

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 217**

51 Int. Cl.:

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.03.2012 PCT/KR2012/002368**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.10.2012 WO2012134215**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2012 E 12764826 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.11.2016 EP 2692867**

54 Título: **Vector de expresión para células animales**

30 Prioridad:

30.03.2011 KR 20110028764

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

15.06.2017

73 Titular/es:

**PANGEN BIOTECH INC. (100.0%)
4F Innoplex-2 552 Woncheon-dong Yeongtong-gu
Suwon, Gyeonggi-do 443-380, KR**

72 Inventor/es:

**YOON, JAESEUNG;
BAEK, KWANGHEE;
BYUN, TAEHO y
PARK, JEONG SOO**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 617 217 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

Vector de expresión para células animales

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un vector de expresión para células animales que tiene una eficacia de expresión génica incrementada.

Técnica precedente

10 A fin de obtener una proteína diana sobreexpresada para usar la proteína diana obtenida para medicina, una industria o similares, se han usado diversos sistemas de expresión tales como un sistema de expresión de microorganismo, un sistema de expresión de planta, un sistema de expresión de levadura, un sistema de expresión de insecto o un sistema de expresión de animal, y similares. Entre ellos, el sistema de expresión de microorganismo, que es el sistema más fácilmente usado, se ha desarrollado como sistemas de expresión adecuados para diversas aplicaciones y se ha comercializado.

15 Sin embargo, el sistema de expresión de microorganismo tiene varios factores limitativos. El principal factor limitativo es que, puesto que el mecanismo de expresión y modificación de la proteína (glicosilación, fosforilación, amidización) del microorganismo es diferente del de una célula animal, aunque se exprese el mismo gen en el sistema de expresión de microorganismo, una estructura o característica de la proteína expresada no es completamente igual que las de la proteína original. Por lo tanto, en caso de producir proteína recombinante usando el sistema de expresión de microorganismo, puesto que una modificación después de la síntesis era difícil de
20 generar, no se genera la inactivación de la proteína producida o una diferencia significativa en las funciones, sino que frecuentemente se expresa proteína modificada o proteína que tiene una diferencia parcial en la estructura. Además, un procedimiento de producción de la proteína recombinante usando el sistema de expresión de microorganismo ha sido difícil ya que se debe realizar un procedimiento de retirada de contaminantes secundario debido a la contaminación del microorganismo, la contaminación del microorganismo con endotoxinas, o similares.

25 Por otra parte, aunque el sistema de expresión de células animales es el sistema más adecuado para la expresión de proteínas animales, el sistema de expresión de células animales tiene un alto coste de producción debido a la baja eficacia de expresión de la proteína recombinante, y un procedimiento operativo de la célula animal es difícil, en comparación con el sistema de expresión de microorganismo, de modo que no es fácil industrializar la expresión de células animales. Como una línea celular animal industrial usada actualmente, existen células de ovario de hámster chino (CHO), células de riñón de cría de hámster (BHK), células de mieloma, o similares. La proteína extraña diana se puede expresar al transfectar un vector de expresión que incluye el gen correspondiente en estas líneas celulares animales.

35 En el caso de que diversos mecanismos de modificación de proteínas incluyendo la glicosilación se mantengan en la célula animal y la proteína se secrete en un medio de cultivo, los procedimientos de obtención y purificación de la proteína se pueden realizar fácilmente. La mayoría de las células animales requieren necesariamente un aditivo compuesto tal como proteína sérica o similares durante un procedimiento de cultivo, pero puesto que la célula CHO se puede cultivar en un medio al que no se añaden suero y proteína, la célula CHO se puede usar como la célula huésped más adecuada para la expresión de proteína recombinante. Además, la célula CHO tiene ventajas ya que
40 se han efectuado diversas investigaciones en las células CHO, de modo que se ha conocido bien la función de las mismas, la velocidad de crecimiento es rápida y se puede realizar un cultivo en suspensión para el cultivo en masa.

45 Generalmente, en caso de permitir que un transgén se exprese en células animales, el transgén y un vector que tiene un marcador se transfectan simultáneamente, y las células transfectadas se cultivan en medio selectivo y se seleccionan. Sin embargo, en la mayoría de los casos, su frecuencia de expresión es significativamente baja. Una de las razones es que estos transgenes se deben integrar en un cromosoma de la célula huésped en la célula animal a diferencia del sistema de microorganismo. Por otra parte, aunque se seleccionen transfectantes estables en los que el transgén esté establemente integrado en el cromosoma de la célula hospedadora, es difícil predecir una
50 cantidad de expresión de los mismos. La razón es que una posición de integración del gen es diferente en cada célula, y un patrón de expresión es diferente según la posición de integración. Por lo tanto, el número de transgenes y la cantidad de expresión del transgén integrado en la célula animal no tienen una correlación clara entre ellos (Grindley y cols., 1987, Trends Genet. 3, 16-22; Kucherlapati y cols., 1984, Crit. Rev. Biochem. 16,349-381; Palmiter y cols., 1986, Annu. Rev. Genet. 20, 465-499). En la mayoría de los casos, la expresión génica en la célula animal es suprimida por bases de ADN alrededor de la posición de integración, de modo que incluso en el caso de transgenes establemente integrados, la expresión a menudo se expresa en un nivel significativamente bajo
55 (Eissenberg y cols., 1991, Trends Genet. 7, 335-340; Palmiter y cols., 1986, Annu. Rev. Genet. 20, 465-499).

60 La disponibilidad de un factor de ADN para proteger la expresión transgénica del efecto específico de la posición génica que se describe anteriormente se ha presentado en diversos sistemas. Como el susodicho factor de ADN, se

5 puede usar un factor aislante, una región de ligazón a la matriz nuclear (en lo sucesivo, denominada "MAR"), una
 10 región de ligazón al armazón (en lo sucesivo, denominada "SAR") o similares. Aunque los mecanismos de operación
 15 de los mismos no se han aclarado, cuando se incluyen factores de ADN en construcciones transgénicas, inducen la
 expresión génica independientemente de la posición de integración, y la cantidad de expresión se determina
 mediante el número de copias del gen (McKnight, R. A. y cols., 1992, Proc. Natl. Acad. US. 89, 6943-6947). Kalos y
 cols. han combinado el elemento de MAR del gen de apolipoproteína B humana con una construcción transgénica
 promotora mínima y han inducido la expresión génica en células animales para incrementar la expresión del
 transcrito en aproximadamente 200 veces (Kalos y cols., 1995, Mol. Cell. Biol. 15, 198-207). De forma similar, se ha
 presentado que el elemento de MAR del gen de lisozima A de pollo, el elemento de SAR de interferón β humano y
 similares confieren expresión transgénica en vertebrados independientemente de una posición de integración en el
 cromosoma de células hospedadores (Eissenberg y cols., 1991, Trends Genet. 7, 335-340; Klehr y cols., 1991,
 Biochemistry 30, 1264-1270). Sin embargo, no se ha presentado todavía un intento de incrementar sustancialmente
 la producción de proteína en líneas celulares usando una combinación del elemento de MAR de globina β
 específico, el elemento de MAR/SAR específico o el elemento de SAR de interferón β específico que se describe
 anteriormente o el caso en el que se identificaba un beneficio industrial.

Esta información divulgada en la presente técnica anterior es solamente para mejorar la comprensión de los
 antecedentes de la presente invención. Por lo tanto, puede no incluirse la información sobre la técnica anterior que
 ya es conocida por los expertos en la técnica.

20 **Sumario**

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un vector de expresión para células animales que comprende
 al menos una copia del elemento de MAR y el elemento de SAR en el extremo 5' de un promotor y/o el extremo 3' de
 un sitio de terminación de la transcripción, todos los cuales están ligados operativamente entre sí dentro del vector
 de expresión, en donde el promotor es un mutante de promotor de EF1 α de ratón y tiene la secuencia génica de
 SEQ ID N° 34.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar una célula animal recombinante que comprende el vector de
 expresión para células animales.

30 Otro objetivo más de la presente invención es proporcionar un método para la producción de una proteína diana, en
 donde el método comprende las etapas de (a) cultivar una célula animal recombinante usando el vector de expresión
 para células animales a fin de expresar la proteína diana y (b) recuperar la proteína diana.

35 Según un aspecto de la presente invención, se proporciona un vector de expresión para células animales que
 comprende al menos una copia del elemento de MAR o el elemento de SAR en el extremo 5' de un promotor y/o el
 extremo 3' de un sitio de terminación de la transcripción, todos los cuales están ligados operativamente entre sí
 dentro del vector de expresión, en donde el promotor es un mutante de promotor de EF1 α de ratón y tiene la
 secuencia génica de SEQ ID N° 34.

40 Según un aspecto de la presente invención, se proporciona un vector de expresión para células animales que
 comprende un factor de incremento de la expresión génica seleccionado de un grupo que consiste en al menos una
 copia de un elemento de MAR de globina β , un elemento de SAR de CSP-B y un elemento de SAR de interferón β
 en un extremo 5' de un promotor y/o un extremo 3' de un sitio de terminación de la transcripción, todos los cuales
 están ligados operativamente entre sí dentro del vector de expresión.

45 Según un aspecto de la presente invención, se proporciona un vector de expresión para células animales que
 comprende un elemento de MAR y un elemento de SAR, que son factores de incremento de la expresión génica, en
 el extremo 5' de un promotor y/o el extremo 3' de un sitio de terminación de la transcripción, todos los cuales están
 ligados operativamente entre sí dentro del vector de expresión, en donde el promotor es un mutante de promotor de
 EF1 α y tiene la secuencia génica de SEQ ID N° 34.

50 Según un aspecto de la presente invención, se proporciona un vector de expresión para células animales que
 comprende un elemento de MAR de globina β y un elemento de SAR de CSP-B, que son factores de incremento de
 la expresión génica, en el extremo 5' de un promotor y/o el extremo 3' de un sitio de terminación de la transcripción,
 55 todos los cuales están ligados operativamente entre sí dentro del vector de expresión, en donde el promotor es un
 mutante de promotor de EF1 α de ratón y tiene la secuencia génica de SEQ ID N° 34.

Según un aspecto de la presente invención, se proporciona un microorganismo recombinante que comprende el
 vector de expresión para células animales.

60 Según un aspecto de la presente invención, se proporciona una célula animal recombinante que comprende el
 vector de expresión para la célula animal, en donde la célula animal se selecciona del grupo que consiste en células

CHO, células Hela, células BHK, células NIH/3T3, células COS-1, células COS-7, células CHO-K1 y células HEK293.

5 Según un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para la producción de una proteína diana, en donde el método comprende las etapas de (a) cultivar una célula animal recombinante a fin de expresar la proteína diana y (b) recuperar la proteína diana expresada.

Otras características y realizaciones de la presente invención se harán obvias a partir de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones adjuntas.

10 **Breve descripción de los dibujos**

La FIG. 1 es un diagrama de configuración que muestra esquemáticamente combinaciones de diversos elementos de MAR y elementos de SAR incluidos en cada vector.

La FIG. 2 es un mapa de un vector de expresión pC(F)mEGM(R).

La FIG. 3 es un mapa de un vector de expresión pM(R)mEGC(F).

15 La FIG. 4 es un mapa de un vector de expresión pM(R)M(R)mEG.

La FIG. 5 muestra los resultados obtenidos al medir la velocidad de expresión de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) humano usando un método de ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA) después de transfectar los vectores pl(F)SG, pl(R)SG, pSGI(F), pSGI(R), pC(F)SG, pC(R)SG, pSGC(F), pSGC(R), pM(R)SG, pM(F)SG, pSGM(F) y pSGM(R) a líneas de células hospedadoras cultivadas adherentes.

20 La FIG. 6 muestra los resultados obtenidos al medir la velocidad de expresión del VEGF usando el método de ELISA después de transfectar los vectores pl(F)SG, pl(R)SG, pSGI(F), pSGI(R), pC(F)SG, pC(R)SG, pSGC(F), pSGC(R), pM(R)SG, pM(F)SG, pSGM(F) y pSGM(R) en líneas de células hospedadoras cultivadas en suspensión.

25 La FIG. 7 muestra los resultados obtenidos al medir la velocidad de expresión del VEGF usando el método de ELISA con respecto a los vectores pl(F)SGM(F), pl(R)SGM(R), pl(R)SGI(F), pl(R)SGI(R), pl(R)SGC(F), pl(R)SGC(R), pC(F)SGM(F), pC(F)SGM(R), pC(F)SGI(F), pC(F)SGI(R), pC(F)SGC(F), pC(F)SGC(R), pC(F)C(F)SG, pM(R)SGC(F), pM(R)SGC(R), pM(R)SGI(F), pM(R)SGI(R), pM(R)SGM(R) y pM(R)M(R)SG.

La FIG. 8 muestra los resultados obtenidos al medir la velocidad de expresión del VEGF usando el método de ELISA con respecto a pC(F)SGM(R), pM(R)SGC(F) y pM(R)M(R)SG.

30 La FIG. 9 muestra los resultados obtenidos al medir la velocidad de expresión del VEGF usando el método de ELISA después de sustituir un promotor de SV40 de los vectores de la FIG. 8 por un mutante de promotor de mEF1 α . Aquí, un promotor de pmEF1 α^* indica en mutante de promotor de mEF1 α .

La FIG. 10 muestra los resultados obtenidos al medir la velocidad de expresión de una proteína de anticuerpo recombinante después de sustituir una proteína diana de los vectores de la FIG. 9 por la proteína de anticuerpo recombinante. Aquí, el promotor de pmEF1 α indica el mutante de promotor de mEF1 α .

35 La FIG. 11 muestra los resultados obtenidos al medir la velocidad de expresión de una proteína de anticuerpo recombinante de pM(R)SG, pMhEG, pMcEG, pMmEG y pMmEG(TA).

Descripción detallada de las realizaciones

40 A menos que se defina otra cosa en la presente, los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria descriptiva tienen los mismos significados que se entienden por los especialistas en la técnica de la que trata la presente invención. Generalmente, la nomenclatura usada en la presente memoria descriptiva es muy conocida y usada comúnmente en la técnica.

45 La presente invención se refiere a un vector de expresión para células animales que tiene un incremento de la eficacia de expresión génica, y particularmente a un vector de expresión para células animales que comprende un elemento de MAR y un elemento de SAR, que son factores de incremento de la expresión génica, en el extremo 5' de un promotor y/o el extremo 3' de un sitio de terminación de la transcripción, todos los cuales están ligados

operativamente entre sí dentro del vector de expresión, en donde el promotor es un mutante de promotor de EF1 α de ratón y tiene la secuencia génica de SEQ ID N° 34.

A fin de incrementar significativamente una cantidad de expresión de genes en el momento de la expresión de genes extraños, los presentes inventores inventaron un factor para proteger a la expresión de genes extraños de un efecto inhibitor específico de la posición de un cromosoma de la célula hospedadora e incrementar la expresión de los genes extraños en células de ovario de hámster chino (CHO), células de riñón de cría de hámster (BHK) o similares, que se conocen como células animales.

Con detalle, se construyó un vector usando una región de unión a la matriz nuclear (en lo sucesivo, mencionada en la presente memoria como "MAR") y una región de unión al armazón (en lo sucesivo, mencionada en la presente memoria como "SAR") de modo que se incluyan al menos una o dos copias del elemento de MAR o el elemento de SAR en el extremo 5' del promotor o el extremo 3' del sitio de terminación de la transcripción, y las capacidades del vector de expresión se compararon y se analizaron.

En primer lugar, a fin de asegurar una secuencia del elemento de MAR o el elemento de SAR, los ADN genómicos correspondientes se separaron de las células correspondientes y a continuación se clonaron en un vector de *Escherichia coli* usando un método de reacción en cadena de polimerización (PCR) del ADN genómico correspondiente y un método de subclonación, asegurando de ese modo diversos elementos de MAR y elementos de SAR. Preferiblemente, el elemento de MAR y el elemento de SAR se pueden seleccionar de un grupo que consiste en MAR de globina β humana (Yu, J., Bock, J. H., Slightom, J. L. y Villeponteau, B., *Gene* 139(2), 139-145 (1994), n° de registro del Genbank: L22754), SAR que flanquea gen de CSP-B humano (Hanson, R. D. and Ley, T. J., N° de Registro del Genbank: M62716) y SAR que flanquea gen de interferón β humano (Mielke, C., Kohwi, Y., Kohwi-Shigematsu, T. y Bode, J., *Biochemistry* 29, 7475-7485 (1990), N° de Registro del Genbank: M83137).

En la presente invención, el vector de expresión para células animales puede ser un vector de expresión para células animales que comprende al menos una copia del factor de incremento de la expresión génica seleccionado del grupo que consiste en el elemento de MAR de globina β , el elemento de SAR de CSP-B y el elemento de SAR de interferón β en cada uno del extremo 5' del promotor y el extremo 3' del sitio de terminación de la transcripción, todos los cuales están ligados operativamente entre sí dentro del vector de expresión.

Además, el vector de expresión para células animales puede ser un vector de expresión para células animales que comprende al menos una copia del factor de incremento de la expresión génica seleccionado el grupo que consiste en el elemento de MAR de globina β , el elemento de SAR de CSP-B y el elemento de SAR de interferón β en el extremo 5' del promotor o el extremo 3' del sitio de terminación de la transcripción, todos los cuales están ligados operativamente entre sí dentro del vector de expresión.

Particularmente, el vector de expresión para células animales puede comprender al menos dos copias del factor de incremento de la expresión génica. Esto es, el vector de expresión para células animales comprende al menos dos copias del factor de incremento de la expresión génica en el extremo 5' del promotor o el extremo 3' del sitio de terminación de la transcripción. Alternativamente, un incremento en la expresión del gen extraño se puede inducir al contener al menos una copia del factor de incremento de la expresión génica en el extremo 5' del promotor o el extremo 3' del sitio de terminación de la transcripción, respectivamente.

Además, más preferiblemente, el vector de expresión para células animales puede incluir tanto el elemento de MAR como el elemento de SAR, que son el factor de incremento de la expresión génica, en el extremo 5' del promotor, el extremo 3' del sitio de terminación de la transcripción o tanto el extremo 5' del promotor como el extremo 3' del sitio de terminación de la transcripción.

En la presente invención, el término "promotor" significa una secuencia de ADN de una región no traducida aguas arriba de una región codificada, que incluye un sitio de unión a polimerasa que tiene una actividad de inicio de la transcripción de genes aguas abajo del promotor en ARNm. Más específicamente, el "promotor" incluye una secuencia TATA situada de 20 a 30 bases aguas arriba desde un sitio de inicio de la transcripción (+1) y que sirve para permitir que la ARN polimerasa inicie la transcripción desde una posición exacta o una región similar a la secuencia TATA, pero no se limita a aguas arriba y aguas abajo de estas regiones. Además de estas regiones, el promotor puede incluir una región requerida para acumular una proteína para regular la expresión, excepto para la ARN polimerasa. En la presente invención, el promotor puede ser un mutante de promotor de EF-1 α de ratón y que tiene la secuencia génica de SEQ ID N° 34. Según se usa en la presente, el término "mutante" significa un mutante obtenido al añadir, suprimir o sustituir una parte de la secuencia del promotor a fin de incrementar la expresión génica.

Además, el promotor está ligado operativamente a fin de inducir la expresión del gen diana, que es un gen extraño. Aquí, el término "ligado operativamente" significa que una secuencia reguladora de la expresión de ADN y una secuencia de ADN que codifica la proteína diana están conectadas funcionalmente entre sí a fin de realizar funciones generales. La ligazón operativa con un vector recombinante se puede realizar usando una tecnología de

recombinación génica muy conocida en la técnica y, en el momento de la escisión y ligazón de ADN específicas de un sitio, se pueden usar enzimas generalmente conocidas en la técnica, o similares.

5 En la presente invención, el gen diana, que es un gen que codifica un producto extraño que se va a expresar, es un gen que codifica todos los tipos de proteínas capaces de ser expresadas como proteínas recombinantes. Como un ejemplo representativo de la proteína que se describe anteriormente, están la insulina, citocinas (interleucina, un factor de necrosis tumoral, interferón, un factor estimulante de colonias, una quimiocina, y similares), eritropoyetina, y similares. El gen diana incluye un "sitio de clonación", que es una secuencia de ADN que incluye un sitio de reconocimiento o escisión de una enzima de restricción introducida en el mismo a fin de que esté integrada en el vector.

10 En la presente invención, el factor de incremento de la expresión génica puede ser el elemento de la región de unión a la matriz (MAR) de globina β , el elemento de SAR de CSP-B o el elemento de SAR de interferón β , en donde el término "región de unión a la matriz (MAR)" indica una secuencia de ADN que une temporalmente un dominio de bucle de ADN transcripcionalmente activo a una red proteínica conocida como matriz nuclear (Pienta y cols. (1991) Crit. Rev. Eukaryotic Gene Expres. 1:355-385). Diversos ejemplos de la secuencia de MAR se conocen en la técnica.

15 En la presente invención, un ejemplo del sitio de terminación de la transcripción puede incluir cualquier sitio de terminación de la transcripción conocido en la técnica relacionada. Preferiblemente, el sitio de terminación de la transcripción puede ser un sitio de terminación de la transcripción de gastrina, y poliA puede estar unida al mismo. Por ejemplo, se puede incluir una señal de poliadenilación (poliA) de hormona del crecimiento humana, una señal de poliadenilación (poliA) de hormona del crecimiento bovina o una señal de poliadenilación (poliA) de virus SV40.

20 Los presentes inventores seleccionaron y construyeron un terminador del gen de gastrina humana del que se sabe exactamente que una señal de poliA esencial para la terminación de la transcripción, un sitio de escisión y un sitio de terminación aplican el terminador del gen de gastrina construido al vector de expresión de la presente invención a fin de mejorar la eficacia del vector de expresión al incrementar la estabilidad del ARNm. La gastrina está compuesta por un fragmento de 603 pb en el que la señal de poli-A, el sitio de escisión y el terminador se incluyen en un mapa enzimático de restricción de HindIII, en donde la señal de poli-A y el sitio de escisión están separados entre sí por 15 pb, y el terminador está separado de la señal de poli-A por aproximadamente 220 pb. La transcripción se termina en el sitio de terminación de la transcripción de la gastrina situada como se describe anteriormente, y la escisión del ARNm y la poliadenilación (poli-A) se generan en el sitio de escisión.

25 En la presente invención, el vector de expresión para células animales puede ser un vector que incluye una copia del elemento de MAR de globina β , el elemento de SAR de CSP-B o el elemento de SAR de interferón β en el extremo 5' del promotor o el extremo 3' del sitio de terminación de la transcripción.

30 En la presente invención, la combinación de los factores de incremento de la expresión génica pueden ser las configuraciones mostradas en la FIG. 1. La FIG. 1 muestra esquemáticamente una secuencia de enlace del factor de incremento de la expresión génica, el promotor, la poliA y el terminador en el vector de expresión para células animales. Aquí, el promotor es el mutante del promotor de mEF1 α y MAR/SAR es el elemento de MAR de globina β , el elemento de SAR de CSP-B o el elemento de SAR de interferón β . También se divulgan el promotor de SV40 y el promotor de mEF1 α .

35 En la presente invención, el vector de expresión para células animales puede ser un vector que comprende el elemento de MAR y el elemento de SAR en el extremo 5' del promotor y/o el extremo 3' del sitio de terminación de la transcripción. En este caso, el elemento de MAR y el elemento de SAR pueden ser adyacentes entre sí o pueden estar separados uno de otro por una secuencia codificante o no codificante.

40 Como un ejemplo específico de la presente invención, el vector de expresión para células animales puede ser un vector que comprende una copia del elemento de MAR de globina β en el extremo 5' del promotor y una copia del elemento de SAR de CSP-B en el extremo 3' del sitio de terminación de la transcripción.

45 Como un ejemplo específico de la presente invención, el vector de expresión para células animales puede ser un vector que comprende una copia del elemento de MAR de globina β en el extremo 5' del promotor y una copia del elemento de SAR de interferón β en el extremo 3' del sitio de terminación de la transcripción.

50 Como un ejemplo específico de la presente invención, el vector de expresión para células animales puede ser un vector que comprende una copia del elemento de SAR de CSP-B en el extremo 5' del promotor y una copia del elemento de MAR de globina β en el extremo 3' del sitio de terminación de la transcripción.

55 Como un ejemplo específico de la presente invención, el vector de expresión para células animales puede ser un vector que comprende una copia del elemento de SAR de interferón β en el extremo 5' del promotor y una copia del elemento de MAR de globina β en el extremo 3' del sitio de terminación de la transcripción.

En la presente invención, cuando se incluyen dos copias de los elementos de MAR de globina β , los elementos de SAR de CSP-B o los elementos de SAR de interferón β , es preferible que las dos copias de los elementos de MAR o de SAR se puedan situar continuamente a fin de ser adyacentes entre sí o estar espaciadas una de otra por una región espaciadora relativamente corta.

5 En la presente invención, el vector puede incluir factores de incremento de la expresión génica incluyendo el elemento de MAR de globina β , el elemento de SAR de CSP-B y el elemento de SAR de interferón β como orientación directa o inversa. Aquí, la orientación de cada uno de los factores de incremento de la expresión génica puede ser diferente según la combinación específica de estos factores.

10 En el Ejemplo de la presente invención, se confirmó que en el caso de usar un mutante de promotor de mEF1 α que tiene una secuencia de SEQ ID N° 34, la productividad del anticuerpo se incrementaba en 5 veces o más en todos los vectores que tenían los elementos de MAR y SAR en comparación con el caso de un promotor de SV40, y particularmente la productividad de un vector pC(F)mEGM(R) se incrementaba en 10 veces o más. Puesto que se analizó que la productividad medida después de sustituir el promotor de SV40 por el promotor de mEF1 α y ser adaptada a una concentración de MTX de 0 nM era superior aproximadamente 2 veces en comparación con la productividad asegurada después de amplificar con MTX en el caso de usar el promotor de SV40, el resultado que se describe anteriormente indica que se pueden asegurar líneas celulares de alta expresión sin realizar la amplificación con MTX. Por lo tanto, la presente invención se caracteriza por usar el mutante de promotor de mEF1 α que tiene una secuencia de SEQ ID N° 34.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a células recombinantes o animales transformadas con el vector de expresión para células animales.

25 Aquí, las células animales pueden ser células CHO, células Hela, células BHK, células NIH/3T3, células COS-1, células COS-7, células CHO-K1, células HEK293 o similares, que son líneas celulares animales generalmente conocidas. También se describen las células SP2/0, células NSO, células PER.C6 o similares.

30 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para la producción de una proteína diana usando un vector de expresión para células animales y caracterizado por cultivar la célula animal recombinante a fin de expresar la proteína diana y recuperar la proteína diana.

35 En la presente invención, el método de producción puede incluir: (a) integrar un gen diana en el vector de expresión para células animales de modo que la expresión sea regulada por el promotor; (b) transfectar células animales con el vector de expresión para células animales en el que está integrado el gen diana; y (c) cultivar la célula animal recombinante transfectada para expresar la proteína diana y recuperar la proteína diana.

40 En lo sucesivo, la presente invención se describirá con detalle a través de los Ejemplos. Sin embargo, estos Ejemplos son solamente para ilustrar la presente invención, y los expertos en la técnica apreciarán que estos Ejemplos no se han de considerar limitativos de un alcance de la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1 Clonación de elementos de MAR y SAR

45 Se aseguró ADN de MAR/SAR mediante un método de PCR después de separar ADN genómico usando un estuche de separación de ADN de líneas celulares Hep G-2 (Wizard Genomic DNA purification kit, Promega, EE. UU.).

50 Se usaron como plantilla 200 ng del ADN genómico separado, y se añadieron 25 pmol de cada cebador, dNTP (0,5 mM) y ADN polimerasa de ExTaq (Takara Shuzo Co., Japón), realizando de ese modo una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las secuencias de los cebadores usados para cada uno de los elementos de MAR/SAR y los tamaños de los fragmentos de ADN obtenidos mediante la PCR se muestran en la siguiente Tabla 1. La reacción en cadena de la polimerasa se realizó usando un GeneAmp PCR system 9600 (Perkin - Elmer Corp., EE. UU.) y las condiciones de la PCR se mostraban en la siguiente Tabla 2.

Tabla 1

Elemento de MAR/SAR	Tamaños de ADN	Cebador	Secuencia N°
MAR de globina β humana	2969 pb	5' - TTT TTC CTC TTT AGG TTC TC -3'	SEQ ID NO: 1
		5' - CCT CCT GAG TAG CTG GGG AC -3	SEQ ID NO: 2
SAR de CSP-B	1233 pb	5' - GGA TCC CAT TCT CCT TGA TG -3'	SEQ ID NO: 3
		5' - GAA TTC AAA CAA	SEQ ID NO:
		CTC AAT AG -3'	4
SAR de interferón- β	2168 pb	5' - GAA TTC AGC AAG GTC GCC AC -3'	SEQ ID NO: 5
		5' - TTG TAT CAA CTT TCT ACA AT -3'	SEQ ID NO: 6

Tabla 2

Etapas	Condiciones	Ciclo
1	94°C, 2 min.	1
2	94°C, 40 s; 65°C, 40 s; 72°C, 40 s	2-31
3	72°C, 10 min.	32

5 Los productos de PCR obtenidos de la MAR de globina β humana, la SAR de CSP-B y la SAR de interferón- β se subclonaron en un vector pT7blue (R) (Novagene, EE. UU.) o pCR 2.1 (Invitrogen, EE. UU.). La MAR de globina β humana se subclonó en el vector pT7blue (R) y la SAR de CSP-B y la SAR de interferón- β se subclonaron en el vector pCR 2.1.

10 Ejemplo 2: Construcción de vector de expresión para células animales

2-1: Construcción de vectores pSV- β -gal/versión I y versión II

A fin de clonar eficazmente los elementos de MAR y SAR subclonados en el vector pT7blue (R) y el vector pCR 2.1, frente a un promotor de un vector pSV- β -gal, se construyeron los vectores recombinantes pSV- β -gal versión I y versión II.

5 En primer lugar, después de construir un cebador (SEQ ID N° 7) que incluye un sitio de enzimas de restricción de Spe I-Sma I-Apa I-EcoR I y un cebador (SEQ ID N° 8) que incluye Hind III en el extremo 3' y realizar una PCR para un promotor de SV40 de un vector pSV-β-gal (Promega Co., EE. UU.), un fragmento tratado con Spe I-Hind III de 443 pb que incluía el promotor de SV40 se separó, se purificó y se recuperó de gel de agarosa usando un gene clean III kit (BIO 101 Co.). A continuación, este fragmento se integró en y se ligó a un pBluescript SK(+) linealizado (Stratagene Co., EE. UU.) tratado con Spe I/Hind III, que eran las mismas enzimas de restricción, construyendo de ese modo un vector promotor pBluescript/SV40 I. Posteriormente, el vector promotor pBluescript/SV40 I construido se trató con las enzimas de restricción Sca I y Hind III, de modo que un fragmento que incluía el promotor de SV40 se purificó, se separó y se recuperó del gel de agarosa mediante el método susodicho. Más adelante, el fragmento se integró en y se ligó al vector pSV-β-gal linealizado tratado con las mismas enzimas de restricción, completando de ese modo el vector de la versión I (pSV-β-gal/versión I).

SEQ ID N° 7: Cebador de sentido para construir el vector pSV-beta-gal/ver1

5'-GCACTAGTCC CGGGCCCATG ATTACGAATT CGCGCAGCACCAT-3'

SEQ ID N° 8: Cebador antisentido para construir el vector pSV-beta-gal/ver1

15 5'-GCAAGCTTTT TGCAAAGCC TAGGCCTCC-3'

20 A fin de construir un vector pSV-β-gal versión II recombinante, después de que el vector pSV-β-gal se tratara con EcoR I y Hind III, de modo que un fragmento EcoR I/Hind III de 420 pb que incluía el promotor de SV40 se purificara, se separara y se recuperara del gel de agarosa mediante el método susodicho. A continuación, este fragmento se integró en y se ligó a un vector pBluescript SK(+) linealizado tratado con EcoR I y Hind III, que eran las mismas enzimas de restricción, construyendo de ese modo un vector promotor pBluescript/SV 40 II. Posteriormente, el vector promotor pBluescript/SV40 II construido se trató con las enzimas de restricción Sca I e Hind III, de modo que un fragmento que incluía el promotor de SV40 se separara, se purificara y se recuperara del gel de agarosa mediante el método susodicho. Más adelante, el fragmento se integró en y se ligó al vector pSV-β-gal linealizado tratado mediante las mismas enzimas de restricción, completando de ese modo el vector versión II (pSV-β-gal/versión II).

25 2-2: Construcción de vector que incluye los elementos de MAR/SAR y el gen de β-gal

30 El vector pT7blue/MAR de globina β construido en el Ejemplo 1 se trató con las enzimas de restricción Spe I y Sma I, de modo que un fragmento de ADN de 3 kb que incluía el elemento de MAR de globina β se separara, se purificara y se recuperara del gel de agarosa. A continuación, este fragmento se integró en y se ligó con el vector pSV-β-gal versión I recombinante linealizado tratado con Spe I y Sma I, que eran las mismas enzimas de restricción, completando de ese modo la clonación del elemento de MAR de globina β (pMS-β-gal). A fin de confirmar la orientación del elemento de MAR de globina β integrado, se realizó un tratamiento usando una enzima de restricción Hind III que estaba presente en el elemento de MAR de globina β y el vector pSV-β-gal versión I recombinante, confirmando de ese modo que la orientación del elemento de MAR de globina β era inversa.

35 Los elementos de SAR se separaron del pCR 2.1/SAR de interferón β y pCR 2.1/SAR de CSP-B y se clonaron en pSV/I o pSV/II como se describe anteriormente. La SAR de interferón β se subclonó en pSV-β-gal/versión I usando ApaI/SpeI, construyendo de ese modo pSV-β-gal/SAR de interferón β (F) (pIS-β-gal). Después de realizar una PCR usando cebadores y pCR 2.1/SAR de CSP-B como una plantilla (SEQ ID N° 9 y 10) que incluía la enzima de restricción Spe I y Sma I, la SAR de CSP-B se trató con las enzimas de restricción Spe I/Sma I separadas y se subclonó en pSV-β-gal/verII tratado mediante las mismas enzimas de restricción, construyendo de ese modo pSV-β-gal/SAR de CSP-B (pCS-β-gal).

SEQ ID N° 9: SAR de CSP-B Sentido

5'-TTT ACT AGT GGA TCC CAT TCT CCT TGA-3'

SEQ ID N° 10: SAR de CSP-B Antisentido

45 5'-TCC CCC GGG GAA TTC AAA CAA CTC AAT AGC-3' (30mero)

2-3: Aseguramiento del sitio de terminación de la transcripción del gen de gastrina y construcción del vector pSG-β-gal

5 Después de que se sintetizara una hebra de sentido del sitio de terminación de la transcripción (GTF) del gen de gastrina usando un cebador (SEQ ID N° 11) y una hebra antisentido del mismo usando un cebador (SEQ ID N° 12), se renaturalizaron dos hebras. El producto de reacción de renaturalización, que se trató con BamH I y Pst I, se integró en y se ligó a un vector pSV-β-gal linealizado (Promega Co., EE. UU.) tratado con las mismas enzimas de restricción por adelantado, completando de ese modo un vector pSG-β-gal.

SEQ ID N° 11: Secuencia de sentido del sitio de terminación de gastrina

5' -AGCGGATCCA GGATAATATA TGGTAGGGTT CATAGCCAGA
GTAACCTTTT TTTTAAATTT TTATTTTATT TTATTTTGAG CTGCAG-3'

10 SEQ ID N° 12: Secuencia antisentido del sitio de terminación de gastrina usado en el vector pSG

5' -CTGCAGCTCA AAATAAAATA AAATAAAAAT TAAAAAAAAA
GGTTACTCTG GCTATGAACCCTACCATATA TTATCCTGGA TCCGCT-3'

2-4: Construcción del vector pM(R)SG

15 Un vector al que se aplicaron simultáneamente la MAR de globina β (orientación inversa) y SPA-GTF se construyó mediante un método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). A fin de construir el vector pM(R)SG, la reacción en cadena de la polimerasa se realizó usando el pMS-β-gal del Ejemplo 2-2 y el pSG-β-gal del Ejemplo 2-3 como plantillas, y a continuación el producto de reacción se trató con una enzima de restricción específica para ser ligado, completando de ese modo el vector pM(R)SG.

① Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el elemento de MAR de globina β

20 La PCR se realizó usando pMS-β-gal como una plantilla, un cebador de sentido ML1 (SEQ ID N° 13) y un cebador antisentido MR1 (SEQ ID N° 14). El producto de reacción obtenido se trató con las enzimas de restricción Sac II y Cla I para ser escindido y a continuación se integró en y se ligó a un vector pMS-β-gal linealizado tratado mediante las mismas enzimas de restricción por adelantado para completar una primera etapa de subclonación, construyendo de ese modo un vector pMS-β-gal/sc, que era un producto vectorial intermedio.

SEQ ID N° 13: Cebador ML1 para amplificar el elemento de MAR de globina β humana en el vector pMS

25 5'-TCCCCGCGGC CCGGGCCTCC TGAGTAGCTG GGGACT-3'

SEQ ID N° 14: Cebador MR1 para amplificar el elemento de MAR de globina β humana en el vector pMS

5'-TTGGGGCCCA TCGATTTTTC CTCTTTAGGT TCTC-3'

② Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que incluye un sitio de multiclonación y un sitio de terminación de la transcripción

30 La PCR para el sitio de terminación de la transcripción del gen de gastrina en el vector pSG-β-gal se realizó usando un cebador de sentido TL1 (SEQ ID N° 15) y un cebador antisentido TR1 (SEQ ID N° 16). El producto de PCR se subclonó en un vector pGEM-T Easy (Promega Co., EE. UU.), que es un tipo de vector de clonación TA construido a fin de clonar directamente un producto de PCR sin tratamiento con enzimas de restricción, construyendo de ese modo un vector pGEM-T/MCSp(A), que era un producto intermedio para construir un vector.

35 SEQ ID N° 15: Cebador TL1 del sitio de terminación de gastrina en el vector pSG

5'-GAAGATCTGT TAACTCGAGA ACTTGTTTAT TGCAGCTTA 3'

SEQ ID N° 16: Cebador TR1 del sitio de terminación de gastrina en el vector pSG

5'-GTGCCAGCTT GCATGCCTGC-3'

③ Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para promotor de SV40 y sitio de multiclonación

5 La PCR para el promotor de SV40 y el sitio de multiclonación se realizó usando un cebador PL1 de sentido (SEQ ID N° 17) y un cebador PR1 antisentido (SEQ ID N° 18). El producto de reacción se trató con enzimas de restricción Apa I y Bgl II y a continuación se ligó a un vector pGEM-T/MCSp(A) linealizado construido por adelantado al ser tratado con la misma enzima de restricción que se describe anteriormente, construyendo de ese modo un vector pGEM-T/SVMCSp(A) como un producto intermedio.

SEQ ID N° 17: Cebador PL1 para fusionar el promotor del virus SV40 y el sitio de multiclonación

5'-CCGGGCCCCAT CGATAAGCTT GATCCCGCGC AGCACCATGG CCTGAA-3'

10 SEQ ID N° 18: Cebador PR1 para fusionar el promotor del virus SV40 y el sitio de multiclonación

5'-GAAGATCTGC GGCCGCTAGC AAGCTTTTTG CAAAAGCCTA-3'

④ Construcción de vector pMS y vector pMSG

15 El vector pGEM-T/SVMCSp(A) construido en el Ejemplo ③ se trató con enzimas de restricción Cla I y BamH I, de modo que el fragmento de ADN compuesto por el promotor de SV40, el sitio de multiclonación y un sitio de terminación de la transcripción de SV40 se separó y se purificó. A continuación, el fragmento de ADN purificado se integró en el vector pMS-β-gal/sc linealizado construido en el Ejemplo ① al ser tratado con las mismas enzimas de restricción por adelantado, completando de ese modo el vector pMS. A fin de construir el vector pM(R)SG, después de que el vector pSG-β-gal construido anteriormente se tratara con las enzimas de restricción BamH I y Sca I para separar y purificar un fragmento de ADN de 950 pb que tenía una secuencia de GTF del gen de gastrina, el
20 fragmento de ADN purificado se integró en y se ligó al vector pMS linealizado tratado por adelantado con las mismas enzimas de restricción, completando de ese modo un vector pM(R)SG.

2-5: Construcción del vector pSG

25 A fin de integrar el elemento de MAR/SAR en un extremo 3' del sitio de terminación de la transcripción, se construyó el vector pSG. Después de que el vector de expresión pM(R)SG se tratara con Sma I y Cla I para retirar la MAR del mismo, lo resultante se trató con Klenow para formar extremos romos y a continuación se autoligó, construyendo de ese modo el vector pSG.

2-6: Construcción de los vectores pMSG y pSGM

30 Después de que el vector de expresión pM(R)SG se tratara con Sac II y Cla I para separar la MAR (R) del mismo, a fin de asegurar MAR (F) (MAR como orientación directa), se construyeron cebadores (SEQ ID N° 19 y 20) de modo que Sac II/Cla I estuviera incluida en los mismos, realizando de ese modo la PCR. El producto de PCR se separó de un gel de agarosa y se integró en el vector pM(R)SG tratado con las mismas enzimas de restricción, construyendo de ese modo el vector pM(F)SG.

SEQ ID N° 19: 5'-TTTTCCGCGGTTTTCTCTTTAG-3'

SEQ ID N° 20: 5'-TTTTATCGATCCTCCTGAGTAG-3'

35 Mientras tanto, el vector pSGM, que es un vector de expresión para células animales que contiene el elemento de MAR de globina β en el extremo 3' del sitio de terminación de la transcripción, se construyó a través de los procedimientos que se describen posteriormente.

40 A fin de construir el vector pSGM, se construyeron cebadores (SEQ ID N° 21 y 22) de modo que incluyeran la enzima de restricción Nar I en ambos extremos de la MAR, y se realizó una PCR usando el pM(R)SG como una plantilla. El producto de PCR se trató con la enzima de restricción Nar I y se integró en el vector pSG tratado con la misma enzima de restricción, construyendo de ese modo los vectores pSGM(R) y pSGM(F).

SEQ ID N° 21: MAR de β-globina de sentido Nar I

ES 2 617 217 T3

5'-AAA AGG CGC CCC TCC TGA GTA GCT GGG ACT A-3' (31mero)

SEQ ID N° 22: MAR de β -globina antisentido Nar I

5'-AAA AGG CGC CTT CTT CCT CTT TAG GTT CTC C-3' (31mero)

2-7: Construcción de vectores pISG y pSGI

- 5 Un vector pISG, que es un vector de expresión para células animales que incluye el elemento de SAR de interferón β en el extremo 5' del promotor, y un vector pSGI, que es un vector de expresión para células animales que incluye el elemento de SAR de interferón β en el extremo 3' del sitio de terminación de la transcripción se construyeron a través de los procedimientos que se describen posteriormente.
- 10 Un gen de β -gal se retiró del vector pSV- β -gal/SAR de interferón β (F) (pI (F)S- β -gal) y el sitio de multiclonación (MCS), el sitio de terminación de la transcripción de SV40 y el GTF de gastrina se integraron, construyendo de ese modo el vector pI(F)SG.
- 15 Un fragmento Hind III/Pst I que incluía el sitio del gen de β -gal del vector pI(F)S- β -gal se retiró y el fragmento Hind III/Pst I se separó del pM(R)SG tratado con la misma enzima de restricción y se integró, construyendo de ese modo el vector pI(F)SG.

20 El vector pI(F)SG se trató con la enzima de restricción EcoR I, el elemento de SAR de interferón β se separó del gel de agarosa y se integró de nuevo en el vector pI(F)SG tratado con la misma enzima de restricción para construir pI(R)SG. Posteriormente, el vector pI(R)SG se confirmó mediante cartografía enzimática de restricción. A fin de construir el vector pSGI, un ligador (SEQ ID N° 23) que incluían el sitio de la enzima de restricción Nar I se integró en un vector pGEM-T Easy, y el elemento de SAR se trató con la enzima de restricción EcoR I a partir del vector pISG para separar un fragmento de ADN. A continuación, el fragmento de ADN separado se integró en un vector T modificado. De nuevo, lo resultante se escindió mediante la enzima de restricción Nar I y a continuación se integró en el vector pSG tratado con la misma enzima de restricción, construyendo de ese modo los vectores pSGI(F) y pSG(R).

SEQ ID N° 23: Ligador

5'-GGC CGG CGC CGA ATT CGG CGC C-3'

2-8: Construcción de vectores pCSG y pSGC

- 30 Un vector pCSG, que es un vector de expresión para células animales que incluye el elemento de SAR de CSP-B en el extremo 5' del promotor, y un vector pSGC, que es un vector de expresión para células animales que incluye el elemento de SAR de CSP-B en el extremo 3' del sitio de terminación de la transcripción se construyeron a través de los procedimientos que se describen posteriormente.
- 35 Se realizó una PCR usando pSV- β -gal/SAR de CSP-B (F) (pCS- β -gal) como una plantilla y cebadores (SEQ ID N° 24 y 10) que incluyen las enzimas de restricción Cla I y Sma I, seguido por tratamiento con las enzimas de restricción Cla I y Sma I, obteniendo de ese modo un fragmento de ADN de SAR de CSP-B. El vector pM(R)SG se trató con las enzimas de restricción Cla I y Sma I para retirar la MAR, seguido por la integración de la SAR de CSP-B tratada con la misma enzima de restricción, construyendo de ese modo el vector pC(R)SG.

40 SEQ ID N° 24: SAR de CSP-B de sentido Cla I

5'-AAA AAT CGA TAT GAC CAT GAT TAC GCC AAG-3' (30mero)

SEQ ID N° 10: SAR de CSP-B antisentido Sma I

5'-TCC CCC GGG GAA TTC AAA CAA CTC AAT AGC-3' (30mero)

45 El elemento de SAR de CSP-B tratado con la enzima de restricción Sac II a partir del vector pC(R)SG se integró en el vector pSG tratado con la misma enzima de restricción, construyendo de ese modo el vector pC(F)SG.

A fin de construir el vector pSGC, se construyeron cebadores (SEQ ID N° 25 y 26) de modo que incluyeran la enzima de restricción Nar I en ambos extremos de la SAR de CSP-B, y se realizó una PCR usando el pC(F)SG como una

plantilla. El producto de PCR se trató con la enzima de restricción Nar I y se integró en el vector pSG tratado con la misma enzima de restricción, construyendo de ese modo los vectores pSGC(F) y pSGC(R).

SEQ ID N° 25: SAR de CSP-B de sentido Nar I

5'-AAA AGG CGC CGA ATT CAA ACA ACT CAA TAG C-3' (31mero)

5 SEQ ID N° 26: SAR de CSP-B antisentido Nar I

5'-AAA AGG CGC CAT GAC CAT GAT TAC GCC AAG-3' (30mero)

2-9: Construcción de los vectores pMMSG, pMSGM, pMSGC y pMSGI

10 Un vector pMMSG, que es un vector de expresión para células animales que incluye 2 copias de los elementos de MAR de globina β en el extremo 5' del promotor, y un vector pMSGM, que es un vector de expresión para células animales que incluye los elementos de MAR de globina β en el extremo 5' del promotor y el extremo 3' del sitio de terminación de la transcripción, respectivamente, se construyeron a través de los procedimientos que se describen posteriormente.

15 Se realizó una PCR usando el vector pM(R)SG como una plantilla y cebadores (SEQ ID N° 21 y 27) que incluían enzimas de restricción Nar I y Cla I en ambos extremos de la MAR. A continuación, el producto de PCR se trató con las enzimas de restricción Nar I y Cla I y se integró en el vector pM(R)SG tratado con la enzima de restricción Cla I, construyendo de ese modo el vector pM(R)M(R)SG.

SEQ ID N° 21: MAR de β -globina de sentido Nar I

5'-AAA AGG CGC CCC TCC TGA GTA GCT GGG ACT A-3' (31mero)

20 SEQ ID N° 27: MAR de β -globina Cla I

5'-AAA ATC GAT TT CTT CCT CTT TAG GTT CTC C-3' (31mero)

25 A fin de construir los vectores pM(R)SGM, pM(R)SGC y pM(R)SGI, los vectores pSGM(F), pSGC(F) y pSGI(F) se trataron con la enzima de restricción Nar I para separar individualmente la MAR de globina β , el elemento de SAR de CSP-B o el elemento de SAR de interferón β y se integraron en el vector pM(R)SG tratado con la misma enzima de restricción, construyendo de ese modo los vectores pM(R)SGM(R), pM(R)SGC(F), pM(R)SGC(R), pM(R)SGI(F) y pM(R)SGI(R).

2-10: Construcción de los vectores pl(R)SGI, pl(R)SGC y pl(R)SGM

30 Un vector de expresión para células animales que incluye una copia del elemento de SAR de interferón β en el extremo 5' del promotor y una copia del elemento de MAR de globina β , el elemento de SAR de CSP-B y el elemento de SAR de interferón β en el extremo 3' del sitio de terminación de la transcripción se construyó a través de los procedimientos que se describen posteriormente.

35 A fin de construir los vectores pl(R)SGI, pl(R)SGC y pl(R)SGM, se prepararon los elementos de MAR/SAR a partir de los vectores pSGI(F), pSGC(F) y pSGM(F) mediante tratamiento con la enzima de restricción Nar I, respectivamente. Los elementos de MAR/SAR separados y purificados se integraron en un vector pl(R)SG tratado con la enzima de restricción Nar I, construyendo de ese modo los vectores pl(R)SGI(R), pl(R)SGI(F), pl(R)SGC(R), pl(R)SGC(F), pl(R)SGM(R) y pl(R)SGM(F).

2-11: Construcción de los vectores pCCSG, pCSGI, pCSGC y pCSGM

40 Un vector pCCSG, que es un vector de expresión para células animales que incluye 2 copias del elemento de SAR de CSP-B en el extremo 5' del promotor, se construyó a través de los procedimientos que se describen posteriormente.

El vector pC(F)SG que incluye el elemento de SAR de CSP-B se trató con la enzima de restricción Hind III para ser separado, y a continuación se realizó la autoligación. De nuevo, lo resultante se trató con las enzimas de restricción

Nhe I y Spe I para separar y purificar el elemento de SAR de CSP-B y a continuación se integró en el vector pC(F)SG tratado con la enzima de restricción Spe I, construyendo de ese modo un vector pC(F)C(F)SG.

- 5 A fin de construir los vectores pC(F)SGI, pC(F)SGC y pC(F)SGM, los elementos de MAR/SAR se separaron de los vectores pSGI(F), pSGC(F) y pSGM(F) mediante tratamiento con la enzima de restricción Nar I, respectivamente. Los elementos de MAR/SAR separados y purificados se integraron en el vector pC(F)SG tratado con la enzima de restricción Nar I, construyendo de ese modo los vectores pC(F)SGI(R), pC(F)SGI(F), pC(F)SGC(R), pC(F)SGC(F), pC(F)SGM(R) y pC(F)SGM(F).

2-12: Construcción de un vector de expresión que incluye promotor de EF1 α de ratón y mutante del mismo

- 10 Un promotor de EF1 α de ratón se separó de ADN genómico asegurado de tejido de saco vitelino de ratón usando un estuche de aislamiento de ADN (DNeasy Blood & Tissue Kit, QIAGEN).

- 15 Se añadieron 200 ng del ADN genómico, 10 pmol de cada cebador (SEQ ID N° 28 y 29) y agua a Maxime PCR Premix (i-pfu) (Intron biotechnology) a fin de tener un volumen total de 20 μ l para realizar una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las condiciones de reacción eran como sigue. Después de un procedimiento de realizar secuencialmente una reacción a 94°C durante 5 minutos, 94°C durante 30 segundos, 56°C durante 1 minuto y 72°C durante 3 minutos efectuado en un ciclador término durante 25 ciclos, se efectuó una reacción final a 72°C durante 5 minutos, seguido por separación y purificación usando un estuche de separación (GeneAll^R ExpinTM PCR SV, Geneall).

- 20 SEQ ID N° 28: mEF1 α -F

5'-TTT TAT CGA TAG CGG AGT AAG GAA GAG TAG-3'

SEQ ID N° 29: mEF1 α -R

5'-TTT TGC TAG CAG CGG TGG TTT TCA CAA CAC-3'

- 25 Después de que el promotor de SV40 se retirara del vector de expresión pM(R)SG usando Cla I y Nhe I, un promotor de EF1 α de ratón tratado con las mismas enzimas de restricción se integró, construyendo de ese modo un vector de expresión pMmEG.

- 30 A fin de sustituir la timina situada en una quinta posición de TATATAA, que es una secuencia TATA del promotor de EF1 α de ratón, por adenina, se construyó un cebador de PCR que incluía una secuencia sustituida como la descrita posteriormente, induciendo de ese modo una mutación de un solo par de bases (Jaeger E., 1997).

- 35 Después de que se realizara una PCR primaria al mezclar el cebador 1 y 3 (SEQ ID N° 30 y 32) en un tubo 1 y el cebador 2 y 4 (SEQ ID N° 31 y 33) en un tubo 2, respectivamente, usando el vector de expresión pMmEG como una plantilla, cada uno de los productos obtenidos en los dos tubos se purificó, y los productos purificados se mezclaron entre sí. A continuación, se realizó una PCR secundaria en las mismas condiciones usando el producto de PCR mixto como una plantilla y el cebador 1 y 4. El producto de PCR se trató con Kpn I y Spe I, y a continuación un mutante de promotor de EF1 α de ratón (mEF1 α (TA)) se aseguró usando un estuche de separación. Después de que el vector de expresión pMmEG se tratara con Kpn I y Spe I para retirar el promotor de EF1 α de ratón, un mutante de promotor de EF1 α de ratón (mEF1 α (TA), SEQ ID N° 34) tratado con la misma enzima de restricción se integró, construyendo de ese modo un vector pMmEG(TA).

- 40 SEQ ID N° 30: mEF-tata-1

5'-TCC CAG GGA CCG TCG CTA AAT TCT CAT AAC-3'

SEQ ID N° 31: mEF-tata-2

5'-GAA CGG TAT AAA AGT GCG GCA GTC GCC TTG-3'

- 45 SEQ ID N° 32: mEF-tata-3

5'-CAA GGC GAC TGC CGC ACT TTT ATA CCG TTC-3'

SEQ ID N° 33: mEF-tata-4

5'-GCT CCG CTC AAA ACT CAA GGG GAC AAA TTC-3'

2-13: Construcción del vector de expresión pmED

5 Después de que el vector pC(R)SG se tratara con la enzima de restricción Sac I para retirar SAR de CSP-B y a continuación se autoligara, lo resultante se trató con las enzimas de restricción Cla I y Nhe I, construyendo de ese modo pG. El vector pMmEG (TA) se trató con las enzimas de restricción Cla I y Nhe I para separar el mutante de EF1 α de ratón y a continuación se integró en el pG tratado con la misma enzima de restricción, construyendo de ese modo un vector pmEG.

2-14: Construcción del vector de expresión pC(F)mEGM(R)/ pM(R)mEGC(F)/ pM(R)M(R)mEG

10 El mutante del promotor de EF1 α de ratón se integró en un vector de expresión que incluye 2 copias de MAR/SAR que tiene alta eficacia de expresión, construyendo de ese modo un vector de expresión como el descrito posteriormente.

15 Después de que el vector de expresión pMmEG(TA) se tratara con las enzimas de restricción Cla I y Nhe I para separar el mutante de promotor de EF1 α de ratón, los vectores de expresión pC(F)SGM(R), pM(R)SGC(F) y pM(R)M(R)SG se trataron con las mismas enzimas de restricción para retirar el promotor de SV40, y el mutante de promotor de EF1 α de ratón separado se integró en los mismos, construyendo de ese modo un mapa de vector de expresión pC(F)mEGM(R) de la FIG. 2, un mapa de vector de expresión pM(R)mEGC(F) de la FIG. 3 y un mapa de vector de expresión pM(R)M(R)mEG de la FIG. 4.

20 En este caso, la información del vector pC(F)mEGM(R) construido (SEQ ID N° 35) era como sigue.

Tabla 3

tamaño del vector (pb)	8664		
	principio	final	Tamaño (pb)
mEF1 α (TA)	1	1416	1416
MCS	1417	1445	29
Señal de poliA del antígeno pequeño de SV40	1446	1580	135
terminador	1581	1652	72
MAR de β -globina humana (R)	1834	4802	2969
Amp	5243	6103	861
Origen de ColE1	6263	6877	615
CSP-B-SAR(F)	7352	8584	1233

Ejemplo 3: Desarrollo de una línea celular transfectada

3-1: Transfección usando una línea de células hospedadoras adherente

25 Una línea celular CHO DG44 deficiente en gen DHFR (Dr. Chasin, Columbia University) se cultivó en un medio MEM (medio esencial mínimo, Gibco BRL) con 10% de suero bovino fetal. Se inocularon 2×10^5 células en una placa de 6 pocillos que contenía 2 ml del medio y se cultivaron durante la noche a 37°C en la incubadora de CO₂ al 5% hasta que se producía la transfección.

30 La transfección se llevó a cabo mediante un método mediado por liposomas. Un vector pDCHIP que incluye un gen DHFR en un vector pSP72, que es un vector comercializado, se cotransfectó con cada vector de prueba en una relación molar de 100:1. Se mezclaron 2 ug de cada vector con GeneJuice (MERCK, Alemania), que es un tipo de tensoactivo graso, y un medio MEM libre de suero para reaccionar entre sí a temperatura ambiente durante 45 minutos y a continuación se añadieron a células lavadas junto con el medio. A continuación, las células transfectadas se cultivaron durante 6 horas y se retiró un medio de cultivo. Para seleccionar la línea celular transfectada, las células se incubaron en el medio MEM sin nucleósido. Después de 2 semanas, se obtuvieron células inicialmente adaptadas y las células se adaptaron continuamente a MTX 10 nM y 100 nM, asegurando de ese modo líneas celulares estables, respectivamente.

3-2: Transfección usando una línea de células hospedadoras cultivadas en suspensión

Una línea de células hospedadoras CHO DG44 adaptada al cultivo en suspensión se subcultivó en un medio comercial libre de suero. Antes de 1 día de la transfección, se realizó el subcultivo, y el vector pDCHIP y cada vector de prueba se transfectó con electroporación. Para seleccionar la línea celular transfectada, las células se incubaron en el medio comercial libre de suero sin nucleósido. Después de 2 semanas, se obtuvieron células inicialmente adaptadas y las células se adaptaron continuamente a MTX 10 nM y 100 nM, asegurando de ese modo líneas celulares estables, respectivamente.

Ejemplo 4: Ejemplo experimental: experimento para confirmar la potencia de expresión

4-1: Construcción del vector de expresión para expresar proteína de VEGF recombinante

Después de obtener genes proteínicos recombinantes subclonados en los vectores pT7blue y pCR 2.1, se cortaron mediante enzimas de restricción. Cada vector construido en el Ejemplo 2 se cortó mediante las mismas enzimas de restricción que en el gen proteínico recombinante y se integró en cada vector, construyendo de ese modo un vector de expresión.

A fin de verificar la eficacia de los vectores construidos en el Ejemplo 2 sobre la expresión génica, un gen de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) humano se amplificó mediante PCR usando un cebador de sentido (SEQ ID N° 36) y un cebador antisentido (SEQ ID N° 37). Después de que el producto de PCR se tratara con las enzimas de restricción Nhe I y Xho I para asegurar el gen de VEGF, los vectores construidos en los Ejemplos se escindieron mediante la misma enzima de restricción, y el gen de VEGF asegurado se integró en estos vectores, construyendo de ese modo vectores de expresión.

SEQ ID N° 36: vegf-5

5'-CTA GCTAGCCACCATGAACTTTCTGCTGTCTTGGG-3'

SEQ ID N° 37: vegf-3

5'-GAAGATCTCACCGCCTCGGCTTGTCAC-3'

4-2: Construcción de vector de expresión para expresar proteína de anticuerpo recombinante

A fin de verificar la eficacia de los vectores construidos en los Ejemplos sobre la expresión génica, se construyó un vector de expresión para expresar gen de anticuerpo anti-CD20 recombinante.

Después de que un gen de cadena pesada del anticuerpo recombinante se tratara con las enzimas de restricción Bgl II y Xho I, y una cadena ligera se tratara con las enzimas de restricción Nhe I y Xho I, respectivamente, los genes tratados se integraron en los vectores de los Ejemplos tratados con las mismas enzimas de restricción, construyendo de ese modo vectores de expresión.

4-3: Establecimiento de una línea celular adherente transfectada

Estos vectores de expresión se introdujeron en la línea de células hospedadoras CHO DG44. Después de que 2×10^5 células se inocularan en una placa de 6 pocillos y se cultivaran a 37°C durante 24 horas en la incubadora de CO₂ al 5%, este vector de expresión (2 µg) y un minigén de DHFR se mezclaron en una relación de 100:1 y se introdujeron en las células CHO conjuntamente mediante transfección mediada por liposomas, tal como lipofectamina, Dosper o similares. Después de 6 horas de introducción, el medio de cultivo se cargó a un medio de crecimiento y a continuación el cultivo celular se mantuvo durante 48 horas.

La línea celular transfectada se cultivó en metotrexato (MTX) secuencialmente creciente a una concentración de 0 nM, 10 nM y 100 nM en un medio selectivo (medio MEM-α con 10% de FBS dializado inactivado térmicamente y sin nucleósido). La línea celular transfectada se inoculó a 2×10^5 células/pocillo (2 ml) a cada concentración de MTX y se cultivó durante 4 días, y, a continuación, el fluido de cultivo se recogió, seguido por analizar la absorbancia usando un estuche de ELISA (R&D Systems, DY293).

Los resultados obtenidos al medir la velocidad de expresión del VEGF usando la absorbancia con respecto a los vectores pl(F)SG, pl(R)SG, pSGI(F), pSGI(R), pC(F)SG, pC (R) SG, pSGC(F), pSGC(R), pM(R)SG, pM(F)SG, pSGM(F) y pSGM(R) se mostraban en la FIG. 5.

4-4: Establecimiento de línea celular cultivada en suspensión transfectada y medida de la productividad de VEGF

Estos vectores de expresión se introdujeron en la línea de células hospedadoras CHO DG44 adaptada al cultivo en suspensión. Después de que las células se añadieran a un matraz a una concentración de 5×10^5 células/ml y se incubaran a 37°C con agitación durante 24 horas en la incubadora de CO_2 al 5%, los vectores de expresión de VEGF y el vector pDCHIP se mezclaron entre sí en una relación molar de 100:1 y se introdujeron conjuntamente en las células CHO mediante electroporación. Después de aproximadamente 3 días de transfección, el medio de cultivo se cambió por un medio selectivo y a continuación el cultivo se realizó de nuevo durante de 2 a 3 semanas.

La línea celular transfectada se cultivó en medio al que se había añadido metotrexato (MTX) y las células adaptadas a cada etapa de MTX se inocularon en una placa de 6 pocillos en 2×10^5 células/pocillo (2 ml) y se cultivaron durante 4 días. Posteriormente, el fluido de cultivo se recogió y se analizó mediante absorbancia usando un estuche de ELISA (R&D Systems, DY293).

En primer lugar, se midió la velocidad de expresión del VEGF (FIG. 6) usando la absorbancia con respecto a los vectores pl(F)SG, pl(R)SG, pSGI(F), pSGI(R), pC(F)SG, pC(R)SG, pSGC(F), pSGC(R), pM(R)SG, pM(F)SG, pSGM(F) y pSGM(R), y los resultados obtenidos se compararon con los del Ejemplo 4-3 mostrado en la FIG. 5. A partir del resultado, se seleccionaron dos copias de combinaciones de MAR/SAR. Se efectuó una combinación de modo que se seleccionaran I(R), C(F) y M(R) aguas arriba del promotor y los elementos de MAR y SAR como orientación directa e inversa se seleccionaron aguas abajo del sitio de terminación de la transcripción.

Posteriormente, la velocidad de expresión del VEGF se midió mediante la absorbancia con respecto a los vectores pl(R)SGM(F), pl(R)SGM(R), pl(R)SGI(F), pl(R)SGI(R), pl(R)SGC(F), pl(R)SGC(R), pC(F)SGM(F), pC(F)SGM(R), pC(F)SGI(F), pC(F)SGI(R), pC(F)SGC(F), pC(F)SGC(R), pC(F)C(F)SG, pM(R)SGC(F), pM(R)SGC(R), pM(R)SGI(F), pM(R)SGI(R), pM(R)SGM(R) y pM(R)M(R)SG usando la combinación seleccionada. Según se muestra en la FIG. 7, los vectores pC(F)SGM(R), pM(R)SGC(F) y pM(R)M(R)SG tenían una productividad significativamente alta en comparación con otros vectores. Esto es, se confirmaba que en el caso de combinar entre sí el elemento de MAR y el elemento de SAR, la proteína diana se expresaba altamente. Particularmente, el pC(F)SGM(R) tenía una velocidad de expresión significativamente alta en comparación con el vector pM(R)M(R)SG que tenía dos elementos de MAR. Esto indica que una combinación del elemento de MAR y el elemento de SAR es más eficaz que el caso de incluir dos elementos de MAR y la proteína se puede producir a un nivel industrial rentable usando esta combinación.

De nuevo, la velocidad de expresión del VEGF se midió mediante el método de ELISA con respecto a los tres vectores seleccionados (pC(F)SGM(R), pM(R)SGC(F) y pM(R)M(R)SG) (FIG. 8). Además, la velocidad de expresión del VEGF se midió usando la absorbancia (FIG. 9) con respecto al vector de expresión pC(F)mEGM(R) (SEQ ID N° 35) de la FIG. 2 en el Ejemplo 2-14 en el que el promotor de SV40 del mismo se sustituía por mutante de promotor de mEF1 α , el vector de expresión pM(R)mEGC(F) de la FIG. 3 en el Ejemplo 2-14 y el vector de expresión pM(R)M(R)mEG que tiene un mapa de escisión de la FIG. 4 en el Ejemplo 2-14. Como resultado, según se muestra en las FIG. 8 y 9, después de sustituir el promotor de SV40 por el mutante del promotor de mEF1 α , en los casos de los tres vectores, la productividad de VEGF se incrementaba en 5 veces o más. Particularmente, en el caso del vector pC(F)mEGM(R), la productividad se incrementaba en 20 veces o más.

El resultado experimental que se describe anteriormente indica que se obtenía un efecto sinérgico significativo al aplicar el mutante de promotor de mEF1 α a la combinación del elemento de MAR y el elemento de SAR.

4-5: Medida de la productividad de proteína de anticuerpo recombinante

Mientras tanto, se construyeron vectores de expresión para proteína de anticuerpo recombinante mediante el método del Ejemplo 4-2 con respecto a los tres tipos de vectores, y las líneas celulares productoras de anticuerpo se transfectaron con los métodos de los Ejemplos 4-4 y se cultivaron en medio selectivo durante de 2 a 3 semanas. Las líneas celulares transfectadas se inocularon en una placa de 6 pocillos en 2×10^5 células/pocillo (2 ml) y se cultivaron durante 6 días y a continuación se recogió un fluido de cultivo, seguido por analizar una velocidad de expresión de anticuerpo usando un estuche de ELISA (PanGen Biotech., PGK1002).

Como resultado, según se muestra en la FIG. 10, en el caso de usar el mutante de promotor de mEF1 α , la productividad del anticuerpo se incrementaba en 3 veces o más en los tres vectores, en comparación con el caso de usar el promotor de SV40. Particularmente, la productividad del vector pC(F)mEGM(R) se incrementaba en 10 veces o más.

Puesto que se analizaba que la productividad medida después de sustituir el promotor de SV40 por el mutante de promotor de mEF1 α y adaptarse a una concentración de MTX de 0 nM era aproximadamente 2 veces superior en comparación con la productividad analizada después de la amplificación con MTX en el caso de usar el promotor de SV40, el resultado que se describe anteriormente indica que se pueden obtener líneas celulares de alta expresión

sin realizar la amplificación con MTX. Esto es, en comparación con la técnica relacionada, se confirmaba que la productividad se mejoraba en un nivel industrialmente rentable al combinar el mutante de promotor de mEF1 α en la combinación del elemento de MAR y el elemento de SAR según la presente invención.

5 Mientras tanto, al producir el anticuerpo recombinante, en el caso de usar la combinación del elemento de MAR y el elemento de SAR con mutante de promotor de EF1 α de ratón, la productividad se mejoraba significativamente en comparación con el caso de usar 2 copias de los elementos de MAR con mutante de promotor de EF1 α de ratón. Se puede sugerir a partir de este resultado experimental que el efecto sinérgico se obtenía al aplicar el mutante de promotor de EF1 α de ratón a la combinación del elemento de MAR y el elemento de SAR.

10 4-6: Confirmación del efecto de mutante de promotor de EF1 α de ratón

A fin de probar un efecto del mutante de promotor de EF1 α de ratón construido en el Ejemplo 2-12, se construyeron un pMhEG en el que se integraba un promotor de EF1 α humano y un pMcEG en el que se integraba un promotor de EF1 α de ovario de hámster chino (CHO) y se compararon con el promotor de EF1 α de ratón y los mutantes del Ejemplo 2-12.

15 En primer lugar, el vector pMhEG se construyó como sigue. Se realizó una PCR dirigida a un sitio promotor de EF1 α humano del vector pEF/myc/cyto (Invitrogen) usando los cebadores de SEQ ID N° 38 y 39.

SEQ ID N° 38: 5'-TCG ATC GAA TTC AAG TT CGT GAG G-3'

SEQ ID N° 39: 5'-GCT AGC GTG TTC ACG ACA CCT GAA ATG-3'

20 Posteriormente, el producto de PCR se trató con las enzimas de restricción Cla I y Nhe I, seguido por separación y purificación de gel de agarosa al 1%. A continuación, el producto de PCR purificado se integró en el vector pM(R)SG tratado con la misma enzima de restricción, construyendo de ese modo el vector pMhEG.

25 Además, el vector pMcEG se construyó como sigue. Las células CHO DG44 que se subcultivaban (1×10^6) se pusieron en un microtubo y se centrifugaron a 3.000 rpm durante 1 minuto para asegurar las células, y se preparó ADN genómico de CHO usando un DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN). A continuación, se realizó una PCR usando los cebadores de SEQ ID N° 40 y 41, obteniendo de ese modo un promotor de EF1 α de CHO (número de registro del Genbank AY188393).

SEQ ID N° 40: chEF1A-F

5'-TAT CGA TAG TGG AGT CAG GAA GGG TAG-3'

30 SEQ ID N° 41: chEF1A-R

5'-TGC TAG CAG CGG TGG TTT TCA CAA CAC-3'

35 El producto de PCR se trató con las enzimas de restricción ClaI y NheI, seguido por separación y purificación de gel de agarosa al 1%. A continuación, el producto de PCR purificado se integró en el vector pM(R)SG tratado con las mismas enzimas de restricción, construyendo de ese modo el vector pMcEG.

Posteriormente, se produjeron anticuerpos recombinantes usando el pM(R)SG del Ejemplo 2-4 y el pMmEG y el pMmEG(TA) del Ejemplo 2-12, y los vectores pMhEG y pMcEG obtenidos según se describe anteriormente mediante el mismo método del Ejemplo 4-5.

40 Como resultado, según se muestra en la FIG. 11, se confirmó que en el caso de usar el promotor de EF1 α de ratón, la productividad era superior que en el caso de usar el promotor de EF1 α humano o el promotor de EF1 α de CHO y, en el caso del mutante del promotor de EF1 α de ratón de SEQ ID N° 34, la productividad se mejoraba significativamente en comparación con el caso de usar el promotor de SV40 o el promotor de EF1 α de ratón, o similares.

Lista de secuencias

- <110> Pangen Biotech Inc.
- <120> Vector de expresión para célula animal
- <130> PP-B1101
- 5 <150> KR10-2011-0028764
- < 151> 2011-03-30
- <160> 41
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- 10 < 211> 20
- < 212> ADN
- < 213> Secuencia artificial
- <220>
- < 223> Cebador de MAR de globina β humana
- 15 <400> 1
- ttttcctct ttaggtctc 20
- <210> 2
- < 211> 20
- < 212> ADN
- 20 < 213> Secuencia artificial
- <220>
- < 223> Cebador de MAR de globina β humana
- <400> 2
- cctcctgagt agctggggac 20
- 25 <210> 3
- < 211> 20
- < 212> ADN
- < 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Cebador de SAR de CSP-B

<400> 3

ggatccatt ctcttgatg 20

5 <210> 4

< 211> 20

< 212> ADN

< 213> Secuencia artificial

<220>

10 < 223> Cebador de SAR de CSP-B

<400> 4

gaattcaaac aactcaatag 20

<210> 5

< 211> 20

15 < 212> ADN

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Cebador de SAR de interferón β

<400> 5

20 gaattcagca aggtcgccac 20

<210> 6

< 211> 20

< 212> ADN

< 213> Secuencia artificial

25 <220>

< 223> Cebador de SAR de interferón β

<400> 6

ttgtatcaac ttctacaat 20

ES 2 617 217 T3

<210> 7

< 211> 43

< 212> ADN

< 213> Secuencia artificial

5 <220>

< 223> Cebador de sentido para construir el vector pSV-beta-gal/ver1

<400> 7

gcactagtcc cgggccatg attacgaatt cgcgcagcac cat 43

<210> 8

10 < 211> 29

< 212> ADN

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Cebador antisentido para construir el vector pSV-beta-gal/ver1

15 <400> 8

gcaagctttt tgcaaaagcc taggcctcc 29

<210> 9

< 211> 27

< 212> ADN

20 < 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Cebador de sentido de SAR de CSP-B

<400> 9

tttactagtg gatccattc tccttga 27

25 <210> 10

< 211> 30

< 212> ADN

< 213> Secuencia artificial

ES 2 617 217 T3

<220>

< 223> Cebador antisentido de SAR de CSP-B

<400> 10

tccccgggg aattcaaaca actcaatagc 30

5 <210> 11

< 211> 86

< 212> ADN

< 213> Secuencia artificial

<220>

10 < 223> Secuencia de sentido del sitio de terminación de gastrina

<400> 11

agcggatcca ggataatata tggtagggtt catagccaga gtaacctttt ttttaattt 60

ttattttatt ttattttgag ctgcag 86

<210> 12

< 211> 86

15 < 212> ADN

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Secuencia antisentido del sitio de terminación de gastrina usado en el vector pSG

<400> 12

ctgcagctca aaataaaata aaataaaaat taaaaaaaaa ggttactctg gctatgaacc 60

20 ctacatata ttatcctgga tccgct 86

<210> 13

< 211> 36

< 212> ADN

< 213> Secuencia artificial

25 <220>

< 223> Cebador ML1 para amplificar el elemento de MAR de globina β humana en el vector pMS

<400> 13

ES 2 617 217 T3

tccccgggc cgggcctcc tgagtagctg gggact 36

<210> 14

< 211> 34

< 212> ADN

5 < 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Cebador MR1 para amplificar el elemento de MAR de globina β humana en el vector pMS

<400> 14

ttggggcca tcgattttc ctcttaggt tctc 34

10 <210> 15

< 211> 39

< 212> ADN

< 213> Secuencia artificial

<220>

15 < 223> Cebador TL1 del sitio de terminación de gastrina en el vector pSG

<400> 15

gaagatctgt taactcgaga acttgttat tgcagctta 39

<210> 16

< 211> 20

20 < 212> ADN

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Cebador TR1 del sitio de terminación de gastrina en el vector pSG

<400> 16

25 gtgccagctt gcatgcctgc 20

<210> 17

< 211> 46

< 212> ADN

ES 2 617 217 T3

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Cebador PL1 para fusionar promotor del virus SV40 y el sitio de multiclonación

<400> 17

5 ccgggcccat cgataagctt gatcccgcg agcaccatgg cctgaa 46

<210> 18

< 211> 40

< 212> ADN

< 213> Secuencia artificial

10 <220>

< 223> Cebador PR1 para fusionar promotor del virus SV40 y el sitio de multiclonación

<400> 18

gaagatctgc ggccgctagc aagcttttg caaaagccta 40

<210> 19

15 < 211> 23

< 212> ADN

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Cebador para aislar elemento de MAR de globina β humana en el vector pM(R)SG

20 <400> 19

tttccgagg tttcctctt tag 23

<210> 20

< 211> 22

< 212> ADN

25 < 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Cebador para aislar elemento de MAR de globina β humana en el vector pM(R)SG

<400> 20

tttatcgat cctcctgagt ag 22
 <210> 21
 < 211> 31
 < 212> ADN
 5 < 213> Secuencia artificial
 <220>
 < 223> MAR de globina β de sentido Nar I
 <400> 21
 aaaaggcgcc cctcctgagt agctgggact a 31
 10 <210> 22
 < 211> 31
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia artificial
 <220>
 15 < 223> MAR de globina β antisentido Nar I
 <400> 22
 aaaaggcgcc ttctcctct ttaggtctc c 31
 <210> 23
 < 211> 22
 20 < 212> ADN
 < 213> Secuencia artificial
 <220>
 < 223> ligador
 <400> 23
 25 ggccggcgcc gaattcggcg cc 22
 <210> 24
 < 211> 30
 < 212> ADN

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> SAR de CSP-B de sentido Cla I

<400> 24

5 aaaaatcgat atgacatga ttacgccaag 30

<210> 25

< 211> 31

< 212> ADN

< 213> Secuencia artificial

10 <220>

< 223> SAR de CSP-B antisentido Sma I

<400> 25

aaaaggcgcc gaattcaaac aactcaatag c 31

<210> 26

15 < 211> 30

< 212> ADN

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> SAR de CSP-B antisentido Nar I

20 <400> 26

aaaaggcgcc atgacatga ttacgccaag 30

<210> 27

< 211> 30

< 212> ADN

25 < 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> MAR de globina β Cla I

<400> 27

aaaatcgatt tcttctctt taggtctcc 30
 <210> 28
 < 211> 30
 < 212> ADN
 5 < 213> Secuencia artificial
 <220>
 < 223> Cebador de mEF1 alfa-F
 <400> 28
 tttatcgat agcggagtaa ggaagagtag 30
 10 <210> 29
 < 211> 30
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia artificial
 <220>
 15 < 223> Cebador de mEF1 α -R
 <400> 29
 tttgctagc agcggtggtt tcacaacac 30
 <210> 30
 < 211> 30
 20 < 212> ADN
 < 213> Secuencia artificial
 <220>
 < 223> Cebador de mEF-tata-1
 <400> 30
 25 tcccaggac cgtcgctaaa ttctataac 30
 <210> 31
 < 211> 30
 < 212> ADN

ES 2 617 217 T3

< 213> Secuencia artificial
<220>
< 223> Cebador de mEF-tata-2
<400> 31
5 gaacggata aaagtgcggc agtcgccttg 30
<210> 32
< 211> 30
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial
10 <220>
< 223> Cebador de mEF-tata-3
<400> 32
caaggcgact gccgcacttt tataccgttc 30
<210> 33
15 < 211> 30
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial
<220>
< 223> Cebador de mEF-tata-4
20 <400> 33
gctccgctca aaactcaagg ggacaaattc 30
<210> 34
< 211> 1416
< 212> ADN
25 < 213> Secuencia artificial
<220>
< 223> Mutante del promotor de EF1 α de ratón
<400> 34

ES 2 617 217 T3

```

agcggagtaa ggaagagtag ggatagattc tggccgccct cttggccagc ttctcgcgc 60
cccaccctcc gctagggcca agagtaattc atacaaaagg agggatcgcc ttcgcctggg 120
gaagtcccag ggaccgtcgc taaattctca taaccataa tcccgtacc cgccccacca 180
cagtgcgagg agcatgctgc cagggctgag cgcggggaga gcagagcaca caagctcata 240
gaccctggtc gtggggggag gggcgactg agcggggggg ggggggtga tgggggggag 300
gaccggggag ctggcgcggt gaaaactggg aaagcgggtg cgtgtgctgg ctccgccctc 360
ttcccgaggg tgggggagaa cggtataaaa gtgcggcagt cgccttgac gttctttttc 420
gcaacggggt tgcctcaga acgcaggtga gggcggggtg tggcttccgc gggccgcga 480
gctggaggtc ctgctccgag cgggccgggc cccgctgctg tcggcgggga ttagctgcga 540
gcattcccgc ttcgagttgc gggcggcgcg ggaggcagag tgcgaggcct agcggcaacc 600
ccgtagcctc gcctcgtgtc cggcttgagg cctagcgtgg tgtccgcgc gccccgcgt 660
gctactccgg ccgcaactct gtcttttttt tttgtgtgt gttgttgcct tgctgccttc 720
gattgccgtt cagcaatagc ggctaacaaa gggagggtgc ggggcttgc cggccggagc 780
ccggagaggt catggttggg gaggaatgga gggacaggag tggcggctgg ggcccgccg 840
ccttcggagc acatgtccga cggcacctgg atggggcgag gcctggggtt tttcccgaag 900
caaccaggct ggggttagcg tgccgaggcc atgtggcccc agcaccggc acgatctggc 960
ttggcggcgc cgcgttgccc tgctcccta actaggggtga ggccatcccg tccggcacca 1020
gttgctgctg tggaaagatg gccgctcccg ggcctgttg caaggagctc aaaatggagg 1080
acgcggcagc ccggtggagc gggcggtga gtcaccaca caaaggaaga gggcctggtc 1140
cctcaccggc tctgcttcc tgtgaccccg tggctctatc ggccgcaata gtcacctcgg 1200
gcttttgagc acgctagtc gcggcggggg gaggggatgt aatggcgttg gagttgttc 1260
acatttggtg ggtggagact agtcaggcca gcctggcgct ggaagtcatt tttggaattt 1320
gtccccttga gttttgagc gagctaattc tcggcttct tagcggttca aaggtatctt 1380
ttaaaccctt ttttaggtgt tgtgaaaacc accgct 1416

```

<210> 35

< 211> 8664

5 < 212> ADN

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Vector pC(F)mEGM(R)

<400> 35

ES 2 617 217 T3

cgatagcggg	gtaaggaaga	gtagggatag	attctggccg	ccctcttggc	cagcttctcg	60
ccgccccacc	ctccgctagg	gccaaagta	attcatacaa	aaggagggat	cgccttcgcc	120
tggggaagtc	ccagggaccg	tcgctaaatt	ctcataacc	ataatcccgg	taccggcccc	180
accacagtgc	gaggagcatg	cgctcagggc	tgagcggggg	gagagcagag	cacacaagct	240
catagaccct	ggtcgtgggg	ggagggggcg	actgagcggg	gggggggggg	gtgatggggg	300
ggaggaccgg	ggagctggcg	cgggggcaaac	tgggaaagcg	gtgtcgtgtg	ctggctccgc	360
cctcttcccg	aggggtgggg	agaacggtat	aaaagtgcgg	cagtcgcctt	ggacgttctt	420
tttcgcaacg	ggtttgccgt	cagaacgcag	gtgagggggc	ggtgtggcct	ccgcgggccg	480
ccgagctgga	ggtcctgctc	cgagcgggcc	gggccccgct	gtcgtcggcg	gggattagct	540
gcgagcattc	ccgcttcgag	ttgcggggcg	cgcgggaggc	agagtgcgag	gcctagcggc	600
aaccccgtag	cctcgcctcg	tgtccggcct	gaggcctagc	gtggtgtccg	cgccgccgcc	660
gcgtgctact	ccggccgcac	tctggctctt	ttttttttgt	tgttgttgtt	gccctgctgc	720
cttcgattgc	cgttcagcaa	taggggctaa	caaaggaggg	gtgcggggct	tgctcggccg	780
gagccccgag	aggtcatggt	tggggaggaa	tggagggaca	ggagtggcgg	ctggggcccc	840
cccgcttcg	gagcacatgt	ccgacgccac	ctggatgggg	cgaggcctgg	ggtttttccc	900
gaagcaacca	ggctgggggt	agcgtgccga	ggccatgtgg	ccccagcacc	cggcacgatc	960
tggcttgggc	gcgcccgcgt	gccctgcctc	cctaaactagg	gtgaggccat	cccgtccggc	1020
accagttgcg	tcggtggaaa	gatggcccgt	cccgggccct	ggtgcaagga	gctcaaaatg	1080
gaggacgcgg	cagcccgggt	gagcggggcg	gtgagtcacc	cacacaaagg	aagagggcct	1140
ggtccctcac	cggtctctgc	ttcctgtgac	cccgtggctc	tatcggccgc	aatagtcacc	1200
tcgggctttt	gagcacggct	agtcgcggcg	gggggagggg	atgtaatggc	ggttgagttt	1260
gttcacattt	ggtgggtgga	gactagtcag	gccagcctgg	cgctggaagt	catttttggg	1320
atgtgtcccc	ttgagttttg	agcggagcta	attctcgggc	ttcttagcgg	ttcaaaggta	1380
tcttttaaac	ccttttttag	gtggtgtgaa	aaccaccgct	gctagcggcc	gcagatctgt	1440

ES 2 617 217 T3

taactcgaga	acttgtttat	tcgagcttat	aatggttaca	aataaagcaa	tagcatcaca	1500
aatttcacaa	ataaagcatt	tttttactg	cattctagtt	gtggtttgtc	caaactcatc	1560
aatgtatcct	atcatgtctg	gatccaggat	aatatatggt	agggttcata	gccagagtaa	1620
cctttttttt	taatttttat	tttattttat	tttgagetgc	aggcatgcaa	gctggcactg	1680
gccgtcgttt	tacaacgtcg	tgactgggaa	aacctggcg	ttacccaact	taatcgctt	1740
gcagcacatc	cccctttg	cagctggcgt	aatagcgaag	aggcccgcac	cgatcgccct	1800
tcccaacagt	tgccgagcct	gaatggcgaa	tggcgcccct	cctgagtagc	tggggactac	1860
agggtacat	cacatgcctg	gctaattttt	ttttttttaa	gtagagacga	ggtcttgcta	1920
tgttgcag	gataatatca	aactcttgag	ctcaagcagt	cctcccactt	ctacctctcc	1980
agtgtcggaa	ttacagacat	gagccaccac	tcoctggctt	cagactat	aaatgactaa	2040
ttcctgacac	tacttgaggg	atactagaca	gtagacaaca	catctttaat	ataccaaatg	2100
ggtgactgta	gggttgagag	ggagattaga	attcaatggt	ttatgaccaa	aaaggcttaa	2160
atcaggcaca	agcttaggtc	ttttcaactg	tgaggaccgg	actgaaagt	tcagttcaa	2220
ggccctgtag	ttgctgttta	actgttccca	ggtggaagtc	tcttcaaaga	accactggtg	2280
caaaaagggg	actacctggg	gataaatatt	tcoctccagaa	agggggaaag	tgcaagctcc	2340
cctacaaaa	gcaccaggca	agtccttgtc	tattttccct	gaagttctca	aagaaatgag	2400
acccttgtt	acctttaaga	ttagagaagg	cttgaaaagt	ttgagctgtg	cctttggagg	2460
ccaacaaact	tttctcctt	gttgaccaag	ttcagctctc	ctgtatactt	ccaaggtctg	2520
ttgcatacag	agtgagtatt	gaaggtotta	gaagctggga	tctcagatgt	agggaaaaga	2580
ggagatttcc	tgttcactca	ctgttaagat	atggctgaaa	ttttttgatc	tagtcatcta	2640
caaagcatga	gttgtgggtc	agaaattggt	tttcacatct	tttgacttcc	tttgacatca	2700
gaatataacc	taggaattga	ttacttaagt	gaaggcaagg	tactttggtc	tggacaggaa	2760
cattttgaac	aaggtaggga	gacagctatg	aaggcaagca	tttattctat	ctatcatcta	2820
tctgtctatc	tatctattct	ttcatccact	tatttataca	tttaacaaa	aagtatagag	2880
cgtagtataa	tttgtaagt	ctcagggctg	tgtgtgtatg	gattgtttga	aatgaaacta	2940
aagtgggagt	ataattctac	tgccccotta	accctgtggt	ccctacacta	ccctgcaaga	3000
ctcttagctg	cttagcttaa	ttgtgagget	gatttggggc	atagcacc	atcctctctg	3060
tctttcaaca	tctcataat	aacttgagaa	taattttata	aaatatcaca	atagggcat	3120
gttcagtagg	gtgatata	aaattagaca	agccatagtt	tgagtttacc	cctttgaata	3180
aatatatgac	aaaaggcaat	ttaattatct	ttatgagttt	ggaggtatcc	agtatgaaat	3240
ttagataata	cctgccttct	agtgttgaaa	ttagaactta	atgatataat	gcatcaatga	3300
acttattata	gttcctagca	caaagtaaga	atcctttcaa	tgtgtgtgtg	tgtgtatgta	3360

ES 2 617 217 T3

tttatctggt	attaatagga	atcttatggg	cattatctca	cttaatcctt	attaataact	3420
atgaagcagg	tatttatttg	agttttccaa	gtgagttaag	tatagcttgt	aatacttaag	3480
gaaatatcca	caagttacat	agctagtata	taactgagaa	ataattttat	ttatattata	3540
aaacattcta	acaatacaga	tgtatataaa	ctaaaaaact	gaaagggctc	atgcaaccct	3600
accttctcaa	tatcacttct	tcaactagaa	aaaaccagcc	ttagctgtct	gctatgaatc	3660
ctttcaaat	atacttctga	gaaatgagag	agagaaatgg	ggagggtaga	aggaaggaag	3720
atagggtaag	agacagggaa	ggaggtgtgg	ggaaagaaat	taaattattc	ttttctctgt	3780
ctcttgaaag	agctctttcc	attacattga	atcaaaggta	atgttgccat	ttctggactc	3840
ttgaaataaa	gaaagaccga	tgtatgaaat	gattttgaaa	gtctatggca	ttttcaaat	3900
gcaaggtgat	gtottactaa	ctagcctttg	ctttattatt	agaaatgggg	aagtgagtat	3960
agacatttta	tcaggagata	tattagaaa	aagggaaact	ggagaaactg	ggaggagtat	4020
ccagatgtcc	tgtccctgta	aggtgggggc	accaccttc	aatcaaaagg	gctccttaac	4080
aacttccttg	cttggggctc	caccatcttg	gaccattagc	tccacaggta	tcttcttccc	4140
tctagtggtc	ataacagcag	cttcagctac	ctctctaaag	agtctgcca	gatataggtc	4200
aggaaatata	atccactaat	aaaagagaa	acattttgac	tgtagttggt	tgttttttgt	4260
cattgtgact	atcaataaca	ttcccactct	ttcatcagta	atcactcagg	ttattctgtg	4320
accaacagac	tgtgggaaaa	atcagagaag	gaggcatcct	catgcttact	agcctaaact	4380
gaaattgcta	tagcagagtg	aaccagaag	tttacagata	ttttccacaa	agagtaaaag	4440
gattgaagcc	ttctccagat	caatgcatag	gaaataataa	tggaccataa	aacctatatt	4500
atgacgaaca	acattaggat	aagtccatat	caatttttaa	tccagtcata	agcacagact	4560
acgtgaagca	cgteccaagt	aaggcaggag	aaatgagagg	agcaagaaag	aggagccatt	4620
tgatcaagaa	tagcagaaaa	aggaaaggca	agtcatatta	acaaatgatt	gtcatgccaa	4680
cagtacagat	aactctgcta	ataaaggtag	aggcataata	caggtagtag	cagatatcta	4740
catagtagtt	aaaggacatg	gccatcagta	cagaagattc	cataaaggag	aacctaaaga	4800
ggaaaaggcg	cctgatgctg	tattttctcc	ttacgcatct	gtgcggtatt	tcacaccgca	4860
tatggtgcac	tctcagtaca	atctgctctg	atgccgcata	gtaagccag	ccccgacacc	4920
cgccaacacc	cgctgacgcg	ccctgacggg	cttgtctgct	cccggcatcc	gcttacagac	4980
aagctgtgac	cgctctccgg	agctgcatgt	gtcagaggtt	ttcacctca	tcaccgaaac	5040
gcgcgagacg	aaagggcctc	gtgatacgcc	tatttttata	ggttaatgtc	atgataataa	5100
tggtttctta	gacgtcaggt	ggcacttttc	ggggaaatgt	gcgcggaacc	cctatttggt	5160
tatttttcta	aatacattca	aatatgtatc	cgctcatgag	acaataaacc	tgataaatgc	5220

ES 2 617 217 T3

ttcaataata ttgaaaaagg aagagtatga gtattcaaca tttccgtgtc gcccttattc	5280
ccttttttgc ggcattttgc cttcctgttt ttgctcacc agaaacgctg gtgaaagtaa	5340
aagatgctga agatcagttg ggtgcacgag tgggttacat cgaactggat ctcaacagcg	5400
gtaagatcct tgagagtttt cgccccgaag aacgttttcc aatgatgagc acttttaaaag	5460
ttctgctatg tggcgcggta ttatcccgta ttgacgccgg gcaagagcaa ctcggtcgcc	5520
gcatacacta ttctcagaat gacttggttg agtactcacc agtcacagaa aagcatctta	5580
cggatggcat gacagtaaga gaattatgca gtgctgccat aacctagagt gataaactg	5640
cggccaactt acttctgaca acgatcggag gaccgaagga gctaaccgct tttttgcaca	5700
acatggggga tcatgtaact cgccttgatc gttgggaacc ggagctgaat gaagccatac	5760
caaacgacga gcgtgacacc acgatgcctg tagcaatggc aacaacgttg cgcaaactat	5820
taactggcga actacttact ctagcttccc ggcaacaatt aatagactgg atggaggcgg	5880
ataaagttgc aggaccactt ctgcgctcgg cccttcgggc tggctggttt attgctgata	5940
aatctggagc cggtgagcgt gggctctcgg gtatcattgc agcactgggg ccagatggta	6000
agccctcccg tatcgtagtt atctacacga cggggagtca ggcaactatg gatgaacgaa	6060
atagacagat cgctgagata ggtgcctcac tgattaagca ttggtaactg tcagaccaag	6120
tttactcata tatacttttag attgatttaa aacttcattt ttaatttaa aggatctagg	6180
tgaagatcct ttttgataat ctcatgacca aaatccctta acgtgagttt tcgttccact	6240
gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg agatcctttt tttctgcgcg	6300
taatctgctg cttgcaaaaca aaaaaaccac cgctaccagc ggtggtttgt ttgccggatc	6360
aagagctacc aactcttttt ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgcag ataccaaata	6420
ctgttcttct agtgtagccg tagttaggcc accactcaa gaactctgta gcaccgccta	6480
catacctcgc tctgctaatac ctgttaccag tggctgctgc cagtggcgat aagtcgtgtc	6540
ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac cggataaaggc gcagcggctc ggctgaacgg	6600
ggggttcgtg cacacagccc agcttgagc gaacgacctc caccgaactg agatacctac	6660
agcgtgagct atgagaaagc gccacgcttc ccgaaggag aaaggcggac aggtatccgg	6720
taagcggcag ggtcggaaaca ggagagcgca cgagggagct tccaggggga aacgcctggt	6780
atctttatag tectgtcggg tttcgccacc totgaettga gcgtcgattt ttgtgatgct	6840
cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc ggcttttta cggttcctgg	6900
ccttttgctg gccttttgct cacatgttct ttctcgcgtt atcccctgat tctgtggata	6960
accgtattac cgcctttgag tgagctgata ccgctcggc cagccgaacg accgagcgca	7020
gcgagtcagt gagcagggaa gcggaagagc gcccaatag caaacgcct ctccccgcgc	7080
gttggccgat tcattaatgc agctggcacg acaggtttcc cgactggaaa gcgggcagtg	7140

ES 2 617 217 T3

agcgcacacgc aattaatgtg agttagctca ctcatagggc acccaggct ttacacttta 7200
 tgcttccggc tcgtatgttg tgtggaattg tgagcggata acaatttcac acaggaaca 7260
 gctatgacca tgattacgcc aagcgcgcaa ttaaccctca ctaaaggaa caaaagctgg 7320
 agctccaccg cggtagggcg cgctctagaa ctagtggatc ccattctcct tgatgtacta 7380
 atttttcttt aaaagtgata ataatagctc ccatttagaa tttttaaata acacaacaaa 7440
 tgtaaagtaa ctaatgtgtc ctctggatca tggtaagtaa tgaataaatt taactccctt 7500
 taccttctcc ctttgctatt ttttccatgc taggatttat acatttttaa aaaactaaat 7560
 ctgctatcaa atgacagctt taaatttact ttttaaaatt tgttattgta tatatttatg 7620
 gggatataag tgatgttatg atatatatat acacaatgta cactgattaa atcaagccaa 7680
 ttaacatttt atcatctcaa atacttaaca tttttgtag tgagaacatt tgaatttac 7740
 ttttagcaat ttcaaacat acattattat tattaactat agtcaccatg atgtaccata 7800
 gatctttaa aacttattct tctgcctaa ctgaaacttt gtactctttg actaacatct 7860
 tttcattccc ccaactccca gcctctggta atcaccatta cacactctgc ttctatgagt 7920
 tcaattgctt tagactccac gtaataaatg agatcatgca gcatttggtt ttctgtgctt 7980
 ggcttatctt gcttagcatg gtgtcttaca ggttcatcca tgttgcaaca aataacagaa 8040
 tctcattctt tgtaaggct gaatactatt ccattgggta tatataccac attttctta 8100
 tccattaatc cactgatgga cccttaggtt gttgattcca tatattggct attgtaata 8160
 gtgcagcaat gaacatgaga gtgcaactat ctcttcaatg tactgatttc gaatccttcg 8220
 gatctacctc agaagtgaga ttgcaggatc atataattct acttttagtc ttttgaggag 8280
 ctccatacag ctttccatat ggccatacta attacattct catcaacagt gtacaatggt 8340
 ttccttttct ccacatctc accaacattt ataatttttt gtctttttga taatagccat 8400
 tctgacaggt gtaaagtgat agctcattgc agttttaatt tgcatttttt gatgattagt 8460
 aatgttgaga attttttcat atatctcttg gccagttgca tgtcttcttt ggaaaaatgt 8520
 ctattcagtt cctttgccca ttttttaatt gggatttttg gtttcaagct attgagttgt 8580
 ttgaattccc catctacata gtagttaaag gacatggcca tcagtacaga agattccata 8640
 aaggagaacc taaagaggaa aaat 8664

<210> 36

< 211> 35

< 212> ADN

5 < 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Cebador vegf-5

<400> 36

ctagctagcc accatgaact ttctgctgtc ttggg 35

ES 2 617 217 T3

- <210> 37
- < 211> 27
- < 212> ADN
- < 213> Secuencia artificial
- 5 <220>
- < 223> Cebador vegf-3
- <400> 37
- gaagatctca cgcctcggc ttgtcac 27
- <210> 38
- 10 < 211> 24
- < 212> ADN
- < 213> Secuencia artificial
- <220>
- < 223> Cebador para amplificar la región promotora de EF1 humano en el vector pEF/myc/cyto
- 15 <400> 38
- tcgatcgaat tcaagttcgt gagg 24
- <210> 39
- < 211> 27
- < 212> ADN
- 20 < 213> Secuencia artificial
- <220>
- < 223> Cebador para amplificar la región promotora de EF1 humano en el vector pEF/myc/cyto
- <400> 39
- gctagcgtgt tcacgacacc tgaatg 27
- 25 <210> 40
- < 211> 27
- < 212> ADN
- < 213> Secuencia artificial

ES 2 617 217 T3

<220>

< 223> Cebador chEF1A-F

<400> 40

tatcgatagt ggagtcagga agggtag 27

5 <210> 41

< 211> 27

< 212> ADN

< 213> Secuencia artificial

<220>

10 < 223> Cebador chEF1A-R

<400> 41

tgctagcagc ggtggttttc acaacac 27

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un vector de expresión para células animales que comprende al menos una copia de elemento de MAR (región de unión a la matriz) y elemento de SAR (región de unión al armazón) en el extremo 5' de un promotor y/o el extremo 3' de un sitio de terminación de la transcripción, todos los cuales están ligados operativamente entre sí dentro del vector de expresión, en donde el promotor es un mutante de promotor de EF1 α de ratón y tiene la secuencia génica de SEQ ID N° 34.
- 10 2. El vector de expresión para células animales según la reivindicación 1, en el que el elemento de MAR y el elemento de SAR están situados adyacentes entre sí o separados uno de otro por una secuencia codificante o no codificante.
- 15 3. El vector de expresión para células animales según la reivindicación 1, en donde el vector incluye el elemento de MAR o el elemento de SAR en orientación directa o inversa.
- 15 4. El vector de expresión para células animales según la reivindicación 1, en el que el elemento de MAR es el elemento de MAR de globina β .
- 20 5. El vector de expresión para células animales según la reivindicación 1, en el que el elemento de SAR es el elemento de SAR de CSP-B o el elemento de SAR de interferón β .
- 20 6. El vector de expresión para células animales según la reivindicación 1, en el que la señal de poliadenilación está ligada al extremo 5' del sitio de terminación de la transcripción.
- 25 7. El vector de expresión para células animales según la reivindicación 1, en el que un gen diana cuya expresión es regulada por el promotor se integra en el vector de expresión y en el que dicho gen diana está ligado operativamente al promotor.
- 30 8. Un vector de expresión para células animales que incluye al menos una copia de un elemento de MAR de globina β , un elemento de SAR de CSP-B en el extremo 5' de un promotor y/o el extremo 3' de un sitio de terminación de la transcripción como un vector de expresión para células animales que incluye el promotor ligado operativamente al mismo y el sitio de terminación de la transcripción, en el que el promotor es un mutante de promotor de EF1 α de ratón que tiene la secuencia génica de SEQ ID N° 34.
- 35 9. El vector de expresión para células animales según la reivindicación 8, en el que el vector es pC(F)mEGM(R) que tiene la secuencia génica de SEQ ID N° 35.
- 40 10. Un microorganismo recombinante que comprende el vector de expresión para células animales según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 40 11. Una célula animal recombinante que comprende el vector de expresión para células animales según las reivindicaciones 1 a 9, en el que la célula animal se selecciona del grupo que consiste en células CHO, células Hela, células BHK, células NIH/3T3, células COS-1, células COS-7, células CHO-K1 y células HEK293.
- 45 12. Una célula animal recombinante según la reivindicación 11, en el que la célula comprende el vector de expresión para células animales según la reivindicación 7.
13. Un método para la producción de una proteína diana, en donde el método comprende las etapas de: (a) cultivar una célula animal recombinante según la reivindicación 12 a fin de expresar la proteína diana; y (b) recuperar la proteína diana.

FIG. 1

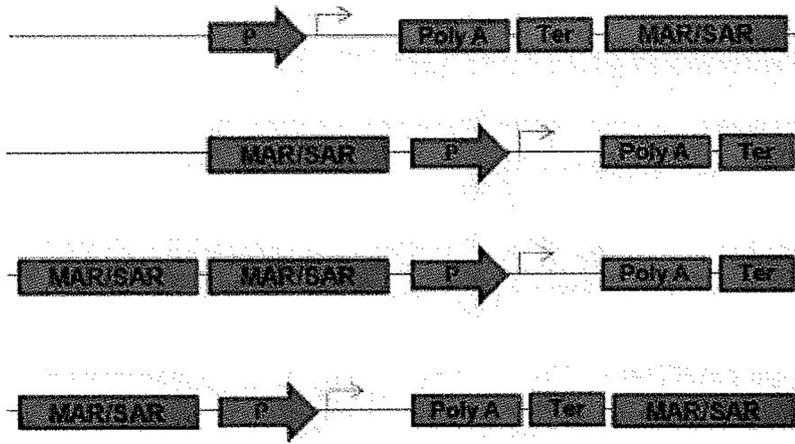


FIG. 2

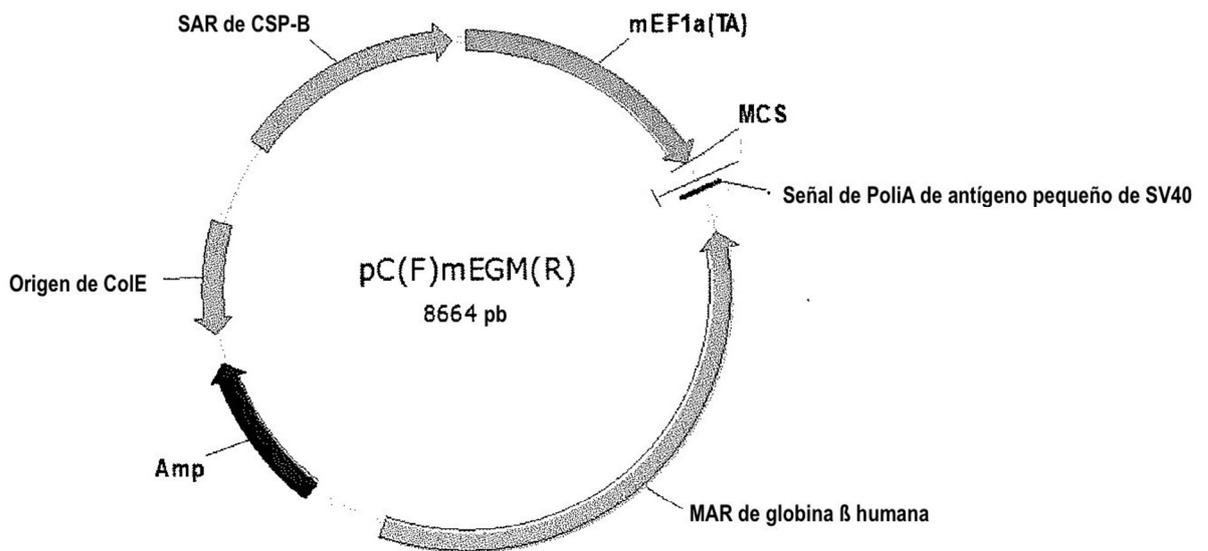


FIG. 3

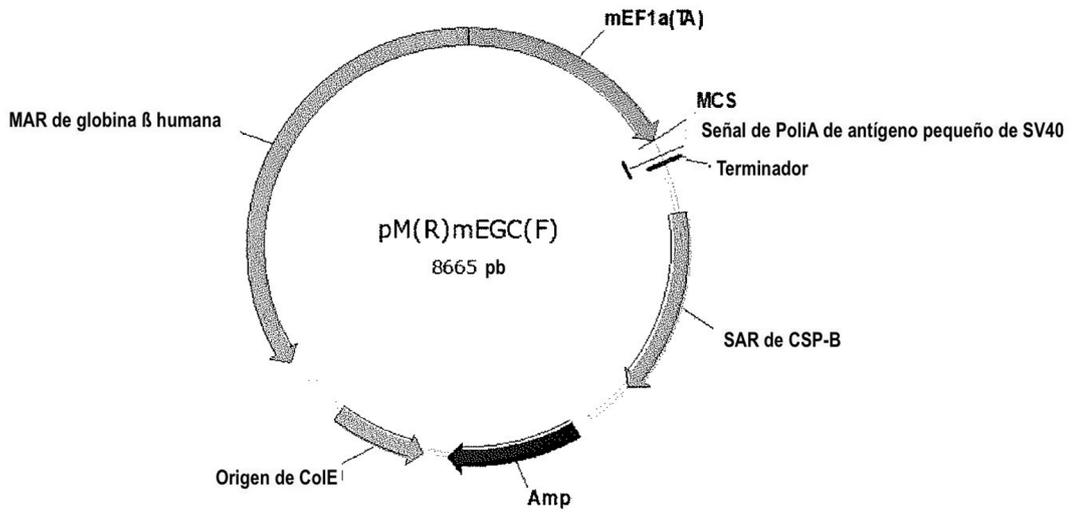


FIG. 4

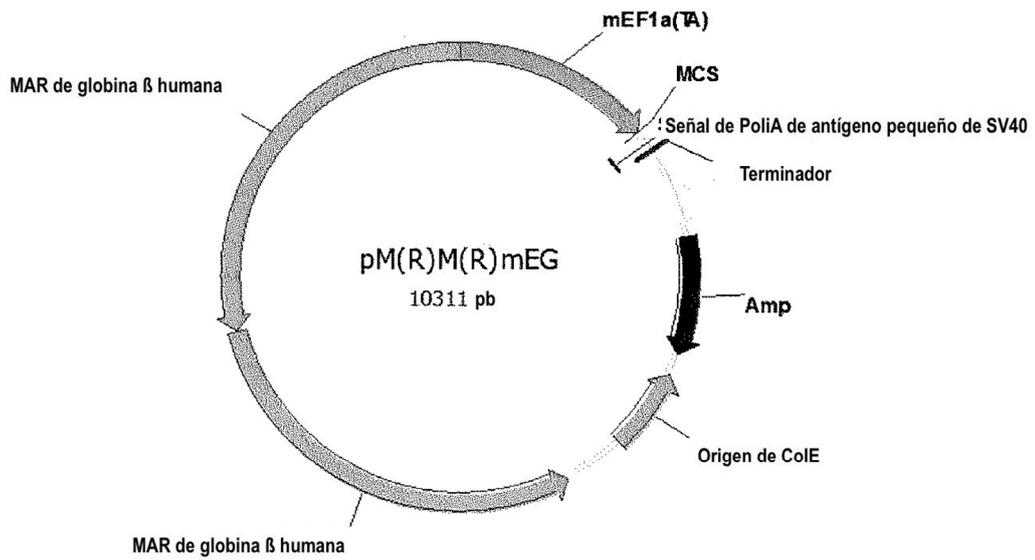


FIG. 8

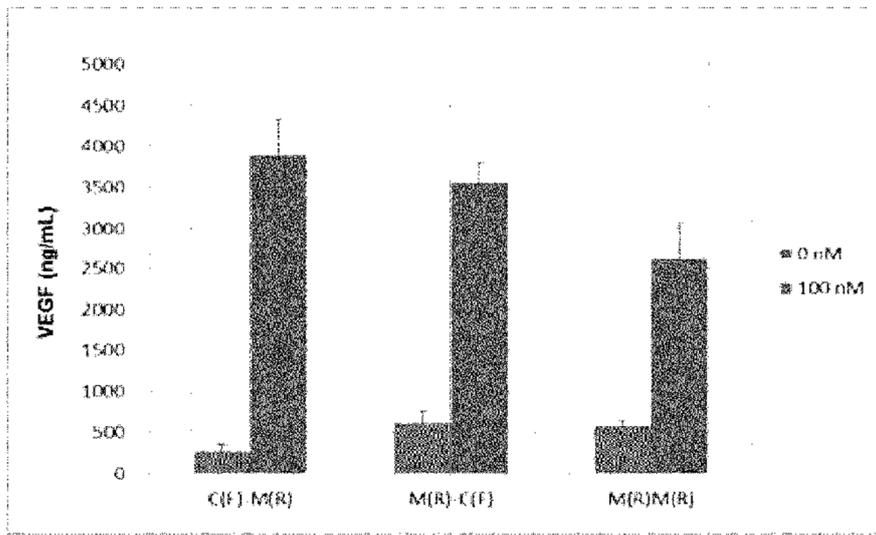


FIG. 9

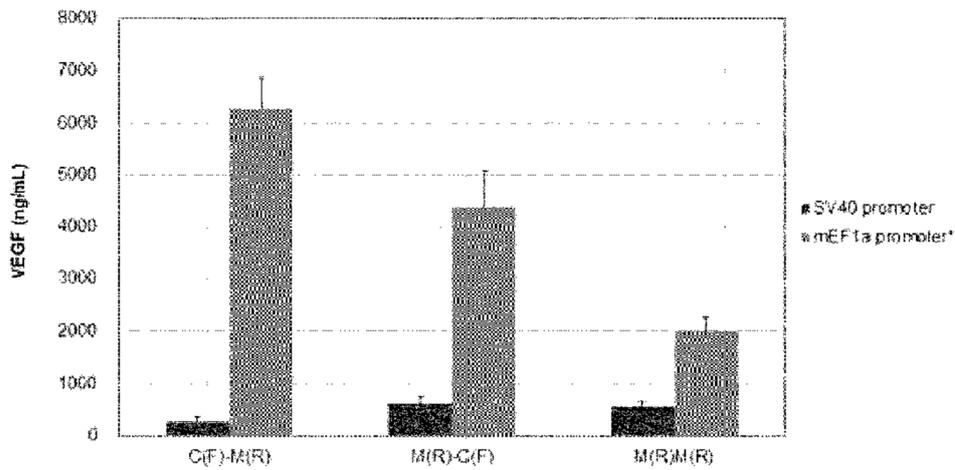


FIG. 10

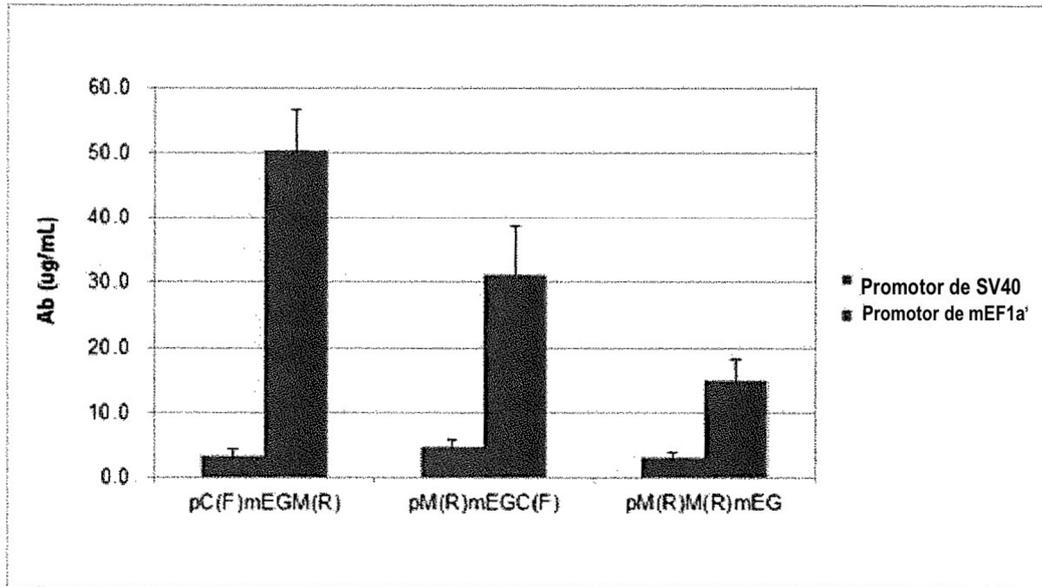


FIG. 11

