



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 267 560**

⑤1 Int. Cl.:
C12N 15/16 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- ⑧6 Número de solicitud europea: **00958920 .1**
⑧6 Fecha de presentación : **18.09.2000**
⑧7 Número de publicación de la solicitud: **1218508**
⑧7 Fecha de publicación de la solicitud: **03.07.2002**

⑤4 Título: **Secuencias de ADN para mejorar la eficacia de alimentación y la tasa de crecimiento en cerdos.**

③0 Prioridad: **17.09.1999 US 398473**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2007

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2007

⑦3 Titular/es: **Leadergene Limited**
Hong Kong Institute of Biotechnology
Suite 208, 2 Biotechnology Avenue
12 Miles Tai Po Road, Shatin
New Territories, Hong Kong, CN

⑦2 Inventor/es: **Lee, Fuk-Ki;**
Tam, Kai-Tong y
Wai, Sing-Fai

⑦4 Agente: **Espiell Volart, Eduardo María**

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

Secuencias de ADN para mejorar la eficacia de alimentación y la tasa de crecimiento en cerdos.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la administración de un péptido hormonal endógeno, más en particular, a la administración de un péptido hormonal endógeno con material genético para mejorar la eficacia de alimentación y la tasa de crecimiento de cerdos.

10 **Antecedentes**

Se han hecho muchas aproximaciones para estimular la tasa de crecimiento del ganado y para potenciar la eficacia de la conversión del alimento. Estas incluyen el uso de antibióticos, compuestos químicos y el uso de compuestos biológicos tales como hormonas de crecimiento (GH) nativas o recombinantes o factores liberadores de la hormona de crecimiento (GHRF). Muchas de estas aproximaciones o bien tienen efectos secundarios o son demasiado caras para implementarse en granjas o haciendas.

Aunque en el pasado se han usado de forma rutinaria suplementos de antibióticos para mejorar el rendimiento de crecimiento y la conversión del alimento, sus beneficios están ahora disminuyendo debido a las mejoras en la gestión de las granjas modernas y al peligro potencial de expandir la resistencia a antibióticos a otros animales, incluyendo al hombre.

En los primeros intentos de mejora biológica se usaban inyecciones de extractos de pituitaria, a partir de los cuales se aisló y purificó posteriormente la GH de pituitaria.

La GH produce diversos efectos en los tejidos del organismo, llevando en último extremo a un aumento en la tasa de crecimiento y en la ganancia de peso. *In vivo*, GH estimula la síntesis de proteínas, la degradación de depósitos grasos y el crecimiento epifisario. Estos efectos están mediados a través de la regulación al alza de las somatomedinas, por ejemplo, factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I). La producción y liberación de GH de la pituitaria está bajo el control de dos péptidos hormonales hipotalámicos. La inhibición por somatostatina y la estimulación por GHRF regulan los niveles de GH en plasma. Cuando los animales envejecen, hay cambios perjudiciales en el eje GHRF → GH → IGF-I). Por ello, en animales más viejos incluyendo el hombre, desciende la tasa de producción de GH y disminuye la respuesta de IGF-I a GH y a GHRF. Estas conducen a la osteoporosis, disminuye el músculo magro y aumenta el depósito de grasa dorsal. Por lo tanto, la GH extraída de la pituitaria se ha usado para suplementar el descenso natural de GH y potenciar el crecimiento. Sin embargo, este tratamiento se ve afectado por los riesgos de transmisión accidental de patógenos. Además, el principal inconveniente es el alto coste que implica. Puesto que GH es una proteína, es digerida fácilmente por las enzimas intestinales y debe ser administrada mediante inyección. Además, GH tiene que darse diariamente debido a su corta semivida en suero. Esto eleva el coste del tratamiento, haciendo que sólo sea viable para terapia humana.

El desarrollo de la tecnología de ADN recombinante y el uso de microbios, tales como *E. coli*, para producir GH de mamíferos significó que las preparaciones de GH homogéneas podrían producirse en grandes cantidades para el tratamiento reduciendo de este modo los costes. Adicionalmente, los avances recientes en la estabilización de proteínas mediante sustituciones por manipulación genética en la estructura primaria y el desarrollo de formulaciones de liberación lenta han reducido la frecuencia de dosificación a semanal o bisemanal. Como descienden los costes del tratamiento, puede usarse comercialmente para estimular la producción ganadera. Por ejemplo, la GH bovina recombinante se está usando actualmente para estimular la producción de leche en un tercio del ganado lechero de los Estados Unidos de América.

Se ha demostrado que el tratamiento de cerdos con GH porcina aumenta la tasa de crecimiento, aumenta las proteínas de la carne mientras que reduce la proporción de grasa. Los beneficios de la GH porcina en el rendimiento de crecimiento de los cerdos y los aspectos de seguridad y económicos se han revisado en Palmer J. Holden (Porcine somatotropine (pST), Biotechnology Information Series (Bio4), Iowa State University, 1993). Resumiendo los datos de veinte estudios, se ha descrito que los cerdos a los que se les inyecta GH porcina crecen el 15% más rápido mientras que consumen el 21% menos de alimento, con más proteína muscular y reduciendo la grasa dorsal. Sin embargo, estas ganancias en la productividad se hacen a un coste sustancial. En primer lugar, debido a su corta semivida en suero y a su rápida eliminación del torrente circulatorio, debería inyectarse GH diariamente para que fuera eficaz. Por lo tanto debe administrarse a los cerdos hasta 4 mg por día de proteína GH porcina durante uno o dos meses que dura el periodo final de engorde para mantener los niveles de GH en el plasma y mejorar el rendimiento productivo. De este modo, cada cerdo puede requerir eventualmente hasta 400 mg de GH. En segundo lugar, unas dosis elevadas pueden ser tóxicas y se ha demostrado que causan algunos efectos secundarios adversos, tales como dificultades respiratorias, tales como se describe en la patente de EE.UU. Nº 5.134.120. Además, el régimen de tratamiento descrito hasta el momento en la bibliografía es demasiado laborioso y traumático para el animal. Incluso aunque las patentes de EE.UU. 5.015.626 y 5.134.120 describen el uso de la GH porcina para aumentar la calidad de la carne y potenciar la ganancia de peso, respectivamente, la tecnología actual de promotores de crecimiento basados en péptidos de GH aún tiene que ser más rentable para poder aplicarse a la ganadería comercial.

El descubrimiento de los factores liberadores de la hormona de crecimiento (GHRF) prometía proporcionar un procedimiento mejor para potenciar el crecimiento. GHRF es una hormona peptídica secretada por el hipotálamo y estimula específicamente la síntesis y liberación de GH por las células somatotropas de la glándula pituitaria anterior. Estimulando la producción endógena de GH, la dosis eficaz requerida es mucho menor que la de GH, lo que proporciona así un modo más fisiológico de tratamiento a un coste potencialmente menor. Sin embargo, parece que sigue sin haber aun un tratamiento satisfactorio, a nuestro mejor entendimiento, y rentable para el ganado. Por ejemplo, el uso de inyecciones de proteína GHRF humana dos veces al día para estimular el crecimiento de ovejas fue descrito en la patente EP N° 0.289.186. Sin embargo, las inyecciones prolongadas del GHRF humano inducen respuesta inmune en la oveja con la formación de anticuerpos neutralizantes frente a la proteína humana. Esto reduce la eficacia de este tratamiento, y los costes laborales y de material hacen que esta aproximación no sea rentable. Las inyecciones del péptido GHRF se han usado para producir una estimulación más mantenida de la producción de GH en el cerdo. Aunque en algunos ensayos se han conseguido producir una ganancia de peso corporal y un menor contenido graso de la carne, el mismo problema de la rápida eliminación significa que se requieren dosis más frecuentes. Por tanto, se requiere una nueva aproximación para suplementar los niveles de GH que potencien el crecimiento.

Desde que se demostró por primera vez que los vectores plasmídicos de ADN inyectados por vía intramuscular son captados por las células del músculo esquelético y expresados durante muchos meses *in vivo*, la terapia génica basada en músculo esquelético se ha mantenido como una gran promesa para el suministro sistémico de proteínas terapéuticas. Esta producción de proteínas recombinantes por el músculo esquelético, que pueden secretarse al sistema circulatorio para alcanzar lugares adecuados distantes se adapta de forma ideal al tratamiento de enfermedades que surgen a partir de deficiencias de proteínas en el suero. Los vectores plasmídicos, aunque mucho menos eficaces para la expresión de proteínas que los vectores basados en virus, tienen las ventajas de ser probablemente menos inmunogénicos y no se integran en el genoma del hospedador. Por tanto, se piensa que generalmente son seguros. Sobre esta base, los vectores plasmídicos se adecuan mejor a situaciones en las que la proteína terapéutica es eficaz en bajas concentraciones. De este modo, la infección de vectores plasmídicos que expresan el gen de GHRF puede ser un procedimiento ideal para aplicar un suplemento crónico de GHRF a una dosis suficiente eficaz para potenciar el rendimiento productivo de los animales. Además, la producción de GHRF persistente podría reducir drásticamente la frecuencia del tratamiento, reduciendo además los costes a un nivel económicamente viable.

Recientemente, se ha demostrado que un plásmido que contiene el ADNc del GHRF humano (hGHRF) bajo el control del promotor mínimo de la actina α del músculo esqueleto de pollo es capaz de producir una elevación en los niveles de GH del plasma cuando se inyecta en el músculo de ratón (Draghia-Akli y col., Nature Biotechnology, 15, págs. 1285-1289 y patente WO99/05300). Además, se describió un aumento del crecimiento de aproximadamente el 15%, 3 semanas después de la inyección. Sin embargo, estos procedimientos provocan una respuesta inmune que se ponen de manifiesto por un aumento de los niveles séricos de anticuerpos neutralizantes anti-hGHRF a los 21 y 28 días tras la inyección del gen del hGHRF. Se ha demostrado que el factor limitante en el nivel de expresión génica *in situ* a partir de los plásmidos inyectados es el grado extremadamente bajo de captación de los plásmidos de ADN por las fibras musculares. Para mejorar los niveles de expresión del hGHRF, Draghia-Akli y colaboradores, inyectaron primero bupivacaína, una bien conocida sustancia miotóxica, antes de inyectar el plásmido de ADN en el músculo en regeneración. Aunque se demostró que esto mejoraba el nivel de expresión aumentando la captación del plásmido en las fibras musculares, no es una técnica deseable ni aceptable para ser aplicada a animales de granja criados para el consumo humano.

Objeto de la invención

Por tanto, un objeto de esta invención es proporcionar una aproximación rentable para estimular la tasa de crecimiento de cerdos y para potenciar la eficacia de conversión del alimento mediante la administración de un péptido hormona GHRF endógeno. Como mínimo, es un objeto de la presente invención proporcionar al público una elección útil.

Resumen de la invención

Por lo tanto, se proporciona el uso de un vector en la fabricación de un medicamento para potenciar la eficacia del alimento y/o las tasas de crecimiento y/o reducir la acumulación de grasa en cerdos, en el que el vector estimula la producción del factor de liberación de la hormona de crecimiento (GHRF) y comprende:

- una secuencia de ADN que codifica un promotor para la expresión génica;
- una secuencia de ADN que codifica un péptido señal de GHRF; y
- una secuencia de ADN que codifica el péptido porcino GHRF (1-44),

y en el que el vector se formula para la administración a través de inyección intramuscular.

Entre las realizaciones particularmente preferidas de esta invención están las variantes del promotor, que es un promotor de actina. Según ciertas realizaciones preferidas de esta invención, el promotor de la actina es un promotor de la actina de músculo esquelético. La secuencia de ADN que codifica un promotor de la actina de músculo esquelético especialmente preferida comprende una copia completa de la secuencia de ADN del promotor de la actina de músculo esquelético.

Según otras realizaciones preferidas de esta invención, la secuencia del gen exógeno incluye además una secuencia de ADN que codifica la región no traducida tres prima (3') que contiene la señal de poliadenilación del gen del promotor o de GHRF.

5 Según aún otras realizaciones preferidas de esta invención, la secuencia del gen exógeno además incluye una secuencia de ADN que codifica un gen de resistencia a un antibiótico.

10 El GHRF y su péptido señal codificados por dichas secuencias de ADNc pueden ser los correspondientes fragmentos naturales o recombinantes o sintéticos, o biológicamente activos o sus análogos con actividades similares con la condición de que el vector comprenda las secuencias de ADN incluidas dentro del alcance del vector de la reivindicación 1. Es una realización particularmente preferida de esta invención que la secuencia de ADN del promotor, la secuencia de ADNc que codifica un péptido señal de GHRF y la secuencia de ADNc que codifica GHRF sean específicas de especie.

15 Dicho elemento exógeno para estimular la producción de GHRF, que es una secuencia de ADN, preferiblemente se mezcla con un vehículo adecuado para su administración subcutánea. Según ciertas realizaciones preferidas de esta invención, la secuencia de ADN exógena se administra por vía intramuscular.

20 Dicho elemento exógeno para estimular la producción de GHRF, que es una secuencia de ADN administrada a un animal, preferiblemente se encuentra en el intervalo de 1 a 100 μ g por kg de peso del animal.

25 Otro aspecto de esta invención es proporcionar una secuencia de un gen exógeno para estimular la producción endógena de GHRF que potencie la eficacia de la alimentación y/o las tasas de crecimiento y/o reduzca la acumulación de grasa en cerdos, en la que la secuencia del gen exógeno comprende una secuencia de ADN que codifica un promotor para la expresión génica, una secuencia de ADNc que codifica un péptido señal de GHRF y una secuencia de ADN complementaria (ADNc) que codifica el péptido porcino GHRF (1-44).

30 Aún otro aspecto de esta invención es proporcionar un procedimiento de fabricación de un medicamento para potenciar la eficacia del alimento y/o las tasas de crecimiento y/o reducir la acumulación de grasa de animales, que comprende proporcionar una secuencia de ADN que codifica un promotor para la expresión génica, unido a una secuencia de ADNc que codifica un péptido señal de GHRF y unido a una secuencia de ADNc que codifica el péptido porcino GHRF (1-44), para formar una secuencia génica y mezclar dicho péptido con un vehículo adecuado.

35 Otros objetos, características, ventajas y aspectos de la presente invención serán aparentes para los expertos a partir de la siguiente descripción. Se comprenderá, sin embargo, que la siguiente descripción y los ejemplos específicos, mientras que sean indicación de las realizaciones preferidas de la invención, se dan sólo a modo de ilustración.

Breve descripción de las figuras

40 Ahora se explicará una realización preferida de la presente invención a modo de ejemplo y en referencia a las figuras acompañantes en las que:

45 La Figura 1 muestra las representaciones esquemáticas de pUPAGRF, el casete de expresión pGHRF, con el reordenamiento del promotor, la región codificadora de pGHRF y la señal de poliadenilación, mientras que el plásmido control pUPAX se produce por supresión de la región codificadora pGHRF.

La Figura 2 muestra las etapas principales implicadas en la construcción del plásmido pUPAGRF proporcionándose las enzimas claves usadas.

50 La Figura 3 representa el esquema que muestra la construcción del plásmido pUPAX a partir de pUPAGRF.

55 La Figura 4 muestra los efectos de la inyección del gen pGHRF en el peso corporal medio de ratones C57BL/6J durante un periodo de cuatro semanas en cuatro grupos de tratamiento, plásmido pUPAGRF a dosis de 30, 100 y 200 μ l ó 100 μ l de pUPAX control, con la inyección y la ponderación realizadas de 2:00 a 4:00 pm.

La Figura 5 muestra la diferencia en el porcentaje de ganancia de peso de los ratones inyectados con el gen pGHRF.

60 La Figura 6 muestra los efectos de la dosis del gen pGHRF en la ganancia de peso en el cerdo Landrace/Yorkshire/Duroc (LYD) macho.

La Figura 7 muestra el cambio en el grosor medio de la grasa dorsal en los cerdos Landrace/Yorkshire tras la inyección del gen pGHRF.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

65 Preferiblemente, el sistema de expresión de GHRF específico de músculo se construye en un vector plasmídico. La secuencia de ADN complementario (ADNc) que codifica el péptido señal de GHRF y el GHRF en sí se diseñaron a partir de la estructura peptídica primaria publicada y se optimizó para el uso de codones en mamíferos. Este ADNc

se sintetiza usando la química convencional de síntesis de oligonucleótidos. El GHRF y su péptido señal codificado por las secuencias de ADNc pueden ser los correspondientes fragmentos naturales o recombinantes o sintéticos, o biológicamente activos o sus análogos con actividades similares. La secuencia líder de GHRF codifica un péptido señal en los péptidos nacientes de GHRF que dirigirá la exportación de dichos péptidos GHRF fuera de las células del músculo y la secreción a la circulación general en una forma activa.

Las secuencias de ADN de los elementos promotores/potenciadores y las regiones no traducidas tres prima (3') que contienen la señal de poliadenilación del promotor/gen GHRF se clonan separadamente mediante una reacción en cadena de la polimerasa. Como ejemplo, se usa el promotor/potenciador de la actina α de músculo esquelético (*sk α*), pero esto no debería considerarse como una restricción para la elección del promotor/potenciador. Se usa una copia completa, pero no una subfracción mínima, de este promotor de la actina, como describen Draghia-Akli y otros. La razón es que estudios *in vivo*, que usan la inyección directa de genes, han demostrado que el promotor completo de la actina α de músculo esquelético daba el nivel más elevado de expresión génica en músculo de ratón, cuando se comparaba con otras versiones truncadas, (Reecy y otros, *Animal Biotechnology* 2: 101-120, 1998).

Como una realización preferida de esta invención, las secuencias de ADN del promotor de la actina, la secuencia de ADNc que codifica un péptido señal de GHRF y la secuencia de ADNc que codifica GHRF son específicas de especie.

Estos segmentos de ADN se insertan en un plásmido pUC en el siguiente orden: promotor de la actina; ADNc del péptido señal de GHRF humano; ADNc de GHRF porcino (1-44); región no traducida 3' de la actina. El plásmido pUC también contiene un gen de resistencia a antibiótico, por ejemplo, resistencia a ampicilina, que permite la selección cuando se transforma en bacterias *E. coli*, así como un origen de replicación ColEI que confiere un elevado número de copias del plásmido.

A continuación, la *E. coli* transformada con el plásmido de expresión de GHRF se cultiva en un fermentador en condiciones de selección con ampicilina. Tras recoger las células y liberar los plásmidos mediante lisis alcalina, el ADN plasmídico se separa del ARN, del ADN bacteriano y de otros contaminantes celulares mediante cromatografía en columna. La integridad del ADN plasmídico purificado se verifica mediante digestión con enzimas de restricción/electroforesis en gel de agarosa y secuenciación de ADN. La pureza se determina midiendo la absorbancia a DO_{260/280} y mediante electroforesis en gel de agarosa.

El ADN plasmídico ensayado se disuelve en un vehículo fisiológicamente aceptable, se comprueban los niveles de pirógeno, se ajusta la dosis y se administra a animales mediante inyección intramuscular. Como una realización preferida de esta invención, la cantidad total de dicho ADN plasmídico administrado por animal deberían de estar en el intervalo de 1 a 100 μ g por kg de peso corporal del ganado.

Tras la inyección en el músculo de los animales, las células del músculo captan el vector de expresión del plásmido, que es ADN. Entonces, el vector de expresión plasmídico dirigirá a la célula para que produzca péptidos GHRF. Estos péptidos se liberan al sistema circulatorio y estimulan la producción de GH cuando alcanzan la glándula pituitaria. Esto da lugar a la elevación de GH en el sistema circulatorio, lo que mejora el rendimiento productivo, dando lugar a una tasa de crecimiento más rápida, masa corporal magra más elevada y mejor conversión del alimento. Además, la carne producida es más magra y con menos grasa, y por tanto, con un valor en el mercado más alto.

Además, se evita el control de retroalimentación negativa normal de GH por la hormona somatostatina, ya que el GHRF liberado esta bajo el control de un promotor constitutivo específico del músculo. Esto permite la producción continua de GH.

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar adicionalmente, sin limitar, las realizaciones de la presente invención.

Ejemplo 1

Construcción del vector plasmídico de expresión pGHRF

La construcción de la expresión pGFRH se diseñó para proporcionar una producción y secreción óptima del péptido pGHRF cuando se transfectó en células musculares de mamífero (Figura 1).

El promotor de la actina alfa de músculo esquelético (*sk α*) es un promotor bien caracterizado que ha sido mostrado para proporcionar una elevada expresión génica muy específica en células diferenciadas de la fibra muscular (Reecy y col., *Gene* 180: 23-26 1996). Además, posee un elevado grado de identidad de secuencia y comparte muchos sitios consenso de unión a factores de transcripción en comparación con los promotores de la *sk α* humana, bovina y de pollo. Esto sugiere que este promotor está muy conservado entre mamíferos y aves. Esto se apoya en estudios *in vitro* que demuestran la capacidad del promotor de la *sk α* para conferir expresión génica específica de músculo en ratones, ratas y porcinos. Por tanto, se ha elegido este promotor de 2 kb para dirigir la expresión específica en músculo del ADNc de pGHRF.

El promotor de la *skaa* porcina fue empalmado delante de un marco de lectura abierto que comprendía la secuencia de ADN que codifica el péptido señal del GHRF humano y el péptido GHRF porcino maduro.

Puesto que no se disponía de la secuencia de ADN que codifica el GHRF, diseñamos ésta mediante traducción inversa de la estructura peptídica conocida, con la optimización para las preferencias de codones de mamíferos. Una modificación adicional de la presente invención implica la adición de la región no traducida 3' del gen de la actina α de músculo esqueleto porcino después del extremo 3' de la región codificadora. Esto sirve para potenciar la expresión del producto pGHRF estabilizando y prolongando la semivida de las transcripciones del ARNm. El procedimiento de construcción del plásmido de expresión pGHRF se detalla a continuación y se resume en la Figura 2.

Región poli A: Se purificó el ADN genómico a partir de riñón de cerdo y se usó para la amplificación de secuencias de genes porcinos. Por PCR se amplificó un fragmento de 750 pb del extremo 3' del gen de la *skaa*. Esta región abarca los nucleótidos número 2.464 a 3.204 de la secuencia publicada (Nº de acceso a Genbank U16368) y contiene la región no traducida 3' y la posible señal de poliadenilación. A continuación, el producto se cortó con las enzimas de restricción *Xba* I y *Sac* II (usando sitios de corte introducidos con los cebadores de PCR) y se clonó en el vector plasmídico pBluescriptKS+ para obtener pS α ApA.

Región codificadora del GHRF: La región codificadora de GHRF es un marco de lectura abierto (ORF) que comprende la "secuencia líder" de ADN que codifica un péptido señal para GHRF humano seguido de un ADNc del GHRF porcino (1-44) en fase. La secuencia líder, que contiene el exón 2 completo y parte del exón 3 del gen del GHRF humano (número de acceso a Genbank L10034-5) se amplificó por PCR a partir del ADN genómico humano. El ADNc del GHRF porcino se construyó con dos oligonucleótidos con las secuencias siguientes:

LGPRF1 5'-TACGCCGACGCCATCTTCACCAACAGCTACAGGAAGGTGCTG
GGCCAGCTGAGCGCCAGGAAGCTGCTGCAGGACATCATG-3'

LGPRF2 5'-CGTCTAGATCACAGCCTCACCCCTGGCGCCCTGCTCCTGGT
TCCTCTCGCCCTGCTGCCTGCTCATGATGTCCTGCAGCAGC-3'

Estos oligonucleótidos contenían un solapado que se usó para hibridarlos entre sí y, a continuación, rellenarlos con la Polimerasa Vent. El producto hibridado se amplificó a continuación por PCR con la Polimerasa Vent. Los productos de la secuencia líder y el ADNc del GHRF porcino se fosforilaron ambos con la polinucleótidoquinasa de T4 y, a continuación, se purificaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. Entonces, los productos se unieron con la ADN ligasa de T4 y el producto de ligamiento de 265 pb se purificó adicionalmente usando un gel de poliacrilamida. Este producto ORF se reamplificó a continuación por PCR con cebadores que contenían lugares para las enzimas de restricción *Xma* I y *Xba* I. Entonces, la ORF se cortó con las enzimas *Xma* I y *Xba* I y se purificó para obtener un fragmento de 245 pb. Este fragmento se clonó a continuación en pS α ApA para obtener pPGRFpA.

Región promotora: El promotor/potenciador completo de 2 kb de la actina α de músculo esquelético porcino (*skaa*) se amplificó por PCR a partir del ADN genómico porcino. A continuación, se hizo una reacción en cadena de la polimerasa anidada (PCR) en el 1/50 de la primera reacción de PCR para obtener un producto de PCR que se extendía desde el pb -1.909 al +76 del gen de la *skaa* porcina (Reecy y col., Gene 180:23-28, 1996). Los extremos de este producto se hicieron romos con la ADN polimerasa de T4 y después se cortaron con la *Eco* RI. El fragmento promotor purificado a partir del gel se clonó en los lugares *Eco* RI y *Eco* RV de pPGRFpA para obtener la construcción intermedia pS α APGRFpA.

Para obtener la construcción final, este casete de expresión se escindió a continuación con las enzimas de restricción flanqueantes *Kpn* I y *Sac* I y se ligó en el plásmido pUC19 y se denominó pUPAGRF. Se hizo una segunda construcción quitando la región codificadora completa de pGHRF del plásmido pUPAGRF por digestión parcial con *Xho* I (Figura 3). Este segundo plásmido, pUPAX, se usó como control en los ensayos con animales.

Los plásmidos se transformaron por separado en *E. coli* K-12 (cepa DH5 α) y se cultivaron en un fermentador usando medios de cultivo suplementados con ampicilina a 150 μ g/ml. Cuando los cultivos alcanzaron la fase estacionaria, las células bacterianas se recogieron y se lisaron mediante lisis alcalina clásica. Los plásmidos se recuperaron mediante centrifugación y se separaron de los contaminantes celulares ADN, ARN y proteínas mediante cromatografía de intercambio aniónico. La pureza se ensayó midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm. La integridad del plásmido de ADN purificado también se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa. Finalmente, la identidad se confirmó mediante digestión con enzimas de restricción y secuenciación de ADN.

ES 2 267 560 T3

El plásmido de ADN se precipitó y se redisolvió en solución salina tamponada con fosfato (PBS) libre de pirógenos y la concentración se calculó leyendo la absorbancia a 260 nm. Después de pasar los ensayos de pirógenos, en este momento, el ADN estaba listo para la inyección en animales.

5 Ejemplo 2

Para ensayar la capacidad de la construcción pUPAGRF para potenciar el rendimiento productivo, inyectamos este plásmido en el músculo cuádriceps del ratón.

10 A partir de una colonia de cría de ratones C57BL/6J, se seleccionaron cuarenta y ocho ratones de 14,5-18 g de peso corporal y se asignaron de forma aleatoria a cuatro grupos de doce. Cada grupo de 12 ratones recibieron una única inyección de 100 μ l de PBS que contenían 100 μ g de plásmido control, o el plásmido de expresión del GHRF (pUPAGRF) a 30, 100 ó 200 μ g, respectivamente. Los ratones se pesaron, se marcaron en el dedo del pie para su identificación y, a continuación, recibieron una única inyección en mitad del músculo cuádriceps izquierdo.

15 Los ratones se mantuvieron con un ciclo de día/noche de 12 horas en condiciones ambientales controladas, entorno de enfermedad mínima y recibieron pienso para ratas y agua convencionales. Los pesos corporales se registraron dos veces por semana. Los ratones se anestesiaron con ketamina/xilacina (0,15 ml por 100 g de peso corporal) para obtener muestras de sangre y tejido. La sangre se recogió mediante punción cardiaca con una jeringa de insulina de 1 ml que contenía 30 μ l de EDTA 0,5 M como anticoagulante. La sangre recogida se mantuvo en hielo hasta que se

20 obtuvo el plasma sedimentando las células a 6.000 g durante 10 min. El músculo cuádriceps completo, que incluía el lugar de inyección se diseccionó y se congeló rápidamente en nitrógeno líquido. También se diseccionó el lóbulo derecho del hígado y se congeló inmediatamente. Todas las muestras se almacenaron a -80°C hasta que se analizaron posteriormente.

25 Resultados

Los ratones de los cuatro grupos de tratamiento mostraron un rápido crecimiento y aumentaron de peso corporal durante el periodo de cuatro semanas tras la inyección. El día 21 del periodo de post-inyección (P.I.) los valores del peso corporal no eran significativamente diferentes entre todos los grupos. Aunque los ratones que recibieron 30 μ g de pUPAGRF mostraban la mayor ganancia de peso mientras que el grupo de la dosis más elevada (200 μ g) se mantenía por detrás (Figura 4), el día 25 P.I. hubieron diferencias significativas entre las dosis más elevadas y el control. A los

30 25 días P.I. los pesos corporales medios de los grupos de 200, 100 y 30 μ g eran de 26,3, 26,5 y 24,7 g, respectivamente, mientras que el grupo control era de 24,5 g ($p < 0,032$, factor sencillo de ANOVA). Los pesos corporales medios a los 28 días P.I. fueron de 26,8 y 26,6 g para los ratones tratados con los 200 y 100 μ g, frente a 24,5 y 25,0 g para los

35 tratados con 30 μ g y los controles, respectivamente. Una vez más, había una diferencia significativa con respecto a los ratones tratados con el control ($p < 0,0045$).

Los efectos de las inyecciones de pUPAGRF en el porcentaje de ganancia de peso se muestran en la Figura 5. Cuatro semanas después de las inyecciones del plásmido, los ratones tratados con el control mostraban unos porcentajes de ganancia del 48,7%, del 56,6% para los de 30 y 100 μ g de pUPAGRF, mientras que para los de 200 μ g era del 68,4%. Estos resultados indican que una única inyección de un plásmido que produce pGHRF es capaz de producir una mejora significativa en la tasa de crecimiento de ratones jóvenes. A dosis de hasta 100 μ g, se observó un aumento de aproximadamente el 8% mientras que una dosis de 200 μ g fue capaz de producir un aumento del 19% en el porcentaje de ganancia de peso. Estos resultados son comparables a las observaciones de Draghia-Akli en la regeneración del

40 músculo de ratón, aunque sus procedimientos de inyección requerían una inyección previa del miotóxico bupivacaína para potenciar la captación y la expresión del plásmido.

Ejemplo 3

50 A continuación, se ensayó la capacidad del tratamiento con el gen pGHRF para mejorar el rendimiento productivo en cerdos de granja.

En este estudio se usaron cerdos de criadero de un cruce triple de Landrace/Yorkshire/Duroc (LYD). Los cerdos machos jóvenes, de 10 semanas de edad, se asignaron de forma aleatoria a tres pocilgas adyacentes en una granja

55 criadero. Los cerdos recibieron la preparación plasmídica mediante una única inyección en el músculo glúteo con una jeringa con aguja del 16 de 1½ pulgadas (3,81 cm). Los cerdos de las pocilgas A y B fueron inyectados con 1 mg y 4 mg de pUPAGRF, respectivamente, mientras que los de la pocilga C recibieron 4 mg del plásmido control pUPAX. Los cerdos tuvieron libre acceso a agua y comida, y se pesaron semanalmente.

60 Resultados

Los cerdos que recibieron una única inyección de 1 mg de pUPAGRF mostraron una ganancia de peso de 62,53 a 87,17 kg (aumento del 37,8%) en el periodo de 6 semanas del experimento. Los cerdos inyectados con 4 mg crecieron de un peso medio de 60,20 kg a 98,28 kg (ganancia del 44,1%). Aquellos del grupo control crecieron de 58,59 a 89,33

65 kg (una ganancia del 34,4%) en el mismo periodo. Así, después de 6 semanas, los cerdos inyectados con el plásmido de expresión de pGHRF mostraban una mayor ganancia de porcentaje de peso que los inyectados con el plásmido control. Además, parece que hay una tendencia a una respuesta dependiente de dosis puesto que la dosis de 4 mg causaba un aumento más de dos veces mayor en comparación con la dosis de 1 mg. En términos de rendimiento de

ES 2 267 560 T3

conversión de alimento, el grupo de 1 mg de dosis, aunque mostraba una modesta ganancia en la tasa de crecimiento, consumía un 10% menos de alimento (tabla 1). Además, no hubo diferencia en la cantidad de alimento consumido entre el control y el grupo de la dosis más elevada, por ello, pUPAGRF a ambos dosis de 1 mg y 4 mg, fueron capaces de proporcionar una mejora de la conversión del alimento.

TABLA 1

Media del consumo de alimento diario en los cerdos LYD tras la inyección del plásmido

	control	1 mg	4 mg
media de consumo de alimento diario por cerdo (kg)	3,960	3,563	3,963
% del control	100,00	89,98	100,08
% del cambio relativo al control	0,00	-10,02	0,08

Ejemplo 4

Se realizaron estudios para determinar los efectos de la inyección de 2 mg del plásmido pUPAGRF en cerdos Landrace/Yorkshire (LY) en la acumulación de grasa dorsal. Se asignaron veinte cerdos LY de aproximadamente 32 semanas de edad y peso medio de 55 kg a dos grupos de diez, cada uno con 5 machos y 5 hembras. A un grupo se le administraron 2 mg del plásmido pUPAGRF mediante inyección intramuscular. El segundo grupo se trató de forma similar con el plásmido pUPAX, y sirvió como control. Semanalmente se determinó el grosor de la grasa dorsal en posiciones laterales con respecto a la última vértebra torácica usando un medidor de ultrasonidos de Renco. Se tomaron tres medidas en las posiciones PI, PII y PIII, que estaban a 45 mm, 65 mm y 80 mm lateralmente desde el centro de la columna vertebral sobre la última vértebra con costilla, respectivamente y se promediaron para obtener una media del espesor de la grasa dorsal.

Resultados

Los resultados se resumen en la Figura 7. En los machos, tanto los cerdos tratados como los controles mostraron un aumento gradual del espesor de la grasa dorsal conforme los animales crecían, aunque los que recibieron el plásmido que expresaba pGHRF mostraban una ganancia reducida de la grasa dorsal. Los cerdos hembras control también mostraron una ganancia gradual en la grasa dorsal, que se suprimió con el tratamiento con pGHRF. La Tabla 2 muestra las ganancias relativas en el espesor de la grasa dorsal durante el periodo experimental. A los 60 días tras la inyección, el tratamiento con pGHRF redujo la cantidad de acumulación de grasa dorsal tanto en cerdos LY machos como hembras.

TABLA 2

Ganancia relativa en el espesor de la grasa dorsal en los cerdos LY tras la inyección del plásmido

	LY macho		LY hembra	
	Control	pGHRF	Control	pGHRF
Ganancia relativa en el espesor de la grasa dorsal	51,3%	34,9%	24,2%	5,1%

Estos resultados de los ejemplos muestran que el tratamiento con el gen pGHRF es capaz de producir beneficios en el rendimiento productivo tanto en el ratón como en el cerdo. Las ganancias en las tasas de crecimiento son comparables con las de los tratamientos con GH, incluso con un régimen de tratamiento muchos más rentable. La cantidad del ADN usado por animal es al menos 100 veces menor que la de la inyección de hormona de crecimiento descrita en la bibliografía. Además, los datos en cerdos muestran que se dan reducciones en la cantidad de alimento necesaria así como en el espesor de la grasa dorsal. Por tanto, esta invención será beneficiosa para la industria ganadera porque potencia la eficacia del alimento y la tasa de crecimiento del ganado.

REIVINDICACIONES

1. El uso de un vector en la elaboración de un medicamento para mejorar las eficacias de alimentación y/o las tasas de crecimiento y/o reducir la acumulación de grasa en cerdos, en el que el vector estimula la producción del factor liberador de la hormona de crecimiento (GHRF) y comprende:

- una secuencia de ADN que codifica un promotor para la expresión génica;
- una secuencia de ADN que codifica un péptido señal del GHRF; y
- una secuencia de ADN que codifica el péptido GHRF (1-44) porcino.

y en el que el vector se formula para su administración mediante inyección intramuscular.

2. El uso según la reivindicación 1, en el que el promotor para la expresión génica es un promotor de actina.

3. El uso según la reivindicación 2, en el que el promotor de actina es un promotor de la actina de músculo esquelético.

4. El uso según la reivindicación 3, en el que la secuencia de ADN codifica un promotor de la actina de músculo esquelético que comprende una copia completa de la secuencia de ADN del promotor de la actina de músculo esquelético.

5. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el vector además incluye una secuencia de ADN derivada de una región no traducida tres prima (3') que contiene una señal de poliadenilación del gen del promotor o del GHRF.

6. El uso según la reivindicación 5 en el que dicha región no traducida 3' es del gen de la actina α de músculo esquelético porcino.

7. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el vector además incluye una secuencia de ADN que codifica un gen de resistencia a antibiótico.

8. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el GHRF y su péptido señal codificados por dichas secuencias de ADN son los correspondientes fragmentos naturales o recombinantes o sintéticos, o biológicamente activos o sus análogos con actividades similares.

9. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la secuencia de ADN del promotor, la secuencia de ADN que codifica un péptido señal de GHRF y la secuencia de ADN que codifica el GHRF son específicas de una especie.

10. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, en el que el promotor de la actina y el péptido señal del GHRF son endógenas para los cerdos.

11. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en el que el péptido señal del GHRF es un péptido señal del GHRF humano.

12. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 11 en el que el promotor de la actina de músculo esquelético es un promotor de la actina de músculo esqueleto porcino.

13. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el vector se mezcla con un vehículo adecuado antes de su administración.

14. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el medicamento se formula de tal modo que la cantidad de dicho vector administrado por animal está en el intervalo de 1 a 100 μ g por kg de peso corporal del cerdo.

15. Un vector para estimular la producción endógena del GHRF para potenciar la eficacia de alimentación y/o las tasas de crecimiento y/o reducir la acumulación de grasa en cerdos que comprende:

- una secuencia de ADN que codifica un promotor para la expresión génica;
- una secuencia de ADN que codifica un péptido señal del GHRF; y
- una secuencia de ADN que codifica el péptido GHRF (1-44) porcino.

16. El vector según la reivindicación 15, en el que el promotor para la expresión génica es un promotor de la actina.

ES 2 267 560 T3

17. El vector según la reivindicación 16, en el que el promotor de la actina es un promotor de la actina de músculo esquelético.

18. El vector según la reivindicación 17, en el que la secuencia de ADN que codifica un promotor de la actina de músculo esquelético comprende una copia completa de la secuencia de ADN del promotor de la actina de músculo esquelético.

19. El vector según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18 en el que el vector además incluye una secuencia de ADN derivada de una región de poliadenilación no traducida 3' de gen del promotor o del GHRF.

20. El vector según la reivindicación 19, en el que dicha región no traducida 3' es del gen de la actina α de músculo esquelético porcino.

21. El vector según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, en el que el vector además incluye una secuencia de ADN que codifica un gen de resistencia a antibiótico.

22. El vector según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 21, en el que el GHRF y su péptido señal codificados por las secuencias de ADN son los correspondientes fragmentos naturales o recombinantes o sintéticos, o biológicamente activos o sus análogos con actividades similares.

23. El vector según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 22, en el que la secuencia de ADN del promotor de la actina, la secuencia de ADN que codifica un péptido señal del GHRF y la secuencia de ADN que codifica el GHRF son específicas de una especie.

24. El vector según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 23, en el que el promotor de la actina y el péptido señal del GHRF son endógenos para cerdos.

25. El vector según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 24 en el que el péptido señal del GHRF es un péptido señal del GHRF humano.

26. El vector según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 25 en el que el promotor de la actina de músculo esquelético es un promotor de la actina de músculo esquelético porcino.

27. Un procedimiento de fabricación de un vector para potenciar la eficacia de alimentación y/o las tasas de crecimiento y/o reducir la acumulación de grasa en cerdos, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- proporcionar una secuencia de ADN que codifica un promotor para la expresión génica;
- unir una secuencia de ADN que codifica un péptido señal del GHRF; y
- unir una secuencia de ADN que codifica el péptido GHRF (1-44) porcino para formar dicho vector.

28. El procedimiento según la reivindicación 27, en el que el promotor para la expresión génica es un promotor de la actina.

29. El procedimiento según la reivindicación 28, en el que el promotor de la actina es un promotor de la actina de músculo esquelético.

30. El procedimiento según la reivindicación 29, en el que la secuencia de ADN que codifica un promotor de la actina de músculo esquelético comprende un conjunto completo de la secuencia de ADN del promotor de la actina de músculo esquelético.

31. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 30 en el que el procedimiento además comprende la etapa de unión de una secuencia de ADN derivada de una región de poliadenilación no traducida 3' del gen proveedor o del GHRF.

32. El procedimiento según la reivindicación 31 en el que dicha región no traducida 3' es la del gen de la actina α de músculo esquelético porcino.

33. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 32, en el que el procedimiento además comprende la etapa de unir una secuencia de ADN que codifica un gen de resistencia a ampicilina.

34. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 33, en el que las secuencias de ADN de la secuencia del vector se unen por ligamiento.

35. El procedimiento según la reivindicación 33, en el que las secuencias de ADN del vector se unen de forma secuencial en el siguiente orden: promotor para la expresión génica; secuencia de ADN que codifica el péptido señal del

ES 2 267 560 T3

GHRF; secuencia de ADN que codifica el GHRF porcino; secuencia de ADN que codifica la región de poliadenilación no traducida 3' de dicho promotor; secuencia de ADN que codifica el gen de resistencia a antibiótico.

5 36. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 35, en el que el GHRF y su péptido señal codificados por las secuencias de ADN son los correspondientes fragmentos naturales o recombinantes o sintéticos, o biológicamente activos o sus análogos con actividades similares.

10 37. El procedimiento según una cualquiera de la reivindicaciones 27 a 36, en el que la secuencia de ADN del promotor, la secuencia de ADN que codifica un péptido señal del GHRF y la secuencia de ADN que codifica el GHRF son específicos de especie.

 38. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 28 a 36 en el que el promotor de la actina y el péptido señal del GHRF son endógenos para cerdos.

15 39. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 38 en el que el péptido señal del GHRF es un péptido señal del GHRF humano.

20 40. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 29 a 39 en el que el promotor de la actina de músculo esquelético es un promotor de la actina de músculo esquelético porcino.

25

30

35

40

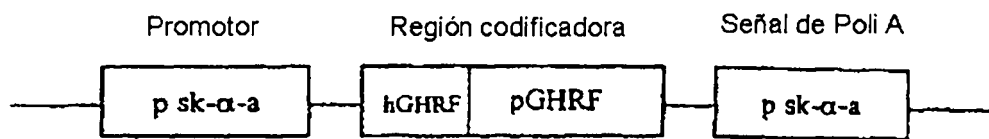
45

50

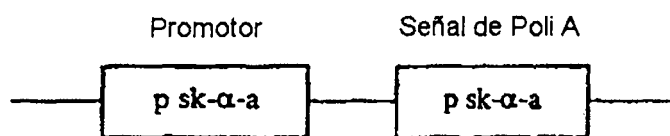
55

60

65



A. pUPAGRF



B. pUPAX

Figura 1

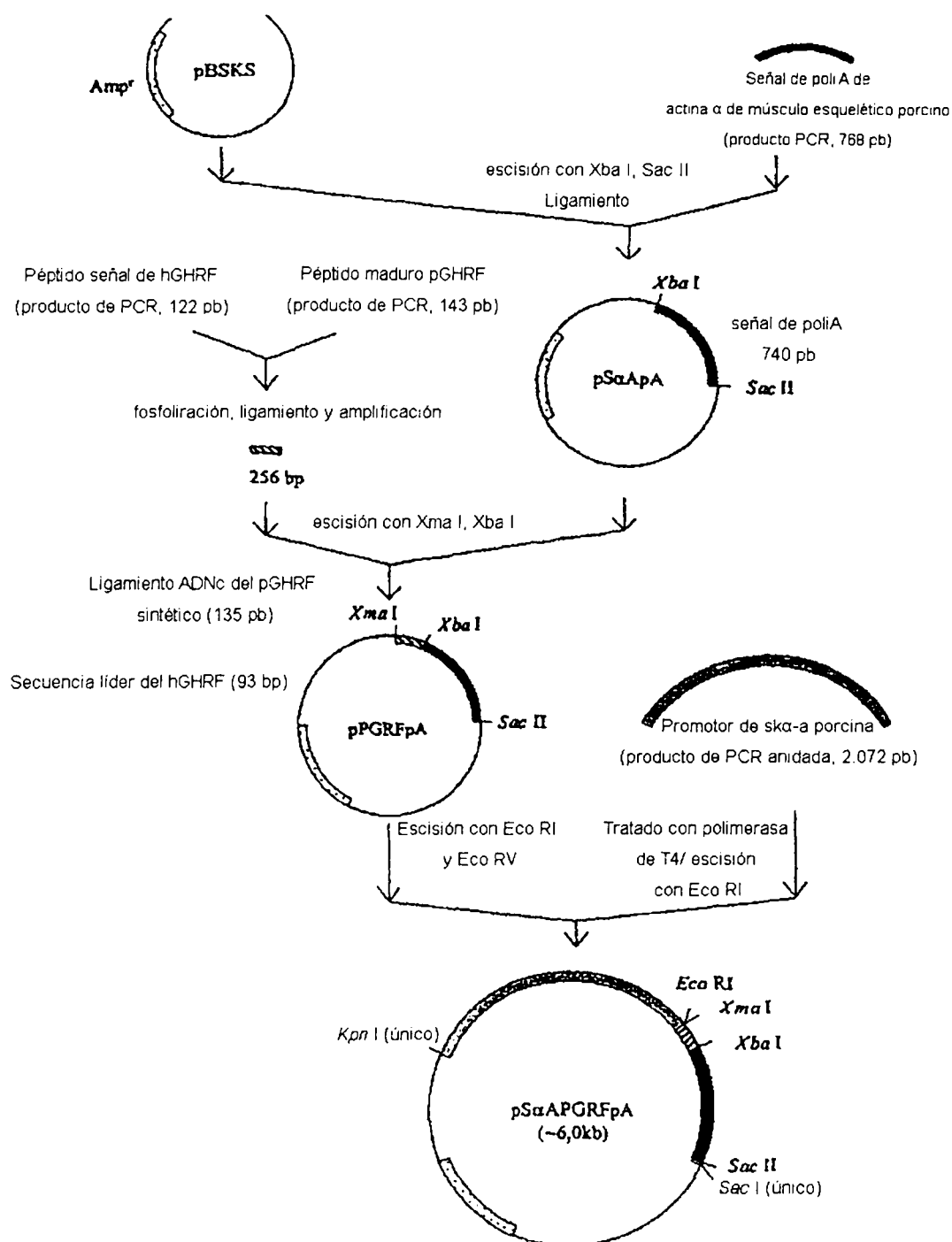


Figura 2

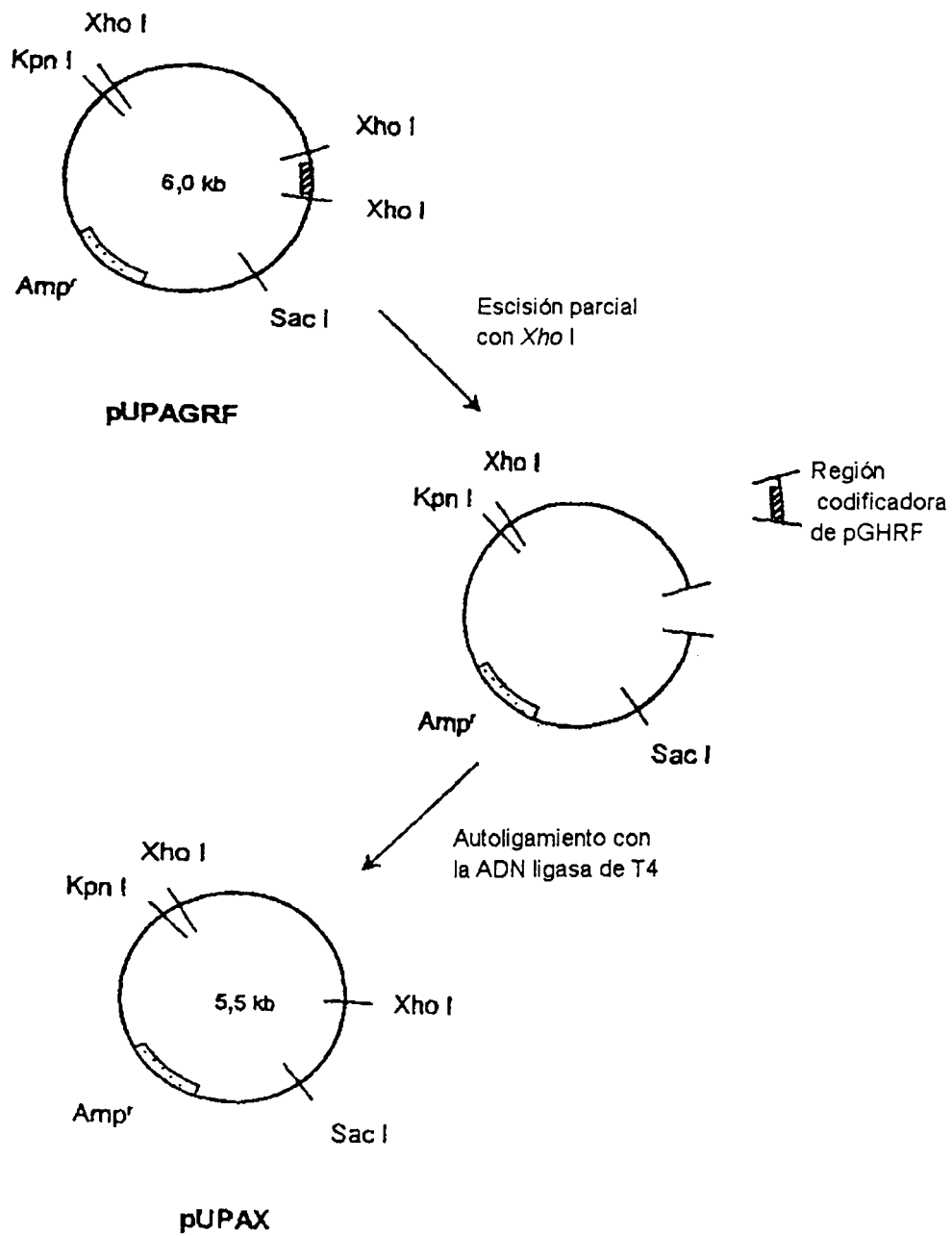


Figura 3

Figura 4

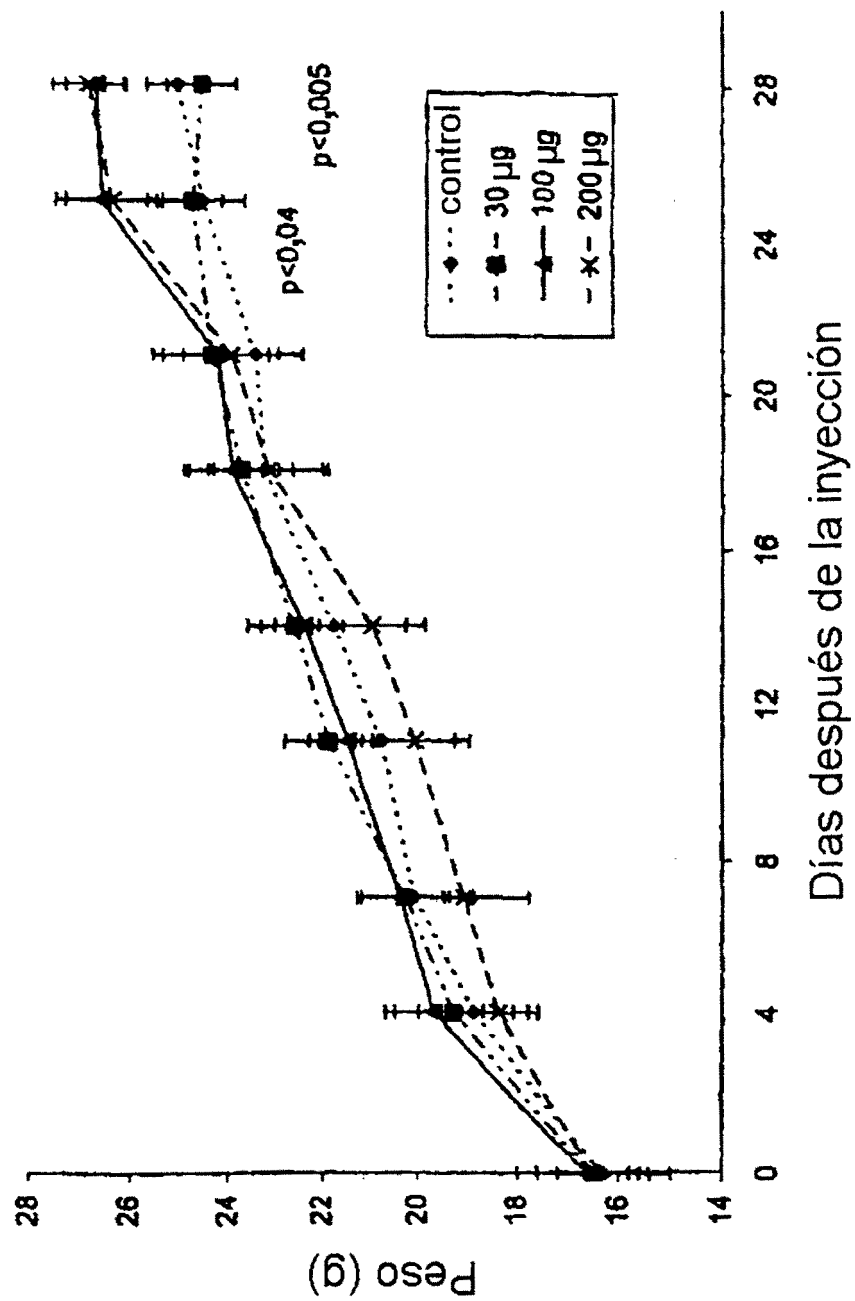


Figura 5

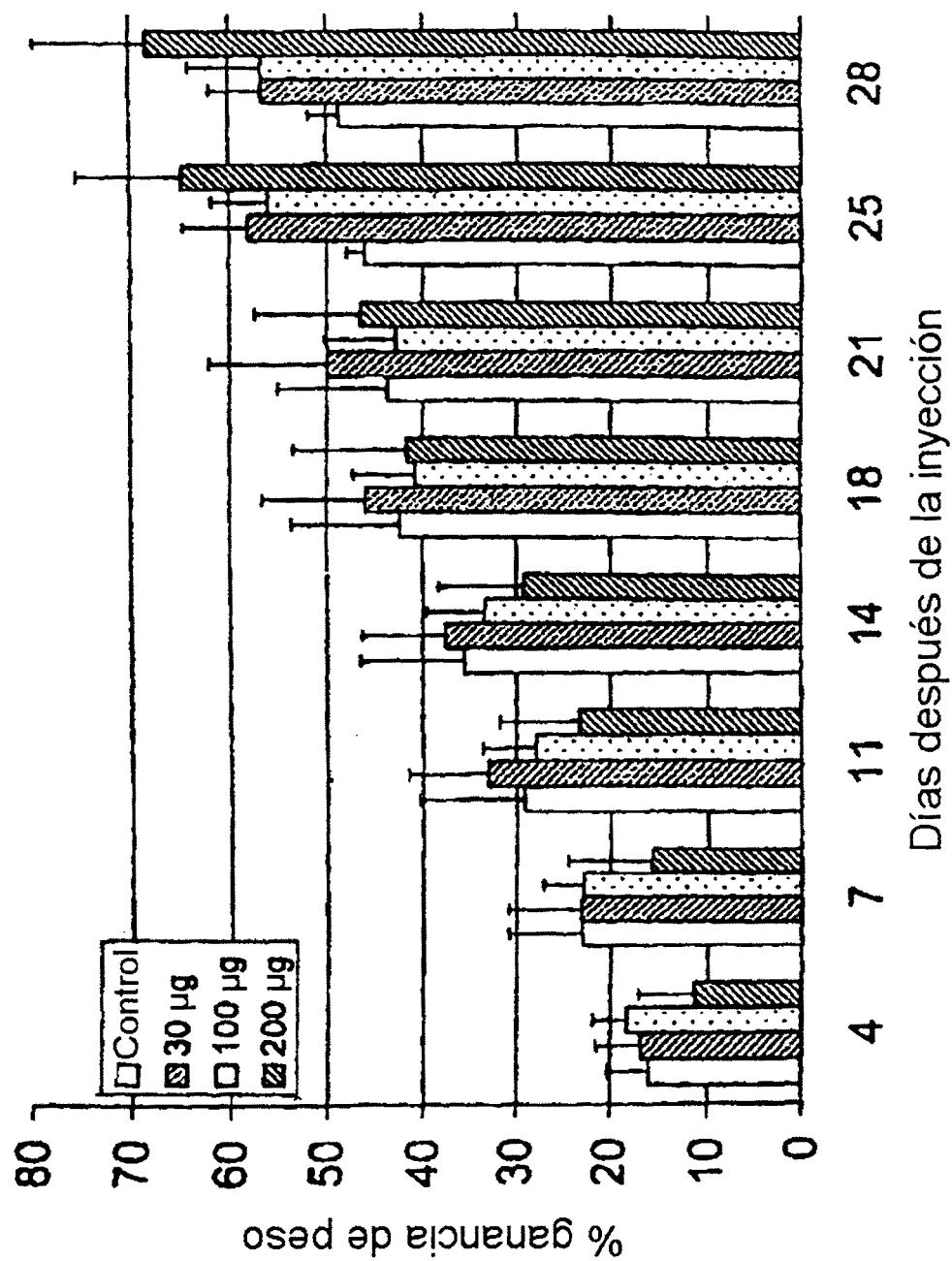


Figura 6

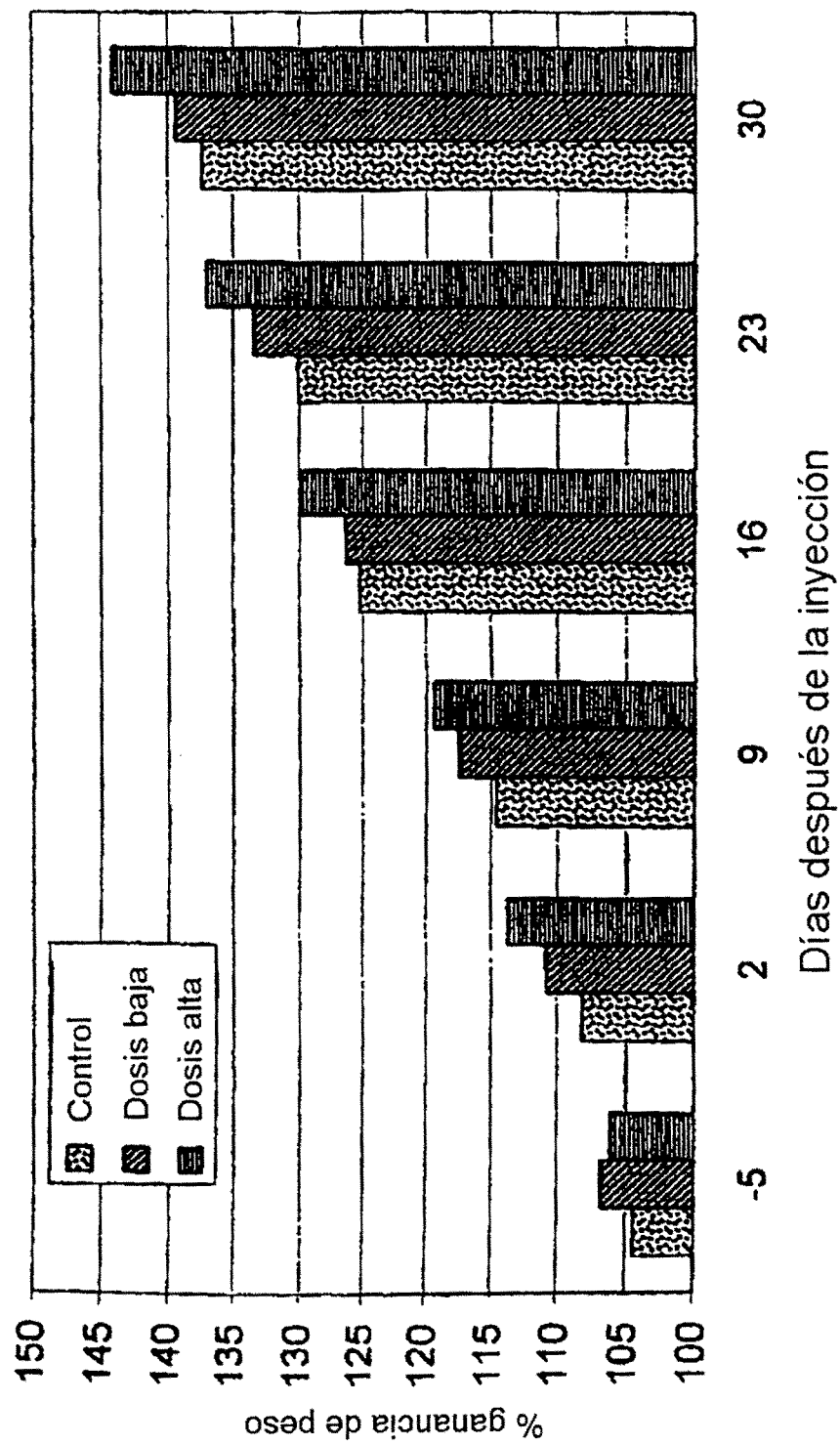


Fig 7a. Efectos del tratamiento con el gen GHRF en el espesor medio de la grasa dorsal en cerdos LY machos

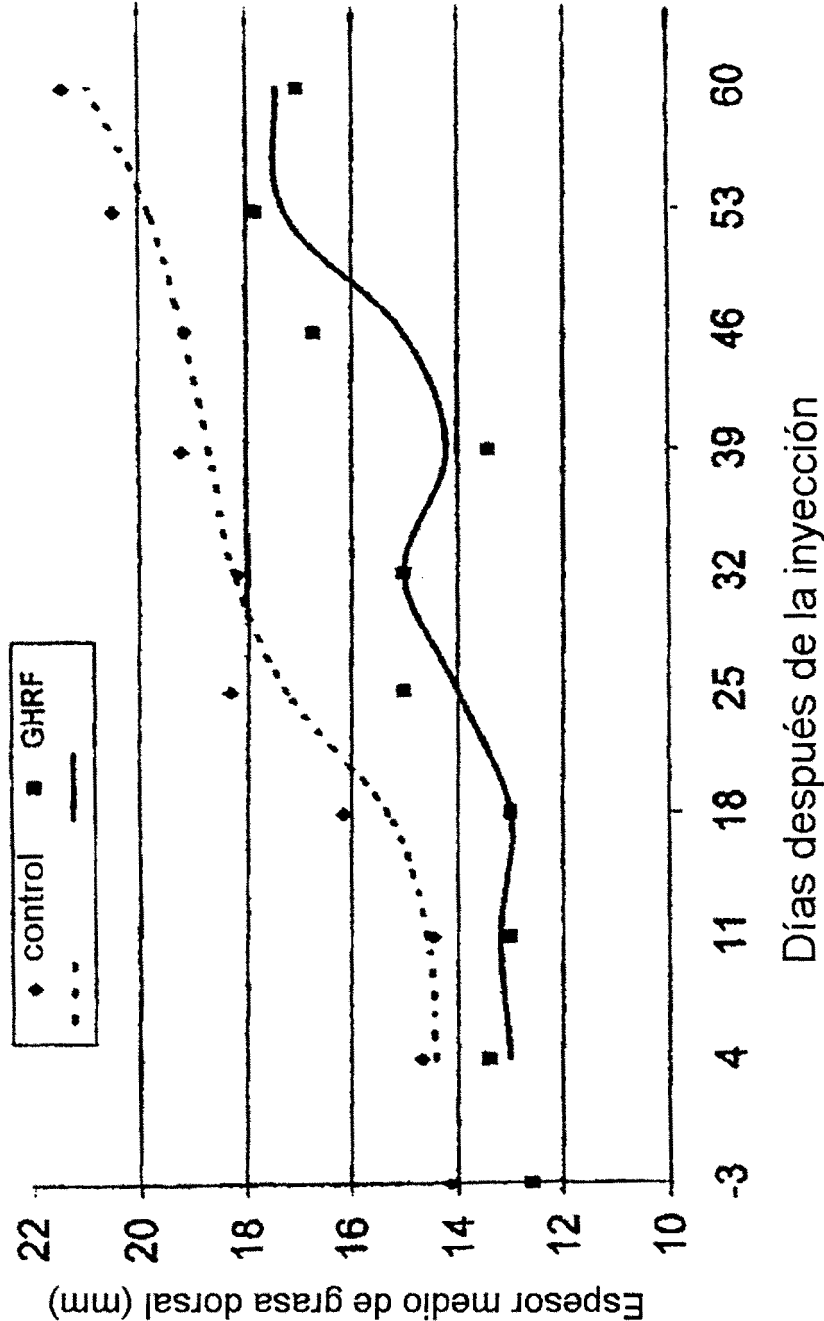
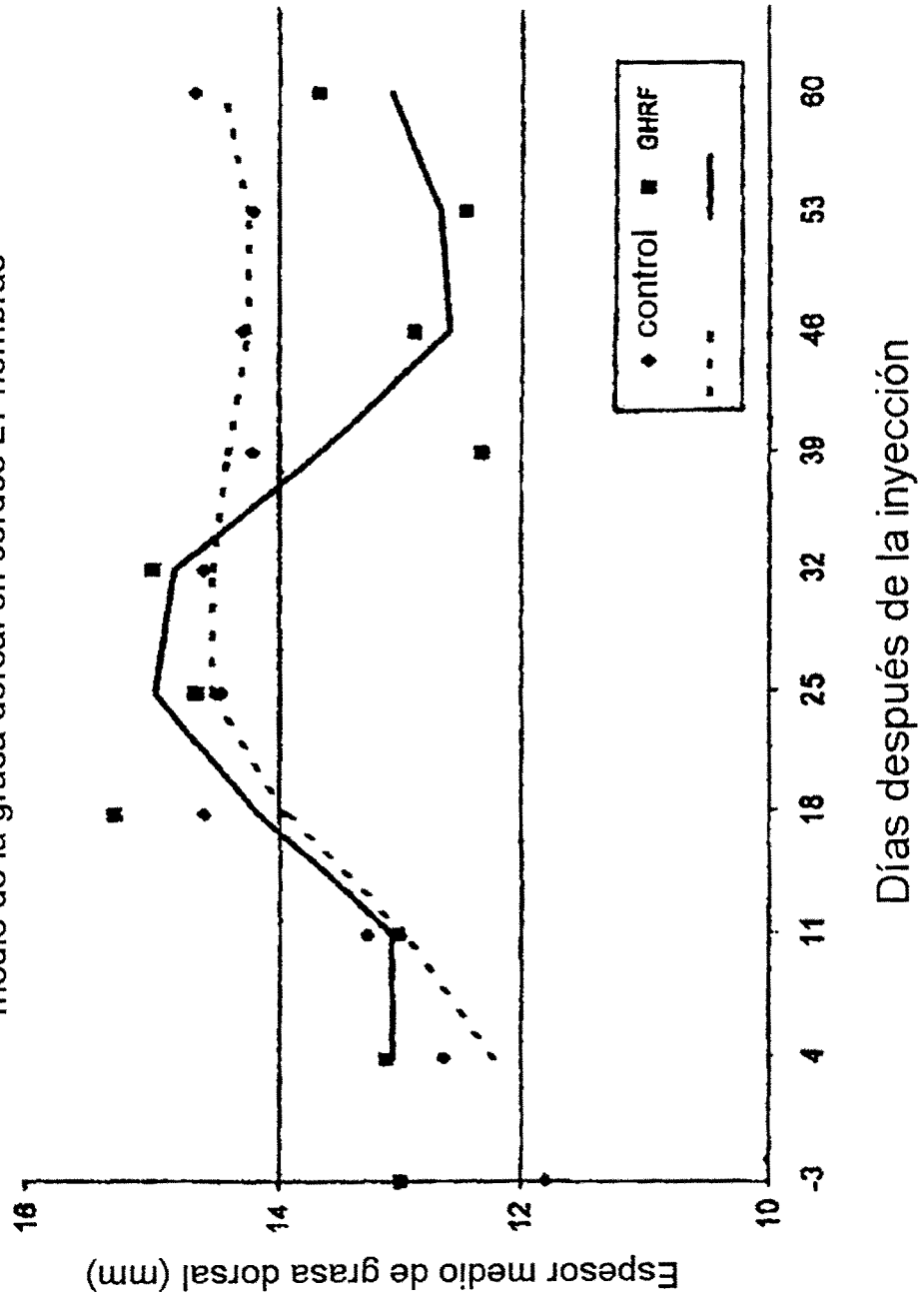


Fig 7b. Efectos del tratamiento con el gen GHRF en el espesor medio de la grasa dorsal en cerdos LY hembras



ES 2 267 560 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> LeaderGene Limited
5 <120> Tratamiento génico para mejorar el rendimiento del alimento y la tasa de crecimiento del ganado
<130> 9815608
<140> PCT/IB00/01317
<141> 18-09-2000
10 <150> US 09/398.473
<151> 17-09-1999
<160> 2
<170> PatentIn. versión 3.0
15 <210> 1
<211> 79
<212> ADN
20 <213> *Sus scrofa*
<400> 1

25 **tacgccgacg ccattcttcac caacagctac aggaagggtgc ggccagctga gcgccagg**
 aa 60

gctgctgcag gacatcatg
 79

30 <210> 2
<211> 81
<212> ADN
35 <213> *Sus scrofa*
<400> 2

40 **cgtctagatc acagcctcac cctggcgccc tgctcctggt tectctcgcc ctgctgcc**
 tg 60

ctcatgatgt cctgcagcag c
 81

45

50

55

60

65