

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 634 513**

51 Int. Cl.:

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.11.2011 PCT/KR2011/009166**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.06.2012 WO12074277**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.11.2011 E 11845541 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.04.2017 EP 2646556**

54 Título: **Nuevo promotor híbrido y vector recombinante que comprende el mismo**

30 Prioridad:

30.11.2010 KR 20100120884

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

28.09.2017

73 Titular/es:

**LG CHEM, LTD. (100.0%)
128, Yeoui-daero, Yeongdeungpo-gu
Seoul 07336, KR**

72 Inventor/es:

**KIM, YEON CHUL;
JUNG, SAEM y
JUNG, JUN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 634 513 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

Nuevo promotor híbrido y vector recombinante que comprende el mismo

5 [Campo técnico]

La presente invención se refiere a un promotor híbrido, en el que un todo o una parte de un potenciador de CMV, un todo o una parte de un promotor de β -actina, un todo o una parte de un promotor CMV, y un todo o una parte de un intrón de β -actina están unidos operativamente entre sí, un vector recombinante que comprende el mismo, una célula huésped transformada con el vector recombinante, una composición farmacéutica que comprende el vector recombinante o la célula huésped, y un método para preparar una proteína diana utilizando el vector recombinante o la célula huésped.

15 [Antecedentes de la técnica]

Con el fin de expresar un gen diana en una célula huésped, se requiere un vector de expresión y una técnica de transferencia génica para portar un gen estructural de interés y expresar el mismo dentro de las células. A este respecto, el vector de expresión capaz de expresar un fragmento de ADN insertado en el mismo incluye generalmente elementos reguladores, tales como un promotor o un potenciador. Tales elementos reguladores facilitan la expresión de un gen diana unido operativamente a la misma. Los vectores de expresión se pueden seleccionar dependiendo del tipo de célula huésped, el nivel de expresión del gen diana, el tipo de expresión deseada y similar, y se han desarrollado una diversidad de vectores de expresión para satisfacer los objetivos deseados.

25 Lingfei Xu et al, "CMV- β -actin promoter directs higher expression from an adeno-associated viral vector in the liver than the cytomegalovirus or elongation factor 1[alpha] promoter and results in therapeutic levels of human factor X in mice", Human Gene Therapy vol. 12, no. 5, 20 March 2001 (2001-03-20), pages 563-573, describen la estructura de vector de AAV que comprende [potenciador de CMV – promotor de β -actina derivado de pollo - exón 1 - intrón β -globina de conejo/ β - actina derivado de pollo – exón 3 β -globina de conejo]-hAAT-AVV. Zhi-Li Xu et al, "Optimization of transcriptional regulatory elements for constructing plasmid vectors", Gene, Elsevier, Amsterdam, NL, vol. 272, no. 1-2, 11 July 2001, p 149-156, describen un vector que incluye un potenciador de CMV, un promotor de β -actina, un promotor CMV, un intrón de β -actina.

35 El documento WO2005/000888 describe la activación de β -actina de hámster en células CHO.

El documento WO2009/105786 describe qué menos un elemento promotor que comprende un promotor CMV y promotor de β -actina se pueden combinar para producir un promotor.

40 [Divulgación]

[Problema técnico]

De acuerdo con lo anterior, los presentes inventores han hecho un esfuerzo para desarrollar un vector de expresión apropiado para aumentar un nivel de expresión de una proteína diana, y encontró que un promotor híbrido, en el que un todo o una parte de un potenciador de CMV, un todo o una parte de un promotor de β -actina, un todo o una parte de un promotor CMV, y un todo o una parte de un intrón de β -actina están unidos operativamente, es capaz de aumentar notablemente el nivel de expresión de la proteína diana.

50 [Solución técnica]

Un objeto de la presente invención es proporcionar un promotor híbrido que comprende en el orden dado un potenciador de CMV que consiste en la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 13, un promotor de β -actina que consiste en la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO : 9 o SEQ ID NO: 10, una caja TATA de un promotor CMV (Cytomegalovirus), y un intrón de β -actina que consiste en la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 12, en el que el potenciador de CMV, el promotor de β -actina, el promotor CMV y el intrón de β -actina están unidos operativamente entre sí.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un vector recombinante, que comprende el promotor híbrido y un gen que codifica la proteína diana unido operativamente a la misma.

60 Otro objeto más de la presente invención es proporcionar una célula huésped en la que se introduce el vector recombinante.

Otro objeto más de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica que comprende el vector recombinante o la célula huésped.

65

Otro objeto más de la presente invención es proporcionar un método para preparar una proteína diana, que comprende las etapas de:

- 1) cultivar la célula huésped de la presente invención;
- 2) inducir la expresión de la proteína diana de la célula huésped; y
- 3) recoger la proteína diana expresada de la célula huésped o la solución de cultivo de la misma.

[Efectos ventajosos]

La presente invención se refiere a un nuevo promotor híbrido que está optimizado para la producción de un anticuerpo o una vacuna de ADN. Cuando se inserta una variedad de genes diana en un vector recombinante que incluye el promotor híbrido, se puede mejorar la transcripción y expresión de los genes diana. Por lo tanto, el vector recombinante que incluye el promotor híbrido de la presente invención se puede utilizar eficazmente para el desarrollo de un anticuerpo o la producción de una vacuna de ADN.

[Descripción de los dibujos]

La figura 1 muestra la estructura de un vector pGL3-Básico, que se utiliza como vector de partida en la presente invención;

La figura 2 muestra la estructura de un vector promotor pGL3 (SV40), en el que se introduce un promotor SV40 en un vector pGL3- Básico;

La figura 3 muestra la estructura de un vector pGL3-BA, en el que se introduce un promotor de β -actina en un vector pGL3- Básico;

La figura 4 muestra una región de caja TATA de un promotor CMV de un vector pcDNA3.1 utilizado en la presente invención;

La figura 5 muestra la estructura de un vector pGL3-B/C_{TA}, en el que se introduce un promotor híbrido que comprende un promotor de β -actina (1.9 kb) y una región de caja TATA de un promotor CMV (130 pb) en un vector pGL3- Básico;

La figura 6 muestra la estructura de un vector pGL3-B/C_{TA}/B_{in}, en el que un promotor híbrido que comprende un promotor de β -actina (1.9 kb), una región de caja TATA de un promotor CMV (130 pb) y una región de intrón de β -actina se introduce en un vector pGL3- Básico;

La figura 7 muestra la estructura de un vector pGL3-U/C_{TA}/B_{in}, en el que un promotor híbrido que comprende un promotor de β -actina (150 pb), una región caja TATA de un promotor CMV (130 pb) y una región de intrón de β -actina se introduce en un vector pGL3- Básico;

La figura 8 muestra la estructura de un vector pGL3-C_{eh}/U/C_{TA}/B_{in}, en el que un promotor híbrido que comprende un promotor de β -actina (150 pb), una región de caja TATA de un promotor CMV (130 pb), una región de intrón de β -actina y una región potenciadora de CMV se introduce en un vector pGL3- Básico; y

La figura 9 muestra los resultados de comparar los niveles de expresión de luciferasa en células CHO transformadas con cada uno de los vectores descritos anteriormente.

[Mejor modo]

En una realización, la presente invención proporciona un promotor híbrido que comprende en el orden dado un potenciador de CMV que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 13, un promotor de β -actina que consiste en la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10, una caja TATA de un promotor CMV (Cytomegalovirus), e intrón de β -actina que consiste en la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 12, en la que el potenciador CMV, el promotor de β -actina, el promotor CMV y el intrón de β -actina están unidos operativamente entre sí.

Como se utiliza en este documento, el término " β -actina" existe en la mayoría de los tipos celulares como un componente principal del citoesqueleto y es una proteína altamente conservada que está implicada en la motilidad celular, estructura e integridad. El gen que codifica β -actina sirve como un gen de mantenimiento, y puede mantener cierto nivel de expresión independientemente de las condiciones ambientales.

Como se utiliza en este documento, el término "promotor" se refiere a una secuencia de polinucleótidos que permite la transcripción de un gen diana unido operativamente a la misma y regula su expresión. El promotor incluye secuencias que son reconocidas por una ARN polimerasa y un sitio de iniciación de la transcripción. Con el fin de expresar una proteína diana en un tipo de célula particular o una célula huésped, se debe elegir cuidadosamente un promotor funcional apropiado. Por ejemplo, las secuencias promotoras han sido depositadas en bancos de datos tales como GenBank, y se pueden obtener como un elemento o elementos separados clonados dentro de una secuencia de polinucleótidos de fuentes comerciales o individuales.

Como se utiliza en este documento, el término "promotor de β -actina" se refiere a un gen estructural que está implicado en la regulación de la actividad transcripcional del gen de mantenimiento, β -actina. En el caso de influir en la expresión de una secuencia codificante bajo regulación transcripcional de un promotor, el promotor de β -actina está unido operativamente a una secuencia codificante. La secuencia codificante puede estar unida operativamente a una secuencia de nucleótidos que regula la transcripción en una dirección hacia adelante o inversa.

Con respecto a los objetos de la presente invención, el promotor de β -actina de la presente invención puede estar compuesto de uno o más fragmentos de ADN seleccionados del grupo que consiste en lo siguiente:

i) un fragmento de ADN que tiene una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 9,

ii) un fragmento de ADN que tiene una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 10.

El promotor de β -actina de la presente invención se puede amplificar por PCR utilizando cebadores hacia adelante e inversos representados por las SEQ ID NO: 1 y 2 y un todo o una parte de la secuencia del promotor de β -actina como plantilla. El promotor de β -actina resultante puede ser un fragmento de ADN que tiene un tamaño de aproximadamente 1.9 kb o 150 pb.

5'-BA 1_F(NheI): 5' -CAG CTA GCG GGA CCA AGA CAG AAC CAT AA-3 (SEQ ID NO: 1)

3'-BA 4_R(HindIII): 5'-GTA AGC TTC GGC GAA CTA TAT CAG GGC A-3 (SEQ ID NO: 2)

Cualquier tipo de promotores de β -actina conocidos en la técnica se puede usar como un promotor de β -actina, el promotor de β -actina de la invención es el promotor de β -actina de la célula CHO (Ovario de Hámster Chino).

El fragmento de ADN de SEQ ID NO: 9 comprende secuencias de nucleótidos de 1930 pb, que codifican para la longitud completa de un promotor de β -actina derivado de células CHO, y el fragmento de ADN de SEQ ID NO: 10 comprende secuencias de nucleótidos de 154 pb, que codifican un fragmento U20114 que tiene una actividad promotora de β -actina.

Como se utiliza en este documento, el término "intrón de β -actina" se refiere a una secuencia que regula la transcripción de un gen que está presente dentro del gen de β -actina o un transcrito del mismo y que no está incluido en un producto de ARN final del gen. La secuencia de nucleótidos de un intrón no tiene información sobre una secuencia de aminoácidos.

Con respecto a los objetos de la presente invención, el intrón de β -actina de la presente invención es un fragmento de ADN que consiste en una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 12.

El intrón de β -actina de la presente invención se puede amplificar por PCR utilizando cebadores hacia adelante e inversos representados por las SEQ ID NO: 6 y 2 y un todo o una parte de la secuencia de intrones de β -actina como plantilla. El intrón de β -actina resultante puede ser un fragmento de ADN que tiene un tamaño de aproximadamente 1 kb.

5'-CBint _F(NheI): 5'-CAA GCT AGC GAG CAC AGG CCT TTC-3' (SEQ ID NO: 6)

3'-BA 4_R(HindIII): 5'-GTA AGC TTC GGC GAA CTA TAT CAG GGC A-3' (SEQ ID NO: 2)

Como se utiliza en este documento, el término "CMV (cytomegalovirus)" pertenece a un género viral del grupo viral conocido como *Herpesviridae*. La especie que infecta a los seres humanos es comúnmente conocida como CMV humano (HCMV) o herpesvirus humano-5 (HHV-5). Se clasifica en la familia del alfa-herpesvirus y en la familia de los gamma-herpesvirus, y todos los herpesvirus comparten una capacidad característica de permanecer latente dentro del cuerpo durante largos períodos.

Como se utiliza en este documento, el término "promotor de CMV (pCMV)" se refiere a un promotor temprano de cytomegalovirus (CMV). pCMV ha sido conocido como un poderoso elemento regulador, y muestra su actividad en varias células.

Como se utiliza en este documento, el término "caja TATA" se refiere a una región que consiste en la secuencia de nucleótidos de TATAAA, que está incluida en muchos promotores eucariotas. La caja TATA se encuentra por lo general muy cerca de un sitio de iniciación de la transcripción (dentro de 50 pares de bases), y una proteína de unión a TATA se une a esta región para ayudar a la formación de un complejo de transcripciones de ARN polimerasa.

Con respecto a los objetos de la presente invención, la región de caja TATA del promotor CMV de acuerdo con la presente invención puede estar compuesta por un fragmento de ADN de los siguientes:

i) un fragmento de ADN que tiene una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 11, o

ii) un fragmento de ADN que tiene una delección, una sustitución o una inserción de uno o más nucleótidos en la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN i), y que tiene una actividad promotora y una actividad de regulación de la expresión de un gen diana unido operativamente en dirección 3' del promotor.

Como se utiliza en este documento, el término "caja TATA" se refiere a una secuencia de timina (T) y adenina (A) alternantes de un sitio de iniciación de transcripción presente en la región promotora, y es una región altamente conservada común en la mayoría de los organismos.

La región de caja TATA del promotor CMV se puede amplificar por PCR utilizando cebadores hacia adelante e inversos representados por las SEQ ID NO: 4 y 5 y un total o una parte de la región de la caja TATA del promotor CMV como plantilla. La región de la caja TATA resultante puede ser un fragmento de ADN que tiene un tamaño de aproximadamente 130 pb.

5'-CMV TA_F(Sall): 5'-CAG TCG ACT AGG CGT GTA CGG TGG GAG-3' (SEQ ID NO: 4)

Sitio del cebador inverso 3'-BGH: 5'-TAG AAG GCA CAG TCG AGG-3' (SEQ ID NO: 5)

Como se utiliza en este documento, el término "potenciador de CMV" se refiere a una secuencia que se une a otra proteína de un complejo de iniciación de transcripción y mejora la iniciación de la transcripción regulada por el promotor relacionado.

Con respecto a los objetos de la presente invención, el potenciador de CMV de la presente invención es un fragmento de ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 13.

El potenciador de CMV de la presente invención se puede amplificar por PCR utilizando cebadores hacia adelante e inversos representados por SEQ ID NO: 7 y 8 y un todo o una parte del potenciador de CMV como plantilla. El potenciador de CMV resultante puede ser un fragmento de ADN que tiene un tamaño de aproximadamente 530 pb.

5'-CMV En_F(MluI): 5'- CAG ACG CGT TGA CAT TGA TTA TTG ACT-3' (SEQ ID NO: 7)

3'-CMV En_R(NheI): 5'-CAG GCT AGC AGT TGT TAC GAC ATT TTG-3' (SEQ ID NO: 8)

Como se utiliza en este documento, el término "PCR (reacción en cadena de la polimerasa)" significa una técnica científica en biología molecular para amplificar una o varias copias de una pieza de ADN a través de varios órdenes de magnitud, generando miles a millones de copias de una secuencia de ADN particular. El método se basa en ciclos térmicos que consisten en ciclos repetidos como sigue:

1) etapa de desnaturalización: calentando una plantilla de ADN, produciendo moléculas de ADN de cadena sencilla,

2) etapa de hibridación: hibridación de cebadores a la plantilla de ADN de cadena sencilla, y la unión de ADN polimerasa al híbrido de cebador-plantilla, y

3) etapa de extensión/alargamiento: sintetizar una nueva hebra de ADN complementaria a la hebra de plantilla de ADN, dando lugar a una amplificación (geométrica) exponencial del ADN diana.

La PCR proporciona un medio para detectar la presencia de una molécula diana en condiciones cuantitativas o semicuantitativas y para determinar la cantidad relativa de la misma dentro del grupo inicial de ácidos nucleicos.

Como se utiliza en este documento, el término "en dirección 3'" se refiere a una secuencia de nucleótidos que está situada en posición 3' con respecto a una secuencia de nucleótidos de referencia. En particular, las secuencias de nucleótidos en dirección 3' se refieren generalmente a secuencias seguidas por un sitio de iniciación de transcripción. Por ejemplo, un codón de iniciación de la traducción de un gen está situado en dirección 3' del sitio de iniciación de la transcripción.

Como se utiliza en este documento, el término "unido operativamente" se refiere a un enlace funcional entre un promotor y una segunda secuencia, en el que la secuencia promotora inicia y media la transcripción del ADN correspondiente a la segunda secuencia. En particular, el término unido operativamente significa que la expresión (operación) de una secuencia de gen diana se localiza bajo el control de una secuencia de regulación de la transcripción (por ejemplo, promotor, potenciador o similares) o una secuencia de regulación de la traducción.

En una realización preferida se ha construido un promotor híbrido, en el que un todo o una parte de un potenciador de CMV, un todo o una parte de un promotor de β -actina, un todo o una parte de un promotor CMV, y un promotor CMV, un todo o una parte de un intrón de β -actina están unidos operativamente entre sí. Se ha encontrado que el promotor híbrido de la presente invención puede mejorar significativamente la transcripción de un gen diana y la expresión de una proteína diana, en comparación con los promotores convencionales conocidos en la técnica (véase la figura 9).

En una realización más específica, el promotor híbrido de la presente invención puede ser un promotor que comprende:

un potenciador de CMV representado por SEQ ID NO: 13,

una región de caja TATA de un promotor CMV representado por SEQ ID NO: 11,

un promotor de β -actina representado por SEQ ID NO: 9, y

una región de intrón de β -actina representada por SEQ ID NO: 12,

en el que el promotor CMV, la caja TATA, el promotor de β -actina y el intrón de β -actina están unidos operativamente entre sí.

Además, el promotor híbrido de la presente invención puede ser un promotor que comprende:

un potenciador de CMV representado por SEQ ID NO: 13,

una región de caja TATA de un promotor CMV representado por SEQ ID NO: 11,

un promotor de β -actina representado por SEQ ID NO: 10, y

una región de intrón de β -actina representada por SEQ ID NO: 12,

en el que el promotor CMV, la caja TATA, el promotor de β -actina y el intrón de β -actina están unidos operativamente entre sí.

Como se utiliza en este documento, el término "homología" en relación con una secuencia (por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico, una secuencia de aminoácidos, etc.) se refiere a la proporción de identidad entre dos o más secuencias de genes. Por lo tanto, cuanto mayor sea la homología entre dos genes dados, mayor será la identidad o similitud entre sus secuencias. La determinación de sí o no dos genes tienen homología se determina comparando sus secuencias directamente o mediante un método de hibridación bajo condiciones rigurosas. Cuando dos secuencias de genes se comparan directamente entre sí, estos genes tienen homología si las secuencias de ADN de los genes tienen representativamente al menos 50% de identidad, preferiblemente al menos 70% de identidad, más preferiblemente al menos 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad entre sí.

Como se utiliza en este documento, el término "homólogo" en todas sus formas gramaticales y variaciones ortográficas se refiere a la relación entre proteínas que poseen un "origen evolutivo común", incluyendo proteínas derivadas de superfamilia (por ejemplo, superfamilia de inmunoglobulinas) y proteínas homólogas derivadas de diferentes especies (por ejemplo, cadena ligera de miosina) (Reeck et al., Cell 50: 667, 1987). Tales proteínas (y sus genes que codifican) tienen homología de secuencia, como se refleja por su alto grado de similitud de secuencia. Sin embargo, en el uso común y en el contexto de la presente invención, el término "homólogo" que se modifica con un adverbio tal como "altamente" se puede referir a la similitud de secuencia y no a un origen evolutivo común.

Como se utiliza en este documento, el término "similitud de secuencia" se refiere al grado de identidad o correspondencia entre las secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos de proteínas que pueden o no compartir un origen evolutivo común. En una realización específica, dos secuencias de ADN son "sustancialmente homólogas" o "sustancialmente similares" cuando al menos aproximadamente 21% (preferiblemente al menos aproximadamente 50% y más preferiblemente aproximadamente 75%, 90%, 95%, 96%, 97 %, 98% o 99%) de los nucleótidos coinciden con la longitud definida de las secuencias de ADN.

Como se utiliza en este documento, el término "sustancialmente similar" se refiere a fragmentos de ácido nucleico en los que los cambios en una o más bases de nucleótidos dan como resultado la sustitución de uno o más aminoácidos, pero no afectan las propiedades funcionales de la proteína codificada por el mismo. "Sustancialmente similar" también se refiere a fragmentos de ácido nucleico en los que los cambios en una o más bases de nucleótidos median la alteración de la expresión génica por tecnología antisentido o cosupresión sin influir en las propiedades funcionales de la misma. "Sustancialmente similar" también se refiere a modificaciones de los fragmentos de ácido nucleico tales como la delección o inserción de una o más bases de nucleótidos que no afectan sustancialmente las propiedades funcionales del transcrito resultante. Por lo tanto, se entiende que la presente invención abarca más que las secuencias de ejemplo específicas. Cada una de las modificaciones propuestas es bien conocida para los expertos en arte, así como la determinación de la retención de actividades biológicas de los productos codificados

La similitud, identidad y homología de secuencias de aminoácidos y secuencias de bases se comparan en este documento utilizando FASTA con los parámetros por defecto. Alternativamente, se puede realizar una búsqueda de identidad, por ejemplo, utilizando BLAST 2.2.9 de NCBI (publicado el 12 de mayo de 2004). Como se utiliza en este documento, el valor de identidad se refiere generalmente al valor como resultado de la alineación con el BLAST como se describió anteriormente usando los parámetros por defecto. Si el cambio de parámetros da lugar a valores más altos, entonces el valor más alto se emplea en este documento como el valor de la identidad. Cuando se evalúa una pluralidad de regiones para determinar la identidad, el valor más alto se emplea en este documento como el valor de la identidad.

En otra realización, la presente invención proporciona un vector recombinante que comprende el promotor híbrido y un gen codificante de proteína diana unido operativamente a él.

Como se utiliza en este documento, el término "vector recombinante" se refiere a un vector que transfiere una secuencia de polinucleótidos de interés a una célula diana. Dicho vector es capaz de autorreplicación o incorporación en un cromosoma en una célula huésped (por ejemplo, una célula procariota, levadura, una célula animal, una célula vegetal, una célula de insecto, un animal individual y una planta individual, etc.), y contiene un promotor en un sitio apropiado para la transcripción de un polinucleótido de la presente invención. El vector recombinante puede comprender un gen estructural y un promotor para regular su expresión, y, además, varios elementos reguladores en un estado que les permite operar dentro de las células huésped. Es bien conocido en la técnica que un tipo de vector recombinante de un organismo vivo tal como un animal y una especie de un elemento regulador utilizado puede variar dependiendo del tipo de célula huésped utilizado.

En una realización específica, el vector recombinante de la presente invención incluye el promotor híbrido de la invención.

Más preferiblemente, el vector recombinante de la presente invención puede incluir el promotor híbrido, en el que un potenciador de CMV representado por SEQ ID NO: 13, una región de caja TATA de un promotor CMV representado por SEQ ID NO: 11, un promotor de β -actina representada por SEQ ID NO: 9 o 10, y una región de intrón de β -actina representada por SEQ ID NO: 12 están unidas operativamente entre sí. Más preferiblemente, el vector recombinante de la presente invención puede ser un vector pGL3-Ceh/U/C_{TA}/B_{in} que tiene un mapa de división como se muestra en la FIG. 8. Se ha encontrado que el vector recombinante de la presente invención puede inducir la transcripción de un gen diana y la expresión de una proteína diana con excelente eficacia (véase la figura 9).

El vector recombinante de la presente invención puede incluir además uno o más elementos reguladores tales como un origen de replicación, marcadores seleccionables, terminadores y similares.

Como se utiliza en este documento, el término "marcador seleccionable" se refiere a un gen que funciona como guía para seleccionar una célula huésped que comprende una construcción de ácido nucleico o un vector. Los marcadores seleccionables pueden incluir, pero no se limitan a: marcadores fluorescentes, marcadores luminiscentes y marcadores seleccionables de fármacos, y similares. Los marcadores fluorescentes pueden incluir, pero no se limitan a, genes que codifican proteínas fluorescentes tales como proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente cian (CFP), proteína fluorescente amarilla (YFP), proteína fluorescente roja (dsRFP) y similares. Los marcadores luminiscentes pueden incluir, pero no se limitan a, genes que codifican proteínas luminiscentes tales como luciferasas. Los marcadores seleccionables de fármacos apropiados en la presente invención pueden incluir, pero no se limitan a, genes de resistencia a antibióticos, tales como ampicilina, estreptomina, gentamicina, kanamicina, higromicina, tetraciclina, cloranfenicol y neomicina.

Como se utiliza en este documento, el término "terminador" se refiere a una secuencia que está situada en dirección 3' de una región codificante de la proteína de un gen y que está implicada en la terminación de la transcripción cuando el ADN se transcribe en ARNm, y la adición de una secuencia poli-A. Se sabe que un terminador contribuye a la estabilidad del ARNm, y tiene una influencia en la cantidad de expresión génica. Los terminadores incluyen, pero no se limitan a, una secuencia que incluye AATAAA.

Para desarrollar un promotor híbrido apropiado para la inducción de respuestas inmunes *in vivo* con el aumento del nivel de expresión de un gen diana, la presente invención ha preparado los siguientes vectores recombinantes por combinaciones de diversas secuencias promotor/potenciador, secuencias poli (A) y secuencias de intrones:

5 pGL3-Básico: f1 ori, sitio sintético de pausa poli (A)/transcripcional, sitio de clonación múltiple (MCS), gen indicador de luciferasa (luc^+), señal de poliadenilación tardía de SV40, Amp^r (véase la figura 1)

10 pGL3-Promotor (SV40): f1 ori, sitio sintético de pausa poli (A)/transcripcional, MCS, promotor SV40, gen de luciferasa (luc^+), señal de poliadenilación tardía de SV40, gen de resistencia a ampicilina (Amp^r) (véase la figura 2)

10 pGL3-BA: f1 ori, sitio sintético de pausa poli (A)/transcripcional, MCS, promotor de β -actina, luc^+ , señal de poliadenilación tardía de SV40, Amp^r (véase la figura 3)

15 pGL3-B/ C_{TA} : f1 ori, sitio sintético de pausa poli (A)/transcripcional, MCS, promotor híbrido del promotor de β -actina (1.9 kb) y región de caja TATA (130 pb) del promotor CMV, luc^+ , señal de poliadenilación tardía de SV40, Amp^r (véase la figura 5)

20 pGL3-B/ C_{TA}/B_{in} : f1 ori, sitio sintético de pausa poli (A)/transcripcional, MCS, promotor híbrido del promotor de β -actina (1.9 kb) y región de caja TATA (130 pb) del promotor CMV, intrón de β -actina, luc^+ , señal de poliadenilación tardía de SV40, Amp^r (véase la figura 6)

25 pGL3-U/ C_{TA}/B_{in} : f1 ori, sitio sintético de pausa poli (A)/transcripcional, MCS, promotor híbrido de la región U20114 (150 pb) del promotor de β -actina y región de caja TATA (130 pb) del promotor CMV, intrón de β -actina, luc^+ , señal de poliadenilación tardía de SV40, Amp^r (véase la figura 7)

25 pGL3- $C_{eh}/U/C_{TA}/B_{in}$: f1 ori, sitio de pausa sintético poli (A)/transcripcional, MCS, potenciador de CMV, promotor híbrido de la región U20114 (150 pb) del promotor de β -actina y región de caja TATA (130 pb) del promotor CMV, intrón de β -actina, luc^+ , señal de poliadenilación tardía de SV40, Amp^r (véase la figura 8)

30 Con el fin de examinar la capacidad para inducir la expresión de una proteína diana, cada uno de los vectores recombinantes descritos anteriormente se transformó en células CHO y, a continuación, se compararon los niveles de expresión de un gen de luciferasa insertado como un gen indicador. Se usó un vector pGL3- Básico, que tiene una estructura básica del vector utilizado en la presente invención y dispensa con la secuencia promotora y potenciadora de acuerdo con la presente invención, como grupo control (véase la figura 1). Como resultado, el nivel de expresión de luciferasa se incrementó notablemente en el vector recombinante que tenía un promotor híbrido de un potenciador de CMV, 150 pb de un promotor de β -actina, un promotor CMV y un intrón de β -actina (pGL3- $C_{eh}/U/C_{TA}/B_{in}$ de la figura 8), en comparación con el vector recombinante que tiene un promotor de β -actina (pGL3-BA de la figura 3), teniendo el vector recombinante un promotor híbrido de 1.9 kb de un promotor de β -actina y una región de caja TATA de un promotor CMV, (pGL3-B/ C_{TA} de la figura 5), teniendo el vector recombinante un promotor híbrido de 1.9 kb de un promotor de β -actina, una región de caja TATA de un promotor CMV y una región de intrón de β -actina (pGL3-B/ C_{TA}/B_{in} de la figura 6), y el vector recombinante que tiene un promotor híbrido de 150 pb de un promotor de β -actina, una región de caja TATA de un promotor CMV y una región de intrón de β -actina (pGL3 -U/ C_{TA}/B_{in} de la figura 7) (véanse las tablas 1 y 2 y la figura 9).

45 Por lo tanto, se ha encontrado que cuando se inserta un gen que codifica una proteína diana en lugar del gen de la luciferasa en el vector recombinante de la presente invención, la transcripción y expresión del gen diana se incrementan por la actividad del promotor híbrido de la presente invención, produciendo con ello en masa la proteína diana.

50 En aún otra realización, la presente invención proporciona una célula huésped que se transforma con el recombinante vector.

55 Como se utiliza en este documento, el término "transformación" se refiere a la introducción de un ácido nucleico en células huésped. Como método de transformación, se puede usar cualquier técnica para introducir ADN en células huésped, incluyendo diversas técnicas bien conocidas, tales como electroporación, coprecipitación con fosfato de calcio, infección retroviral, microinyección, DEAE-dextrano y liposomas catiónicos, pero no se limita a ellos.

60 Como se utiliza en este documento, el término "transformante" se refiere a la totalidad o a una parte de un organismo, tal como una célula, en la que se introduce un ADN extraño por transformación. Ejemplos de una célula huésped pueden incluir células procariontas, levaduras, células animales, células vegetales, células de insecto y similares, preferiblemente células animales o células derivadas de células animales, y más preferiblemente células de ovario de hámster chino (CHO). La transformación de células CHO con un gen diana junto con un gen amplificable tal como dihidrofolato reductasa (DHFR) o glutamina sintetasa (GS) ofrece plataformas eficaces para la expresión de las proteínas requeridas. El sistema DHFR se utiliza rutinariamente con células CHO deficientes en la actividad DHFR (DHFR-). El gen diana se administra a las células junto con el gen marcador de DHFR, usualmente

en el mismo vector plasmídico. La exposición de las células transformadas al inhibidor de la enzima DHFR, el metotrexato (MTX) promueve la amplificación de la DHFR y el gen diana cotransformado. El tratamiento con MTX mejora la producción de proteínas específicas después de un aumento del número de copias genéticas.

5 En aún otra realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el vector recombinante o la célula huésped como un ingrediente eficaz, y un portador farmacéuticamente aceptable. La composición de la presente invención se administra en una cantidad farmacéuticamente eficaz.

10 Como se utiliza en este documento, el término "cantidad farmacéuticamente eficaz" en el contexto del ingrediente efectivo se refiere a una cantidad suficiente para exhibir la eficacia pretendida en una relación beneficio/riesgo razonable de manera que sea aplicable al tratamiento médico.

15 Como se utiliza en este documento, el término "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un material que se usa para la producción de un agente farmacéutico o un producto químico agrícola (por ejemplo, un fármaco animal) y no tiene ningún efecto adverso sobre ingredientes eficaces. Cualquier portador farmacéuticamente aceptable conocido en la técnica se puede usar en la composición farmacéutica de la presente invención.

20 Para la administración oral, el portador farmacéuticamente aceptable puede incluir un aglutinante, un lubricante, un desintegrador, un excipiente, un solubilizante, un agente dispersante, un estabilizador, un agente de suspensión, un agente colorante y un perfume. Para la administración inyectable, el portador farmacéuticamente aceptable puede incluir un agente regulador, un agente conservante, un analgésico, un solubilizante, un agente isotónico y un estabilizante. Para la administración tópica, el portador farmacéuticamente aceptable puede incluir una base, un excipiente, un lubricante y un agente conservante.

25 La composición farmacéutica de la presente invención se puede formular en una variedad de formas de dosificación en combinación con los portadores farmacéuticamente aceptables antes mencionados. Por ejemplo, para administración oral, la composición farmacéutica se puede formular en comprimidos, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes u obleas. Para la administración inyectable, la composición farmacéutica se puede formular en una ampolla como una forma de dosificación de una sola dosis o una forma de dosificación unitaria, tal como un recipiente multidosis. La composición farmacéutica se puede formular también en soluciones, suspensiones, comprimidos, pastillas, cápsulas y preparaciones de acción prolongada.

35 Por otra parte, los ejemplos del portador, excipiente y diluyente apropiados para la composición farmacéutica de la presente invención pueden incluir lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidón, goma de acacia, alginato, gelatina, fosfato de calcio, silicato cálcico, celulosa, metilcelulosa, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, agua, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio y aceites minerales. Además, la composición farmacéutica de la presente invención puede incluir además agentes de carga, agentes anticoagulantes, lubricantes, humectantes, perfumes y antisépticos.

40 La composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar a través de cualquiera de las vías comunes, siempre y cuando sea capaz de alcanzar un tejido deseado. Se contemplan una variedad de modos de administración, incluyendo por vía intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutáneamente, intradérmica, oral, tópica, intranasal, intrapulmonar e intrarectal, pero no se limitan a los mismos.

45 Sin embargo, puesto que los péptidos son digeridos tras la administración oral, el ingrediente efectivo de la composición farmacéutica para administración oral debe revestirse o formularse para protección contra la degradación en el estómago. Preferiblemente, la composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar en una forma inyectable. Además, la composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar usando un cierto aparato capaz de transportar el ingrediente efectivo dentro de una célula diana.

50 La frecuencia de administración y la dosis de la composición farmacéutica de la presente invención se pueden determinar por varios factores relacionados incluyendo los tipos de enfermedades que se van a tratar, las vías de administración, la edad del paciente, el sexo, el peso y la gravedad de la enfermedad, así como por los tipos de fármaco como un ingrediente eficaz. La composición de la presente invención se puede administrar sola o en combinación con otro agente terapéutico, ya sea secuencial o simultáneamente, en una dosis única o en dosis múltiples. Teniendo en cuenta todos los factores anteriores, una cantidad mínima para conseguir la máxima eficacia sin efectos secundarios puede ser determinada fácilmente por los expertos en arte.

60 En aún otra realización, la presente invención proporciona un método para preparar una proteína diana, que comprende las etapas de:

1) cultivar la célula huésped de la presente invención;

2) inducir la expresión de la proteína diana a partir del transformante; y

65 3) recolección de la proteína diana expresada a partir del transformante o de su solución de cultivo del mismo.

Como se utiliza en este documento, el término "proteína diana" incluye anticuerpos, enzimas, citoquinas, linfoquinas, moléculas de adhesión, receptores y los derivados o fragmentos de los mismos, pero no se limita a los mismos.

5 Generalmente, se pueden usar todas las clases de polipéptidos que actúan como agonistas o antagonistas y/o tienen aplicaciones terapéuticas o diagnósticas como una proteína diana. Otras proteínas diana incluyen, por ejemplo, proteínas antiapoptóticas, chaperonas, enzimas metabólicas, enzimas de glicosilación y los derivados o fragmentos de los mismos, pero no se limitan a ellos.

10 Como se utiliza en este documento, el término "polipéptido" se refiere a un polímero de aminoácidos sin tener en cuenta la longitud del polímero; de este modo, los péptidos, oligopéptidos y proteínas están incluidas dentro de la definición de polipéptido. Este término tampoco especifica ni excluye modificaciones químicas o posteriores a la expresión de los polipéptidos de la invención, aunque las modificaciones químicas o posteriores a la expresión de estos polipéptidos pueden incluirse o excluirse como realizaciones específicas. Por lo tanto, por ejemplo, las modificaciones a polipéptidos que incluyen la unión covalente de grupos glicosilo, grupos acetilo, grupos fosfato, grupos lipídicos y similares están expresamente abarcadas por el término. Las modificaciones incluyen acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de una unidad estructural hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado lipídico, unión covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclación, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glicosilación, formación de anclajes GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, pegilación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición mediada de la transferencia de ARN de aminoácidos a proteínas tales como arginilación, y ubiquitinación (véase, por ejemplo, Creighton, (1993), Posttranslational Covalent Modification of Proteins, W.H. Freeman and Company, New York B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York 1-12; Seifter, et al., (1990) Meth Enzymol 182:626-646; Rattan et al., (1992) Ann N Y Acad Sci 663:48-62). También se incluyen dentro de la definición polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos que no ocurren naturalmente, aminoácidos que sólo ocurren naturalmente en un sistema biológico no relacionado, aminoácidos modificados de sistemas de mamíferos, etc.), polipéptidos con enlaces sustituidos, así como otras modificaciones conocidas en la técnica, tanto de origen natural como no naturales.

30 Ejemplos de la proteína diana preparada de acuerdo con el método de la presente invención pueden incluir, pero no se limitan a, hormonas de crecimiento humano, hormonas de liberación de la hormona del crecimiento, péptidos de liberación de la hormona del crecimiento, interferones y receptores de interferón (por ejemplo, interferón alfa, beta y gamma, receptor de interferón soluble tipo I, etc.), factores estimulantes de colonias de granulocitos (G-CSFs), factores estimulantes de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSFs), péptidos similares a glucagones (GLP-1, etc.), receptores acoplados a proteína G, interleucinas (por ejemplo, receptor IL-1, receptor IL-4, etc.), enzimas (por ejemplo, glucocerebrosidasa, iduronato-2-sulfatasa, alfa-galactosidasa-A, agalsidasa alfa, beta- o alfa-liduronidasa, butirilcolinesterasa, quitinasa, glutamato decarboxilasa, imiglucerasa, lipasa, uricasa, factor de activación de plaquetas acetilhidrolasa, endopeptidasa neutra, mieloperoxidasa, etc.), proteínas de unión a interleucina o citoquina (por ejemplo, IL-18bp, proteínas de unión a TNF, etc.), factores activadores de macrófagos, péptidos de macrófagos, factores de células B, factores de células T, Proteína A, inhibidores de alergia, glicoproteína de necrosis celular, toxinas inmunes, toxinas linfáticas, factores de necrosis tumoral, factores supresores de tumor, factores de crecimiento de transición, alfa-1 antitripsina, albúmina, alfa-lactalbumina, apolipoproteína-E, eritropoyetina, eritropoyetina altamente glicosilada, angiopoyetina, hemoglobina, trombina, péptidos activadores del receptor de trombina, trombosmodulina, factor VII de la sangre, factor VIIa de la sangre, factor VIII de la sangre, factor IX de la sangre, factor XIII de la sangre, factor activador del plasminógeno, péptidos que se unen a la fibrina, uroquinasas, estreptoquinasas, hirudina, proteína C, proteínas C reactivas, inhibidores de renina, inhibidores de la colagenasa, superóxido dismutasas, leptina, factor de crecimiento originado por plaquetas, factor de crecimiento epitelial, factor de crecimiento epidérmico, angiostatina, angiotensina, factor de crecimiento de mielopoyesis, factor estimulante de mielopoyesis, calcitonina, insulina, atriopéptina, inductor de cartilago, elcatonina, factor de activación tisular de las articulaciones, inhibidor de la vía del factor tisular, hormona estimulante del foliculo, hormona formadora de progesterona, hormona liberadora de la hormona formadora de progesterona, factores de crecimiento nervioso (por ejemplo, factor de crecimiento nervioso, factor neurotrófico ciliar, factor 1 de la axogénesis, el péptido natriurético cerebral, el factor neurotrófico derivado de la glía, la nefrina, el factor inhibidor de la neurofilia, el factor neurotrófico, la neuturina, etc.), paratormona, relaxina, secretina, somatomedina, el factor de crecimiento de tipo insulínico, hormonas adrenocorticales, glucagones, colecistocinina, polipéptidos pancreáticos, péptido liberador de gastrina, factor liberador de corticotropina, hormona estimulante del tiroides, autotaxina, lactoferrina, miostatina, receptores (por ejemplo, TNFR(P75), TNFR(P55), receptor de IL-1, receptor de VEGF, receptor de factor activador de células B, etc.), antagonistas de receptores (por ejemplo IL1-Ra, etc.), antígenos de superficie celular (por ejemplo, CD 2, 3, 4, 5, 7, 11a, 11b, 18, 19, 20, 23, 25, 33, 38, 40, 45, 69, etc.), anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, scFv, Fab, Fab', F(ab')₂ y Fd), antígenos de vacunas originados en virus. Los fragmentos de anticuerpo incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, Fd o scFv que es capaz de unirse a un antígeno específico, y preferiblemente Fab'.

65 Los sistemas de producción para las proteínas diana descritas anteriormente pueden ser *in vitro* o *in vivo*. Los sistemas de producción *in vitro* pueden emplear el uso de células eucariotas o procariotas. Por ejemplo, la proteína diana se puede obtener cultivando la célula huésped de la presente invención *in vitro*. El cultivo de la célula huésped

se puede realizar de acuerdo con métodos convencionales en la técnica, y las condiciones tales como la temperatura, el tiempo y el pH de un medio se pueden controlar adecuadamente. Los medios de cultivo utilizados para el cultivo necesitan cumplir los requisitos para el crecimiento de cepas particulares de una manera apropiada. Los medios de cultivo para diversas cepas se describen, por ejemplo, en "Manual of Methods for General Bacteriology" de American Society for Bacteriology (Washington D. C, USA, 1981). Una fuente de carbono para los medios de cultivo puede ser azúcar y carbohidratos (por ejemplo, glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, melaza, almidón y celulosa), aceite y grasa (por ejemplo, aceite de soja, aceite de girasol, aceite de cacahuete y aceite de coco), un ácido graso (por ejemplo, ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linolénico), un alcohol (por ejemplo, glicerol y etanol) y un ácido orgánico (por ejemplo, ácido acético). Las fuentes de carbono se pueden usar solas o en una mezcla. Una fuente de nitrógeno puede ser también un compuesto orgánico que contiene nitrógeno (por ejemplo, peptona, extracto de levadura, extracto de carne, extracto de malta, licor de maíz fermentado, harina de soja y urea) o un compuesto inorgánico (por ejemplo, sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio). La fuente de nitrógeno se puede usar sola o en una mezcla. Una fuente de fósforo puede ser dihidrogenofosfato de potasio, fosfato de hidrógeno dipotásico o su sal de sodio del mismo. Además, los medios de cultivo deben contener una sal metálica (por ejemplo, sulfato de magnesio o sulfato de hierro) esencial para el crecimiento. Finalmente, el medio de cultivo puede incluir además sustancias esenciales para el crecimiento, tales como aminoácidos y vitaminas, además de las sustancias mencionadas anteriormente. También se pueden adicionar precursores apropiados al medio de cultivo. Aquellos componentes de medios de cultivo pueden añadirse a los medios de cultivo sobre una base discontinua o sobre una base continua durante el cultivo.

El pH del medio de cultivo se puede ajustar con un compuesto básico (por ejemplo, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o amoníaco), o un compuesto ácido (por ejemplo, ácido fosfórico o ácido sulfúrico). Se puede adicionar un agente antiespumante tal como éster de poliglicol de ácido graso para evitar la formación de burbujas. Se puede mantener un estado aeróbico inyectando oxígeno o gas que contiene oxígeno (por ejemplo, aire) en el medio de cultivo.

Por ejemplo, medios de cultivo líquidos para células animales pueden incluir DMEM, MEM, RPM11640, IMDM, medio F10, y medio F12. Los medios de cultivo pueden incluir suplementos de suero tales como suero fetal bovino (FCS), o pueden ser medios de cultivo libres de suero. Además, se puede adicionar un transactivador al medio. El cultivo se realiza preferiblemente a aproximadamente pH 6.0 a 8.0. El cultivo se lleva a cabo por lo general a aproximadamente 30 a 40°C, durante aproximadamente 15 a 200 horas. Si es necesario, el medio puede ser cambiado, aireado o agitado.

Dado que las condiciones de cultivo varían dependiendo del tipo de célula utilizado, los expertos en arte pueden determinar adecuadamente las condiciones adecuadas. Por ejemplo, las células CHO se pueden cultivar bajo una atmósfera de CO₂ de 0 a 40%, preferiblemente de 2 a 10%, a una temperatura de 30 a 39°C, preferiblemente de 37°C, durante 1 a 14 días.

Se pueden utilizar diversos aparatos de cultivo para células animales y se ejemplifican mediante aparatos de cultivo de tanques de tipo tanque de fermentación, aparatos de cultivo de tipo de levantamiento por aire, aparatos de cultivo de tipo de frasco de cultivo, aparatos de cultivo del tipo de frasco giratorio, aparatos de cultivo del tipo de microportador, aparatos de cultivo del tipo de depósito de flujo, aparatos de cultivo del tipo de fibra hueca, aparatos de cultivo del tipo de botella de rodillo, aparatos de cultivo de tipo de lecho empaquetado o similares

Mientras tanto, los sistemas de producción *in vivo* pueden incluir, por ejemplo, sistemas de producción que utilizan animales o plantas no humanos. Se puede introducir un ADN de interés en tal animal o planta, y puede recogerse el polipéptido producido en el animal o planta *in vivo*.

[Modo de invención]

A continuación, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a los ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos son sólo para propósitos ilustrativos, y la invención no pretende ser limitada por estos ejemplos.

Ejemplo 1: Técnicas generales de biología molecular

Se llevaron a cabo métodos generalmente utilizados en biología molecular, tales como tratamiento con enzimas de restricción, electroforesis en gel de agarosa, extracción con gel, purificación de ADN de plásmido, reacción en cadena de polimerasa (PCR), ligadura de fragmentos de ADN y transformación de *E. coli* según los métodos descritos en la literatura con modificaciones menores (Sambrook J et al., 2001 Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.).

Ejemplo 2: Preparación de vectores plasmídicos

<2-1> Preparación del vector pGL3-BA

La PCR se realizó utilizando un ADN genómico total obtenido a partir de células CHO como plantilla y un par de cebadores de SEQ ID NO: 1 y 2 para amplificar un gen promotor de β -actina y, de este modo, el producto de PCR amplificado se trató con enzimas de restricción NheI and HindIII. El fragmento de ADN del promotor de β -actina resultante (3.0 kb) se insertó en un vector pGL3- Básico (Promega) tratado con las mismas enzimas de restricción, para preparar así un vector pGL3-BA (Figura 3). En este caso, la PCR se realizó en las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C, durante 5 minutos; 25 ciclos de desnaturalización a 94°C, durante 1 minuto, hibridación a 55°C, durante 1 minuto y polimerización a 72°C, durante 3.5 minutos; y elongación final a 72°C, durante 7 minutos.

5'-BA 1_F(NheI): 5'-CAG CTA GCG GGA CCA AGA CAG AAC CAT AA-3' (SEQ ID NO: 1)

3'-BA 4_R(HindIII): 5'-GTA AGC TTC GGC GAA CTA TAT CAG GGC A-3' (SEQ ID NO: 2)

Como se muestra en la figura 3, el vector pGL3-BA preparado incluye f1 ori, sitio sintético de pausa de poli (A)/transcripcional, MCS, promotor de β -actina, luc⁺, señal de poliadenilación tardía de SV40 y gen de resistencia a Amp.

<2-2> Preparación del vector pGL3-B/C_{TA}

La PCR se realizó utilizando un vector pcDNA3.1 (Invitrogen) como plantilla y un par de cebadores de SEQ ID NO: 4 y 5 para amplificar una región de caja TATA (130 pb) de un promotor CMV (Figura 4), y de este modo se trató el producto de PCR amplificado con las enzimas de restricción Sall y HindIII. El fragmento de ADN resultante de la región de caja TATA se insertó en el vector pGL3-BA tratado con las enzimas de restricción XhoI y HindIII, para preparar así un vector pGL3-B/C_{TA} (Figura 5). El vector pGL3-B/C_{TA} resultante no tiene sitios de restricción Sall y XhoI. En este caso, la PCR se realizó bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C, durante 5 minutos; 25 ciclos de desnaturalización a 94°C, durante 1 minuto, hibridación a 55°C, durante 1 minuto y polimerización a 72°C, durante 2.5 minutos; y elongación final a 72°C, durante 7 minutos.

5-CMV TA_F(Sall): 5'-CAG TCG ACT AGG CGT GTA CGG TGG GAG-3' (SEQ ID NO: 4)

Sitio del cebador inverso 3'-BGH: 5'-TAG AAG GCA CAG TCG AGG-3' (SEQ ID NO: 5)

Como se muestra en la figura 5, el vector pGL3-B/C_{TA} preparado incluye f1 ori, sitio sintético de pausa de poli (A)/transcripcional, MCS, un promotor híbrido de un promotor de β -actina (1.9 kb) y una región de caja TATA (130 pb) de un Promotor CMV, luc⁺, señal de poliadenilación tardía de SV40 y el gen de resistencia a Amp.

<2-3> Preparación del vector pGL3 - B/C_{TA}/B_{in}

La PCR se realizó usando un vector pGL3-BA preparado en el ejemplo 2-1 como una plantilla y un par de cebadores de SEQ ID NO: 6 y 2 para amplificar una región de intrón de β -actina, y de este modo se trató el producto de PCR amplificado con las enzimas de restricción SacI y HindIII, para obtener así un fragmento de ADN (1 kb) de intrón de β -actina. Además, el vector pGL3-B/C_{TA} preparado en el ejemplo 2-2 se trató con las enzimas de restricción EcoRV y SacI, para obtener así un fragmento de ADN (370 pb) de la región de caja TATA. Después de tratar el vector pGL3-B/C_{TA} con las enzimas de restricción EcoRV y HindIII, se insertó el fragmento de ADN (1 kb) de intrón de β -actina y el fragmento de ADN (370 pb) de la región de caja TATA en el vector, para preparar así un vector pGL3-B/C_{TA}/B_{in} (figura 6). El vector resultante pGL3-B/C_{TA}/B_{in} tiene dos sitios de restricción SacI. En este caso, la PCR se realizó bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C, durante 5 minutos; 25 ciclos de desnaturalización a 94°C, durante 1 minuto, hibridación a 55°C, durante 1 minuto y polimerización a 72°C, durante 3,5 minutos; y elongación final a 72°C, durante 7 minutos.

5'-BA-int(SacI): 5'-CAA GAG CTC TCT GGC TAA CTG AGC ACA GGC CTT TC-3' (SEQ ID NO: 6)

3'-BA 4_R(HindIII): 5'-GTA AGC TTC GGC GAA CTA TAT CAG GGC A-3' (SEQ ID NO: 2)

Como se muestra en la figura 6, el vector pGL3-B/C_{TA}/B_{in} preparado incluye f1 ori, sitio sintético de pausa poli (A)/transcripcional, MCS, un promotor híbrido de un promotor de β -actina (1.9 kb) y una región de caja TATA (130 pb) De un promotor CMV, un intrón de β -actina, luc⁺, una señal de poliadenilación tardía de SV40 y un gen de resistencia a Amp.

<2-4> Preparación del vector pGL3-U/C_{TA}/B_{in}

La PCR se realizó utilizando el vector pGL3-B/C_{TA}/B_{in} preparado en el ejemplo 2-3 como plantilla y un par de cebadores de SEQ ID NO: 3 y 2 para amplificar un fragmento de ADN que cubre una región U20114 de un promotor de β -actina, una región de caja TATA de un promotor CMV y un intrón de β -actina, y de este modo el producto de PCR amplificado se trató con las enzimas de restricción NheI y HindIII. El fragmento de ADN resultante se insertó en

el vector pGL3- Básico tratado con las mismas enzimas de restricción, para preparar así un vector pGL3-U/C_{TA}/B_{in} (Figura 7). En este caso, la PCR se realizó bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C, durante 5 minutos; 25 ciclos de desnaturalización a 94°C, durante 1 minuto, hibridación a 55°C, durante 1 minuto y polimerización a 72°C, durante 1.5 minutos; y elongación final a 72°C, durante 7 minutos.

5 5'-U20114_F(NheI): 5'-CAC GCT AGC TCT CTC TTT TTT TTT TTT TAT-3' (SEQ ID NO: 3)

3'-BA 4_R(HindIII): 5'-GTA AGC TTC GGC GAA CTA TAT CAG GGC A-3' (SEQ ID NO: 2)

10 Como se muestra en la figura 7, el vector pGL3-U/C_{TA}/B_{in} preparado incluye f1 ori, sitio sintético de pausa poli (A)/transcripcional, MCS, un promotor híbrido de una región U20114 de un promotor de β-actina y una región de caja TATA (130 pb) de un promotor CMV, un intrón de β-actina, luc⁺, señal de poliadenilación tardía de SV40 y un gen de resistencia a Amp.

15 <2-5> Preparación del vector pGL3-C_{eh}/U/C_{TA}/B_{in}

Se llevó a cabo la PCR utilizando un vector pcDNA3.1 (Invitrogen) como plantilla y un par de cebadores de SEQ ID NO: 7 y 8 para amplificar una región potenciadora de un promotor CMV y, de este modo, el producto PCR amplificado se trató con enzimas de restricción MluI y NheI. El fragmento de ADN resultante del potenciador de CMV se insertó en el vector pGL3-U/C_{TA}/B_{in} tratado con las mismas enzimas de restricción, para preparar así un vector pGL3-C_{eh}/U/C_{TA}/B_{in} (Figura 8). En este caso, la PCR se realizó bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C, durante 5 minutos; 25 ciclos de desnaturalización a 94°C, durante 1 minuto, hibridación a 55°C, durante 1 minuto y polimerización a 72°C, durante 1 minuto; y elongación final a 72°C, durante 7 minutos.

25 5'-CMV En_F(MluI): 5'-CAG ACG CGT TGA CAT TGA TTA TTG ACT-3' (SEQ ID NO: 7)

3'-CMV En_R(NheI): 5'-CAG GCT AGC AGT TGT TAC GAC ATT TTG-3' (SEQ ID NO: 8)

30 Como se muestra en la figura 8, el vector pGL3-U/C_{TA}/B_{in} preparado incluye f1 ori, sitio sintético de pausa poli (A)/transcripcional, MCS, un promotor híbrido de un potenciador de CMV, una región U20114 de un promotor de β-actina y una región de caja TATA (130 pb) de un promotor CMV, un intrón de β-actina, luc⁺, una señal de poliadenilación tardía de SV40 y un gen de resistencia a Amp.

35 Ejemplo 3: Ensayo de eficacia *in vitro* de vectores plasmídicos

Cada uno de los vectores recombinantes preparados en el ejemplo 2 se transformó en células CHO y, a continuación, se examinaron los niveles de expresión de luciferasa mediante ELISA.

40 En primer lugar, el vector recombinante se introdujo en células CHO usando lipofectamina (Invitrogen). Específicamente, las células CHO se mantuvieron en un medio DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco, GIBCO-BRL) suplementado con FBS al 10% inactivado por calor (suero fetal bovino, GIBCO-BRL). Cada uno de los vectores recombinantes preparados en el ejemplo 2 y un vector pCH110 que albergaba β-gal se cotransformaron en las células CHO cultivadas. Un día antes de la transformación, las células CHO se cultivaron en una placa de 24 pozos (Falcon) a una densidad de 6X10⁴ células por pozo.

45 Mientras tanto, el tubo 1 (cantidad de reacción para 1 pozo) que contiene cada 500 ng de los vectores recombinantes preparados en el ejemplo 2, 150 ng del vector pCH110 para la corrección β-gal, 0.83 μl de Reactivo Plus y 23.92 μl de Opti-MEM y el tubo 2 (cantidad de reacción para 1 pozo) que contiene 1.25 μl de lipofectamina y 30 μl de Opti-MEM se dejaron a temperatura ambiente durante 15 minutos, respectivamente. A continuación, dos tubos se mezclaron entre sí, seguido de reacción a temperatura ambiente durante 15 minutos más. El medio de la placa de pozo que contiene las células CHO cultivadas se reemplazó con 200 μl de Opti-MEM, y después se adicionaron 60 μl de la mezcla a cada pozo. La placa de pozo se incubó entonces a 5% de CO₂, a 37°C, durante 3 horas. Después de la incubación, se adicionaron 260 μl de DMEM suplementado con FBS al 20% a cada pozo, y se realizó el cultivo durante 2 días más.

55 Después de 2 días, el medio se retiró de cada pozo, y la placa de pozo se lavó con 300 μl de PBS. Se adicionaron a cada pozo 100 μl de solución reguladora de lisis de Reporter (Promega), seguido de congelación de la placa de pozo y descongelación a 37°C. La solución de reacción se agitó suavemente a temperatura ambiente y después se transfirieron cada 20 μl a una placa de análisis para realizar un ensayo de luciferasa y un ensayo de β-gal. El ensayo de β-gal se realizó para determinar si la transformación había ocurrido uniformemente, y los resultados del ensayo de luciferasa fueron corregidos por los resultados del ensayo β-gal.

60 Como se muestra en las siguientes tablas 1 y 2, y la figura 10 en comparación con el vector pGL3-BA conocido, el vector pGL3-C_{eh}/U/C_{TA}/B_{in} mostró un nivel de expresión aumentado de luciferasa, y los vectores pGL3-B/C_{TA}/B_{in} y pGL3-U/C_{TA}/B_{in} mostraron un nivel de expresión de luciferasa similar o ligeramente bajo. En contraste, el vector

pGL3-B/C_{TA} mostró un nivel de expresión de luciferasa menor que el vector pGL3-BA. Sin embargo, cuando se realizó el ensayo β-gal por cotransformación con el vector pCH110 para la corrección en cada experimento, mostró menores valores de β-gal (0.7~3), en comparación con el vector pGL3-C_{eh}/U/C_{TA}/B_{in} (cerca de 3) que muestra el alto nivel de expresión de luciferasa.

5

[Tabla 1]

Primera ronda	luminiscente		β-gal		β-gal corregido		Promedio corregido LUC	Stdev	
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 1	Muestra 2			
1	pGL3- Básico	1763	1550	2.890	3.214	610	482	546	90
2	pGL3-promotor(S V40)	3356	3374	2.960	3.107	1134	1086	1110	34
3	pGL3-BA	12557	12811	3.106	3.254	4043	3937	3990	75
4	pGL3-B/C _{TA}	3533	3902	3.151	3.312	1121	1178	1150	40
5	pGL3-B/C _{TA} /B _{in}	13577	13566	3.152	3.126	4307	4340	4324	23
6	pGL3-U/C _{TA} /B _{in}	13501	13499	3.197	3.368	4223	4008	4116	152
7	pGL3-C _{eh} /U/C _{TA} /B _{in}	13469	13439	1.893	2.013	7115	6676	6896	310

10

[Tabla 2]

Segunda ronda	luminiscente		β-gal		β-gal corregido		Promedio corregido LUC	Stdev	
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 1	Muestra 2			
1	pGL3-Básico	3346	2841	3.300	3.254	1014	873	944	100
2	pGL3-promotor (S V40)	3356	3096	2.451	2.443	1369	1267	1318	72
3	pGL3-BA	12557	13567	3.336	3.235	3764	4194	3979	304
4	pGL3-B/C _{TA}	3533	4520	3.269	3.124	1081	1447	1264	259
5	pGL3-B/C _{TA} /B _{in}	13577	13569	3.286	3.166	4132	4286	4209	109
6	pGL3-U/C _{TA} /B _{in}	13586	13558	2.821	2.886	4816	4698	4757	84
7	pGL3-C _{eh} /U/C _{TA} /B _{in}	13531	13464	1.241	1.307	10903	10301	10602	426

* Luminiscente: representa los valores de luminiscencia expresados por el gen de la luciferasa insertado en el vector
 * β-gal: representa el nivel de expresión de la galactosidasa
 * β-gal corregido: representa valores corregidos para la comparación del nivel de expresión de galactosidasa de cada promotor
 * promedio corregido LUC: representa el nivel de expresión de la luciferasa corregido por el promedio
 * Stdev: representa desviación estándar del nivel de expresión de luciferasa

[Aplicabilidad industrial]

15

La presente invención proporciona un nuevo promotor que está optimizado para la producción de un anticuerpo o una vacuna de ADN. Cuando se inserta una variedad de genes diana en un vector recombinante que incluye el promotor híbrido de la presente invención, se puede mejorar la transcripción y expresión de los genes diana. Por lo tanto, el vector recombinante que incluye el promotor híbrido de la presente invención se puede utilizar para el desarrollo de anticuerpos o vacunas de ADN.

20

LISTA DE SECUENCIAS

25

<110> LG Life Sciences Ltd.

<120> NUEVO PROMOTOR HÍBRIDO Y VECTOR RECOMBINANTE QUE COMPRENDE EL MISMO

<130> OPA11159PCT

30

<150> KR10-2010-0120884

<151> 2010-11-30

<160> 13

<170> KopatentIn 1.71
<210> 1
5 <211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
10 <220>
<223> Cebador hacia adelante para el promotor de beta-actina
15 <400> 1
cagctagcgg gaccaagaca gaaccataa 29
<210> 2
20 <211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
25 <220>
<223> Cebador reverso para el promotor de beta-actina
30 <400> 2
gtaagcttcg gcgaactata tcagggca 28
35 <210> 3
<211> 30
<212> ADN
40 <213> Secuencia artificial
<220>
45 <223> Cebador hacia adelante para el promotor de beta-actina
<400> 3
50 cagcctagct ctctctttt ttttttat 30
<210> 4
<211> 27
55 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
60 <223> Cebador hacia adelante para caja TATA del promotor CMV
<400> 4
65 cagtcgacta ggcgtgtacg gtgggag 27

ES 2 634 513 T3

<210> 5
<211> 18
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
10 <223> Cebador reverso para caja TATA del promotor CMV
<400> 5
15 tagaaggcac agtcgagg 18
<210> 6
<211> 35
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
25 <223> Cebador hacia adelante para intrón de beta-actina
<400> 6
30 caagagctct ctggctaact gagcacaggc ctttc 35
<210> 7
35 <211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
40 <220>
<223> Cebador hacia adelante para potenciador de CMV
45 <400> 7
cagacgcggt gacattgatt attgact 27
<210> 8
50 <211> 27
<212> ADN
55 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador reverso para potenciador de CMV
60 <400> 8
caggctagca gttgttacga cattttg 27
65 <210> 9

<211> 1930

<212> ADN

5 <213> Cricetulus griseus

<220>

<221> promotor

10

<222> (1)..(1930)

<223> promotor de beta-actina

15

<400> 9

ES 2 634 513 T3

gctagcggga ccaagacaga accataagcc agtgggatag atcagaaatg ttccagaggt 60
gggatggggc cagagtgcct gccocttgaa ccgctccagc gaccagaggt gacaaagtgg 120
caacacaggt cctgcctggg aatctggtct gctcctactt agtaaagctg cctggtgtca 180
cacaagaggc ccccacttat tcttgcaccc ctggtggtag gtggcgtctt ctcccctgca 240
gccaccaggc tcccctgaga aactgcctgg cagtcctcat tgacaggcag tattecctct 300
gccccacccc cacctgtgaa ttgcagggct ggcaggtcct caggcagctg gcaaaccgcc 360
tgaacaactg agagatacag ggccagggcc agggcagctc cgtcccccg aggcagggag 420
gggacgtgct gggaaagttc tctctctcag gccaggttg gtgactgcag aaggcttctg 480
tcaaactctt tttgtgggaa ccacagagta gccctgaacg tgggggtgtg ctccagat 540
actctggggg caccctttcc atactggagg cctctgcaac ttcaaatgc tctgctacca 600
acctagcaca aggaagtgg tccagcctcc ccacgcaagg ccactgctgc agtccatata 660
tggaactaag ctcccttggg ttcaacacct aactcactg agcccctact atgtgtatgc 720
agagccgaga caggccctga gcatctcatc tgaagcggcc ttcttgcta aattcagttt 780
tctgtcactt tctcccagga ggtgtgtgtc cctctaagct aagccagggg tcctcacc 840
ctgccccact cccatcccta gtgtaggtat cagctgaaga gcttctgag cagaacactc 900
ttgggtgctg acattttgat aaataggccc atggtgagga gagcaggggt ccgggggcg 960
gagatcttct ctggtggatt gagggtcca agaactactc tttgagcag ctgtccctcc 1020
cagagtcccc acagcctcca gatggactag aacacagttc ggctgtggct gcacataact 1080
aacagaggat agatggtggg tcccagccca acagtgcctg gcaatcacc agagccacca 1140
gctaacggcc ttggcttagt tttttgcctg ggtgtgatca ggcagccctc caaaactgcc 1200
cggactccat gacaagtttt gcttgttcta tagagcacag ttcctttcta ggtctggggc 1260
gagggacatc gggagacatc ttctgcaac agctccagtc actggaccac caggctcgcc 1320
ctgtotttgg tgtgtggccc tgagtctcct aagtggccca aacctgtgaa gaccctcca 1380
accacagttt tgcttctaaa ttgtacccca acacacctag caaattgaaa ccccaccaga 1440
agtccccag atctggcttt ccggctattg ctggcaaggg ggagtgactc ccggcccatt 1500
caatccaggc cccgctgttt cctcaaacia gaagccacgt aacataaac cgagcctcca 1560
tgctgaccct tgccatcga ggtactcaat gttcacgtga tatccacacc cagaggtgcc 1620
tggggtgggt gcatgagccc cagaatgcag gcttgataac cgagaccctg aatggggcag 1680
tgtccacaag gggggaggcc agtcatgcat gttcgggcct atggggccag caccacaacgc 1740
caaaactctc catcctcttc ctcaatctcg ctttctctct ctctctctt ttttttttt 1800
ttttttttt ttttgcaaaa ggaggggaga ggggtaaaa aaatgctgca ctgtgaggct 1860
aggccggtga gtgagcggcg cggagccaat cagcgtctgc cgttccgaaa gttgcctttt 1920
atggctcgac 1930

<210> 10

5 <211> 154

ES 2 634 513 T3

<212> ADN
 <213> Cricetulus griseus
 5 <220>
 <221> promotor
 <222> (1)..(154)
 10 <223> promotor de beta-actina U20114
 <400> 10
 gctagctctc tctttttttt tttttatttt ttttttttgc aaaaggaggg gagagggggt 60
 aaaaaaaaatgc tgcactgtgc ggctaggccg gtgagtgagc ggcgcgagc caatcagcgc 120
 tcgccgttcc gaaagttgcc ttttatggct cgac 154
 15
 <210> 11
 <211> 130
 20 <212> ADN
 <213> virus del herpes humano
 <220>
 25 <221> promotor
 <222> (1)..(130)
 30 <223> caja TATA del promotor de CMV
 <400> 11
 taggcgtgta cggtgggagg tctatataag cagagctctc tggctaacta gagaaccac 60
 tgottactgg cttatcgaaa ttaatacgac tcactatagg gagaccaag ctggctagcg 120
 tttaaactta 130
 35
 <210> 12
 <211> 1019
 <212> ADN
 40 <213> Cricetulus griseus
 <220>
 45 <221> intrón
 <222> (1)..(1019)
 <223> intrón de beta-actina
 50 <400> 12

ES 2 634 513 T3

ctagcgagca caggcctttc gcagctcttt cttcgccgct ccacaccgc caccaggtaa 60
 gcagggacaa caggcccagc cggccacagc cctcccgtag gcagtgaccg cgctgcaggg 120
 tcgcggggga cactcggcgc ggacaccggg gaaggctgga ggggtggtgcc gggccgcgga 180
 gcgacactt tcagatccaa ctttcagtcc aggggtgtaga ccctttacag ccgcatgccc 240
 acgggtgtaga caccgggtgga ccogctctgg ctacagagcac gcggcttggg ggaaccatt 300
 agggctgcag tgtggggcgt atgagagccg atgcagcttt cgggtggtga accgtatctg 360
 cccaccttgg ggggaggaca caaggtcggg agccaaacgc cacgatcatg ccttggtggc 420
 ccatgggtct ttgtctaaac cggtttgccc atttgcttg ccgggcgggc gggcgcggcg 480
 ggcccggctc ggccgggtg gggctgggtt gccactgccc ttgcgcgctc tatggctggg 540
 tattggggcg cgtgcacgct ggggaggag cccttctct tccccctct ccaagttaa 600
 cttgcgcgtg cgtattgaga cttggagcgc ggccaccggg gttgggcgag ggcggggccg 660
 ttgtccgaa gggcgggggt cgcagcggct tcggggcgc tgctcgcgt tctgctggg 720
 tgtggtgcc tcccgcgcgc gactagccg cccgcggcg ggcgaaggc ggggcttgcg 780
 ccogtttggg gagggggcg aggcctggct tcctgcgctg ggcgcgctc cggaccagcg 840
 tttgcctct atggtataa cgcggccgc ctgggcttc tttgtccct gagtttgggc 900
 gcgcgcccc tggcggccc aggcgcggc ttgccggaag tgggcagggc ggcagcggct 960
 gcgcctagt gcccgctagt gaccgcgacc ctcttttgt ccctgatata gttcgcga 1019

<210> 13

5 <211> 530

<212> ADN

<213> virus del herpes humano

10

<220>

<221> potenciador

15

<222> (1)..(530)

<223> potenciador de CMV

<400> 13

acgcgtgac attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg gtcattagtt 60
 catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc gcctggctga 120
 ccgcccacg acccccgcc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat agtaacgcca 180
 atagggactt tccattgaog tcaatgggtg gactatttac ggtaaactgc ccacttgcca 240
 gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtac cccctattg acgtcaatga cggtaaatgg 300
 cccgcctggc attatgcca gtacatgacc ttatgggact ttctacttg gcagtacatc 360
 tacgtattag tcacgctat taccatgggt atgcggtttt ggcagtacat caatggcggt 420
 ggatagcggg ttgactcaog gggatttcca agtctocacc ccattgacgt caatgggagt 480
 ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaacaactg 530

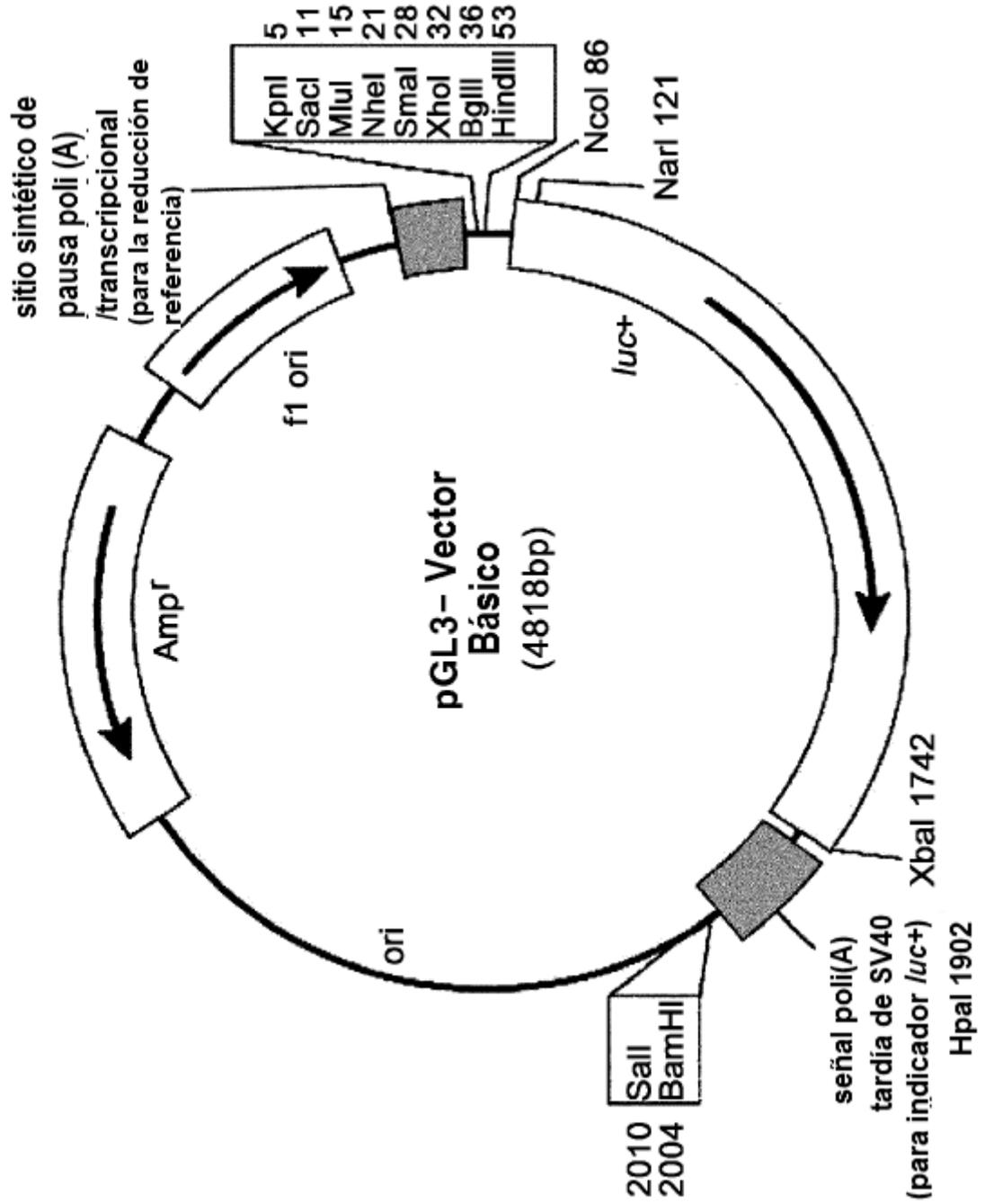
20

REIVINDICACIONES

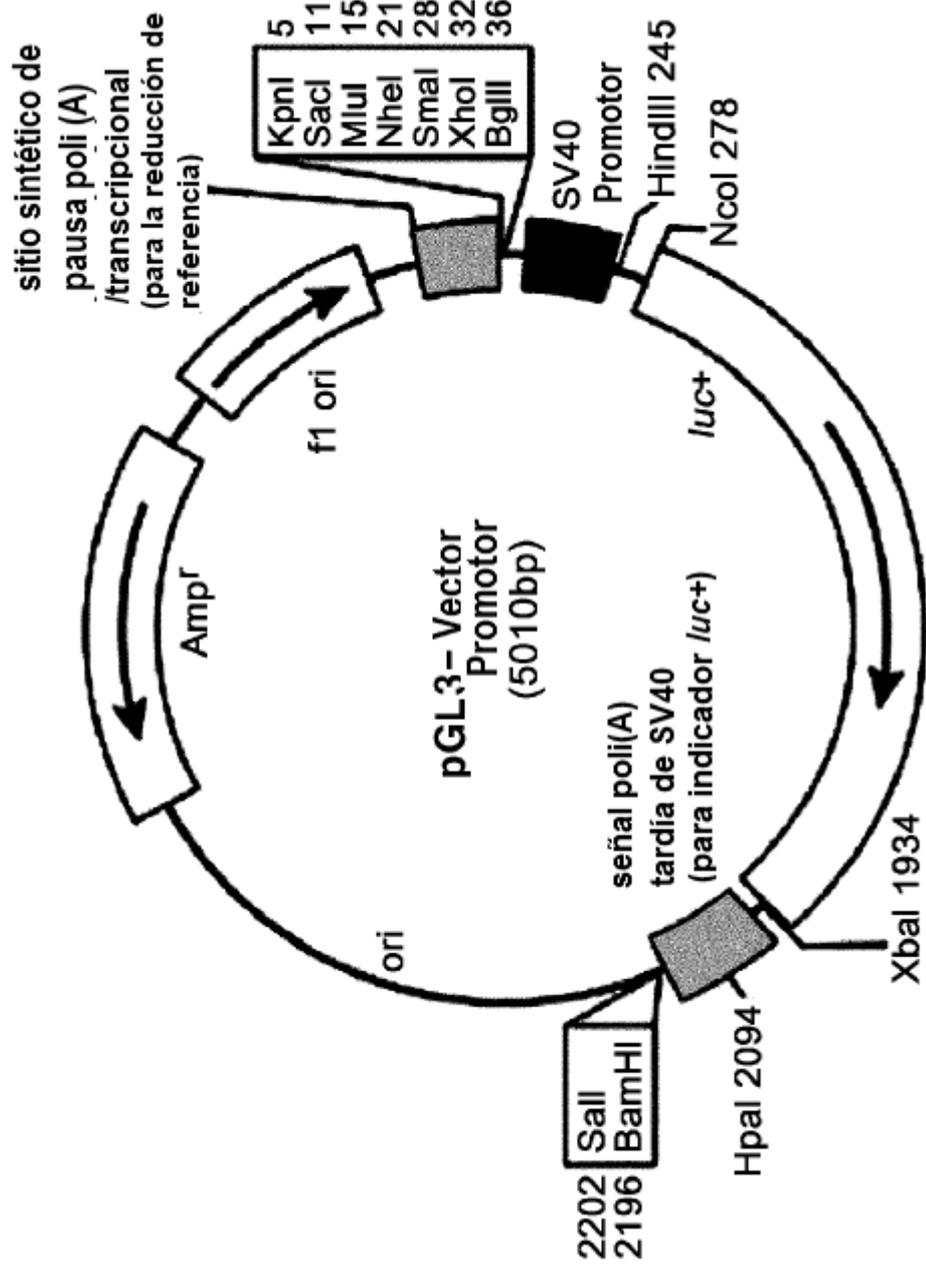
1. Un promotor híbrido que comprende en el orden dado un potenciador de CMV que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 13, un promotor β -actina que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10, una caja TATA de un promotor CMV (Cytomegalovirus) y un intrón de β -actina que consiste en la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 12, en el que el potenciador de CMV, el promotor β -actina, el promotor CMV y el intrón de β -actina están unidos operativamente entre sí.
2. El promotor híbrido según la reivindicación 1, en el que la región de caja TATA del promotor CMV consiste en un fragmento de ADN de los siguientes:
- i) un fragmento de ADN que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 11, o
- ii) un fragmento de ADN que tiene una deleción, una sustitución o una inserción de uno o más nucleótidos en la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN i), y que tiene una actividad promotora y una actividad de regulación de la expresión de un gen diana unido operativamente en dirección 3' del promotor.
3. El promotor híbrido según la reivindicación 1, que comprende el potenciador de CMV de SEQ ID NO: 13, la región de caja TATA del promotor CMV de SEQ ID NO: 11, el promotor β -actina de SEQ ID NO: 9 o 10, y la región de intrón β -actina de SEQ ID NO: 12.
4. Un vector recombinante que comprende el promotor híbrido de la reivindicación 1 y un gen codificante de la proteína diana unido operativamente a la misma.
5. El vector recombinante según la reivindicación 4, que comprende además uno o más elementos reguladores de expresión seleccionados del grupo que consiste en un origen de replicación, un marcador seleccionable, un gen indicador, un terminador y una combinación de los mismos.
6. El vector recombinante según la reivindicación 5, en el que el marcador seleccionable es un gen de resistencia a fármacos.
7. El vector recombinante según la reivindicación 6, en el que el gen de resistencia a fármacos es un gen resistente a antibióticos seleccionados del grupo que consiste en ampicilina, estreptomina, gentamicina, kanamicina, higromicina, tetraciclina, cloranfenicol y neomicina.
8. El vector recombinante según la reivindicación 5, en el que el gen indicador es un gen que codifica una proteína seleccionada del grupo que consiste en la proteína fluorescente verde (GFP), la proteína fluorescente cian (CFP), la proteína fluorescente amarilla (YFP), la proteína fluorescente roja (dsRFP), la luciferasa (Luc), la cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), la β -galactosidasa (LacZ) y β -glucuronidasa (Gus).
9. Una célula huésped que comprende el vector recombinante de la reivindicación 4.
10. Una composición farmacéutica que comprende el vector recombinante de la reivindicación 4 o la célula huésped de la reivindicación 9 como un ingrediente eficaz y un portador farmacéuticamente aceptable.
11. Un método para preparar una proteína diana, que comprende las etapas de:
- 1) cultivar la célula huésped de la reivindicación 9;
- 2) inducir la expresión de la proteína diana de la célula huésped; y
- 3) recoger la proteína diana expresada de la célula huésped o la solución de cultivo de la misma.
12. El método según la reivindicación 11, en el que la proteína diana se selecciona del grupo que consiste en hormona de crecimiento humana, hormona de liberación de hormona de crecimiento, péptido de liberación de hormona de crecimiento, interferón, receptor de interferón, factor estimulante de colonias, péptido tipo glucagón, receptor acoplado a proteína G, interleucina, receptor de interleucina, enzima, proteína de unión a citoquina de interleucina, factor activador de macrófagos, péptido de macrófagos, factor de célula B, factor de célula T, proteína A, inhibidor de alergia, glicoproteína de necrosis celular, toxina inmune, toxina linfática, factor de necrosis tumoral, apolipoproteína-E, eritropoyetina, eritropoyetina altamente glucosilada, angiopoyetina, hemoglobina, trombina, péptido activador del receptor de trombina, trombomodulina, factor VII, VIIa, VIII, IX y XIII de la sangre, factor activador del plasminógeno, péptido de unión a la fibrina, uroquinasa, estreptoquinasa, hirudina, proteína C, proteína C reactiva, inhibidor de renina, inhibidor de colagenasa, superóxido dismutasa, leptina, factor de crecimiento originado en plaquetas, factor de crecimiento epitelial, factor de crecimiento epidérmico, angiostatina, angiotensina,

5 factor de crecimiento de mielopoyesis, factor estimulante de mielopoyesis, calcitonina, insulina, atriopeptina, inductor de cartílago, elcatonina, factor de activación tisular de las articulaciones, inhibidor de la vía del factor tisular, hormona estimulante del folículo, hormona formadora de la progesterona, hormona liberadora de hormona formadora de la progesterona, factor de crecimiento nervioso, parathormona, relaxina, secretina, somatomedina, factor de crecimiento similar a la insulina, hormona adrenocortical, glucagón, colecistocinina, polipéptido pancreático, péptido liberador de gastrina, factor liberador de corticotropina, hormona estimulante de la tiroides, autotaxina, lactoferrina, miostatina, receptor, antagonista del receptor, antígeno de la superficie celular, antígeno de vacuna originado por virus, anticuerpo monoclonal, anticuerpo policlonal y fragmento de anticuerpo.

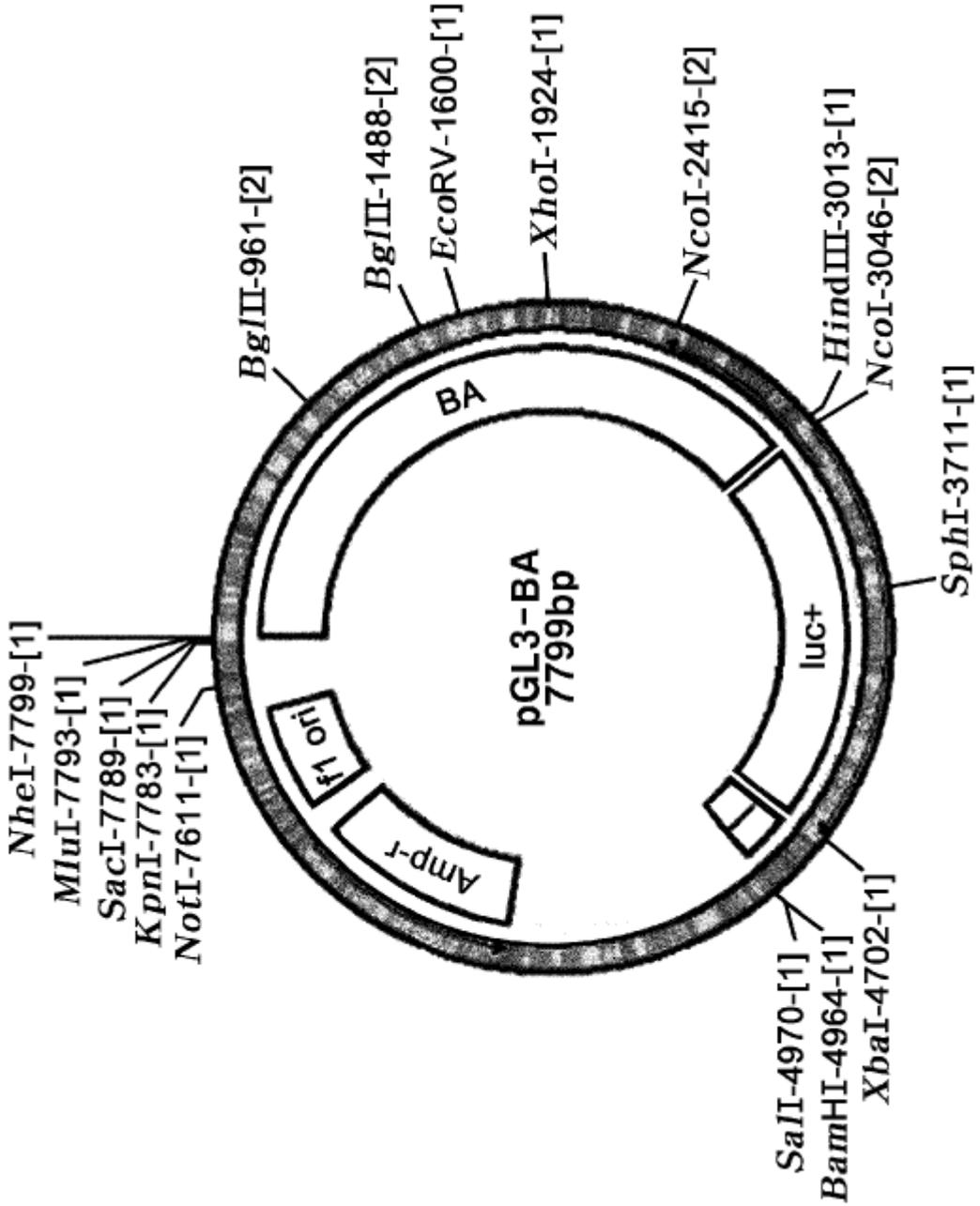
[Fig. 1]



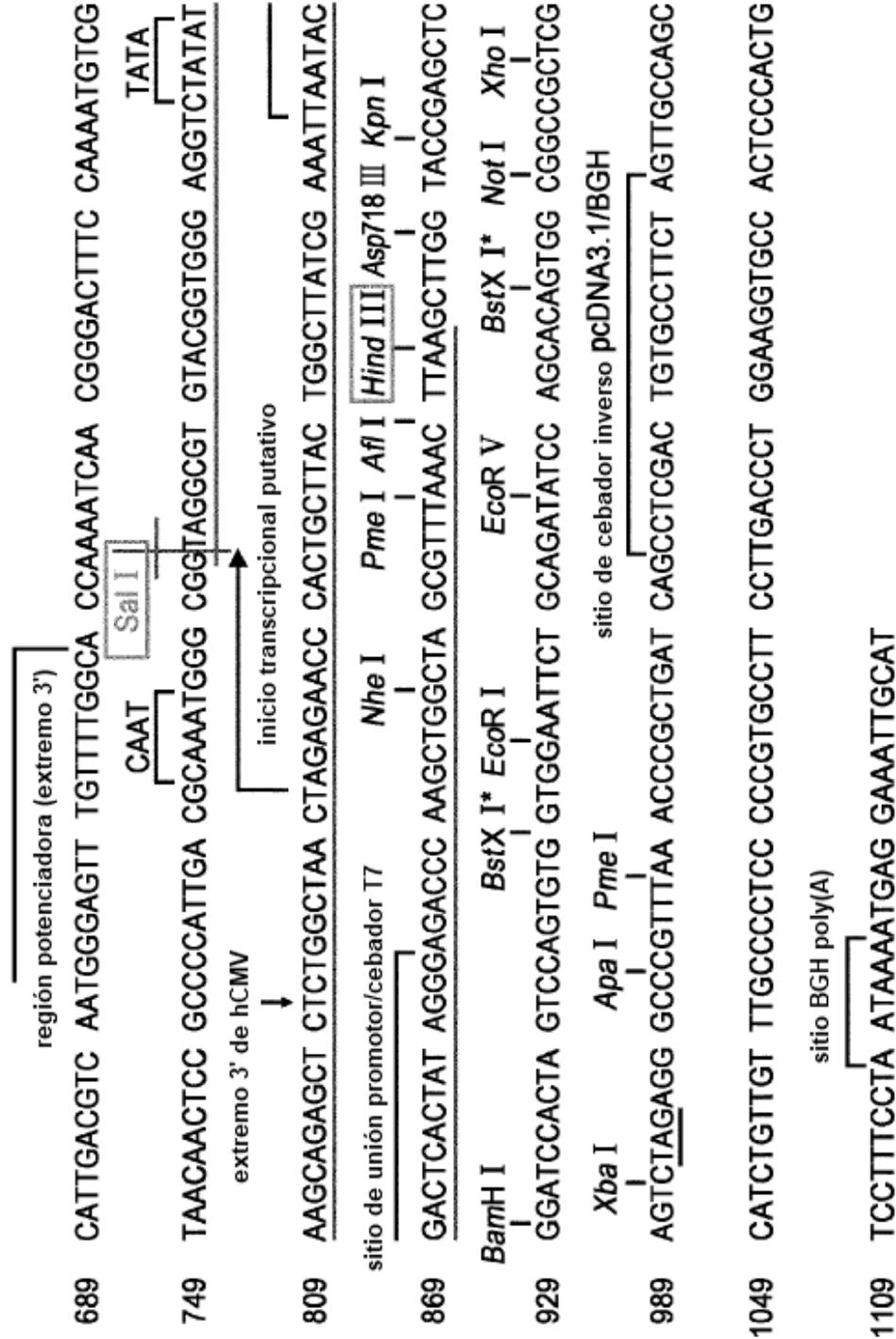
[Fig. 2]



[Fig. 3]

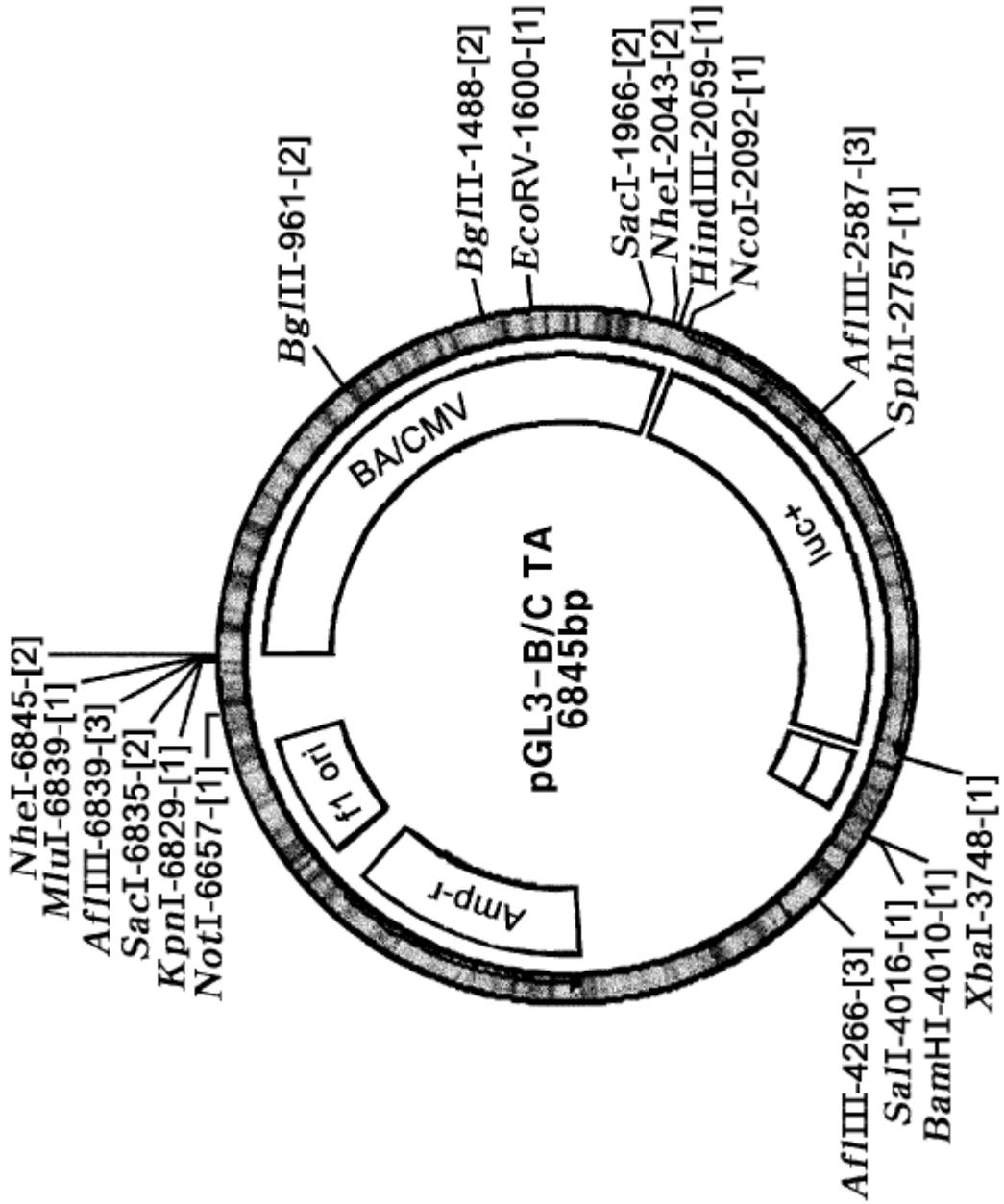


[Fig. 4]

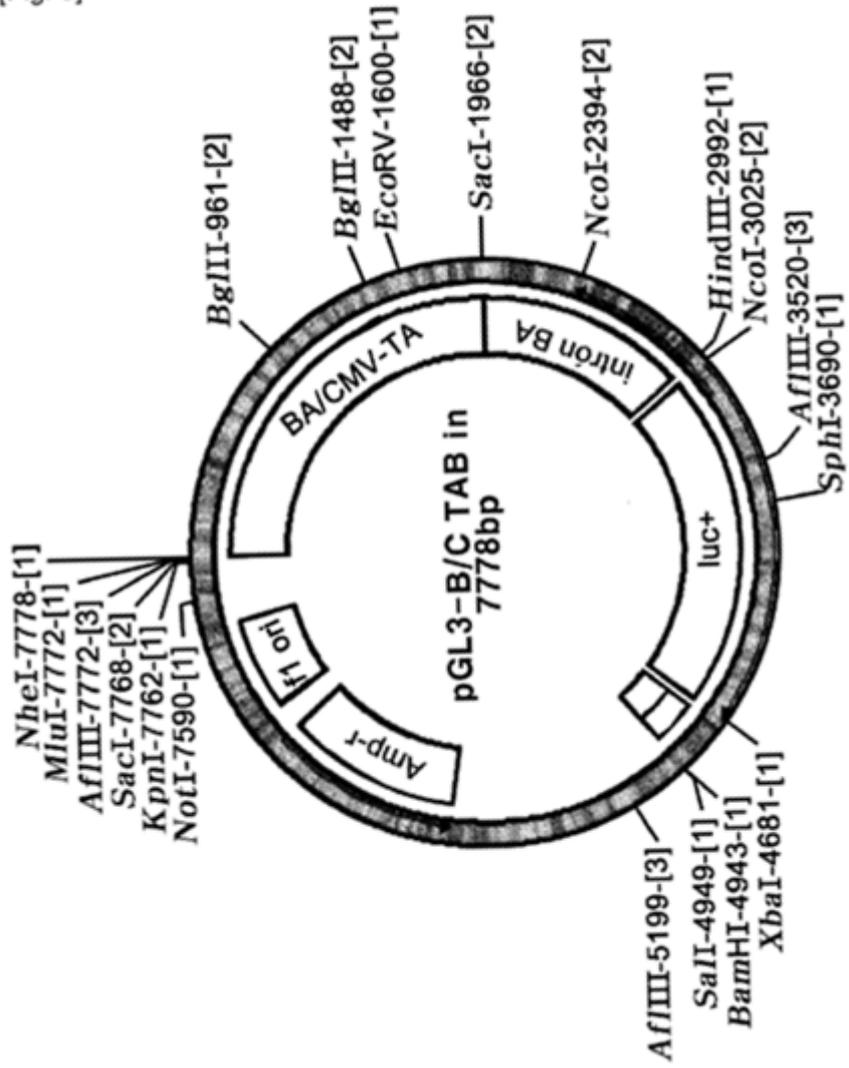


*Tener en cuenta que hay dos sitios BstX I en el polienlazador

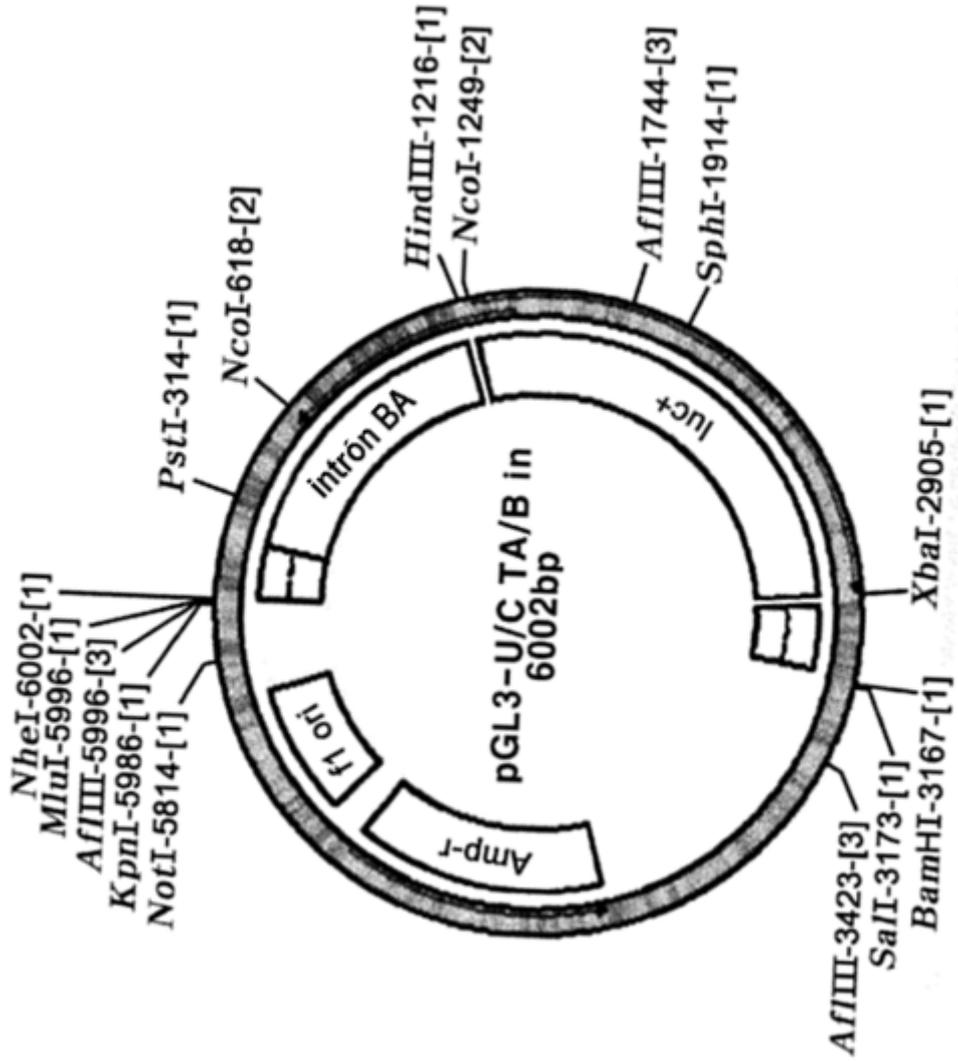
[Fig. 5]



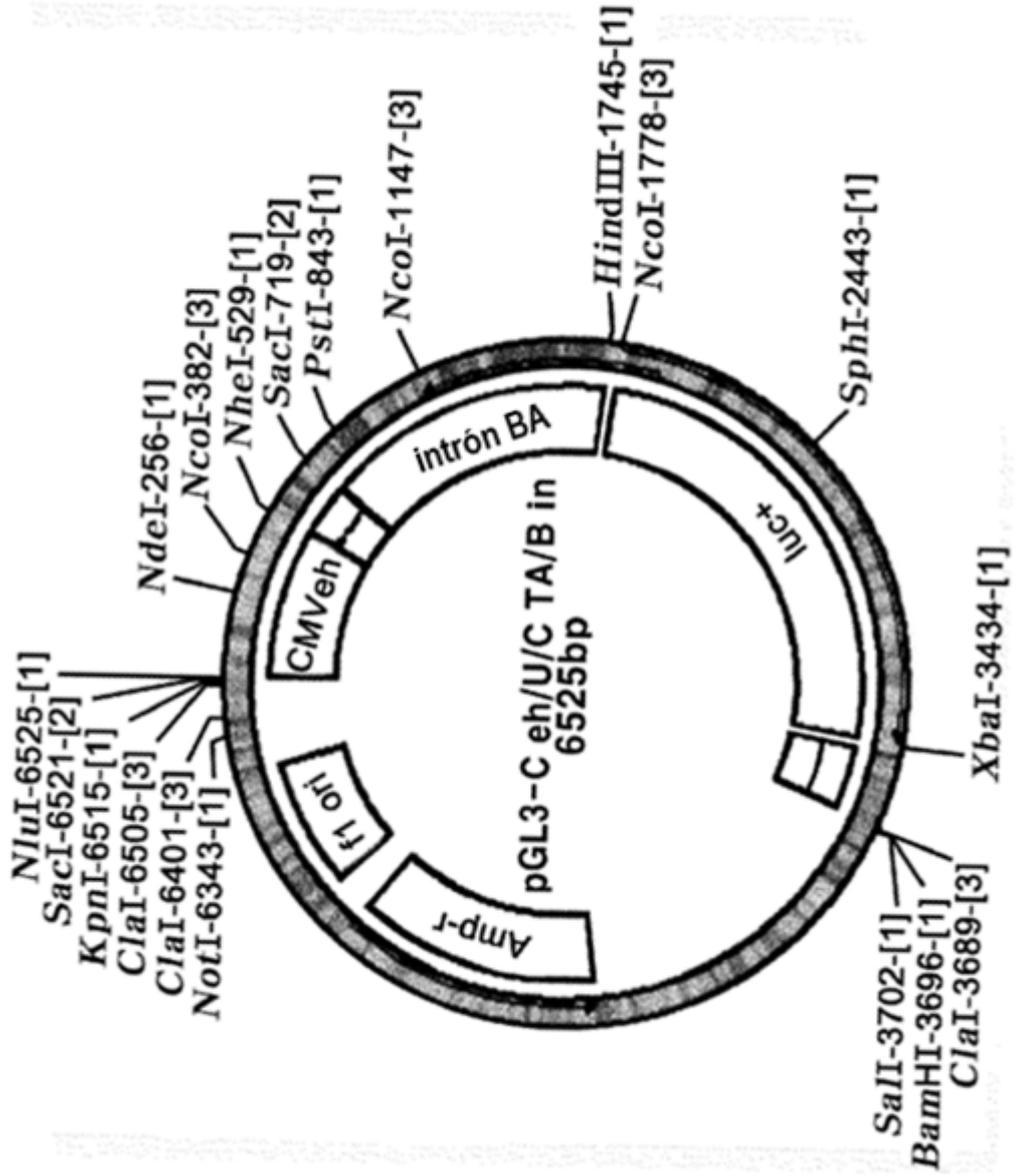
[Fig. 6]



[Fig. 7]



[Fig. 8]



[Fig. 9]

