estrógenos que le permite ser reconocido por el dominio de unión a ADN del receptor de estrógenos.

ES 2 301 375 B1

16. Procedimiento para la expresión regulada de genes según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 en la que las secuencias codificantes de los activadores transcripcionales heterólogos se hallan integradas en al menos un plásmido.

5 17. Procedimiento para la expresión regulada de genes según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 en la que las secuencias codificantes de los activadores transcripcionales heterólogos se hallan integradas en alguno de los cromosomas de la célula hospedadora del sistema de expresión.

10 18. Procedimiento para la expresión regulada de genes según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 en la que al menos un promotor terminal y el gen o genes por él controlados se hallan integrados en un vector plasmídico o en un cromosoma artificial.

15 19. Procedimiento para la expresión regulada de genes según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 en la que al menos un promotor terminal y el gen o genes por él controlados se hallan integrados en alguno de los cromosomas de la célula hospedadora.

20. Células eucarióticas que contengan las secuencias codificantes de los activadores transcripcionales heterólogos para usarlas en el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19.

20 21. Células de la reivindicación 20 en la que el organismo es del grupo de los ascomicetos.

22. Células de la reivindicación 21 en la que el organismo es *Saccharomyces cerevisiae*.

25 23. Vectores de ADN que contengan el promotor bidireccional GAL1-GAL10 de *Saccharomyces cerevisiae* que por un lado controlen la expresión del activador transcripcional heterólogo quimérico de la reivindicación 6 y divergentemente dirijan la expresión del gen recombinante.

30 24. Uso del procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 para controlar la expresión de polipéptidos de uso en investigación, diagnóstico, enzimas industriales, dianas terapéuticas, o en ingeniería metabólica para superproducir o generar vacunas o nuevos metabolitos de uso industrial o farmacéutico.

35

40

45

50

55

60

65

FIGURAS

Figural

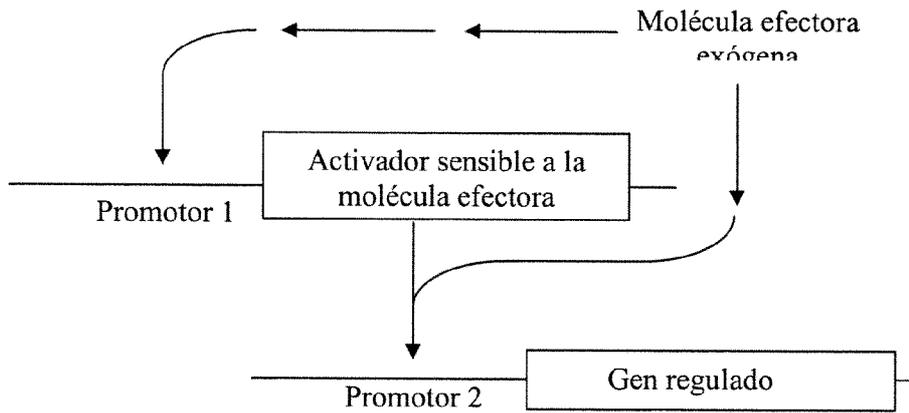


Figura 2

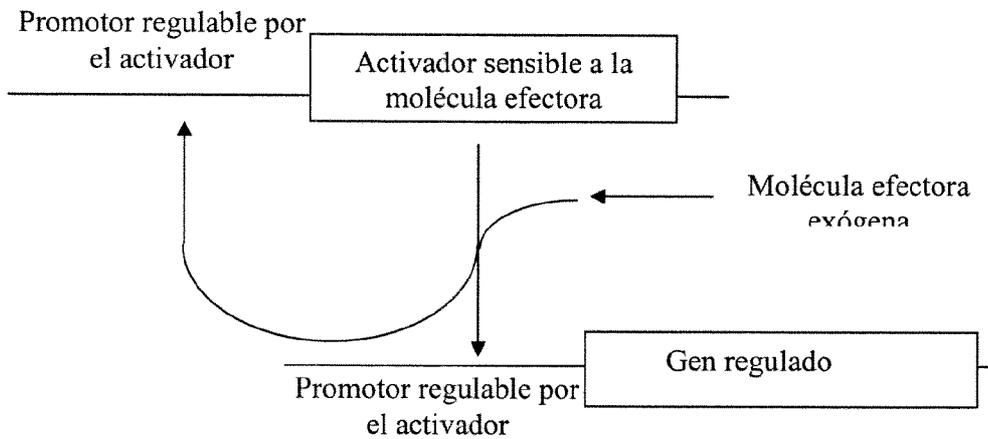


Figura 3

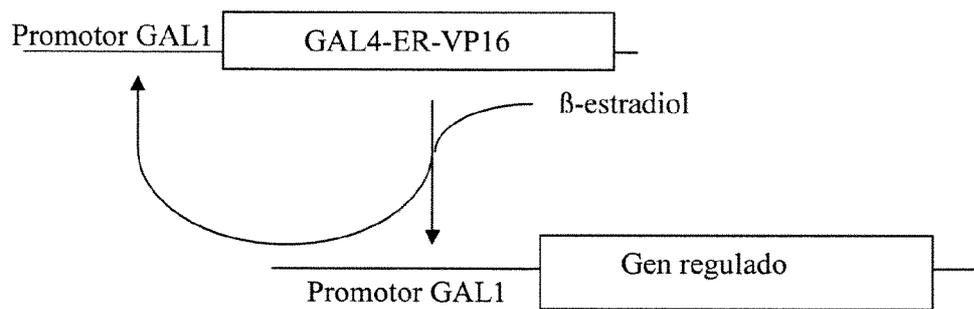


Figura 4

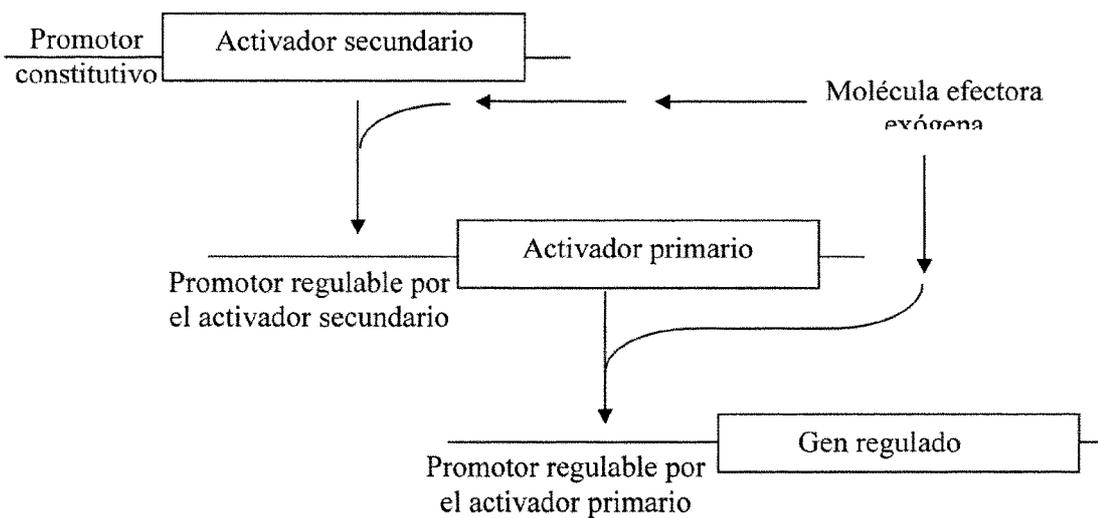


Figura 5

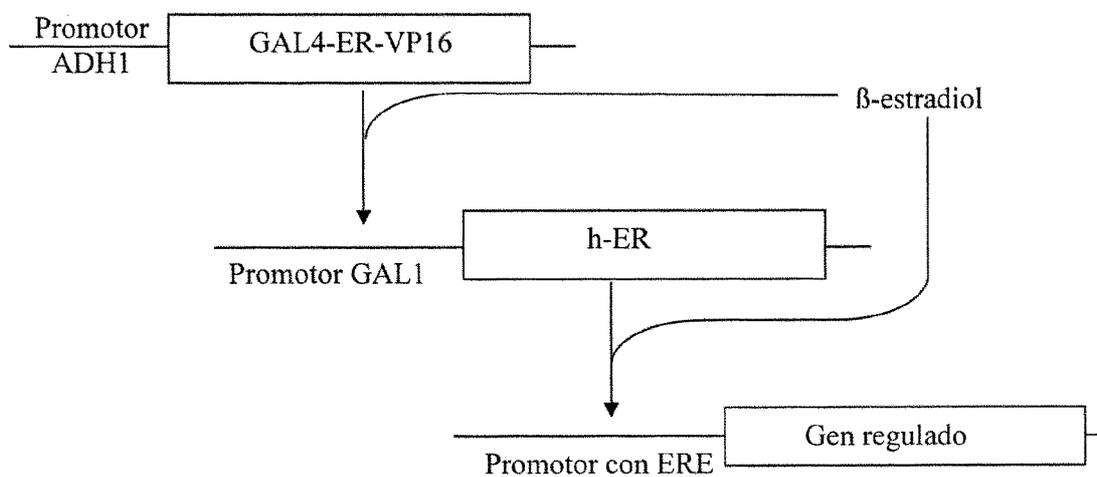


Figura 6

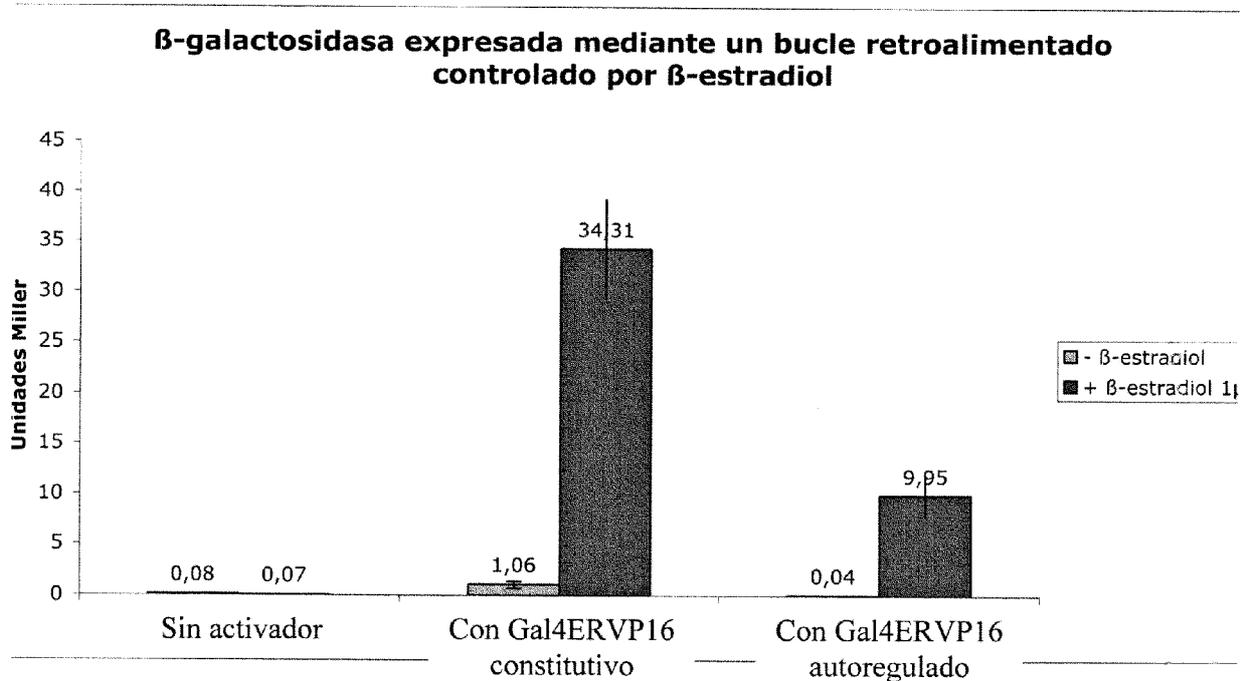
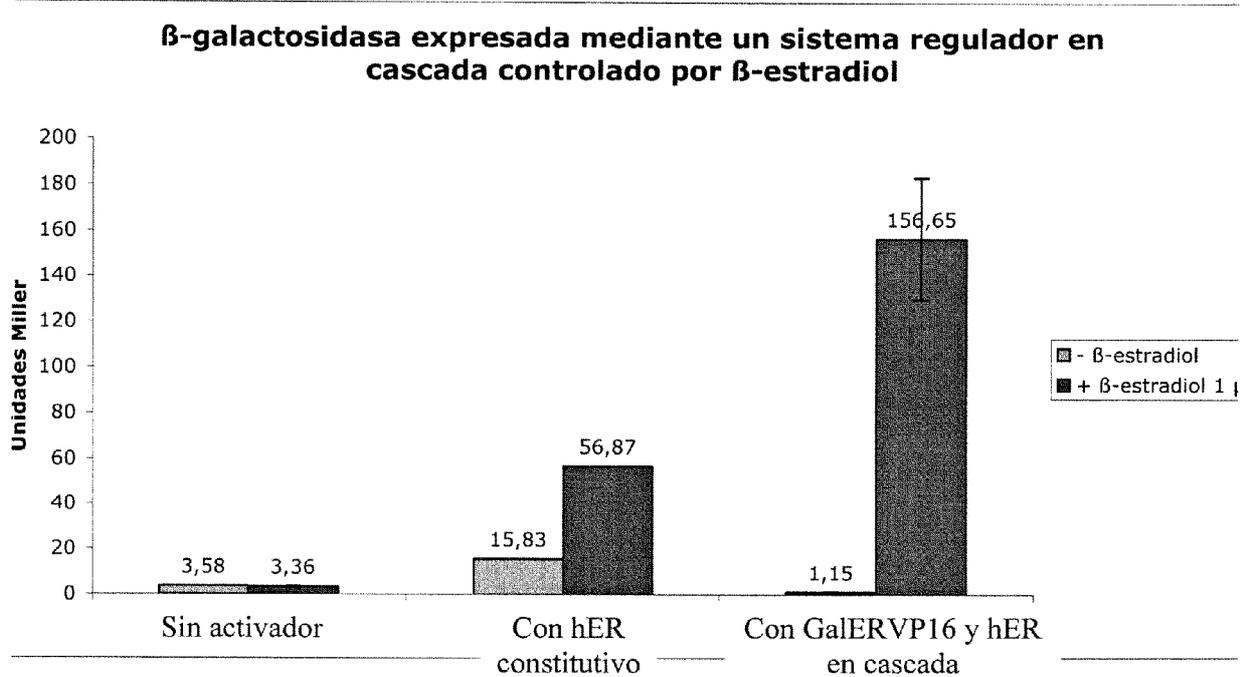


Figura 7





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 301 375

② N° de solicitud: 200601963

③ Fecha de presentación de la solicitud: 19.07.2006

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: C12N 15/79 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	BRASELMANN, S, et al., "A selective transcriptional induction system for mammalian cells based on Gal4-estrogen receptor fusion proteins.", PROC. NATL. ACAD. SCI. U S A., 1993, Vol. 90, No. 5, páginas 1657-1661. Materiales y Métodos; Resultados.	1,3-7, 10-12,14, 16-24
Y	LOUVION, J.F. et al., "Fusion of GAL4-VP16 to a steroid-binding domain provides a tool for gratuitous induction of galactose-responsive genes in yeast.", GENE, 1993, Vol. 131, No. 1, páginas 129-134. Todo el documento.	1,3-7, 10-12,14, 16-24
Y	EP 0252737 A2 (MERCK & CO. INC.) 13.01.1988, ejemplos 1-4; figuras.	1,3-7, 10-12,14, 16-24
Y	STAGOJ, M.N. et al., "A novel GAL recombinant yeast strain for enhanced protein production.", BIOMOL. ENG., 2006 Sep, Vol. 23, No. 4, páginas 195-199. [Artículo publicado 'on line': 18.04.2006]. Materiales y Métodos; Resultados.	1,3-7, 10-12,14, 16-24
Y	IMHOF, M.O. et al., "A regulatory network for the efficient control of transgene expression.", J. GENE MED., 2000, Vol. 2, No. 2, páginas 107-116. Materiales y Métodos; Resultados.	1,3-7, 10-12,14, 16-24
A	BOVEE, T.F. et al., "Development of a rapid yeast estrogen bioassay, based on the expression of green fluorescent protein.", GENE, 2004, Vol. 325, páginas 187-200. Todo el documento.	1-24
A	SHIAU, S.P. et al., "Activation of the human estrogen receptor by estrogenic and antiestrogenic compounds in Saccharomyces cerevisiae: a positive selection system.", GENE, 1996, Vol. 179, No. 2, páginas 205-210. Todo el documento.	1-24

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

21.05.2008

Examinador

J.L. Vizán Arroyo

Página

1/1