



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 337 967**

51 Int. Cl.:
C12N 15/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99923306 .7**

96 Fecha de presentación : **20.05.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **1082437**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.03.2001**

54 Título: **Inducción xenobiótica de la expresión génica del citocromo P450 CYP3A4.**

30 Prioridad: **21.05.1998 AU PP3628**

73 Titular/es: **The University of Sydney
Parramatta Road
Sydney, New South Wales 2006, AU**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.04.2010

72 Inventor/es: **Liddle, Christopher y
Goodwin, Bryan James**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.04.2010

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 337 967 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

Inducción xenobiótica de la expresión génica del citocromo P450 CYP3A4.

5 La presente invención se refiere a la modulación o realización de la expresión génica y/o a la formación de enzimas de la subfamilia del citocromo P450 CYP3A humano y animal no humano.

10 El desarrollo de fármacos terapéuticos para el uso médico y veterinario resulta importante para la mejora y el avance de las modalidades de tratamiento en seres humanos y animales. Por desgracia, se ha encontrado que muchos fármacos desarrollados y utilizados posteriormente presentan vidas medias limitadas *in vivo* debido al metabolismo rápido del receptor. Resultaría ventajoso disponer de un sistema para cribar nuevos fármacos potenciales para la susceptibilidad a la acción metabólica en los pacientes.

15 Un citocromo P450 (P450) denominado CYP3A4 es un gen humano importante que codifica un enzima expresado en el hígado y en menor grado en un abanico de otros tejidos. Cuantitativamente es el P450 más abundante en el hígado humano. El enzima CYP3A4 resulta crucial para el metabolismo de muchos compuestos químicos exógenos (xenobióticos), incluyendo fármacos terapéuticos, así como un abanico de compuestos endógenos, tales como las hormonas esteroideas. Los cambios del nivel de expresión de CYP3A4 pueden afectar drásticamente a la tasa de eliminación de los fármacos terapéuticos y, de esta manera, presentar un impacto sobre su efectividad. Un abanico de compuestos químicos exógenos, incluyendo algunos fármacos terapéuticos (en lo sucesivo denominados “inductores xenobióticos”) son capaces de incrementar la tasa transcripcional del gen CYP3A4 y por lo tanto la formación del enzima CYP3A4. El resultado es un gran incremento de la eliminación de los fármacos metabolizados por CYP3A4, reduciendo de esta manera su efecto terapéutico.

25 Los presentes inventores han obtenido una molécula de ADN, situada aproximadamente a 7 kilobases en el lado 5' del sitio de inicio de transcripción del gen del P450 CYP3A4 humano, que es responsable de la inducción transcripcional del gen CYP3A4 por parte de inductores xenobióticos, incluyendo fármacos terapéuticos, y que también se encuentra implicada en la expresión constitutiva de dicho gen. Esta molécula de ácidos nucleicos, denominada “módulo intensificador sensible a los xenobióticos” (XREM) por los presentes inventores, presenta varios usos beneficiosos.

30 La referencia de Hashimoto *et al.*, Eur. J. Biochem. 218:585-595, 1993, describe el gen CYP3A4, incluyendo la secuencia promotora proximal.

35 La referencia de Dogra *et al.*, Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 25 (enero de 1998):1-9, describe la activación transcripcional de genes P450 por diferentes clases de inductores químicos.

La referencia de Ogg *et al.*, Eur. J. Drug Metabolism and Pharmacokinetics 22(4):311-313, 1997, describe un ensayo *in vitro* de un gen informador para la evaluación de la inducción xenobiótica del gen CYP3A4 humano.

40 La referencia Lehmann *et al.*, J. Clin. Invest 5:1016-1023, 1998, describe la activación del receptor PXR nuclear huérfano humano por compuestos que regulan la expresión del gen CYP3A4 y provocan interacciones farmacológicas.

45 La referencia de Barwick *et al.*, Mol. Pharm 50:16-26, 1996, describe la activación transcripcional inducible por glucocorticoides de CYP3A4 humano transitoriamente expresado y CYP3A6 de conejo en cultivos primarios de hepatocitos de rata y de conejo adulto.

La invención proporciona un constructo genético según se define en las reivindicaciones. La invención también proporciona un método según se define en las reivindicaciones.

50 La presente memoria proporciona una molécula aislada de ácidos nucleicos que incluye una secuencia de nucleótidos que forma un intensificador transcripcional de la producción o expresión del citocromo P450 (P450) CYP3A4.

55 Preferentemente, la molécula aislada de ácidos nucleicos incluye una secuencia de nucleótidos sustancialmente igual a la mostrada en la figura 1 (SEC ID nº 1) o una secuencia de nucleótidos funcionalmente equivalente o una porción de la misma, codificante de un intensificador de CYP3A4, o una secuencia que se hibrida con la secuencia de nucleótidos de la figura 1 (SEC ID nº 1), o una secuencia que muestra una homología de por lo menos 60% con la secuencia de nucleótidos de la figura 1 (SEC ID nº 1). Más preferentemente, la molécula de ácidos nucleicos presenta una homología de por lo menos 80% con la secuencia de nucleótidos de la figura 1 (SEC ID nº 1) y más preferentemente la molécula de ácidos nucleicos presenta una homología de por lo menos 90% con dicha secuencia.

60 La presente memoria proporciona una molécula aislada de ácidos nucleicos que incluye elementos de respuesta de receptor nuclear de la región 5'-flanqueante de CYP3A4. Los elementos de respuesta son: XREM-DR3-1 GAA TGAAGTTGC TGACCC TCT (SEC ID nº 2); XREM-ER6 CCT TGAAAT CATGTC GGTTC AAGC (SEC ID nº 3); XREM-DR6 AGG TGAATC ACAAGC TGAAGT TCT (SEC ID nº 4) y XREM-DR3-2 ATA TATTGT TAT TGAAGT ATC (SEC ID nº 5).

Debido a que los presentes inventores han identificado varios elementos de respuesta específicos en el intensificador de CYP3A4, se apreciará que la secuencia SEC ID nº 1 puede utilizarse para identificar otros elementos de respuesta.

Debido a que la secuencia completa del intensificador no resulta necesaria para la utilización posterior, se encuentra comprendido dentro del alcance de la presente invención la utilización de elementos de respuesta del intensificador con secuencias intermedias o conectoras procedentes de otras fuentes.

- 5 Preferentemente, la molécula de ácidos nucleicos aislada presenta una secuencia de nucleótidos sustancialmente igual a la mostrada en la figura 1 (SEC ID nº 1).

En una forma preferente, el CYP3A4 es CYP3A4 humano. Sin embargo, se apreciará que la presente invención también se refiere a otros enzimas de la subfamilia de CYP3A humana y a enzimas de la subfamilia CYP3A de animales no humanos.

La inducción de CYP3A4 preferentemente se debe a uno o más inductores xenobióticos.

15 La presente memoria también proporciona polinucleótidos que se hibridan con la secuencia mostrada en la figura 1 (SEC ID nº 1). Preferentemente, el polinucleótido se hibrida con la secuencia indicada en la figura 1 (SEC ID nº 1) bajo condiciones de alta astringencia. Tal como se utiliza en la presente memoria, las condiciones astringentes son aquéllas que: (a) utilizan una fuerza iónica reducida y una temperatura elevada para el lavado, por ejemplo NaCl 0,015 M/citrato sódico 0,0015 M/NaDodSO₄ al 0,1% a 50°C, (b) utilizan durante la hibridación un agente desnaturizante, tal como formamida, por ejemplo formamida al 50% (v/v) con albúmina de suero bovino al 0,1%, Ficoll al 0,1%, polivinilpirrolidona al 0,1%, tampón de fosfato sódico 50 mM a pH 6,5 con NaCl 750 mM, citrato sódico 75 mM a 20 42°C, o (c) utilizan formamida al 50%, 5xSSC (NaCl 0,75 M, citrato sódico 0,075 M), fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), pirofosfato sódico al 0,1%, 5x solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonicado (50 g/ml), SDS al 0,1% y dextrán sulfato al 10% a 4 2°C en 0,2xSSC y SDS al 0,1%.

25 El polinucleótido capaz de hibridarse con la secuencia de nucleótidos de la figura 1 (SEC ID nº 1) puede presentar una longitud inferior a 5.000 nucleótidos, sin embargo, puede presentar una longitud inferior a 1.000, o incluso inferior a 500 nucleótidos. Preferentemente, los polinucleótidos hibridantes presentan una longitud de por lo menos 10, más preferentemente de por lo menos 18 nucleótidos.

30 En una realización, la presente invención proporciona un constructo genético adecuado para la utilización en la medición del grado de inducción de un gen informador, incluyendo el constructo una molécula de ácidos nucleicos según el primer aspecto de la presente invención (según las reivindicaciones) operablemente ligada a una molécula de ácidos nucleicos codificante de una molécula de informador.

35 Preferentemente, la molécula de ácidos nucleicos codificante de la molécula de informador codifica un enzima. La molécula de ácidos nucleicos codificante del informador puede codificar el enzima CYP3A4 o un enzima funcionalmente equivalente. Entre los ejemplos de moléculas informadoras adecuadas se incluyen la luciferasa de luciérnaga, la beta-galactosidasa, la cloranfenicol acetiltransferasa, la fosfatasa alcalina y la proteína fluorescente verde. Alternativamente, el ácido nucleico puede codificar un ARN mensajero (ARNm) que puede detectarse mediante técnicas 40 estándares, tales como la transferencia northern o los ensayos de protección frente a ribonucleasa.

Sin embargo, se apreciará que la molécula de ácidos nucleicos codificante de la molécula de informador puede ser cualquier molécula de ácidos nucleicos o gen que, al expresarse, presente una actividad detectable. La molécula de ácidos nucleicos codificante de la molécula de informador se encuentra necesariamente asociada al sistema del citocromo P450, aunque el inductor de transcripción (XREM) utilizado se deriva de dicho sistema génico. También se 45 apreciará que la molécula de ácidos nucleicos codificante del gen informador puede incluir más de una molécula de informador.

La presente memoria describe un sistema de ensayo que incluye el constructo de la invención, de manera que al 50 exponer el sistema a un inductor xenobiótico, se incrementa la expresión de la molécula de ácidos nucleicos codificante de la molécula de informador.

El sistema de ensayo incluye dentro de su alcance células que contienen el constructo (XREM) y sistemas libres de células capaces de proporcionar soporte a la función del constructo (XREM). Dichos sistemas libres de células típicamente contienen extractos celulares, tales como extractos nucleares, aunque no en todos los casos. El sistema 55 de ensayo también incluye sistemas experimentales que determinan la unión de compuestos al constructo (XREM). Entre ellos se incluyen las huellas de ADNasa I y los ensayos de retardo en gel. Estos sistemas de ensayo pueden utilizarse para detectar la activación del constructo (XREM), pero no resultan tan convenientes para el cribado en masa de compuestos como los constructos de gen informador. Preferentemente, el incremento de la expresión resulta en un incremento de la actividad de producto del gen informador.

La célula puede ser cualquier célula adecuada, incluyendo células bacterianas, vegetales o animales. El constructo puede existir en forma de una entidad genética separada en la célula o puede incorporarse en el genoma de la célula. Además, la célula puede formar parte de un animal transgénico.

65 En una realización, la presente invención proporciona un método (según se define en las reivindicaciones) para cribar un compuesto para la inducción xenobiótica de la expresión de CYP3A4 en una célula, incluyendo el método

exponer un sistema de ensayo de la presente invención al compuesto y medir la inducción o el potencial de expresión de la molécula de ácidos nucleicos codificante de la molécula de informador.

El método según la presente invención resulta particularmente adecuado para cribar nuevos fármacos terapéuticos. Aunque pueden encontrarse disponibles muchos fármacos potenciales en la etapa de desarrollo, en el caso de que un fármaco induzca la expresión de CYP3A4 *in vivo*, su adecuación como agente terapéutico eficaz se ve reducida. Durante la utilización, la vida media del fármaco será más corta debido a que resulta metabolizado por el enzima CYP3A4 inducido en el hígado del paciente. Otro problema que puede surgir es que el fármaco cause la aceleración del metabolismo o la eliminación de otros fármacos proporcionados al paciente. Con frecuencia se requieren “cócteles” de fármacos o combinaciones de fármacos para tratar muchas enfermedades. En el caso de que uno de los fármacos administrados presente la tendencia a incrementar la eliminación de uno o más de los demás fármacos utilizados en el tratamiento de una enfermedad particular, esto resultará altamente no deseable y podría resultar en una reducción de la eficacia del tratamiento.

Se apreciará que, en el caso de que un compuesto o nuevo fármaco no consiga inducir la expresión del gen informador al someterlo a ensayo mediante el método según la presente invención, este hecho es una indicación de que el compuesto o nuevo fármaco podría no ser un inductor xenobiótico y, por lo tanto, un candidato adecuado para el desarrollo posterior. Un procedimiento de cribado resultaría beneficioso en el desarrollo de fármacos terapéuticos, debido a que los candidatos no adecuados pueden descartarse en una etapa temprana del desarrollo. Además, también pueden desarrollarse compuestos químicos alternativos o relacionados basados en un resultado negativo del compuesto en el cribado de ensayo.

La memoria describe exponer un animal transgénico y medir en el animal la inducción del gen informador tras la exposición al compuesto químico o fármaco.

La presente memoria proporcionar el XREM como herramienta de análisis genético. A este respecto, se introducen mutaciones que responden a variantes alélicas en seres humanos y se observan sus consecuencias funcionales. Además, debido a que XREM presenta una función definida de regulación transcripcional, puede utilizarse para la determinación de la variación alélica.

La utilización puede implicar la determinación de la variación alélica dentro del XREM (relevante para la expresión constitutiva), y la utilización de la mutación dirigida a sitio del XREM para determinar el impacto de la variación alélica.

En la totalidad de la presente memoria, a menos que el contexto indique lo contrario, el término “comprenden”, o variaciones tales como “comprende” o “comprendiendo”, se entenderá que implican la inclusión del elemento, número entero o etapa, o de los grupos de elementos, números enteros o etapas, que se indican, aunque sin sugerir la exclusión de cualquier otro elemento, número entero o etapa, o grupos de elementos, números enteros o etapas.

Con el fin de que la presente invención se entienda más claramente, se describen formas preferentes mediante la referencia a los ejemplos y dibujos siguientes.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra una secuencia de la región XREM del gen CYP3A4. La numeración de las bases es relativa y no indica la localización dentro de la estructura del gen CYP3A4.

La figura 2 muestra un ejemplo de una serie de constructos de delección de la región 5'-flanqueante del gen CYP3A4 utilizados para definir los elementos sensibles a xenobióticos. El factor de inducción de la expresión del gen informador de la luciferasa se refiere al tratamiento con un potente inductor de CYP3A4 (rifampicina 5 μ M) en comparación con vehículo solo (dimetilsulfóxido al 0,1%). Dicho factor se normalizó respecto a la actividad de un vector informador básico pGL3 “vacío”. Todos los constructos se transfectaron temporalmente en células HepG2.

La figura 3 muestra el efecto de la cotransfección de un vector de expresión hPXR (pSG-hPXR) sobre células HepG2 que contienen un constructo informador CYP3A4 XREM en presencia o en ausencia de un potente inductor de CYP3A4 (rifampicina 5 μ M). La inserción muestra una vista magnificada de los efectos sobre las células de control.

La figura 4 muestra el efecto de diversos fármacos inductores sobre células HepG2 que contenían un constructo informador CYP3A4 XREM y un vector de expresión hPXR en comparación con vehículo (dimetilsulfóxido) al 0,1% solo. Leyenda: 1, DMSO; 2, rifampicina; 3, RU-486; 4, clotrimazol; 5, fenobarbital; 6, metirapona; 7, pregnenolona 16 α -carbonitrilo.

La figura 5 muestra el efecto de las delecciones y de la mutagénesis dirigida un sitio de elementos de respuesta de receptor nuclear putativo sobre la inducción transcripcional de la región 5'-flanqueante de CYP3A4 por la rifampicina 5 μ M. Las partes en negro corresponden a elementos mutados. La numeración es respecto al sitio de inicio de transcripción.

La figura 6 muestra un constructo optimizado de región 5'-flanqueante de CYP3A4 acoplado a un gen informador de la luciferasa (Luc) para determinar la capacidad de los xenobióticos de inducir la activación transcripcional del gen CYP3A4. La numeración es respecto al sitio de inicio de transcripción.

5 Modos de poner en práctica la invención

Definiciones

Biología molecular general

10 A menos que se indique lo contrario, las técnicas de ADN recombinante utilizadas en la presente invención son procedimientos estándares bien conocidos para el experto en la materia. Dichas técnicas se describen y se explican en la literatura en fuentes tales como: J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons, 1984; J. Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989; T.A. Brown (editor), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, volúmenes 1 y 2, IRL Press, 1991; D.M. Glover y B.D. Hames (editores), DNA Cloning: A Practical Approach, volúmenes 1 a 14, IRL Press, 1995 y 1996; y F.M. Ausubel *et al.* (editores), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates y Wiley-Interscience (1988, incluyendo todas las actualizaciones hasta la actualidad).

20 *Mutantes, variantes y homología-ácidos nucleicos*

Los polinucleótidos mutantes presentan una o más mutaciones que son delecciones, inserciones o sustituciones de residuos nucleótidos. Los mutantes pueden ser naturales (es decir, aislados a partir de una fuente natural) o sintéticos (por ejemplo mediante la realización de mutagénesis dirigida a un sitio en el ADN). De esta manera, resulta evidente 25 que los polinucleótidos de la invención pueden ser naturales o recombinantes (es decir, preparados utilizando técnicas de ADN recombinante).

Una variante alélica es una variante que es de origen natural dentro de un organismo individual.

30 Las secuencias de nucleótidos son homólogas en el caso de que se encuentren relacionadas a partir de la divergencia de un ancestro común. En consecuencia, en una especie un homólogo del polinucleótido será un polinucleótido equivalente al que se encuentra naturalmente en otra especie. Dentro de cualquier especie dada un homólogo puede existir como numerosas variantes alélicas, y éstas se consideran homólogos del polinucleótido. Pueden obtenerse variantes alélicas y homólogos específicos mediante las técnicas estándares siguientes conocidos para el experto en la materia. 35 Entre los homólogos específicos preferentes se incluyen aquellos obtenidos de representantes del mismo filum, más preferentemente de la misma clase taxonómica y todavía más preferentemente del mismo orden taxonómico.

Un polinucleótido es idéntico por lo menos al 70%, según se determina mediante métodos bien conocidos para el experto en la materia (por ejemplo el método descrito por Smite, T.F. y Waterman, M.S., Ad. Appl. Math. 2:482-489, 1981; o por Needleman, S.B. y Wunsch, C.D., J. Mol. Biol. 48:443-453, 1970), al de la presente invención se describe en la presente invención, al igual que las proteínas con una identidad de por lo menos 80% o 90%, y más preferentemente de por lo menos 95%, respecto del polinucleótido descrito en la presente invención. Lo anterior se refiere generalmente a una región de por lo menos 60, preferentemente de por lo menos 90, residuos nucleótidos contiguos.

45 *Sustancialmente purificado*

Mediante la expresión "sustancialmente purificado" los presentes inventores se refieren a un polinucleótido que ha sido separado de lípidos, ácidos nucleicos, otros polipéptidos o polinucleótidos y otras moléculas contaminantes.

50 *Fragmento activo*

Mediante la expresión "fragmento activo" los presentes inventores se refieren a un fragmento de una secuencia mostrada en la figura 1 que codifica un intensificador transcripcional del citocromo P450 (P450) denominado CYP3A4.

55 **Antecedentes**

Citocromo P450 3A4 humano (CYP3A4)

60 CYP3A4 es un gen importante en la farmacología clínica del ser humano. Además de su papel crucial en el metabolismo de los fármacos terapéuticos y de las hormonas esteroideas endógenas, algunos estudios recientes han asociado un polimorfismo no codificante en una región reguladora putativa de este gen, con el cáncer de próstata y el desarrollo de leucemia secundaria a quimioterapia del cáncer. Una comprensión de la regulación génica de CYP3A4 resultará importante para el desarrollo de fármacos terapéuticos. Además, el gen CYP3A4 representa una nueva diana 65 para la manipulación farmacológica y una herramienta para tanto el análisis farmacogenético como posiblemente la predicción de enfermedades. Sin embargo, una comprensión completa de la regulación y genética de CYP3A4 resulta necesaria para alcanzar dichos objetivos. La presente invención se refiere a un módulo regulador dentro de la región 5'-flanqueante del gen CYP3A4 que es responsable de su inducción xenobiótica y de la expresión constitutiva.

Citocromos hepáticos P450 humanos

Los P450s hepáticos humanos son hemoproteínas unidas a membrana activas en el metabolismo de un amplio abanico de sustratos lipofílicos. Las proteínas P450 resultan de considerable relevancia para la medicina, no sólo debido a su papel central en el metabolismo de fármacos y de otros xenobióticos, sino también debido a sus muchos sustratos lipofílicos “naturales” o “endógenos”. Entre ellos se incluyen las hormonas esteroideas, ácidos grasos (especialmente leucotrienos), colesterol y sales biliares. Se considera probable que el sistema P450 evolucionó debido a su papel crucial en el metabolismo del colesterol y de los esteroides. Un pequeño subconjunto de P450s hepáticas humanas expresadas constitutivamente, incluyendo CYP3A4, resulta de particular interés debido a que cuantitativamente son las formas más importantes y catalizan un abanico de reacciones biológicamente importantes.

Papel fisiológico y variabilidad de CYP3A4

CYP3A4, el citocromo P450 predominante en el hígado humano, comprende hasta 60% de la cantidad total de proteína citocromo P450 hepático. CYP3A4 se encuentra implicado en el metabolismo de un extenso abanico de fármacos y esteroides endógenos. Se ha estimado que más de 60% de todos los fármacos terapéuticos son metabolizados total o parcialmente por dicho enzima. Los cambios del nivel de expresión de CYP3A4 pueden presentar un impacto drástico sobre el metabolismo de los fármacos terapéuticos y causar de esta manera varias interacciones importantes entre fármacos. Además, el nivel variable de expresión constitutiva de dicho enzima presenta una contribución importante a la variabilidad interindividual del metabolismo oxidativo de los fármacos. Además, CYP3A4 es la ruta principal del metabolismo oxidativo de las hormonas esteroideas, catalizando la 6 β -hidroxilación de varios esteroides endógenos, tales como cortisol, androstenediona y testosterona, así como la 2-hidroxilación y la 4-hidroxilación del estradiol para formar estrógenos catacol. En el ser humano se encuentran dos otros citocromos P450 de la subfamilia CYP3A. CYP3A7 se encuentra principalmente en el hígado fetal, mientras que CYP3A5 se encuentra principalmente en el hígado de adultos, así como en los pulmones y en los riñones.

Regulación de la expresión génica de CYP3A4

CYP3A4 se encuentra sometido a múltiples niveles de regulación transcripcional. Entre ellos se incluyen la inducción xenobiótica (por ejemplo por algunos fármacos terapéuticos), la regulación específica de tejido, así como variabilidad sustancial de la expresión constitutiva (hasta de 10 veces entre individuos no expuestos a inductores o inhibidores conocidos).

Inducción xenobiótica de los genes CYP3A

Los genes CYP3A en varias especies de mamífero, incluyendo el ser humano, son transcripcionalmente inducibles por varios fármacos terapéuticos estructuralmente diferentes. Basándose en la premisa de que la inducción xenobiótica de CYP3A4 se encuentra mediada por un elemento de respuesta en la región 5'-flanqueante de este gen, los presentes inventores han clonado 22 kilobases (kb) del gen CYP3A4 en el lado 5' del sitio de inicio de transcripción. Lo anterior se utilizó para generar una serie de delección de constructos que cubrían 13 kb de la región 5'-flanqueante que se encontraban ligados a un gen informador de luciferasa para el análisis de la actividad transcripcional. Estos constructos se utilizaron para transfectar temporalmente una línea celular de hepatoblastoma humano (HepG2), así como cultivos primarios de hepatocitos de rata y de conejo. Mediante la comparación de las células transfectadas tratadas con agentes inductores, tales como rifampicina, con controles no tratados, los presentes inventores determinaron que el elemento de respuesta [denominado en lo sucesivo módulo intensificador sensible a xenobióticos (XREM)] se encontraba aproximadamente localizado entre -7,2 kb y -7,8 kb en el lado 5' del sitio de inicio de transcripción (figura 2). Los presentes estudios demuestran que XREM es un elemento complejo que abarca varios cientos de pares de bases (figura 1, SEC ID n° 1). Las huellas de ADNasa I muestran además que dicha región es rica en interacciones de ADN-proteína y aparentemente es capaz de unirse a varios factores de transcripción, de entre los que el recientemente descrito receptor humano de pregnano X (hPXR) (el receptor de pregnenano X es idéntico al receptor de pregnano activado (PAR) y el receptor de esteroide X (SXR)) [1-3] es el más importante para la regulación inducida por xenobióticos de CYP3A4.

Los presentes inventores han demostrado que hPXR forma el enlace vital entre el inductor xenobiótico (por ejemplo rifampicina) y elementos situados dentro de XREM. En el ser humano, el tratamiento de rifampicina típicamente induce la expresión del gen CYP3A4 incrementándola 50 veces o más. En el caso de que un constructo informador adecuado que contenga la secuencia de XREM se transfecte en células HepG2, el tratamiento de rifampicina resulta en una inducción de 3 a 5 veces de la expresión del gen informador. Sin embargo, los presentes inventores han demostrado que la cotransfección del constructo de gen informador que contiene XREM con un vector de expresión hPXR restaura totalmente la inducción provocada por la rifampicina (figura 3). Los presentes inventores también han demostrado que otros fármacos, tales como fenobarbitona y clotrimazol, también actúan sobre XREM a través del hPXR (figura 4), demostrando que lo anterior es un mecanismo general para la inducción xenobiótica del gen CYP3A4.

El hPXR es un receptor nuclear huérfano perteneciente a la superfamilia génica de receptores nucleares [4]. Algunos estudios de otros laboratorios sugieren que se une a ADN en forma de heterodímero con el receptor de retinoide X (RXR) [1-3]. Los presentes inventores han identificado varios elementos de respuesta putativos de receptor nuclear dentro de XREM dispuestos en forma de repeticiones directas con un espaciador de 3 bases (DR3), de repeticiones directas con un espaciador de 6 bases (DR6) o de repeticiones revertidas con un espaciador de 6 bases (ER6) (Tabla 1). Con el fin de evaluar la afinidad de dichos elementos de respuesta putativos para los heterodímeros hPXR-RXR, se lle-

varon a cabo ensayos de desplazamiento de electromovilidad (EMSA) utilizando hPXR y RXR transcritos/traducidos *in vitro*. Estos ensayos demostraron que XREM-DR3-1 y Prox-ER6 se unen eficientemente a heterodímeros hPXR-RXR, resultando en un desplazamiento en el gel, aunque no resultó evidente ningún desplazamiento con XREM-DR6 ni XREM-DR3-2. A pesar de este resultado, los presentes inventores han demostrado mediante experimentos de mutagénesis dirigida a sitio que las dos últimas respuestas resultan funcionalmente importantes (figura 5). El XREM-ER6 no se unió a heterodímeros hPXR-RXR, aunque con menor afinidad que XREM-DR3-1 o Prox-ER6.

TABLA 1

Secuencias de elementos de respuesta putativos de receptor nuclear dentro del XREM de CYP3A4 en comparación con un elemento de respuesta putativo en la región 5'-flanqueante proximal de CYP3A4 (Prox-ER6). Se muestra con fines comparativos un elemento de la región 5'-flanqueante proximal del gen CYP3A23 de rata (CYP3A23 DR3) que interacciona con el receptor de pregnano X.

Denominación	Secuencia	(motivos nucleares en negrita)				SEC ID	nº
XREM-DR3-1	gaa	TGAACT	tgc	TGACCC	tct	2	
XREM-ER6	cct	TGAAAT	catgtc	GGTTCA	agc	3	
XREM-DR6	agg	TGAATC	acaagc	TGAACT	tct	4	
XREM-DR3-2	ata	TATTGT	tat	TGAACT	atc	5	
Prox-ER6	ata	TGAACT	caaagg	AGGTCA	gtg	6	
CYP3A23 DR3	aga	TGAACT	tca	TGAACT	gtc	7	

Al delecionar XREM de los constructos de gen informador que contenían la región 5'-flanqueante de CYP3A4, no se observó actividad de inducción xenobiótica, demostrando que la región XREM resulta esencial para el proceso de la inducción xenobiótica. Además, al unir XREM a un promotor de gen heterólogo, tal como un promotor mínimo de timidina quinasa del virus herpes simplex, se observó inducción xenobiótica, demostrando que XREM no depende de manera absoluta de otros elementos situados dentro del gen CYP3A4. Sin embargo, para una sensibilidad xenobiótica máxima, los presentes inventores han determinado que resulta necesario un elemento ER6 en el interior de la región promotora proximal del gen CYP3A4 (Prox-ER6, Tabla 1). Resulta importante apreciar que el elemento Prox-ER6 no presenta actividad de inducción xenobiótica en ausencia del XREM.

A partir de los resultados anteriormente proporcionados, se determinó una secuencia optimizada de ADN para el análisis de la inducción xenobiótica del gen CYP3A4. Este gen incluye la región XREM, así como las bases -356 a +53 del promotor proximal de CYP3A4 y se denomina constructo nº 5 (figura 6). Típicamente, esta secuencia de ADN se encuentra unida a un gen informador y se estudió en células, o en un sistema libre de células, adecuados. Los presentes inventores determinaron que la línea celular HepG2 cultivada en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con suero fetal bovino al 10%, transfectada utilizando un reactivo comercialmente disponible (FuGene-6, Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania) funciona bien.

Expresión específica de tejido y constitutiva de genes de la subfamilia de CYP3A.

Los mecanismos que determinan la expresión restringida a tejidos y constitutiva de CYP3A4 probablemente son similares, si no iguales. La comprensión de estos aspectos de la regulación génica resultan críticos para una explicación definitiva de por qué los seres humanos muestran una variabilidad interindividual tan marcada en el metabolismo de fármacos mediado por CYP3A4.

Las P450s de la subfamilia CYP3A humana se expresan predominantemente en el hígado. Sin embargo, se produce una expresión restringida a tejido extrahepático significativa. CYP3A4 se expresa en cantidades significativas en el intestino delgado, colon y páncreas, así como en el tejido mamario. Los niveles relativos de expresión constitutiva en hígado e intestino muestran poca concordancia, sugiriendo que en cada tejido actúan mecanismos diferentes. Aunque CYP3A4 se expresa constitutivamente en todos los hígados humanos adultos, existe una variabilidad de factor 10 del ARNm de CYP3A4 entre muestras de hígado. La variabilidad de la expresión intestinal es todavía más marcada, informándose de una variación de factor 30.

En el caso de la expresión hepática de CYP3A4 utilizando constructos informadores que contienen la región 5'-flanqueante del gen CYP3A4, los presentes inventores han demostrado que preferentemente resultan necesarios factores específicos del hígado para proporcionar soporte a la transcripción de CYP3A4. Al comparar una línea celular derivada de hígado (HepG2) con una línea no derivada de hígado (NIH-3T3) para su capacidad de proporcionar soporte a la activación transcripcional, en presencia o en ausencia de hPXR, la línea celular no derivada de hígado fue marcadamente inferior. Lo anterior sugiere claramente un papel opcional de los factores de transcripción específicos del hígado. Sin embargo, es conocido de los presentes inventores que las células HepG2, aunque son una línea celular derivada de hígado humano, no expresan constitutivamente CYP3A4 en cantidades significativas. Los presentes

inventores han encontrado que un receptor nuclear huérfano humano, denominado receptor β constitutivo humano de androstano (hCAR- β) [5], al cotransfectarse en células HepG2 con un constructo informador de región 5'-flanqueante de CYP3A4, provoca un incremento de 6 a 10 veces en la actividad de informador. hCAR- β no requiere ligando para transactivar las secuencias de ADN reguladoras y la expresión de las mismas se encuentra restringida prácticamente por completo al hígado. Los experimentos realizados utilizando constructos de delección muestran que la respuesta del gen CYP3A4 frente al receptor hCAR- β depende de XREM. Además, tal como se ha observado para la inducción xenobiótica con hPXR, se ha observado expresión constitutiva mediada por hCAR- β tras la unión de XREM al promotor mínimo de timidina quinasa, aunque a un nivel inferior al observado con el promotor nativo. Los experimentos preliminares sugieren que existe cooperatividad entre XREM y el elemento Prox-ER6 en la expresión constitutiva mediada por hCAR- β . Sin embargo, el promotor nativo por sí solo no muestra ninguna respuesta frente a la cotransfección con hCAR- β .

Resultados

El citocromo P450 3A4 (CYP3A4), el P450 de expresión predominante en el hígado humano adulto, se encuentra sometido a la inducción transcripcional por una diversidad de compuestos xenobióticos no relacionados estructuralmente, incluyendo el antibiótico rifampicina. Los presentes inventores han transfectado una línea celular derivada de hígado humano (HepG2) con diversos constructos de CYP3A4-gen informador de luciferasa que contenían un conjunto anidado de delecciones 5' del promotor de CYP3A4. La transcripción inducible por rifampicina del gen informador únicamente se observó en el constructo más largo. El tratamiento de rifampicina de células transfectadas con el constructo -13000/+53-luciferasa resultó en un incremento de 3 a 5 veces en la actividad de gen informador. Este constructo resultó activado de una manera dependiente de la dosis por la rifampicina, con una inducción máxima a 5 μ M. Se preparó un conjunto adicional de clones por delección y la región sensible se localizaba en las bases -7800 a -7200, aproximadamente. Los mutantes por delección generados por reacción en cadena de la polimerasa sugieren que, la respuesta a la rifampicina se basa en la integridad de una región más grande que comprende varios cientos de bases, y no en un elemento corto de acción en cis. Dicha región, conjuntamente con un promotor mínimo de CYP3A4 (-362 a +53) fue capaz de proporcionar sensibilidad frente a la rifampicina al gen informar. La inducción era independiente de la orientación del fragmento -7800/-7200 y su posición relativa respecto al promotor proximal de CYP3A4. Los constructos de gen informar heterólogo, que contienen la región intensificadora distal de CYP3A4 ligada al promotor de timidina quinasa del gen del herpes simplex, también fueron capaces de inducir la expresión de luciferasa tras el tratamiento de rifampicina. El análisis de la secuencia de nucleótidos de dicha región reveló varios sitios putativos de unión de factor transcripcional. En resumen, los presentes inventores han identificado una región intensificadora en el gen CYP3A4 capaz de mediar en la activación transcripcional por parte de la rifampicina.

Mediante la utilización de una serie de constructos de delección de la región 5'-flanqueante del gen CYP3A4, los presentes inventores han descubierto una secuencia de ADN, situada aproximadamente a 7,5 kilobases en el lado 5' del sitio de inicio transcripcional del gen de P450 CYP3A4 humano, que es responsable de la inducción transcripcional del gen CYP3A4 por parte de inductores xenobióticos, incluyendo fármacos terapéuticos. Los presentes inventores han denominado a dicho elemento "módulo intensificador sensible a xenobióticos" (XREM). Este trabajo inicialmente se llevó a cabo con el potente inductor de CYP3A4 rifampicina, un antibiótico utilizado comúnmente para tratar la tuberculosis. Sin embargo, algunos estudios preliminares con otros fármacos sugieren que XREM podría ser capaz de responder a un amplio abanico de compuestos químicos. Los presentes inventores han utilizado la secuencia de ADN que contiene XREM procedente de CYP3A4 para construir modelos de cultivo celular que responden a inductores xenobióticos mediante el incremento de la transcripción del gen CYP3A4 de una manera análoga a la que ocurre en el ser humano.

Los presentes inventores cotransfectaron un constructo de una región 5'-flanqueante de CYP3A4, que contiene XREM y unida a un informador de luciferasa, en células HepG2 con o sin un constructo de expresión hPXR (pSG-hPXR). La adición de hPXR incrementó sustancialmente la tasa de transcripción del constructo informador, tanto constitutivamente (tratado con vehículo solo) y tras la adición de un inductor xenobiótico (rifampicina 5 μ M). La observación de que la adición de hPXR solo incrementa la tasa de transcripción del informador que contiene CYP3A4 XREM indica que hPXR es capaz de cierta transactivación en ausencia del ligando o que existe un ligando endógeno para hPXR dentro de las células HepG2.

Se ha demostrado que hPXR se une a elementos de respuesta a ADN de acción en cis (PXRE) en forma de heterodímero con el receptor de retinoide α (RXR). El PXRE aparentemente consiste generalmente de una repetición de la secuencia TGAAGT, en forma de repetición directa o revertida/invertida. Los presentes inventores han identificado varios elementos de respuesta putativos de receptor nuclear (PXREs) dentro de XREM mostrados en la Tabla 1.

Los presentes inventores han llevado a cabo experimentos de retardo de la movilidad en gel con sondas oligonucleótidas marcadas con 32 P para determinar si los heterodímeros hPXR-RXR son capaces de unirse a los PXREs putativos dentro de XREM.

Para examinar adicionalmente la contribución de los PXREs putativos dentro de la región XREM a la inducción transcripcional de CYP3A4 por la rifampicina, se creó una serie de constructos de informador de luciferasa que contenían delecciones y/o mutagénesis dirigida a un sitio de los PXREs (figura 5). La delección de la región que contenía PXRE XREM-DR3-1 (-7834 a -7610 pb) resultó en la eliminación prácticamente completa de la actividad transcrip-

cional. Esto no se debió únicamente a la pérdida de función de XREM-DR-3, debido a que la mutagénesis dirigida a un sitio de dicho PXRE resultó en una pérdida de actividad de sólo 47%. La mutación de XREM-DR6 también redujo la tasa de transcripción (hasta 52% de la del tipo salvaje) a pesar de la aparente incapacidad de dicho motivo para unirse al heterodímero hPXR-RXR en el experimento de retardo en gel. Una posibilidad es que dicho sitio se una a otros factores de transcripción o que sea un sitio de baja afinidad para hPXR-RXR.

Podrá apreciarse que el PXRE putativo en el interior de la región promotora proximal que consiste del motivo Prox-ER6 no presenta función propia. Sin embargo, la mutagénesis dirigida a un sitio de Prox-ER6 en un constructo que contiene el XREM completo reduce la tasa de transcripción (hasta 41% de la del tipo salvaje) (figura 5), sugiriendo la existencia de cooperatividad entre XREM y Prox-ER6.

XREM media en la inducción transcripcional del gen CYP3A4 producida por muchos xenobióticos, no sólo la rifampicina.

Muchos fármacos inducen la transcripción del gen CYP3A4. Debido a sus potentes propiedades de inducción, los presentes inventores utilizaron rifampicina para identificar y caracterizar el XREM. Para determinar si un constructo informador que contenía XREM era capaz de responder a otros xenobióticos, se trataron células HepG2 transfectadas con XREM con un abanico de fármacos (figura 4). Se encontró que RU-486 (mifaprostona) y clotrimazol inducían el constructo XREM de una manera análoga a la producida *in vivo*. Los presentes inventores también examinaron un amplio abanico de fármacos que es conocido que induce CYP3A4 *in vivo*, y encontraron que el modelo *in vitro* desarrollado refleja estrechamente la realidad *in vivo*.

Usos de la invención

La invención presenta varias áreas de aplicación, incluyendo, aunque sin limitarse a ellas, el desarrollo de fármacos terapéuticos. En algunas de dichas áreas de aplicación, se utilizan constructos de ADN que contienen XREM para determinar los efectos de compuestos sobre la transcripción del gen CYP3A. Entre estos constructos se incluyen genes informadores que permiten la medición cómoda de la actividad génica. Entre dichos genes informadores se incluyen cloranfenicol acetiltransferasa, luciferasa, fosfatasa alcalina y proteína fluorescente verde, aunque podría utilizarse cualquier producto génico detectable, incluyendo el ARN mensajero (ARNm). Dichos constructos génicos se introducen transitoria o permanentemente en células en cultivo adecuadas, o en forma de transgén en animales transgénicos. Pueden cotransfectarse constructos de ADN adicionales conjuntamente con constructos que contienen XREM para proporcionar condiciones adecuadas para responder a preguntas particulares respecto a la regulación del gen CYP3A. Entre dichos constructos cotransfectados se incluyen los plásmidos de expresión para hPXR y hCAR- β , que los presentes inventores han demostrado que interactúan con XREM. Los presentes estudios también han demostrado que existen muchas interacciones de proteína-ADN dentro de XREM, de manera que es probable que otros constructos cotransfectados demuestren ser útiles para determinadas situaciones.

Otro área de aplicación es la utilización de la secuencia de XREM para examinar el ADN genómico humano para la presencia de polimorfismos relevantes para la expresión del gen CYP3A4. Dichos polimorfismos pueden relacionarse con varias áreas de utilización, incluyendo la predicción de la capacidad metabolizadora de fármacos y asociaciones con enfermedades.

Utilización de células o modelos animales transgénicos para cribar sustancias químicas para la capacidad de inducir la formación del enzima de CYP3A4

La inducción de los enzimas de la subfamilia CYP3A por parte de fármacos terapéuticos se considera generalmente un efecto no deseable. Dicha inducción podría incrementar la eliminación del fármaco mismo o de fármacos coadministrados. Esto generalmente reduce la efectividad de los fármacos. La capacidad de cribar fármacos potenciales para la inducción de CYP3A durante la etapa temprana del desarrollo resulta útil en el aspecto de que dichos fármacos pueden descartarse en favor de aquellos que no presentan dicha actividad. La información obtenida de dicho cribado de fármaco también permite desarrollar relaciones de estructura-función, indicando las moléculas o partes de moléculas que presentan una tendencia a inducir CYP3A4. Este conocimiento permitiría la utilización del diseño racional de fármacos para sintetizar nuevos compuestos que presentan características más favorables. Este procedimiento puede aplicarse a fármacos existentes que inducen no deseablemente los CYP3As, tales como los listados en la Tabla 2.

TABLA 2

Lista no exclusiva de fármacos terapéuticos que es conocido que inducen la expresión del gen CYP3A4

5	Fármaco
	Carbamazapina
	Clotrimazol y otros antimicóticos imidazol
10	Lovastatina
	Fenitoína
	Fenobarbitona
	Rifampicina
15	Rifabutina
	RU-486

Además de los anteriormente indicados, existen usos terapéuticos potenciales para fármacos diseñados específicamente para inducir o inhibir la formación de enzima CYP3A como su acción primaria. Pueden utilizarse inductores de CYP3A4 para acelerar el metabolismo de toxinas xenobióticas o sustancias producidas endógenamente que son sustratos de CYP3A4. Los inhibidores de CYP3A4 podrían utilizarse para superar la inducción no deseable de CYP3A4 por parte de fármacos terapéuticos, tales como los listados en la Tabla 2. SE apreciará que existen muchos usos potenciales de los fármacos diseñados específicamente para modular la formación del enzima CYP3A, diferentes de los indicados en la presente memoria. La secuencia de XREM resulta útil para identificar dichos fármacos.

XREM como herramienta para el análisis farmacogenético/susceptibilidad a enfermedades.

Existen marcadas diferencias interindividuales en la capacidad de las personas para metabolizar los compuestos xenobióticos (tales como los fármacos terapéuticos) y los compuestos endógenos (tales como hormonas secretadas endógenamente). Por lo menos algunas de estas diferencias pueden relacionarse con polimorfismos en los genes codificantes de los enzimas o proteínas transportadoras que interaccionan con dichos xenobióticos o con compuestos producidos endógenamente.

Algunos miembros de la superfamilia génica de citocromos P450 se encuentran implicados en el metabolismo de un amplio abanico de sustratos lipofílicos. Los P450s de la subfamilia CYP3A (tales como CYP3A4) se encuentran particularmente implicados en el metabolismo de fármacos terapéuticos y de hormonas esteroideas producidas endógenamente. Se ha reconocido perfectamente que existen marcadas diferencias interindividuales en el metabolismo de los sustratos de CYP3A (de hasta 20 veces). Sin embargo, hasta al momento no se han encontrado polimorfismos dentro de la región codificante de la proteína CYP3A4 del gen CYP3A4 que expliquen dichas diferencias. Esto sugiere fuertemente que es la regulación de la expresión génica de CYP3A que explica dichas diferencias interindividuales.

Los presentes inventores han demostrado que la región XREM de CYP3A4 es un elemento regulador importante para el control transcripcional de la expresión de dicho gen. Se infiere que los polimorfismos dentro de XREM podrían afectar significativamente a la transcripción génica y a la expresión de la proteína CYP3A4, explicando de esta manera, por lo menos en parte, las diferencias interindividuales en el metabolismo mediado por CYP3A.

Rebbeck y colaboradores recientemente han descrito un polimorfismo en la región 5'-flanqueante proximal del gen CYP3A4 que se correlaciona con formas más severas de cáncer prostático [6] y una incidencia reducida de leucemia secundaria a quimioterapia del cáncer [7]. Se supone que dicho polimorfismo causó dichos cambios debido a efectos sobre la expresión de CYP3A4, aunque esto todavía no ha sido demostrado.

De esta manera, la utilización de la secuencia y función de XREM proporciona una herramienta potencialmente potente para la búsqueda de polimorfismos del gen CYP3A. El cribado para dichos polimorfismos resultaría de considerable utilidad para determinar la capacidad de un individuo para metabolizar fármacos (análisis farmacogenético) o para determinar la susceptibilidad a enfermedades (por ejemplo el cáncer de próstata). El método para llevar a cabo dicho cribado típicamente implica la amplificación de la región de ADN genómico de interés (en el presente caso, XREM) utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). A continuación, el producto de PCR puede examinarse para polimorfismos utilizando una de entre varias técnicas, tales como polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), la secuencia del ADN o de polimorfismos conformacionales monocatenarios (SSCP) de ADN.

Utilización de XREM como intensificador inducible para la expresión génica en el contexto más amplio de la biología molecular, la transgenética y la expresión génica dirigida.

El concepto de la utilización de una parte de un gen de citocromo P450 como interruptor genético se ha demostrado anteriormente utilizando el gen CYP1A1. Debido a que la región XREM del gen CYP3A4 es capaz de regular la transcripción en respuesta a xenobióticos así como de determinadas hormonas esteroideas, resulta potencialmente

útil como interruptor genético dentro del contexto más amplio de la biología molecular y la expresión génica dirigida. Un ejemplo es la activación de un transgén en el hígado de un animal mediante un mecanismo dependiente de PXR/XREM.

5 Referencias

1. **Lehmann JM, et al. (1998)** The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions *J Clin Invest* 102:1015-1023.
- 10 2. **Bertilsson G, et al. (1998)** Identification of a human nuclear receptor defines a new pathway for CYP3A induction. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:12208-12213.
3. **Blumberg B, et al. (1998)** SXR, a novel steroid and xenobiotic sensing receptor. *Genes & Dev* 12:3195-3205.
- 15 4. **Mangelsdorf DJ, et al. (1995)** The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83:835-839.
5. **Baes M, et al. (1994)** A new orphan member of the nuclear hormone receptor superfamily that interacts with a subset of retinoic acid response elements. *Mol Cell Biol* 14:1544-52.
- 20 6. **Rebeck TR, et al. (1998)** Modification of the clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. *J Natl Cancer Inst* 90:1225-1229.
7. **Félix CA, et al. (1998)** Association of CYP3A4 genotype with treatment-related leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:13176-81.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Constructo genético, que comprende:

(i) una secuencia de nucleótidos que forma un intensificador transcripcional de la producción o expresión del citocromo P450 CYP3A4, y

(ii) un gen codificante de una molécula de informador,

en el que la secuencia de nucleótidos incluye cada uno de los elementos de respuesta nuclear siguientes de la región 5'-flanqueante de CYP3A4: SEC ID nº 2, SEC ID nº 3, SEC ID nº 4 y SEC ID nº 5.

2. Constructo genético según la reivindicación 1, en el que la secuencia de nucleótidos es SEC ID nº 1.

3. Constructo genético según la reivindicación 1 ó 2, que comprende además una secuencia de nucleótidos de secuencia SEC ID nº 6.

4. Constructo genético según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la molécula de ácidos nucleicos forma un intensificador transcripcional que resulta activado en respuesta a la rifampicina.

5. Constructo genético según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la molécula de informador es la luciferasa de luciérnaga, la beta-galactosidasa, la fosfatasa alcalina, la proteína fluorescente verde o la cloranfenicol acetiltransferasa.

6. Célula que comprende un constructo genético según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

7. Método para el cribado de un compuesto para la inducción xenobiótica de la expresión de CYP3A4 en una célula, que incluye exponer un constructo genético según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 a un compuesto y medir la inducción o el potencial de expresión de la molécula de ácidos nucleicos codificante de la molécula de informador.

ES 2 337 967 T3

```

TCTAGAGAGA TGGTTCATTC CTTTCATTTG ATTATCAAAG AAACATCATGT CCCAATTAAA    60

GGTCATAAAG CCCAGTTTGT AAACATGAGAT GATCTCAGCT GAATGAACCTT GCTGACCCTC    120

TGCTTTCCTC CAGCCTCTCG GTGCCCTTGA AATCATGTCG GTTCAAGCAG CCTCATGAGG    180

CATTACAAAG TTTAATTATT TCAGTGATTA TTAAACCTTG TCCTGTGTTG ACCCCAGGTG    240

AATCACAAGC TGAACCTCTG ACAAGAACAA GCTATCATAT TCTTTTCAAT TACAGAAAAA    300

AGTAAGTTAA TTGATAGGAT TTTTTTTGTT TAAAAAAAAT GTTACTAGTT TTTGAAAAGG    360

TAATATGTTG CACATGGTAA AACTAAGAA GGTATAAGAG CATAATGCTT TTATACTACT    420

AAGAATAATG TTTTCTCTAA GTTTTTTTTG GTAGATGCTT TCATCAGATT AAGAAAATTC    480

CCTGCTATTA GTTGTTGAAG GTTTTTTATAT CATAAATGAA AGTTGAATAT TATTATCATA    540

TATTATTAAT ATATTGTTAT TGAACATCA AAGCCTTTTC CTAAAACCAT TGAGATGATC    600

TTATAACCAT TCTCCTTTAA CCTGTTGACG AG                                     632

```

Figura 1

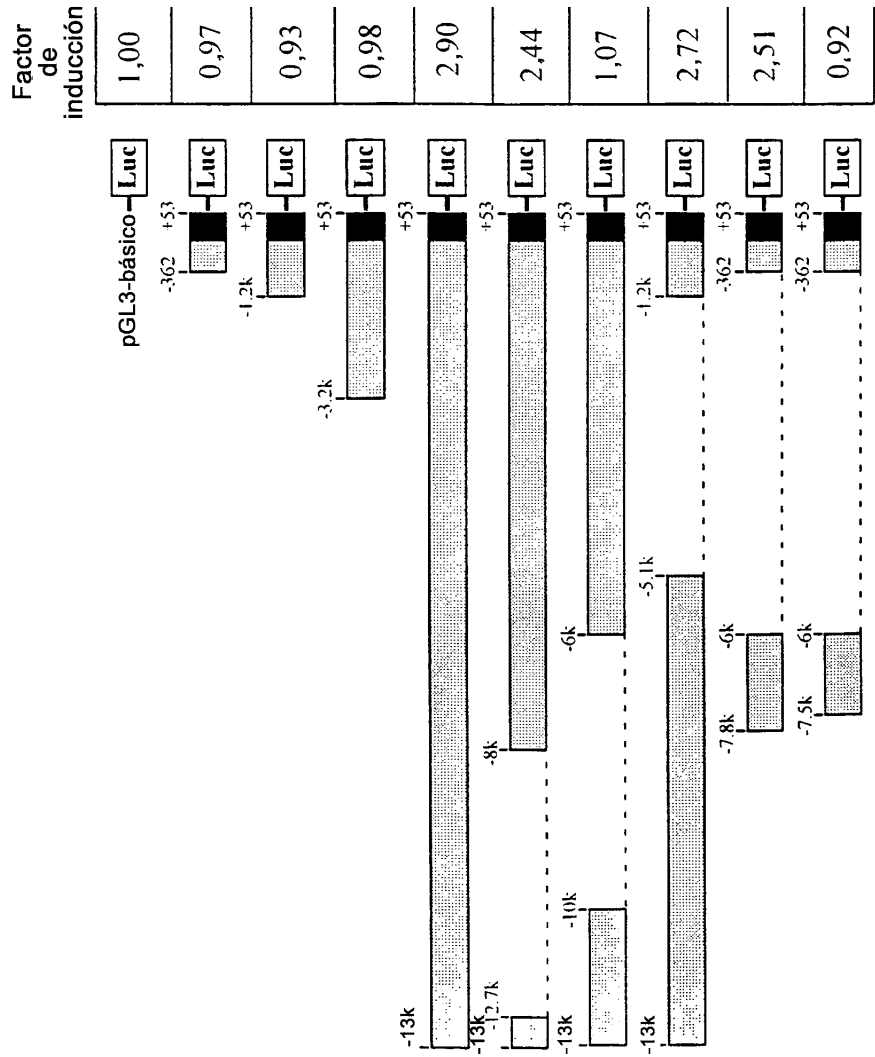


Figura 2

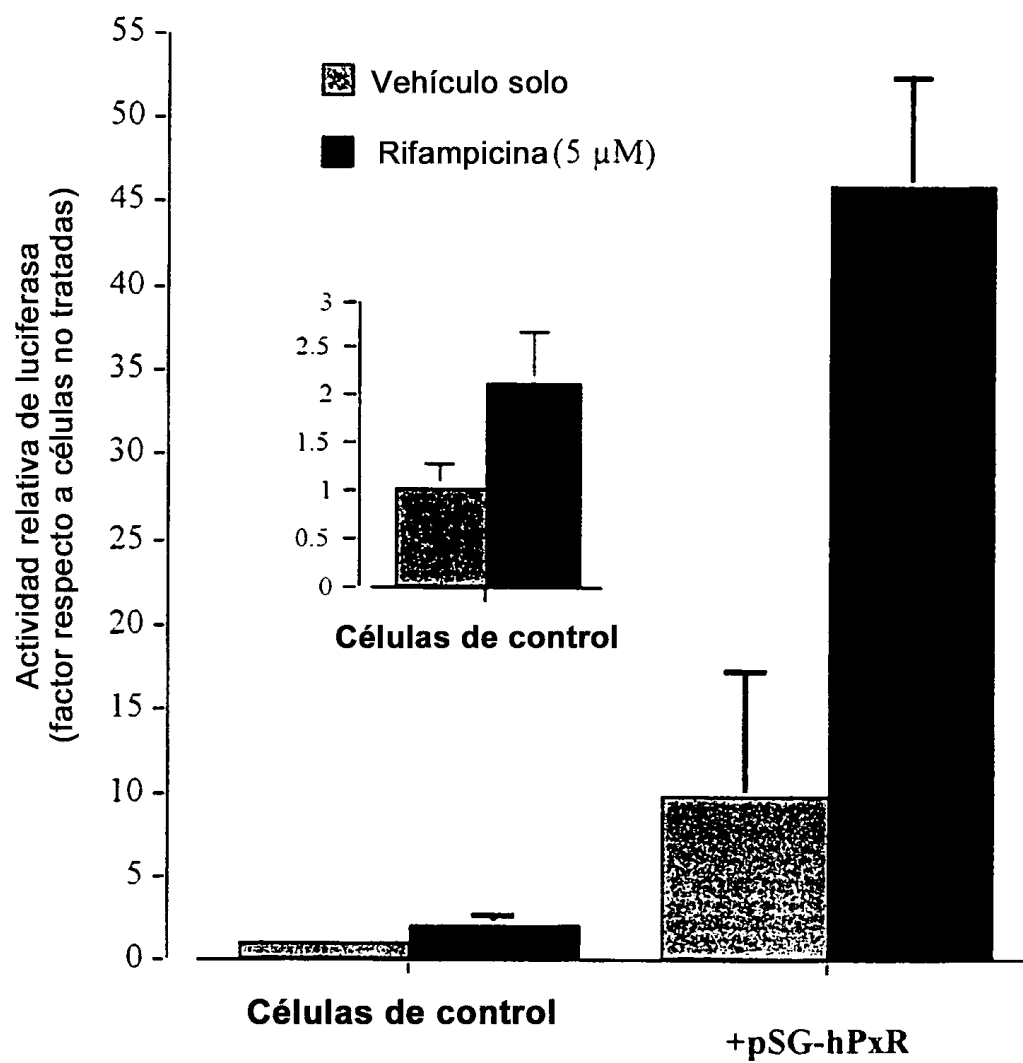


Figura 3

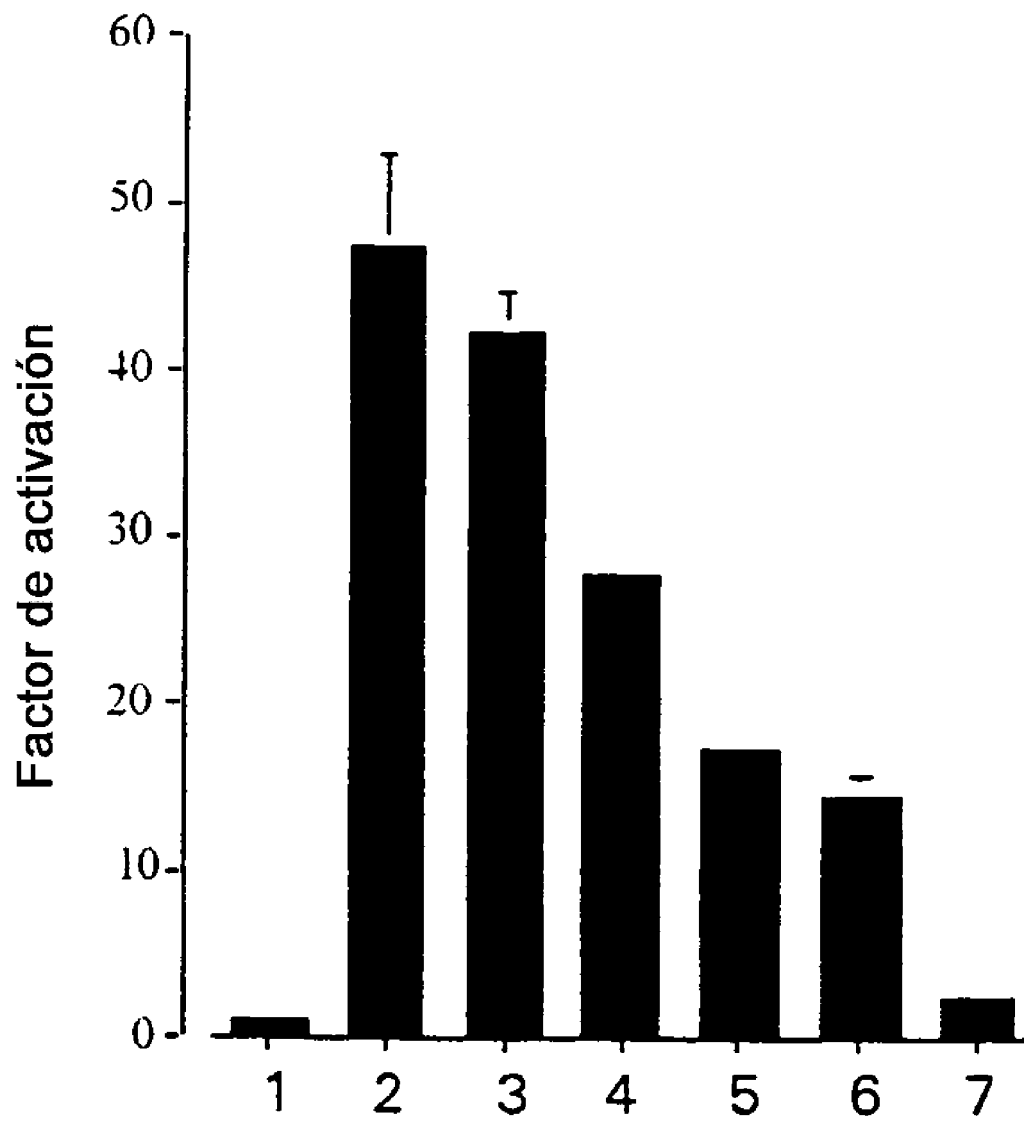


Figura 4

Factor de activación	Porcentaje del tipo salvaje
54 ± 4	=100
45 ± 2	84
8.8 ± 0.9	16
0.6 ± 0.02	NA
29 ± 5.5	53
28 ± 0.5	52
13 ± 0.7	23
22 ± 5	41
36 ± 2.5	68
1 ± 0.6	NA

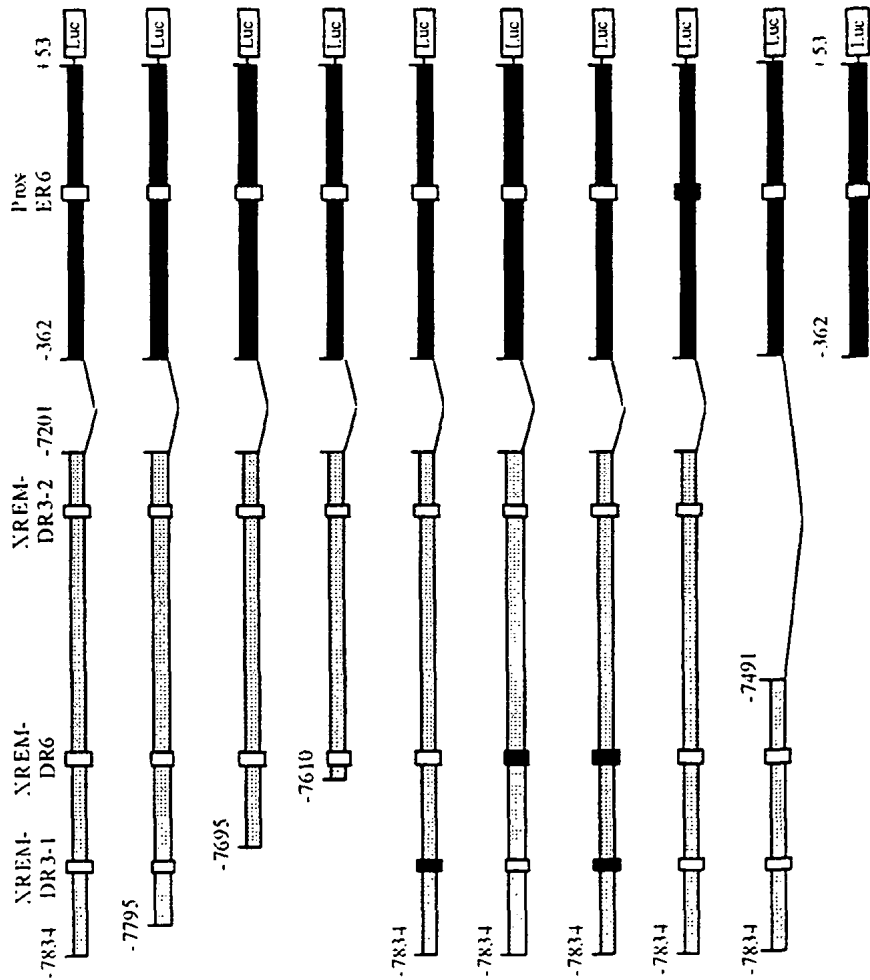


Figura 5

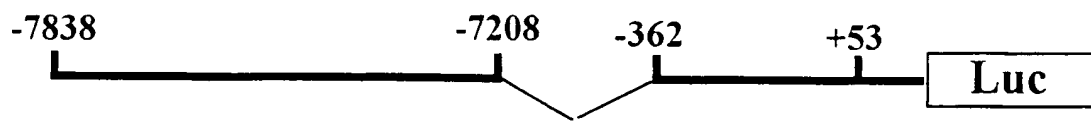


Figura 6

ES 2 337 967 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

(i) SOLICITANTE:

- (A) NOMBRE: University of Sydney
- (B) CALLE:
- (C) CIUDAD: Sydney
- (D) ESTADO: Nueva Gales del Sur
- (E) PAÍS: Australia
- (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): 2006

(ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Inducción xenobiótica de la expresión génica

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 7

(iv) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:

- (A) TIPO DE MEDIO: disquete
- (B) ORDENADOR: IBM PC compatible
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn release nº 1.0, versión nº 1.30 (EPO)

(2) INFORMACIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID nº 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 632 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 1

```
TCTAGAGAGA TGGTTCATTC CTTTCATTTG ATTATCAAAG AAATCATGT CCCAATTAAA 60
GGTCATAAAG CCCAGTTTGT AAATGAGAT GATCTCAGCT GAATGAACCT GCTGACCCCTC 120
TGCTTTCCTC CAGCCTCTCG GTGCCCTTGA AATCATGTCG GTTCAAGCAG CCTCATGAGG 180
CATTACAAAG TTTAATTATT TCAGTGATTA TTAAACCTTG TCCTGTGTTG ACCCCAGGTG 240
AATCACAAGC TGAACCTCTG ACAAGAACAA GCTATCATAT TCTTTTCAAT TACAGAAAAA 300
AGTAAGTTAA TTGATAGGAT TTTTGTGTT TAAAAAAAT GTTACTAGTT TTTGAAAAGG 360
TAATATGTTG CACATGGTAA AACTAAGAA GGTATAAGAG CATAATGCTT TTATACTACT 420
AAGAATAATG TTTTCTCTAA GTTTTGTGTT GTAGATGCTT TCATCAGATT AAGAAAATTC 480
CCTGCTATTA GTTGTGAAG GTTTTATAT CATAAATGAA AGTTGAATAT TATTATCATA 540
TATTATTAAT ATATTGTTAT TGAACATCA AAGCCTTTTC CTAAAACCAT TGAGATGATC 600
TTATAACCAT TCTCCTTTAA CCTGTGACG AG 632
```

(2) INFORMACIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID nº 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 21 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: única

ES 2 337 967 T3

	(D) TOPOLOGÍA: lineal	
	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)	
5	(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 2:	
	GAATGAACTT GCTGACCCTC T	21
10	(2) INFORMACIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID nº 3:	
	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	
	(A) LONGITUD: 24 pares de bases	
15	(B) TIPO: ácido nucleico	
	(C) CADENA: única	
	(D) TOPOLOGÍA: lineal	
20	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)	
	(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 3:	
	CCTTGAAATC ATGTCGGTTC AAGC	24
25	(2) INFORMACIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID nº 4:	
	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	
30	(A) LONGITUD: 24 pares de bases	
	(B) TIPO: ácido nucleico	
	(C) CADENA: única	
	(D) TOPOLOGÍA: lineal	
35	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)	
	(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 4:	
40	AGGTGAATCA CAAGCTGAAC TTCT	24
	(2) INFORMACIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID nº 5:	
45	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	
	(A) LONGITUD: 21 pares de bases	
	(B) TIPO: ácido nucleico	
	(C) CADENA: única	
50	(D) TOPOLOGÍA: lineal	
	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)	
	(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 5:	
55	ATATATTGTT ATTGAACTAT C	21
	(2) INFORMACIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID nº 6:	
60	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	
	(A) LONGITUD: 24 pares de bases	
	(B) TIPO: ácido nucleico	
65	(C) CADENA: única	
	(D) TOPOLOGÍA: lineal	

ES 2 337 967 T3

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 6:

5 ATATGAACTC AAAGGAGGTC AGTG

24

(2) INFORMACIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID nº 7:

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 21 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: única

15 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

20 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 7:

AGATGAACTT CATGAACTGT C

21

25 LISTADO DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

30 (i) SOLICITANTE:

(A) NOMBRE: University of Sydney

(B) CALLE:

35 (C) CIUDAD: Sydney

(D) ESTADO: Nueva Gales del Sur

(E) PAÍS: Australia

40 (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): 2006

(ii) TÍTULO DE LA INVENCION: Inducción xenobiótica de la expresión génica

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 7

45 (iv) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:

(A) TIPO DE MEDIO: disquete

(B) ORDENADOR: IBM PC compatible

(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS

50 (D) SOFTWARE: PatentIn Release nº 1.0, versión nº 1.30 (EPO)

(2) INFORMACIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID nº 1:

55 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 632 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

60 (C) CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

65 (iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 1:

ES 2 337 967 T3

TCTAGAGAGA TGGTTCATTC CTTTCATTTG ATTATCAAAG AAATCATGT CCCAATTAAA 60
 GGTCATAAAG CCCAGTTTGT AAATGAGAT GATCTCAGCT GAATGAACTT GCTGACCCTC 120
 5 TGCTTTCCTC CAGCCTCTCG GTGCCCTGA AATCATGTCG GTTCAAGCAG CCTCATGAGG 180
 CATTACAAAG TTTAATTATT TCAGTGATTA TTAAACCTTG TCCTGTGTTG ACCCCAGGTG 240
 AATCACAAGC TGAACCTCTG ACAAGAACAA GCTATCATAT TCTTTTCAAT TACAGAAAAA 300
 10 AGTAAGTTAA TTGATAGGAT TTTTTTTGTT TAAAAAAAT GTTACTAGTT TTGAAAAGG 360
 TAATATGTTG CACATGGTAA AACTAAGAA GGTATAAGAG CATAATGCTT TTATACTACT 420
 AAGAATAATG TTTTCTCTAA GTTTTTTTTG GTAGATGCTT TCATCAGATT AAGAAAATTC 480
 15 CCTGCTATTA GTTGTTGAAG GTTTTATAT CATAAATGAA AGTTGAATAT TATTATCATA 540
 TATTATTAAT ATATTGTTAT TGAACATCA AAGCCTTTTC CTAAAACCAT TGAGATGATC 600
 TTATAACCAT TCTCCTTTAA CCTGTTGACG AG 632

20 (2) INFORMACIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID nº 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 21 pares de bases
- 25 (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

30 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 2:

35 GAATGAACTT GCTGACCCTC T 21

(2) INFORMACIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID nº 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 40 (A) LONGITUD: 24 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: única
- 45 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 3:

50 CCTTGAAATC ATGTCGGTTC AAGC 24

(2) INFORMACIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID nº 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 55 (A) LONGITUD: 24 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- 60 (C) CADENA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 4:

65 AGGTGAATCA CAAGCTGAAC TTCT 24

ES 2 337 967 T3

(2) INFORMACIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID nº 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 21 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: única
- 10 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 5:

15 ATATATTGTT ATTGAACTAT C 21

(2) INFORMACIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID nº 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 20 (A) LONGITUD: 24 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- 25 (C) CADENA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 6

30 ATATGAACTC AAAGGAGGTC AGTG 24

(2) INFORMACIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID nº 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 35 (A) LONGITUD: 21 pares de bases
- 40 (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº 7:

45 AGATGAACTT CATGAACTGT C 21

50

55

60

65