

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
12 de mayo de 2011 (12.05.2011)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2011/054994 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12N 15/63 (2006.01) C12N 15/86 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2010/070715

(22) Fecha de presentación internacional:
4 de noviembre de 2010 (04.11.2010)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200902122
5 de noviembre de 2009 (05.11.2009) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): **PROYECTO DE BIOMEDICINA CIMA, S.L.** [ES/ES]; Avenida Pío XII, 22 Oficina 1, E-31008 Pamplona - Navarra (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **GONZÁLEZ ASEGUINOLAZA, Gloria** [ES/ES]; ICT (D.P.I.), Avda. Pío XII, 53, E-31008 Pamplona - Navarra (ES). **PRIETO VALTUEÑA, Jesús María** [ES/ES]; ICT (D.P.I.), Avda. Pío XII, 53, E-31008 Pamplona - Navarra (ES). **VANRELL MAJÓ, Lucía María** [ES/ES]; ICT (D.P.I.), Avda. Pío XII, 53, E-31008 Pamplona - Navarra (ES).

(74) Mandatario: **ARIAS SANZ, Juan**; ABG Patentes, S.L., Avenida de Burgos, 16D, Edificio Euromor, E-28036 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR,

BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaraciones según la Regla 4.17:

- sobre el derecho del solicitante para solicitar y que le sea concedida una patente (Regla 4.17(ii))
- sobre la calidad de inventor (Regla 4.17(iv))

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))
- con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: REGULATED EXPRESSION SYSTEMS

(54) Título : SISTEMAS DE EXPRESIÓN REGULADA

(57) Abstract: The application relates to gene constructs for inducible hepato- specific expression of polynucleotides of interest in response to an inducer agent, said constructs comprising (i) an inducible bi-directional operator -promoter with at least one responsive element to said inducer agent flanked by two hepato- specific promoters acting in divergent manner, (ii) a first nucleotide sequence encoding a transactivator which may be activated by said inducer agent operatively coupled to the first hepato- specific promoter and (iii) a second nucleotide sequence operatively coupled to the second hepato- specific promoter, wherein the promoters are induced as a consequence of the binding of the transactivator to the operator region of the operator -promoter in the presence of the inducer agent.

(57) Resumen: La invención se relaciona con métodos y herramientas para la expresión inducible hepatoespecífica de un gen de interés mediante el uso de promotores bidireccionales hepatoespecíficos que se encuentran operativamente acoplados a dicho gen de interés y a un transactivador que es capaz de promover la transcripción en presencia de un determinado gen de interés. La invención se refiere también a construcciones génicas y viriones que permiten la expresión regulada hepatoespecífica así como al uso de los mismos para el tratamiento de enfermedades hepáticas.



WO 2011/054994 A1

SISTEMAS DE EXPRESIÓN REGULADA

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCIÓN

La invención se encuentra dentro del campo de los sistemas de expresión regulables y, más concretamente, dentro de la expresión regulable de forma espacial (en un tejido determinado) y temporal (en respuesta a la adición de un agente inductor). La invención se refiere también a construcciones génicas y viriones que permiten la expresión regulada hepatoespecífica así como al uso de los mismos para el tratamiento de enfermedades hepáticas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Las funciones del hígado incluye, entre otros, el metabolismo de carbohidratos y de lípidos, secreción de citoquinas, eliminación de insulina y de otras hormonas, la producción de bilis, etc. Asimismo, en el hígado se producen factores que afectan a numerosas enfermedades genéticas, cardiovasculares, metabólicas, hemorrágicas y cancerosas. Las células del hígado tienen tiempos de vida media elevados y están directamente conectadas al torrente sanguíneo lo que facilita la llegada a las mismas de agentes terapéuticos. Por estos motivos, se considera que el hígado constituye un buen candidato para la terapia génica. No obstante, con el fin de evitar los efectos secundarios asociados a la expresión del gen diana en tejidos no hepáticos, es conveniente disponer de sistemas que permitan la expresión de un gen de interés de forma específica en el hígado.

Para ello, se han utilizado construcciones en las que el gen de interés se encuentra bajo el control de un promotor hepatoespecífico del tipo del promotor de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), enzimas de la gluconeogénesis (Yang, Y. W., J. et al, Gene Med., 5:417'-424 (2003)), α 1-antitripsina, albumina, FVII, polipéptido transportador de aniones orgánicos (OATP-C), proteína core del virus de la hepatitis B (Kramer, M. G., et al, Mol. Ther., 7:375-385, 2003), y la globulina de unión a tiroxina (Wang, L., et al, Proc. Natl. Acad. Sci, 96: 3906-3910 (1999)). No obstante, este tipo de

sistemas tiene la desventaja de que resultan en la expresión constante del gen de interés, lo que puede resultar en toxicidad y efectos indeseados.

Con el fin de evitar los efectos resultantes de la expresión constante de genes de interés, se han desarrollado sistemas inducibles en los que la expresión tiene lugar únicamente en presencia de un determinado agente inductor. Así, es conocido un sistema inducible de expresión controlable temporal- y espacialmente basado en el uso de un promotor que es activable en presencia de un factor de transcripción quimérico cuya actividad se induce en presencia de mifepristona (RU486) (véase Wang et al., Nat. Biotechnol., 1997, 15:239-43). Este tipo de regulación se puede aplicar a cualquier tipo celular usando un promotor específico de tejido. Este sistema es específico, reversible y no tóxico. No obstante, presenta la desventaja de que conduce a niveles de expresión elevados en condiciones basales, lo que lo hace inaceptable si se desea su aplicación *in vivo*.

Zabala y cols (Cancer Research 2004, 64:2799-2804] han descrito vectores plasmídicos que incluyen distintas realizaciones de un sistema de expresión inducible por tetraciclinas (tet-on) donde todos comprenden una secuencia que codifica un transgén (luciferasa, o IL-12) que se transcribe desde una unidad transcripcional controlada por una secuencia operadora-promotora constituida por 7 copias del Operador de tetraciclina (tetO7) unidas al promotor de la albúmina (Palb); este sistema incluye también una secuencia que codifica un transactivador reverso rtTA (rtTA2s-M2), puesta bajo el control de secuencias promotoras hepatoespecíficas, diferentes según las realizaciones, seleccionadas entre EIIP α 1AT (promotor del gen de la α 1-antitripsina humana, P α 1AT fusionado con la región potenciadora del antígeno core del virus de la hepatitis B, EII), EalbP α 1AT (promotor del gen de la α 1-antitripsina humana, P α 1AT fusionado con la región potenciadora del gen de la albúmina, Ealb) y Phpx (promotor del gen de la hemopexina humana). En este trabajo se comprobó que la expresión basal del transgén era directamente proporcional a la fuerza del promotor hepatoespecífico utilizado para controlar la expresión del rtTA; la capacidad de inducir la expresión transgénica era inversamente proporcional a la expresión basal (máxima tasa de inducción cuando se utilizó Phpx, el promotor más débil); sin embargo los niveles

máximos de expresión tras inducción eran directamente proporcionales a la potencia de promotor, es decir el promotor mas fuerte expresaba los niveles mas altos tras la inducción. Por otro lado, cuando las unidades transcripcionales para el rtTA y el transgén están dispuestas en tándem, la expresión transgénica es mayor que cuando se disponen en sentidos opuestos. Sin embargo, en este estudio la utilización de un promotor Palb para dirigir la expresión transgénica estaba asociada a una menor expresión del transgén, en comparación con la obtenida con un sistema en el que se utilizaba el promotor mínimo del citomegalovirus.

Kramer y cols (*Molecular Therapy*, 2003, 7:375-385) compara la actividad promotora de diversas construcciones de promotores, entre ellos los promotores hepatoespecíficos EII Pa1AT, Ealb Pa1AT, y Phpx. Comprueban que el promotor Pa1AT, solo o unido a los potenciadores Ealb o EII del virus VHB, es el más potente para dirigir la expresión estable de un gen en células hepáticas.

Chtarto y cols (*Gene Therapy*, 2003, 10:84-94) describen un vector AAV para la expresión inducible de un transgén (gen reportero eGFP, enhanced GFP) desde un sistema de expresión transgénica inducible por tetraciclinas bidireccional. Dicho sistema incluye una secuencia que contiene la región operadora tetO7 flanqueada a ambos lados por secuencias promotoras mínimas del citomegalovirus (pCMV_m) que dirigen, en direcciones opuestas, la transcripción de un transactivador (rtTA) activable por tetraciclinas y del transgén, de manera que en presencia de doxiciclina el transactivador rtTA induce la transcripción del transgén y de él mismo. El sistema incluye también señales de poliadenilación de SV40 bidireccional. Este sistema autoregurable exhibe una capacidad de inducción para la expresión de un transgén en líneas celulares tumorales y para la expresión in vivo en cerebro. En una divulgación más reciente (Chtarto et al. *Experimental Neurology* 2007, 204:387-399) este mismo grupo describe una versión mejorada del vector que porta un transactivador rtTA mutado, y que permite expresar el GDNF en el núcleo estriado en concentraciones biológicamente activas que reprimen la tirosina-hidroxilasa en ratas tratadas con doxiciclina pero no en controles no inducidos. Sin embargo, no se dispone de datos de si

estos vectores son adecuados para obtener una expresión transgénica en el hígado con los requerimientos antes señalados.

No obstante, existe la necesidad en la técnica de desarrollar sistemas alternativos para la expresión hepatoespecífica e inducible de genes de interés que no presenten las desventajas de los sistemas descritos hasta la fecha.

COMPENDIO DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han demostrado que vectores de expresión inducibles basados en el uso de transactivadores sensibles a tetraciclina y promotor mínimo de CMV no tienen un buen comportamiento para expresión controlada específica en hígado pero que, por el contrario, sistemas de expresión de genes heterólogos que incluyen los promotores de la albúmina humana (pAlb) en sustitución de los promotores pCMV mínimo permiten no sólo obtener una expresión basal mas baja y específica en hígado sino que además, de forma sorprendente, permiten obtener niveles de expresión, tras la inducción, superiores a los que se obtienen con promotores más fuertes del tipo de CMV mínimo.

Así, la presente invención se refiere, en un primer aspecto, a una construcción génica que permite la expresión inducible hepatoespecífica de un polinucleótido de interés en respuesta a un agente inductor que comprende

- (i) un operador-promotor inducible bidireccional que comprende al menos un elemento de respuesta a dicho agente inductor flanqueado por una primera secuencia promotora hepatoespecífica y por una segunda secuencia promotora hepatoespecífica en donde ambas secuencias promotoras hepatoespecíficas actúan de forma divergente,
- (ii) una primera secuencia nucleotídica que comprende una secuencia que codifica un transactivador activable por dicho agente inductor y una señal de poliadenilación situada en posición 3' con respecto a la región que codifica el transactivador, en donde dicha secuencia que codifica un

transactivador se encuentra operativamente acoplada a la primera secuencia promotora hepatoespecífica y

- (iii) una segunda secuencia nucleotídica que comprende un polinucleótido que se encuentra operativamente acoplado a la segunda secuencia promotora hepatoespecífica y una señal de poliadenilación situada en posición 3' con respecto al polinucleótido de interés,

en donde la actividad promotora de dichas primera y segunda secuencias promotoras hepatoespecíficas se induce como consecuencia de la unión del transactivador a la región operadora del operador-promotor en presencia del agente inductor.

En un segundo aspecto, la invención se relaciona con un vector, un genoma viral o un virión que comprende la construcción génica de la invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un virión obtenible expresando un genoma viral de la invención en una célula empaquetadora adecuada.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método in vitro para la expresión en una célula de origen hepático de un polinucleótido de interés que comprende las etapas de

- (i) poner en contacto dicha célula con una construcción génica según la invención, con un vector según la invención, con un genoma viral según la invención o con un virión según la invención en condiciones adecuadas para la entrada en la célula de dicha construcción, de dicho vector o de dicho virión y
- (ii) poner en contacto la célula con el agente inductor durante el tiempo necesario para que se produzca la expresión del polinucleótido de interés.

En aspectos adicionales, la invención se relaciona con una composición farmacéutica construcción génica según la invención, con un vector según la invención, con un genoma viral según la invención o con un virión según la invención así como al uso de los mismos como medicamento o para su uso en el tratamiento de una enfermedad hepática.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un operador-promotor inducible bidireccional adecuado para la expresión hepatoespecífica e inducible por un agente inductor de dos polinucleótidos de interés que comprende

- (i) al menos un elemento de respuesta a dicho agente inductor,
- (ii) una primera secuencia promotora hepatoespecífica y
- (iii) una segunda secuencia promotora hepatoespecífica,

en donde la primera y la segunda secuencia promotora hepatoespecífica actúan de forma divergente con respecto al elemento de respuesta al agente inductor y en donde la actividad promotora de la primera y la segunda secuencia promotora hepatoespecífica se ve aumentada en presencia de dicho agente inductor y en presencia de un transactivador que se une al elemento de respuesta.

En un aspecto adicional, la invención se relaciona con una construcción génica adecuada para la expresión hepatoespecífica e inducible por un agente inductor de un polinucleótido de interés que comprende

- (a) Un operador-promotor inducible bidireccional que comprende
 - (i) al menos un elemento de respuesta a dicho agente inductor,
 - (ii) una primera secuencia promotora hepatoespecífica y
 - (iii) una segunda secuencia promotora hepatoespecífica,
- (b) una secuencia nucleotídica que codifica un transactivador activable por dicho agente inductor que se encuentra operativamente acoplada a la primera secuencia promotora hepatoespecífica y una señal de poliadenilación situada en posición 3' con respecto a la región que codifica el transactivador,

en donde la primera y la segunda secuencia promotora hepatoespecífica actúan de forma divergente con respecto al elemento de respuesta al agente inductor y en donde la actividad promotora de la primera y la segunda secuencia promotora hepatoespecífica se ve aumentada en presencia de dicho agente inductor y en presencia de un transactivador que se une al elemento de respuesta en el operador-promotor inducible bidireccional .

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Esquema de la estructura del sistema de expresión de un transgén inducible por tetraciclinas de la invención. (1) secuencia operadora-promotora bidireccional; (2) elemento bidireccional de respuesta a la forma activa del transactivador; (3) secuencias promotoras que comprenden un promotor hepatoespecífico (preferiblemente un promotor de albúmina (pAlb) o un promotor mínimo de la albúmina (pmAlb)); (4) secuencia que codifica un transactivador reverso activable por un agente inductor, preferiblemente por tetraciclinas (rtTA); (5) secuencia que codifica un transgén de interés; (6) señales de poliadenilación (poliA o pA). La secuencia operadora-promotora bidireccional controla la transcripción de las secuencias que codifican el transactivador (preferiblemente rtTA) (4) y el transgén de interés (5); su actividad promotora es a su vez inducida por la proteína transactivadora (preferiblemente rtTA) (4) en presencia del agente inductor (preferiblemente tetraciclina o un análogo de la tetraciclina como la doxiciclina).

Figura 2. Estructura de distintos virus adeno-asociados recombinantes, en los que se ha incorporado un sistema de expresión de un transgén inducible por tetraciclinas, utilizados en los ejemplos.

A) rAAV-pTet_{bid}-pCMV-luc: El genoma de este virus adeno-asociado lleva incorporado un sistema de expresión bidireccional inducible por tetraciclinas que incluye una región operadora con 7 copias de 42 bases del Operador de la tetraciclina (tetO7), flanqueado por 2 promotores mínimos del citomegalovirus (pCMV); el operador-promotor controla la expresión de 2 secuencias, colocadas una a cada lado, que codifican respectivamente un transactivador reverso rtTA-M2 y luciferasa (luc) como transgén de interés; como señales de poliadenilación (pA) se han incorporado las señales de poliadenilación bidireccionales de SV40; flanqueando el casete de expresión se han incluido el 5' ITR (*inverted terminal repeat*) y 3' ITR del virus adeno-asociado de tipo 2 (AAV2).

B) rAAV-pTet_{bid}-pAlb-luc: El genoma de este virus adeno-asociado lleva incorporado un sistema de expresión bidireccional inducible por tetraciclinas que incluye los mismos elementos que el virus rAAV-pTet_{bid}-pCMV-luc, con la única diferencia de que los

promotores mínimos pCMV han sido sustituidos por las secuencias promotoras del gen de la albúmina (pAlb).

C) rAAV-pTet_{bid}-pAlb-mIL12: El genoma de este virus adeno-asociado lleva incorporado un sistema de expresión bidireccional inducible por tetraciclinas que incluye los mismos elementos que el virus rAAV-pTet_{bid}-pAlb-luc, con la única diferencia de que el gen de la luciferasa ha sido sustituido por la secuencia de la IL12 de ratón de cadena única (Lieschke, G.J., et al. Nat Biotechnol, 1997. 15: 35-40).

Figura 3. Imágenes de bioluminiscencia obtenidas mediante cámara CCD. En ellas se muestran las regiones que se seleccionan para la medición de los niveles de actividad de luciferasa. A) Zona abdominal superior (incluye el hígado), y B) Niveles de bioluminiscencia emitidos por todo el animal.

Figura 4. Medición de la actividad luciferasa (fotones/seg) en ratones hembras BALB/c a los que se inyectaron viriones o partículas virales que contenían genomas del virus recombinante rAAV-pTet_{bid}-pCMV-luc (en dosis de 1×10^{10} , 3×10^{10} y 1×10^{11} genomas virales (gv) por ratón, según los grupos). Los viriones inyectados eran viriones AAV2/8, que contenían genomas contruidos sobre ITRs del virus AAV2 pero empaquetados en cápsidas AAV8 (formadas por proteínas de la cápsida correspondientes a un AAV del serotipo 8). Para inducir la expresión de la luciferasa, a los 21 días de la administración del vector viral, a cada animal se le administró doxiciclina (50 mg/Kg de peso; vía i.p.), y tras 24 horas la inducción se mantuvo mediante la administración de doxiciclina (dox) durante 7 días en el agua de bebida (2 mg/ml de doxiciclina; 5 % sacarosa). Las líneas indican la actividad luciferasa medida en el tiempo, expresado en días t(d) desde la primera administración i.p. de doxiciclina (día 0). Los niveles de actividad en el área hepática se representan con líneas de trazo continuo; los niveles de actividad en todo el animal se representan con líneas de trazo discontinuo.

Figura 5. Medida de la actividad luciferasa (fotones/seg) en ratones inyectados con viriones AAV2/8 que contenían genomas del virus rAAV-pTet_{bid}-pCMV-luc (dosis 1×10^{10} , 3×10^{10} , y 1×10^{11} gv/ratón). Las mediciones se realizaron tras inducciones repetidas con dosis crecientes de doxiciclina (mg/Kg; vía i.p.), separadas por un periodo

de 15 días. La actividad luciferasa se midió en el área abdominal superior o hepática una vez transcurridas 24 horas desde la administración i.p. de la doxiciclina.

Figura 6. Actividad luciferasa (fotones/seg) medida en hembras BALB/c a las que se inyectaron, por vía intravenosa, viriones AAV2/8 que contenían genomas del virus recombinante rAAV-pTet_{bid}-pAlb-luc (1×10^{11} gv/ratón). La actividad se midió en estado basal antes de la inducción con doxiciclina (Dosis 0), y en estado inducido 24 horas después de la administración por vía i.p. de 50 mg/Kg de peso (Dosis 50); estas mediciones se realizaron tanto en el área superior abdominal (Hígado) y como en el animal completo (Total).

Figura 7. Comparación entre las actividades de luciferasa (fotones/seg) medidas en estado basal (Dosis 0) e inducido, 24 horas después de la administración por vía i.p. de 50 mg/Kg de doxiciclina (Dosis 50) en ratones hembras BALB/c inyectados con viriones AAV2/8 que contenían genomas de rAAV-pTet_{bid}-pCMV-luc o de rAAV-pTet_{bid}-pAlb-luc (1×10^{11} gv/ratón; vía i.v.). Las medidas se realizaron en el área superior abdominal (hepática).

Figura 8. Actividad luciferasa (fotones/seg) en hembras BALB/c inyectadas con viriones AAV2/8 que incorporan genomas del virus rAAV-pTet_{bid}-pAlb-luc (a dosis de 1×10^{11} y 1×10^{10} gv/ratón según grupos; vía i.v.). La medida de la actividad se realizó en el estado basal (Inducción 0) y 24 horas después de inducir con 50 mg/Kg de doxiciclina en 4 ciclos de inducción repetida (Inducción 1, 2, 3 y 4 respectivamente). Entre la inducción 1 y la inducción 2, y entre la 2 y 3 transcurrieron 15 días; entre la Inducción 3 y la Inducción 4 transcurrieron 80 días.

Figura 9. A) Actividad luciferasa (fotones/seg) de hembras y machos C57BL/6 inyectados con viriones AAV2/8 portadores de genomas de rAAV-pTet_{bid}-pAlb-luc (1×10^{11} gv/ratón; por vía i.v.), medida en estado basal e inducido, tras inducción con distintas dosis de doxiciclina. Se administró una dosis de diferente de doxiciclina por grupo (N = 5) de ratones (Dosis en mg/Kg de peso; vía i.p.). La medición de actividad basal se realizó el día 14 después de la inyección del virus correspondiente; la medición

en estado inducido se realizó 22 días después de la inyección del virus y 24 horas después de la administración de la dosis de doxiciclina.

B) Transformación logarítmica [Log_{10} (fotones/seg)] de los datos de actividad mostrados en A).

Figura 10. Actividad luciferasa (fotones/seg) medida en hembras y machos C57BL/6 inyectados con viriones AAV2/8 portadores de rAAV-pTet_{bid}-pAlb-luc (1×10^{11} gv/ratón; por vía i.v.), en estado basal (día 0) y en distintos días durante el periodo de administración de doxiciclina en agua de bebida (2 mg/ml + 5% sacarosa).

Figura 11. Biodistribución de la actividad luciferasa *ex vivo*. Se inyectaron hembras de las cepas BALB/c (A), y C57BL/6 (B) (N = 4–8) con viriones AAV2/8 portadores de rAAV-pTet_{bid}-pCMV-luc o rAAV-pTet_{bid}-pAlb-luc (una dosis de 1×10^{11} gv/ratón por vía i.v). 21 días después de la inyección de los virus se indujo la expresión de luciferasa mediante la administración de doxiciclina (50 mg/Kg; vía i.p.); 24 horas después de la inducción se sacrificaron los animales; se extrajeron los órganos y se midió la actividad luciferasa (RLU) en cada uno de ellos, normalizándola por la cantidad de proteína total (RLU/mg proteína).

Figura 12. Biodistribución de la actividad luciferasa *ex vivo*. Se inyectaron machos de las cepas BALB/c (A), y C57BL/6 (B) (N = 4–8) con viriones AAV2/8 portadores de rAAV-pTet_{bid}-pCMV-luc o rAAV-pTet_{bid}-pAlb-luc (una dosis de 1×10^{11} gv/ratón por vía i.v). 21 días después de la inyección de los virus indujo la expresión mediante la administración de doxiciclina (50 mg/Kg; vía i.p.); 24 horas después de la inducción se sacrificaron los animales; se extrajeron los órganos y se midió la actividad luciferasa (RLU) en cada uno de ellos, normalizándola por la cantidad de proteína total (RLU/mg proteína).

Figura 13 Esquema del protocolo del tratamiento antitumoral administrado a ratones hembras C57BL/6 tras la implantación de células de la línea tumoral singénica MC38. A día 0 se les administraron 3 dosis diferentes de viriones AAV2/8 portadores de rAAV-pTet_{bid}-pAlb-mIL12 (3×10^{10} , 1×10^{10} y 3×10^9 gv/ratón), y se dejó un grupo de

ratones sin vector (N=5). Tras 30 días, se implantaron 5×10^5 células MC38 de forma intrahepática. Diez días después de la implantación (día 40 del protocolo) se comenzó la inducción del sistema con una administración i.p de doxiclina (50 mg/Kg). Al día siguiente se continuó la inducción en agua de bebida (2 mg/ml de dox + 5% sacarosa) que se mantuvo durante los 6 días posteriores (hasta el día 47 del protocolo). A día 90 se realizó un rechallenge subcutáneo con 1×10^6 células MC38/ratón, en los dos grupos que recibieron mayor dosis de vector, y como control se usaron 5 ratones naive. Se midió el tamaño tumoral a los 13, 23 y 42 días post-rechallenge (día 103, 113 y 132 del protocolo). A día 113 se sangraron los ratones, y se extrajeron PBLs. Por último, a día 132 se sacrificaron los animales y se extrajeron los tumores subcutáneos de aquellos ratones que no fueron completamente protegidos. En líneas verticales rojas se indican los días de sangrado para medición de parámetros séricos. En líneas verticales azules se indican los días en que se realizó la medición del tamaño tumoral post-rechallenge.

Figura 14. Niveles de las transaminasas, ALT (A), y AST (B), en el suero de animales hembras C57BL/6 inyectados con viriones AAV2/8 portadores de rAAV-pTet_{bid}-pAlb-mIL12, a tres dosis diferentes: 3×10^{10} , 1×10^{10} y 3×10^9 gv/ratón. Se muestran los niveles en el estado basal (día 0 de inducción), a día 1, 4 y 7 tras una administración inicial de 50 mg/Kg de doxiclina i.p., realizada a día 0 de inducción seguido de la administración de doxiclina en agua de bebida (2 mg/ml dox + 5% sacarosa).

Figura 15. Porcentaje de supervivencia en el tiempo, de los ratones C57BL/6 a los que se les aplicó el protocolo descrito en la Figura 13. Las leyendas muestran la dosis de virus (en gv/ratón) que recibió cada grupo de forma intravenosa al comienzo del protocolo. El grupo control no recibió vector. Las evaluaciones estadísticas se realizaron utilizando el test de Logrank (GraphPad Prism software) (**p<0.001).

Figura 16. Tamaño tumoral de los ratones tratados que fueron sometidos a un rechallenge subcutáneo con 1×10^6 células MC38/ratón (B) comparados con un grupo de ratones sin tratar, control (A). Entre paréntesis (en B) se indica la dosis de virus expresada en gv que recibió cada ratón según el protocolo descrito en la Figura 13. En (C) se muestran los tamaños tumorales alcanzados por los diferentes grupos al finalizar

el experimento (día 132 del protocolo). Entre paréntesis se indica la dosis de virus expresada en gv que recibió cada ratón según el protocolo descrito en la Figura 13.

Figura 17. Porcentaje de PBLs CD8⁺/Tet⁺ (MC38). Se extrajo sangre de los ratones a día 23 post-rechallenge (día 113 del protocolo descrito en la Figura 13), se obtuvieron PBLs y se marcaron con anticuerpos anti-CD8⁺ y con un tetrámero cargado con un péptido específico de células MC38. Se analizó el porcentaje de PBLs CD8⁺-MC38Tet⁺ utilizando el programa informático FlowJo. Las evaluaciones estadísticas se realizaron utilizando el test t de Student (*p<0.05)

Figura 18. Porcentaje de linfocitos CD8⁺ intra-tumorales específicos del tetrámero de MC38 y positivos para el marcador de activación CD44. Se agruparon los grupos de los ratones tratados por no presentar diferencias significativas entre ellos (A). En B y C) se muestran los diagramas de puntos correspondientes a un ratón representativo del grupo control y a uno del grupo tratado, respectivamente. Las evaluaciones estadísticas se realizaron utilizando el test t de Student (**p<0.001).

Figura 19. Esquema del protocolo del tratamiento terapéutico antitumoral administrado a ratones hembras C57BL/6. A día 0 se realizó la implantación de células de la línea tumoral singénica MC38. 7 días más tarde se les inyectó una única dosis de 1×10^{10} genomas virales (gv) de rAAV-pTet_{bid}pAlb-mIL12 y se dejó un grupo de ratones sin vector (N=5). 15 días más tarde se comenzó la inducción del sistema con una administración i.p de doxiciclina (50 mg/Kg). Al día siguiente se continuó la inducción en agua de bebida (2 mg/ml de dox + 5% sacarosa) que se mantuvo durante los 6 días posteriores tras lo cual se analizó la supervivencia en ambos grupos.

Figura 20. Porcentaje de supervivencia en el tiempo, de los ratones C57BL/6 a los que se les aplicó el protocolo descrito en la Figura 19. Las leyendas muestran la dosis de virus (en gv/ratón) que recibieron los animales tratados. El grupo control no recibió vector. Las evaluaciones estadísticas se realizaron utilizando el test de Logrank (GraphPad Prism software) (**p<0.001).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

CONSTRUCCIONES GÉNICAS DE LA INVENCIÓN

Los autores de la presente invención han desarrollado un sistema de expresión de polinucleótidos de interés que permite una expresión precisa tanto temporal como espacial de dichos polinucleótidos en el hígado. Para ello, hacen uso de un operador-promotor bidireccional activable que está asociado a un primer promotor hepatoespecífico que controla la expresión de un transactivador el cual activa la expresión de dicho promotor bidireccional en presencia de un agente inductor y a un segundo promotor hepatoespecífico que controla la expresión del gen de interés. En estado basal (sin inducir), el promotor hepatoespecífico dirige la expresión de pequeñas cantidades tanto del transactivador como del transgén dando lugar a lo que se denomina expresión residual del sistema. El transactivador en ausencia de agente inductor es incapaz conformacionalmente de unirse a los sitios operadores en el promotor bidireccional y, por lo tanto, de activar la transcripción del promotor bidireccional.

En presencia de inductor, éste se une a las moléculas de transactivador residuales presentes en la célula, produciéndole un cambio conformacional que le permite unirse a los sitios operadores del promotor-operador inducible bidireccional y activar su transcripción. De esta manera, se induce la expresión del transgén, tanto como del transactivador. Estas nuevas moléculas de transactivador sintetizadas son capaces de unirse al agente inductor libre de la célula y de crear un bucle o “loop” de retroalimentación positiva, hasta que se llega a un estado en el cual pueden presentarse dos situaciones:

- (a) que todos los sitios operadores estén ocupados por moléculas del complejo agente inductor-transactivador; o
- (b) que se consuma el agente inductor libre de la célula, en el caso de que no se haya administrado en exceso, y las moléculas de transactivador sintetizado no puedan seguir uniéndose a los sitios operadores.

Por lo tanto, tras la administración del inductor comenzará la etapa de inducción o estado inducido. Los niveles de expresión tanto del transactivador como del transgén dependerán de la dosis de inductor administrada. Una vez retirado el inductor, el transactivador vuelve a su estado conformacional inactivo, y no logra unirse eficientemente a los sitios operadores, lo cual hace que la expresión transgénica disminuya hasta volver al estado inicial o basal. La expresión máxima se obtiene cuando todos los sitios operadores estén ocupados por moléculas del complejo agente inductor-transactivador.

Los autores de la presente invención han demostrado como, de forma sorprendente, los vectores desarrollados permiten una expresión hepatoespecífica tras la inducción que alcanza niveles superiores a la que se obtiene mediante vectores en los que se utilizan promotores cuya expresión basal es superior. Así, aunque la expresión máxima de los sistemas de inducción descritos hasta la fecha correlaciona de forma directa con la potencia del promotor en estado basal, en el sistema objeto de la presente invención en donde se usan promotores específicos de tejido que son por lo general más débiles que los promotores ubicuos del tipo CMV, se obtiene una expresión en situación basal tras la inducción que es más alta que la obtenida con el CMV. En concreto, en el ejemplo 2 de la presente invención se observa como la tasa de inducción de un gen reportero obtenida usando el sistema hepatoespecífico de la invención tras la administración del agente inductor es aproximadamente 85 veces mayor que la tasa de inducción del sistema basada en el promotor ubicuo CMV (véase figura 7), lo que contrasta con los resultados obtenidos por Zabala *et al* (Zabala, M., et al., Cancer Res. 2004; 64: 2799-2804) en donde la utilización de un promotor Palb para dirigir la expresión transgénica estaba asociada a una menor expresión del transgén, en comparación con la obtenida con un sistema en el que se utilizaba el promotor mínimo del citomegalovirus. Además, la diferencia en el estado inducido entre ambos sistemas para esta dosis de dox es altamente significativa. Por otro lado, la expresión en hígado de un gen reportero controlado por el sistema de expresión hepatoespecífico e inducible de la presente invención alcanza niveles de inducción de la actividad de luciferasa mayores que el sistema basado en el promotor ubicuo CMV (véase figura 11).

Así, en un primer aspecto, la invención se relaciona con una construcción génica que permite la expresión inducible hepatoespecífica de un polinucleótido de interés en respuesta a un agente inductor que comprende

- (i) un operador-promotor inducible bidireccional que comprende un elemento de respuesta a dicho agente inductor flanqueado por una primera secuencia promotora hepatoespecífica y por una segunda secuencia promotora hepatoespecífica en donde ambas secuencias promotoras hepatoespecíficas se orientan de forma divergente,
- (ii) una primera secuencia nucleotídica que comprende una secuencia que codifica un transactivador activable por dicho agente inductor y una señal de poliadenilación situada en posición 3' con respecto a la región que codifica el transactivador, en donde la secuencia que codifica un transactivador activable se encuentra operativamente acoplada a la primera secuencia promotora hepatoespecífica y
- (iii) una segunda secuencia nucleotídica que comprende un polinucleótido que se encuentra operativamente acoplada a la segunda secuencia promotora hepatoespecífica y una señal de poliadenilación situada en posición 3' con respecto al polinucleótido de interés,

en donde la actividad promotora de dichas primera y segunda secuencias promotoras hepatoespecíficas se induce como consecuencia de la unión del transactivador a la región operadora del operador-promotor en presencia del agente inductor.

La expresión “construcción génica”, según se usa en la presente invención, se refiere a un ácido nucleico, de cadena sencilla o de cadena doble, que comprende una región capaz de expresarse y, opcionalmente, secuencias reguladoras que preceden a dicho ácido nucleico (secuencias 5' no codificantes) o que se encuentran a continuación de dicho ácido nucleico (secuencias 3' no codificantes). Las expresiones “construcción génica” y “construcción de ácidos nucleicos” se usan indistintamente en la presente invención.

El término “expresión”, se refiere a la transcripción de un gen o genes o construcción génica para dar lugar a RNA estructural (ARNr, ARNt) o ARNm con o sin la posterior traducción de dicho ARN en proteína.

La expresión “expresión inducible”, según se usa en la presente invención, se refiere a que la expresión puede verse aumentada en respuesta a un activador/inductor.

La expresión “polinucleótido de interés”, según se usa en la presente invención, se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que es parcial o totalmente heteróloga con respecto a la célula o al sujeto en el que se introduce y que, en virtud de la presencia de regiones reguladoras de la expresión en posición 5' o 3' con respecto a dicho polinucleótido de interés, puede transcribirse y, eventualmente, traducirse para dar lugar a un polipéptido con una actividad biológica deseada. La expresión “polinucleótido de interés”, no debe entenderse únicamente como un polinucleótido con capacidad de codificar un polipéptido, sino que también puede utilizarse para referirse a una secuencia de ácidos nucleicos que es parcial o totalmente complementaria a un polinucleótido endógeno a la célula o sujeto en el que se va a introducir, de forma que tras su transcripción, genere una molécula de ARN (microRNA, shRNA o siRNA) capaz de hibridar e inhibir la expresión del polinucleótido endógeno. El polinucleótido de interés puede ser ADN o ADNc.

La expresión “agente inductor”, según se usa en la presente invención, se refiere a cualquier molécula que sea capaz de provocar un aumento en la transcripción de un gen. Habitualmente, el gen cuya transcripción se induce en respuesta a dicho agente inductor se encuentra bajo control operativo de una región reguladora de la transcripción que, a su vez, presenta sitios de unión para un activador transcripcional cuya actividad aumenta en presencia de dicho agente inductor. Así, en el contexto de la presente invención, la expresión “elemento de respuesta para el agente inductor”, al referirse a la región reguladora de la transcripción de un gen de interés, se usa para referirse a los sitios de unión para un activador transcripcional cuya actividad se ve aumentada por la unión del agente inductor. Preferiblemente, el agente inductor es un compuesto de fácil administración y distribución en el organismo e inocuo a las dosis empleadas para

activar el sistema. Además debe ser capaz de penetrar en el tejido u órgano deseado, y contar con una vida media de unas cuantas horas (no minutos, ni días).

Operador-promotor bidireccional regulable

El elemento (a) de la construcción génica de la invención comprende un operador-promotor inducible bidireccional que comprende un elemento de respuesta a un transactivador en su forma activa flanqueado por una primera secuencia promotora hepatoespecífica y por una segunda secuencia promotora hepatoespecífica en donde ambas secuencias promotoras hepatoespecíficas se orientan de forma divergente,

La expresión “operador-promotor bidireccional regulable” según se usa en la presente invención, se refiere a un promotor que es capaz de activar la transcripción de polinucleótidos específicos en direcciones opuestas a partir de dicho “operador-promotor” en presencia de una señal determinada.

El término “elemento de respuesta a un agente inductor” se refiere a uno o más elementos de ADN que actúan en cis y que confieren a un promotor la capacidad de activar la transcripción en respuesta a la interacción de dicho elemento con los dominios de unión de ADN de un factor de transcripción o de un transactivador cuya actividad transcripcional se induce en presencia del agente inductor, normalmente a consecuencia de un cambio conformacional en el transactivador resultante de la unión al agente inductor. Por tanto, la expresión “elemento de respuesta a un agente inductor” debe de entenderse como elemento de respuesta a un activador transcripcional en presencia de un agente inductor. El dominio de unión de ADN del factor de transcripción o del transactivador es capaz de unirse, en presencia o ausencia del agente activador, a la secuencia de ADN del elemento de respuesta para iniciar o inhibir la transcripción de genes situados en posición 3' con respecto al promotor. El término “elemento de respuesta” se usa indistintamente con “elemento de respuesta transcripcional” o TRE (transcripcional response element).

En una forma preferida de realización, el promotor-operador bidireccional regulable comprende al menos un elemento de respuesta a un transactivador activable por antibióticos, preferiblemente un elemento de respuesta a tetraciclina y, aún más preferiblemente, un elemento de respuesta a tetraciclina que comprende un número variable de copias de la secuencia operadora de 42 pares de bases (denominado TetO) tal y como fue descrita originalmente en Baron et al. (Nucleic Acids Res., 1995, 17:3605-3606). El número de copias del TetO puede ser de al menos 2, al menos 5 o, preferiblemente, no más de 7. Este tipo de elementos de respuesta tetraciclina puede activar la transcripción de forma bidireccional en presencia del transactivador reverso activado por tetraciclina (o su análogo doxiciclina) según fue descrito originalmente por Gossen et al. (Science, 1995, 278:1766-1769). En una forma preferida de realización, el elemento de respuesta a transactivador+tetraciclina comprende 7 copias de la secuencia operadora, en cuyo caso se denomina TetO7. En una forma aún más preferida, el operador-promotor comprende o consiste en la secuencia SEQ.ID.NO.:1.

El elemento (a) de la construcción génica comprende, adicionalmente, una primera y una secuencia promotora hepatoespecífica.

La expresión “secuencia promotora de la transcripción” según se usa en la presente invención, se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que es reconocida por una célula huésped y que resulta en la activación de la transcripción de secuencias de ácidos nucleicos presentes en posición 3' con respecto a dicha región promotora. Generalmente, la secuencia promotora contiene secuencias de control transcripcional que permite la expresión del polinucleótido de interés.

La expresión “hepatoespecífica”, según se usa en la presente invención para referirse a la región promotora de la transcripción, se refiere a que dicha región es capaz de activar la transcripción de forma selectiva en células hepáticas o en líneas celulares derivadas de células hepáticas. Promotores específicos de hígado adecuados para la presente invención incluyen, sin limitación, el promotor de α 1-anti-tripsina (AAT), el promotor de globulina de unión a hormona tiroidea, el promotor de alfa fetoproteína, el promotor de alcohol deshidrogenasa, el promotor de IGF-II, el promotor del factor VIII (FVIII),

el promotor de la proteína núcleo básico (Basic Core Protein o BCP) de HBV y promotor PreS2, el promotor de globulina de unión a tiroxina (TBG), el promotor de híbrido región de control hepática (HCR)-ApoCII, el promotor híbrido HCR-hAAT, el promotor AAT combinado con el elemento potenciador del gen de la albúmina de ratón (Ealb), el promotor de apolipoproteína E, el promotor de lipoproteína de baja densidad, el promotor de piruvato quinasa, el promotor de fosfenol piruvato carboxiquinasa, el promotor de lecitina-colesterol acil transferasa (LCAT), el promotor de apolipoproteína H (ApoH), el promotor de la transferrina, el promotor de transtiretina, los promotores de alfa-fibrinógeno y beta-fibrinógeno, el promotor de alfa 1-antiquimiotripsina, el promotor de glicoproteína alfa 2-HS, el promotor de haptoglobina, el promotor de ceruloplasmina, el promotor de plasminógeno, promotores de las proteínas del complemento (CIq, C1r, C2, C3, C4, C5, C6, C8, C9, factor I y factor H del complemento), el promotor del activador del complemento C3, el promotor de la hemopexina y el promotor de la glicoproteína α 1-ácida. Se pueden encontrar promotores específicos de tejido adicionales en Tissue-Specific Promoter Database, TiProD (Nucleic Acids Research, J4:D104-D107 (2006). Alternativamente, es posible el uso de promotores híbridos que comprenden un potenciador específico de hígado y un promotor específico de hígado. Este tipo de promotores incluyen el promotor híbrido de la región de control hepática (HCR)-ApoCII, el promotor híbrido HCR-hAAT, el promotor AAT combinado con el elemento potenciador del gen de la albúmina de ratón (Ealb) y un promotor de apolipoproteína E, el promotor híbrido formado por el potenciador del gen de la albúmina de ratón (Ealb) y el promotor de la alfa1-antitripsina (AAT) de ratón (Ealb-AATp).

En una forma preferida de realización, el promotor hepatoespecífico que forma parte del primer casete de expresión es el promotor del gen de albúmina de origen murino o de origen humano. En particular, la presente invención contempla el uso del promotor completo del gen de albúmina (SEQ.ID.NO.:2) o la región mínima de dicho promotor (SEQ.ID.NO.:3), correspondiente a los nucleótidos 113 a 196 del promotor completo definido en SEQ.ID.NO.:2. La invención contempla el uso de cualquier fragmento del promotor que incluya al menos el promotor mínimo (residuos 113-196 de la secuencia SEQ ID NO:2).

En el contexto de esta invención, un promotor específico de hígado es un promotor que es más activo en hígado comparado con su actividad en cualquier otro tejido del cuerpo. Típicamente, la actividad de un promotor específico de hígado será considerablemente mayor en hígado que en otros tejidos. Por ejemplo, tal promotor puede ser al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5 ó al menos 10 veces más activo en tejido hepático que en otro tipo de células. La actividad de dicho promotor en células de origen hepático con respecto a una célula de referencia puede ser determinado mediante su capacidad de dirigir la expresión en un tejido determinado al tiempo que previene la expresión en otras células o tejidos. Según esto, un promotor específico de hígado permite una expresión activa del gen unido en el hígado y previene la expresión en otras células o tejidos.

El experto en la materia apreciará que la primera y la segunda región promotora de la transcripción hepatoespecífica pueden ser iguales o pueden ser distintas. En una forma preferida de realización, ambas regiones reguladoras de la transcripción son iguales. En una forma de realización aún más preferida, tanto la primera región promotora de la transcripción como la segunda región promotora de la transcripción comprenden el promotor del gen de albúmina. En una forma de realización aún más preferida, el promotor del gen de albúmina que forma la primera y/o la segunda región promotora de la transcripción comprende una secuencia seleccionada del grupo de SEQ.ID.NO.:2 y SEQ.ID.NO.:3.

En una forma preferida de realización, el promotor-operador bidireccional regulable comprende un elemento de respuesta a tetraciclina formado por siete sitios de unión a al transactivador activable por el agente inductor, preferiblemente tetraciclina, que se encuentra flanqueado por dos promotores del gen de albúmina orientados de forma divergente. En una forma aún más preferida de realización, dicho operador promotor que comprende el operador TetO7 y dos promotores de albúmina comprende la secuencia de SEQ.ID.NO.:4.

Las secuencias con actividad promotora hepatoespecífica se encuentran orientadas en forma divergente con respecto a la región operadora. La expresión “orientación divergente”, según se usa en la presente invención para referirse a los promotores hepatoespecíficos, se refiere a parejas de promotores en donde la activación de la transcripción mediada por el primer promotor del par tiene lugar sobre una de las hebras de la molécula de ADN permitiendo la actuación de la RNA polimerasa en sentido 5'-3', mientras que el segundo promotor actuaría sobre la hebra opuesta lo que resultaría en el desplazamiento de la RNA polimerasa en dirección opuesta a la que actúa junto con el primer promotor.

Los elementos que forman el operador-promotor bidireccional de la construcción génica de la invención se encuentran organizados de forma que la actividad promotora de la primera y la segunda secuencia promotora hepatoespecífica se induzca como consecuencia de la unión del transactivador a la región operadora del operador-promotor en presencia del agente inductor. El experto en la materia apreciará que dicha inducción de la actividad promotora de la transcripción dependerá, entre otros factores, de la distancia existente entre el elemento operador y las secuencias promotoras hepatoespecíficas. Preferiblemente, la distancia entre el operador y la primera o segunda secuencia promotora puede variar entre 0 y 30 nucleótidos, más preferiblemente entre 0 y 20 y aún más preferiblemente entre 0 y 15 nucleótidos.

Primera secuencia nucleotídica de la construcción génica de la invención

El elemento (b) de la construcción génica de la invención es una secuencia nucleotídica que comprende: una secuencia que codifica un transactivador activable por dicho agente inductor que se encuentra operativamente acoplada a la primera secuencia promotora hepatoespecífica; y una señal de poliadenilación situada en posición 3' con respecto a la región que codifica el transactivador.

La expresión “secuencia nucleotídica”, “ácido nucleico” o “polinucleótido” se usan indistintamente en la presente invención para referirse a la forma polimérica del éster fosfato de ribonucleosidos (adenosina, guanosina, uridina o citidina; "moléculas de

ARN") o deoxi ribonucleosidos (deoxiadenosina, deoxiguanosina, deoxitimidina o deoxicitidina; " moléculas de ADN") o cualquier análogo fosfoéster de los mismos tales como fosforotioatos y tioesteres, en forma de hebra sencilla o de doble hebra. Así, son posibles las hélices formadas por ADN-ADN, ADN-ARN y ARN-ARN. El término "secuencia de ácidos nucleicos" y, en particular, la molécula de ADN o ARN, se refiere únicamente a la estructura primaria o secundaria de la molécula y no limita a ningún tipo particular de estructura terciaria. Así, este término engloba ADN de doble cadena tal y como aparece en moléculas de ADN lineales o circulares, plásmidos ADN superenrollado y cromosomas.

La expresión "transactivador activable por el agente inductor", según se usa en la presente invención, se refiere a un polipéptido que, cuando se encuentra unido a dicho agente inductor, es capaz de promover la transcripción de un determinado gen mediante su unión a regiones específicas de reconocimiento para dicho polipéptido en la región no codificante de dicho gen, es decir, que su actividad puede ser modulada por medio de factores adicionales que pueden ser aportados o eliminados en función de la necesidad de promover la transcripción de los genes que comprenden sitios de unión específicos para tales reguladores. El experto en la materia apreciará que el transactivador codificado por la primera secuencia nucleotídica de la invención es capaz de unirse a la región del operador-promotor que comprende los elementos de respuesta a dicho agente inductor, de forma que el transactivador active la transcripción de dichas primera y segunda secuencias promotoras hepatoespecíficas tras su unión a la región operadora del operador-promotor en presencia del agente inductor.

Adicionalmente, el experto en la materia apreciará que la invención contempla cualquier método para regular la expresión del regulador transcripcional siempre que permita la expresión de forma regulada y con un mínimo de transcripción basal. En particular, la invención contempla el uso de reguladores transcripcionales cuya inducción tiene lugar no mediante un aumento de los niveles de expresión del regulador transcripcional sino mediante un cambio conformacional en respuesta a la unión del agente inductor que puede resultar en la translocación del factor de transcripción al núcleo donde ejerce su efecto o en un aumento de la actividad transcripcional. En este tipo de reguladores

transcripcionales suelen estar formados por un dominio de unión a ADN o DBD (*DNA binding domain*), un dominio de unión a un ligando o LBD (*ligand binding domain*), y un dominio de activación de la transcripción o AD (*activating domain*).

El dominio de unión de ADN puede ser cualquier dominio para el que exista un elemento de unión específico conocido, incluyendo dominios de unión a ADN sintéticos, quiméricos o análogos. Dominios de unión a ADN adecuados para la presente invención incluyen (i) homeodominios (Scott *et al.*, 1989, *Biochim. Biophys. Acta* 989:25-48; Rosenfeld *et al.*, 1991, *Genes Dev.* 5:897-907) formados, por regla general, por una cadena de aproximadamente 61 amino ácidos que presenta una estructura secundaria compuesta por tres hélices alfa, (ii) dedos de zinc formados por dos a tres docenas de dedos de ADN de fórmula general Cys₂His₂ organizados en tándem (por ejemplo TFIIIA, Zif268, Gli, and SRE-ZBP) en donde cada módulo comprende una hélice alfa capaz de contactar con una región de ADN de 3 a 5 pares de bases siendo necesarios al menos 3 dedos de zinc para generar un sitio de unión a ADN de alta afinidad y al menos dos dedos de zinc para generar sitios de unión a ADN de baja afinidad, (iii) los dominios de unión a ADN denominados hélice-giro-hélice o HLH (*helix-turn-helix*) tales como TetR, MAT1, MAT2, MATa1, Antennapedia, Ultrabithorax, Engrailed, Paired, Fushi tarazu, HOX, Unc86, Oct1, Oct2 y Pit-1, (iv) dominios de unión a ADN del tipo cremalleras de leucina (*leucine zipper*) tales como GCN4, C/EBP, c-Fos/c-Jun y JunB. Ejemplos de dominios de unión a ADN adecuados en la presente invención incluyen el dominio de unión a ADN de GAL4, de LexA, de factores de transcripción, de receptores nucleares del grupo H, receptores nucleares de la superfamilia de las esteroides/hormonas tiroideas. El experto en la materia apreciará que la invención contempla el uso de dominios de unión a ADN híbridos formados por varios motivos de unión a ADN que pueden reconocer sitios de unión a ADN distintos a los de los elementos que los componen. Así, es posible el uso de dominios de unión de ADN formados por la unión de un dedo de zinc y un *homeobox*. En una forma preferida de realización, el dominio de unión a ADN es el procedente del represor transcripcional Tet de *E.coli*.

Las secuencias de unión a ligando capaces de promover la localización nuclear de un activador transcripcional que los contienen, adecuadas para el uso en la presente invención, incluyen la secuencia de localización derivada de PPAR (receptores activados por activadores peroxisomales), que se translocan al núcleo en presencia de 15-desoxy-[Delta]-prostaglandina J2, receptores del ácido retinoico que se translocan al núcleo en presencia de los isómeros alfa, beta o gamma del ácido 9-cis-retinoico, receptores de farnesoide X, activables por ácido retinoico y TTNPB, receptores X hepáticos activables por 24-hidroxicolesterol, receptores de benzoato X, activables por 4-amino-butylbenzoato, receptor constitutivo de androstano, receptores de pregnano, inducibles por pregnolono-16-carbonitrilo, receptores de esteroides y xenobióticos, inducibles por rifampicina, receptores de progesterona, activables por medroxiprogesterona así como por agonistas y antagonistas de mifepristona y derivados de 19-nortestosterona, receptores de glucocorticoides activables por glucocorticoides, receptores de hormonas tiroideas, activables por T3 y/o T4, y receptores de estrógenos, activables por estrógenos y sus derivados tales como el 17-betaestradiol y el estradiol, transactivadores tTA activables por tetraciclina/doxiciclina “tet-off” (Gossen y Bujard, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 5547-5551), transactivadores rtTA activables por tetraciclinas “tet-on” (Gossen *et al.*, 1995, *Science*, 268: 1766-1769), transactivador inducible por muristerona A o ligandos análogos del receptor de la ecdisona (No *et al.*, 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 3346-3351), transactivadores activables por el ligando RSL1, como el sistema RheoSwitch inicialmente descrito por Palli *et al.* (2003, *Eur. J. Biochem.*, 270: 1308-1315), un transactivador activable por rapamicina o análogos de la rapamicina (Ho *et al.*, 1996, *Nature*, 382: 822-826; Amara *et al.*, 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 10618-10623), y un transactivador activable por coumermicina/novobiocina, que actúan competitivamente como inductor y represor respectivamente (Zhao *et al.*, 2003, *Hum. Gene Ther.*, 14: 1619-1629).

Por último, el dominio de activación transcripcional puede ser un dominio de activación ácido, un dominio de activación rico en prolina, un dominio de activación rico en serinas/treoninas y un dominio de activación rico en glutamina. Ejemplos de dominios de activación ácidos incluyen las regiones de VP16 y la región de GAL4 formada por los aminoácidos 753-881. Ejemplos de dominios de activación

transcripcional ricos en prolina incluyen los aminoácidos 399-499 de CTF/NF1 y los aminoácidos 31-76 de AP2. Ejemplos de dominios de activación ricos en serina-treonina incluyen los aminoácidos 1-427 de ITF1 y los aminoácidos 2-452 de ITF2. Ejemplos de dominios de activación ricos en glutamina incluyen los aminoácidos 175-269 de Oct1 y los aminoácidos 132-243 de Sp1. Las secuencias de cada uno de las regiones descritas así como otros dominios de activación transcripcional han sido descritos por Seipel, K. et al. (EMBO J. (1992) 13:4961-4968). Adicionalmente, otros dominios de activación transcripcional pueden ser obtenidos a partir de los anteriores usando métodos conocidos en el estado de la técnica. Adicionalmente, el dominio de activación puede ser el dominio de activación de los receptores nucleares del grupo H, de los receptores nucleares de hormonas tiroideas o esteroideas, el dominio de activación de VP16, de GAL4, de NF- κ B, de B42, de BP64, o de p65.

En una forma preferida de realización, el dominio de activación transcripcional es la proteína 16 del virión del herpes simplex (en adelante VP16), cuya secuencia de aminoácidos ha sido descrita por Triezenberg, S. J. et al. (Genes Dev., 1988, 2:718-729). Este dominio puede estar formado por en torno a 127 aminoácidos del extremo C-terminal de VP16. Alternativamente, el dominio de activación transcripcional puede estar formado por los 11 aminoácidos de la región C-terminal de VP16 y que mantienen la capacidad de activar la transcripción. Regiones adecuadas del extremo C-terminal de VP16 adecuadas para su uso como dominios de activación transcripcional han sido descritos por Seipel, K. et al. (EMBO J. (1992) 13:4961-4968). En una forma aún más preferida, el activador transcripcional comprende la región mínima de dicha proteína formada por 13 aminoácidos cuya secuencia es PADALDDFDLML (SEQ.ID.NO.:5) tal y como ha sido descrito por Baron et al. (Nucleic Acids. Res., 1997, 25:2723-2729).

En una forma preferida de realización el activador transcripcional es un activador transcripcional activable por tetraciclina o sus análogos.

El término “análogo de tetraciclina”, según se usa en la presente invención, se refiere a compuestos estructuralmente relacionados con tetraciclina con capacidad de unión al represor de tetraciclina (TetR) con una K_a de al menos en torno a 10^{-6} M⁻¹.

Preferiblemente, el análogo de tetraciclina tiene una afinidad por el TetR de al menos 10^{-9} M^{-1} . Ejemplos de análogos de tetraciclina adecuados para la presente invención incluyen, sin limitación, anhidrotetraciclina, doxiciclina (Dox), clorotetraciclina, oxitetraciclina, epioxitetraciclina, cianotetraciclina, demeclociclina, meclociclina, metociclina y otros de los que han sido descritos por Hlavka and Boothe, "The Tetracyclines," en "Handbook of Experimental Pharmacology 78, R. K. Blackwood et al. (eds.), Springer-Verlag, Berlin-New York, 1985; L. A. Mitscher, "The Chemistry of the Tetracycline Antibiotics", Medicinal Research 9, Dekker, N.Y., 1978; Noyee Development Corporation, "Tetracycline Manufacturing Processes" Chemical Process Reviews, Park Ridge, N.J., 2 volumes, 1969; R. C. Evans, "The Technology of the Tetracyclines", Biochemical Reference Series 1, Quadrangle Press, New York, 1968; and H. F. Dowling, "Tetracycline", Antibiotic Monographs, no. 3, Medical Encyclopedia, New York, 1955.

En una forma preferida de realización, el transactivador activable por tetraciclinas puede ser el denominado proteína represora de tetraciclina reversa, o tetR reverso, que se refiere a un polipéptido que (i) muestra afinidad específica por el agente inductor, (ii) muestra afinidad específica por el elemento de respuesta del tipo tet cuando se encuentra unido al agente inductor y (iii) se desplaza del elemento tet cuando no se encuentra unido al agente inductor. Este activador incluye tanto formas naturales del mismo como derivados funcionales. En una forma preferida de realización, el activador regulable por tetraciclinas puede ser el denominado transactivador reverso dependiente de tetraciclina (rtTA) caracterizados por que en presencia de tetraciclina o de sus análogos sufren un cambio conformacional que los permite convertirse en activadores de la transcripción, siendo inactivos en ausencia de tetraciclina. De esta forma se evitan los problemas asociados con los transactivadores derivados del represor TetR de *E. coli* que es capaz de activar la transcripción de genes que presentan elementos de respuesta a tetraciclina en ausencia de tetraciclina y que, en presencia de tetraciclina, dejarían de activar. Los transactivadores reversos dependiente de tetraciclina (rtTA) incluyen, preferiblemente, el transactivador rtTA o cualquiera de las variantes de rtTA descritas por Urlinger, S. et al. (Proc.Natl.Acad.Sci USA, 2000; 97:7963–7968). En una forma preferida de realización, la variante de rtTA es la variante conocida como rtTA-M2,

caracterizada en que requiere para su activación una concentración doxiciclina 10 veces menor que la que requiere el rtTA original. El transactivador rtTA-M2 es un polipéptido codificado por el polinucleótido de secuencia SEQ.ID.NO.: 6.

El elemento (b) de la primera secuencia nucleotídica de la construcción génica de la invención comprende, adicionalmente, una secuencia de poliadenilación que se encuentra en posición 3' con respecto al polinucleótido que codifica el transactivador. La expresión "secuencia de poliadenilación" o "señal de poliadenilación", según se usa en la presente invención, se refiere a un ácido nucleico que contiene una señal de terminación de la transcripción y que, cuando aparece en un transcrito de ARN, permite que dicho transcrito sea poliadenilado en presencia de una enzima con actividad poliadenil transferasa. La "poliadenilación", según se usa aquí, se refiere a la adición de un tramo de poliadeninas al extremo 3' del ARNm. Señales de poliadenilación adecuadas para su uso en la presente invención incluyen sin limitación, la señal de poliadenilación temprana-tardía de SV40, la señal de poliadenilación de la timidina quinasa de HSV, la señal de poliadenilación del gen de la protamina, la señal de poliadenilación de E1b de adenovirus 5, la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina, la señal de poliadenilación de la variante humana de la hormona de crecimiento y similares.

En una forma preferida de realización, la señal de poliadenilación es una señal de poliadenilación bidireccional. El uso de una señal poliadenilación bidireccionales es particularmente ventajoso cuando la construcción génica de la invención se va a expresar usando vectores virales en los que las secuencias de terminación tienen cierta actividad promotora de la transcripción (en particular AAVs, lentivirus). De esta manera se evita que pueda interferir con el sistema inducible, y reducir así la actividad basal). En una forma de realización aún más preferida, la señal de poliadenilación bidireccional corresponde a la señal de poliadenilación de SV40. En una forma de realización aún más preferida, la señal de poliadenilación de SV40 comprende la secuencia SEQ.ID.NO.:7.

Segunda secuencia nucleotídica de la construcción génica de la invención

La construcción génica de la invención comprende, adicionalmente, un polinucleótido que se encuentra operativamente acoplado a la segunda secuencia promotora hepatoespecífica y una señal de poliadenilación situada en posición 3' con respecto al polinucleótido de interés.

Los términos “secuencia nucleotídica”, “polinucleótido”, “secuencia promotora hepatoespecífica”, “control operativo” y “señal de polidenilación” han sido definidos con anterioridad y se utilizan en la primera secuencia nucleotídica de la misma forma que en la primera secuencia nucleotídica de expresión. El término “polinucleótido de interés”, según se usa en la presente invención, se refiere a una secuencia de ADN cuya manipulación es deseable por distintos motivos e incluye ADN, ADNc, ADN genómico, ARN o análogos de ácidos nucleicos así como las correspondientes moléculas antisentido que son capaces de generar una proteína o molécula de ARN como por ejemplo, y de manera no limitante, ARN interferente pequeño (ARNip), ARN de bucle corto (shRNA) o ribozimas.

En una forma preferida de realización, el polinucleótido de interés codifica un polipéptido. Este polipéptido puede ser un gen reportero de tipo de luciferasa, proteína verde fluorescente (GFP), variantes de GFP (EGFP, YFP o BFP), fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, beta-glucuronidasa, catecol deshidrogenasa.

Alternativamente, el polinucleótido de interés codifica un polipéptido cuya expresión en el hígado o en células hepáticas es útil para la corrección de trastornos hepáticos que se beneficiarán mediante la expresión de dicho polipéptido. Así, polipéptidos adecuados para su uso en el tratamiento de alteraciones hepáticas incluyen, sin limitación, un interferón α y, en concreto, un IFN- α seleccionado del grupo de IFN- α 2a, IFN- α 2b, IFN- α 4, IFN- α 5, IFN- α 8, oncostatina, cardiotrofina, IL-6, IGF-I y variantes del mismo, anfiregulina, IL-15, IL-12, CD134, CD137, PBGD, anticuerpos, inhibidores de TGF- β 1 tales como los péptidos P17 Y P144 descritos en las solicitudes internacionales de patente WO0031135, WO200519244 y WO0393293 que se incorporan aquí mediante

referencia, inhibidores de IL-10, inhibidores FoxP3, inhibidores TNF α , inhibidores VEGF, inhibidores PD-1 e inhibidores CD152.

En una forma preferida de realización, el polinucleótido de interés codifica IL-12 o una variante funcionalmente equivalente de la misma. La interleuquina-12 (IL-12) es una citoquina de tipo I que se secreta mayormente por macrófagos y células dendríticas, que incluye tanto la IL-12 nativa como la IL-12 preparada de forma recombinante y que es capaz de aumentar la inmunidad antitumoral a través de múltiples mecanismos que incluyen: (1) aumento de las respuestas de linfocitos T citotóxicos, (2) activación de células citolíticas naturales (NK, natural killer), (3) fomento de la proliferación de células citolíticas naturales y linfocitos T, (4) inducción de la polarización de una subserie de células T auxiliares de tipo 1 (Th1, T helper 1), y (5) inducción de un efecto antiangiogénico. Muchas de estas actividades están mediadas por la producción y secreción de interferón- γ (INF- γ) por las células citolíticas naturales y linfocitos T activados.

La citoquina IL-12 es un heterodímero que consta de una cadena pesada (p40) y una cadena ligera (p35). Las secuencias de las cadenas ligera y pesada de origen humano han sido descritas por Gubler et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 1991, 88:4143). El polinucleótido de interés puede codificar la cadena pesada si la cadena ligera se aporta de forma exógena, puede codificar la cadena ligera si la cadena pesada se aporta exógenamente o puede codificar ambas cadenas. El polinucleótido que codifica IL-12 da lugar a un único ARN que comprende dos marcos abierto de lectura separados entre sí por un sitio interno de entrada ribosomal lo que lleva a la expresión de cada una de las cadenas a partir de cada uno de los marcos abiertos de lectura. Preferiblemente, el polinucleótido que codifica IL-12 comprende un único marco abierto de lectura que codifica una proteína de fusión que comprende las cadenas ligeras y pesadas unidas entre sí por un enlazador tal y como ha sido descrito en WO9624676 y en Lieschke GJ. et al. (Nat Biotechnol. 1997, 15:35-40). En una forma preferida, el polinucleótido que codifica IL-12 de cadena sencilla comprende la secuencia de SEQ.ID.NO.:8.

El término “variante funcionalmente equivalente”, según se usa en la presente invención, se refiere a polipéptidos que difieren de la secuencia de la IL-12 por medio de una o más inserciones, deleciones o sustituciones pero que mantienen sustancialmente la actividad biológica de IL-12. La variante funcionalmente equivalente de IL-12 adecuadas para su uso en la presente invención presentan una identidad de secuencia con dicha citoquina de al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99%. El grado de identidad entre las variantes y las citoquinas inmunoestimuladoras se determina utilizando algoritmos y métodos de ordenador que son ampliamente conocidos por los expertos en la materia. La identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina preferiblemente utilizando el algoritmo BLASTP [BLASTManual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., et al., J Mol Biol, 215: 403-410 (1990)]. Funciones de IL-12 que puede ser monitorizadas para determinar si un determinado polipéptido es una variante funcionalmente equivalente de IL-12 incluye, sin limitación, diferenciación de células T inmaduras en células Th1, estimulación del crecimiento y función de las células T, síntesis de IFN- γ y TNF- α por células NK (natural killer), reducción de la supresión de IFN- γ mediada por IL-4, aumento de la actividad citotóxica de las células NK y de los linfocitos CD8+, estimulación de la expresión de las cadenas beta 1 y beta 2 del receptor de IL-12 y actividad anti-angiogénica. Preferiblemente, la determinación de la actividad IL-12 de una variante se lleva a cabo mediante la medida de la capacidad de aumentar la inmunidad antitumoral, determinada por ejemplo por medio del ensayo descrito por Zabala, M. 2007 et al., [J Hepatology, vol. 47(6): 807-815].

VECTORES, GENOMAS VIRALES Y VIRIONES DE LA INVENCION

La construcción génica de la invención puede presentarse de forma aislada. No obstante, con el fin de facilitar su manipulación y propagación, es conveniente incorporar la construcción en un vector. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un vector que comprende una construcción génica de la invención.

Según se usa en la presente invención, el término “vector”, se refiere a un vehículo por el que un polinucleótido o una molécula de ADN puede ser manipulada o introducida en una célula. El vector puede ser un polinucleótido lineal o circular o puede ser un polinucleótido de mayor tamaño o cualquier otro tipo de construcción tal y como el ADN o el ARN de un genoma viral, un virión o cualquier otra construcción biológica que permite la manipulación del ADN o su introducción en la célula. Se entiende que la expresiones “vector recombinante”, “sistema recombinante” se pueden usar de forma intercambiable con el término vector. El experto en la materia apreciará que no existe limitación en cuanto al tipo de vector que puede ser utilizado ya que dicho vector puede ser un vector de clonaje adecuado para la propagación y para obtener los polinucleótidos o construcciones génicas adecuadas o vectores de expresión en distintos organismos heterólogos adecuados para la purificación de los conjugados. Así, vectores adecuados de acuerdo a la presente invención incluyen vectores de expresión en procariotas tales como pUC18, pUC19, Bluescript y sus derivados, mp18, mp19, pBR322, pMB9, CoIE1, pCR1, RP4, fagos y vectores “shuttle” tales como pSA3 y pAT28, vectores de expresión en levaduras tales como vectores del tipo de plásmidos de 2 micras, plásmidos de integración, vectores YEP, plásmidos centroméricos y similares, vectores de expresión en células de insectos tales como los vectores de la serie pAC y de la serie pVL, vectores de expresión en plantas tales como vectores de la serie pIBI, pEarleyGate, pAVA, pCAMBIA, pGSA, pGWB, pMDC, pMY, pORE y similares y vectores de expresión en células eucariotas superiores bien basados en vectores virales (adenovirus, virus asociados a los adenovirus así como retrovirus y lentivirus) así como vectores no virales tales como pSilencer 4.1-CMV (Ambion), pcDNA3, pcDNA3.1/hyg pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1, pZeoSV2, pCI, pSVL y pKSV-10, pBPV-1, pML2d y pTDTL.

El vector de la invención puede ser utilizado para transformar, transfectar o infectar células susceptibles de ser transformadas, transfectadas o infectadas por dicho vector. Dichas células pueden ser procariotas o eucariotas. A modo de ejemplo, el vector donde se introduce dicha secuencia de ADN puede ser un plásmido o un vector que, cuando se introduce en una célula hospedadora, se integra en el genoma de dicha célula y se

replica junto con el cromosoma (o cromosomas) en el que (o en los que) se ha integrado. La obtención de dicho vector puede realizarse por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia (Sambrook et al., 2001, citado *supra*).

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una célula que comprende un polinucleótido, una construcción génica o un vector de la invención, para lo cual dicha célula ha podido ser transformada, transfectada o infectada con una construcción o vector proporcionado por esta invención. Células transformadas, transfectadas o infectadas pueden ser obtenidas por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia (Sambrook et al., 2001, citado *supra*). En una realización particular, dicha célula hospedadora es una célula animal transfectada o infectada con un vector apropiado.

Células huésped adecuadas para la expresión de los conjugados de la invención incluyen, sin estar limitado, células de mamíferos, plantas, insectos, de hongos y de bacterias. Células bacterianas incluyen, sin estar limitado, células de bacterias Gram positivas tales como especies del género *Bacillus*, *Streptomyces* y *Staphylococcus* y células de bacterias Gram negativas tales como células del género *Escherichia* y *Pseudomonas*. Células de hongos incluyen, preferiblemente, células de levaduras tales como *Saccharomyces*, *Pichia pastoris* y *Hansenula polymorpha*. Células de insectos incluyen, sin limitación, células de *Drosophila* y células Sf9. Células de plantas incluyen, entre otros, células de plantas de cultivos tales como cereales, plantas medicinales, ornamentales o de bulbos. Células de mamíferos adecuadas para en la presente invención incluyen líneas celulares epiteliales (porcinas, etc.), líneas celulares de osteosarcoma (humanas, etc.), líneas celulares de neuroblastoma (humanas, etc.), carcinomas epiteliales (humanos, etc.), células gliales (murinas, etc.), líneas celulares hepáticas (de mono, etc.). células CHO (Chinese Hamster Ovary), células COS, células BHK, células HeLa, 911, AT1080, A549, 293 o PER.C6, células ECCs humana NTERA-2, células D3 de la línea de mESCs, células troncales embrionarias humanas tales como HS293 y BGV01, SHEF1, SHEF2 y HS181, células NIH3T3, 293T, REH y MCF-7 y células hMSCs.

Alternativamente, la construcción génica de la invención puede estar formando parte de un genoma viral recombinante. Así, en otra forma de realización, la invención se relaciona con un genoma viral recombinante que comprende una construcción génica de acuerdo a la invención. El término “genoma viral”, según se usa en la presente invención, se refiere al complemento genético de un virus bien completo o bien manipulado de forma que se hayan eliminado los elementos no esenciales manteniendo los elementos esenciales de forma que se mantenga la funcionalidad adecuada para infectar, transducir e introducir una secuencia de nucleótidos de interés a una célula diana.

En una forma preferida de realización, el genoma viral que comprende la construcción de la invención es el genoma de un virus adeno-asociado recombinante. Según se usa aquí, el término “virus adenoasociado” (AVV) incluye cualquier serotipo de AAV. En general, los serotipos de AAV tienen secuencias genómicas de homología significativa a nivel de aminoácidos y ácido nucleico, proporcionan un serie idéntica de funciones genéticas, producen viriones que son esencialmente física y funcionalmente equivalentes, y se replican y ensamblan mediante mecanismos prácticamente idénticos. En particular, la invención se puede llevar a cabo usando el serotipo 1 de AAV (AAV1), AAV2, AAV3 (incluyendo los tipos 3A y 3B), AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV aviar, AAV bovino, AAV canino, AAV equino, AAV ovino, y cualquier otro AAV conocido ahora o descubierto más adelante. Ver por ejemplo, Fields et al., *Virology*, volumen 2, capítulo 69 (4^a ed., Lippincott-Raven Publishers). Recientemente, se han identificado un número de putativos nuevos serotipos y clados de AAV (ver, por ejemplo, Gao et al., (2004) *J. Virology* 78:6381-6388; Moris et al., (2004) *Virology* 33:375-383). Las secuencias genómicas de varios serotipos de AAV y los parvovirus autónomos, así como las secuencias de las repeticiones terminales invertidas (ITR), proteínas Rep, y subunidades de la cápside son conocidas en la técnica. Tales secuencias se pueden encontrar en la bibliografía o en bases de datos públicas tal como GenBank. Ver por ejemplo, Números de acceso de GenBank NC_002077, NC_001401, NC_001729, NC_001863, NC_001829, NC_001862, NC_000883, NC_001701, NC_001510, NC_006152, NC_006261, AF063497, U89790, AF043303, AF028705, AF028704, J02275, J01901, J02275,

X01457, AF288061, AH009962, AY028226, AY028223, NC_001358, NC_001540, AF513851, AF513852, AY530579; las divulgaciones de los cuales se incorporan aquí mediante referencia para enseñanza de secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos de parvovirus y AAV. Ver también, por ejemplo, Srivistava et al., (1983) *J. Virology* 45:555; Chiorini et al., (1998) *J. Virology* 71:6823; Chiorini et al., (1999) *J. Virology* 73:1309; Bantel-Schaal et al., (1999) *J. Virology* 73:939; Xiao et al., (1999) *J. Virology* 73:3994; Muramatsu et al., (1996) *Virology* 221: 208; Shade et al., (1986) *J. Virol.* 58:921; Gao et al., (2002) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 99:11854; Moris et al., (2004) *Virology* 33-: 375-383; publicaciones de patentes internacionales WO 00/28061, WO 99/61601, WO 98/11244; y patente de EE.UU. No. 6156303; las divulgaciones de los cuales se incorporan aquí mediante referencia para una descripción de las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos de AAV.

Típicamente, el “genoma recombinante de AAV” (o “genoma rAAV”) se refiere a un vector que comprende una o más secuencias de polinucleótidos de interés, genes de interés o “transgenes” que están flanqueados por al menos una secuencia de repetición terminal invertida (ITR) de parvovirus o AAV. Tales vectores rAAV se pueden replicar y empaquetar en partículas víricas infecciosas cuando están presentes en una célula huésped que expresa los productos de los genes rep y cap de AAV (es decir las proteínas Rep y Cap de AAV). Cuando un vector rAAV se incorpora en una construcción de ácido nucleico mayor (por ejemplo, en un cromosoma o en otro vector tal como un plásmido o baculovirus usado para clonación o transfección), el vector rAAV se refiere típicamente como un “pro-vector” que se puede “rescatar” mediante replicación y encapsidación en presencia de funciones empaquetadoras de AAV y funciones auxiliares necesarias.

Así, en una forma preferida de realización, el genoma viral recombinante de la invención comprende la construcción génica de la invención y al menos una ITR de AAV. Preferiblemente, la construcción génica de la invención se encuentra flanqueada por ITRs de AAV. Las repeticiones terminales invertidas (ITR) están típicamente presentes en al menos dos copias en el vector AAV, típicamente flanqueando la construcción génica de la invención. Las ITR típicamente estarán en los extremos 5' y

3' de la construcción génica de la invención pero no necesitan ser contiguas a ella. Las repeticiones terminales pueden ser iguales o diferentes entre sí. El término "repetición terminal" incluye cualquier repetición terminal vírica y/o secuencias parcial o completamente sintéticas que forman estructuras en horquilla y funcionan como repeticiones terminales invertidas, tal como la "secuencia doble D" descrita en la patente de los Estados Unidos No. 5478745 a Salmulski y col. Una "repetición terminal de AAV" puede ser de cualquier AAV, incluyendo pero no limitado a los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, ó 12 o cualquier otro AAV conocido ahora o descubierto con posterioridad. La repetición terminal de AAV no necesita tener una secuencia salvaje (por ejemplo, una secuencia salvaje puede estar alterada por inserción, delección, truncamiento o mutaciones sin sentido), mientras la repetición terminal medie las funciones deseadas, por ejemplo, replicación, corte, empaquetamiento de virus, integración, y/o rescate de provirus, y similares. El genoma del vector puede comprender una o más (por ejemplo, dos) repeticiones terminales de AAV, que pueden ser iguales o diferentes. Además, una o más repeticiones terminales de AAV pueden ser del mismo serotipo de AAV que la cápside de AAV, o puede ser diferente. En formas de realización particulares, el genoma del vector comprende una repetición terminal de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 y/o AAV12, en particular de AAV1, AAV2 y/o AAV4. En una forma de realización preferida, las ITR pueden derivar de AAV2 y se pueden definir mediante SEQ.ID.NO.:9 (5'-ITR) y SEQ.ID.NO.:10 (3'-ITR).

Aunque se prefiere que las secuencias de ácidos nucleicos que codifican los genes de la cápside estén proporcionadas en *trans* por la célula empaquetadora o por un segundo vector, la invención también contempla genomas AAV que comprenden además una secuencia que codifica una o más proteínas de la cápside que empaqueta la secuencia de polinucleótido mencionada anteriormente. Las secuencias que codifican las proteínas de cápside VP1, VP2 y VP3 para su uso en el contexto de la presente invención pueden proceder de cualquiera de los 42 serotipos conocidos, más preferiblemente de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 o AAV9 o partículas similares a AAV recién desarrolladas obtenidas mediante, por ejemplo técnicas de mezcla de la cápside y librerías de cápside de AAV. Cuando las secuencias que codifican las

proteínas de la cápside derivan de un serotipo de AAV diferente que las ITR, el genoma de AAV se conoce como genoma de AAV “híbrido” (es decir, en el que la cápside de AAV y las repeticiones terminales de AAV son de diferentes AAV) como se describe en la publicación de patente internacional WO 00/28004 y Chao et al., (Molecular Therapy 2000, 2:619). Según se describe aquí, el vector rAAV puede ser cualquier vector rAAV adecuado conocido ahora o descubierto más adelante. De forma alternativa, las secuencias que codifican los genes de la cápside se pueden proporcionar en trans mediante cotransfección en la célula empaquetadora de un polinucleótido que codifica dichas proteínas de la cápside. En una forma de realización preferida, el vector viral comprende ITR de AAV1, AAV2 y/o AAV4 y uno o más o todos los genes de la cápside de AAV1, AAV2, AAV5, AAV6 o AAV8.

Opcionalmente, los genomas de AAV de la invención pueden comprender secuencias adicionales que codifican proteínas Rep. Las secuencias que codifican Rep (Rep78/68 y Rep52/40) derivan preferiblemente de AAV1, AAV2 y/o AAV4. Las secuencias Rep e ITR de AAV están particularmente conservadas entre la mayoría de los serotipos. Las proteínas Rep78 de varios serotipos de AAV son por ejemplo, más del 89% idénticas y la identidad total de la secuencia de nucleótidos a nivel del genoma entre AAV2, AAV3A, AAV3B y AAV6 es alrededor del 82% (Bantel-Schaal et al., 1999, J. Virol., 73:939-947). Además, se sabe que las secuencias Rep y las ITR de la muchos serotipos de AAV trans-complementan (es decir, se sustituyen funcionalmente) de forma eficaz las secuencias correspondientes de otros serotipos en la producción de partículas de AAV en células de mamífero. US2003148506 describe que las secuencias Rep e ITR de AAV también trans-complementan eficazmente otras secuencias Rep e ITR de AAV en células de insecto.

Se sabe que las proteínas VP de AAV determinan el tropismo celular del virión AAV. Las secuencias que codifican las proteínas VP están significativamente menos conservadas que las proteínas y genes Rep entre los diferentes serotipos de AAV. La capacidad de las secuencias Rep e ITR para trans-complementar las secuencias correspondientes de otros serotipos permite la producción de partículas rAAV pseudotipadas que comprenden las proteínas de la cápside de un serotipo (por ejemplo,

AAV5) y las secuencias Rep y/o ITR de otro serotipo de AAV (por ejemplo, AAV2). Tales partículas rAAV pseudotipadas son parte de la presente invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un virión obtenible expresando un genoma viral de acuerdo con la presente invención en una célula empaquetadora adecuada. Los términos “virión”, “partícula de virus recombinante” y “vector viral” se usan aquí de forma intercambiable y se refieren a una partícula de virus infecciosa, deficiente en replicación, que comprende el genoma vírico empaquetado en una cápside y, opcionalmente, en una envuelta lipídica rodeando la cápside. En una forma de realización preferida, el virión es un virión AAV. En otra forma de realización, si el virión se obtiene empaquetando un vector AAV de la invención, el virión de la invención es un “virión AAV recombinante”. El término, “virión AAV recombinante” o “virión rAAV”, como se usa aquí, se refiere a un virus infeccioso, deficiente en replicación compuesto de un armazón proteico de AAV encapsidando un polinucleótido que comprende la construcción génica de la invención flanqueada en ambos extremos por los ITRs de AAV.

El término “proteína Cap”, como se usa aquí, se refiere a un polipéptido que tiene al menos una actividad funcional de una proteína Cap nativa de AAV (por ejemplo, VP1, VP2, VP3). Ejemplos de actividades funcionales de proteínas Cap (por ejemplo, VP1, VP2, VP3) incluyen la capacidad de inducir la formación de una cápside, facilitar la acumulación de ADN monocatenario, facilitar el empaquetamiento de ADN de AAV en cápsides (es decir, encapsidación), unión a receptores celulares, y facilitar la entrada del virión en las células huésped. En una forma de realización preferida, la secuencia de polinucleótidos que codifica el gen cap corresponde al gen cap de AAV8. El armazón de un virión AAV muestra simetría icosaédrica y normalmente contiene una proteína Cap principal, normalmente la menor de la proteína Cap, y una o dos proteína o proteínas Cap minoritarias.

El término “proteína Rep”, como se usa aquí, se refiere a un polipéptido que tiene al menos una actividad funcional de una proteína Rep nativa de AAV (por ejemplo, Rep 40, 52, 68, 78). Una “actividad funcional” de una proteína Rep (por ejemplo, Rep 40,

52, 68, 78) es cualquier actividad asociada con la función fisiológica de la proteína, incluyendo facilitar la replicación del ADN mediante reconocimiento, unión y corte del origen de replicación de ADN de AAV así como actividad ADN helicasa. Funciones adicionales incluyen la modulación de la transcripción de promotores de AAV (u otro heterólogo) e integración específica de sitio de ADN de AAV en un cromosoma huésped. En una forma de realización preferida, la secuencia de polinucleótidos que codifica el gen rep corresponde al gen rep de AAV2.

El experto en la materia entenderá que los viriones AAV de la invención pueden comprender proteínas de cápside de cualquier serotipo de AAV. Sin embargo, debido al diferente tropismo de los serotipos conocidos de AAV por diferentes células, los viriones AAV contendrán una proteína de la cápside que es más adecuada para la distribución a las células hepáticas. Para la transducción de células hepáticas los viriones rAAV con proteínas de la cápside de AAV1, AAV8 y AAV5 son preferidos (Nathwani et al., 2007, *Blood* 109: 1414–1421; Kitajima et al., 2006, *Atherosclerosis* 186:65-73).

Las secuencias que codifican Rep (Rep78/68 y Rep52/40) pueden ser de cualquier serotipo de AAV, pero preferiblemente derivan de AAV1, AAV2 y/o AAV4. Las secuencias que codifican las proteínas de la cápside VP1, VP2 y VP3 para su uso en el contexto de la presente invención se pueden sin embargo tomar de cualquiera de los 42 serotipos conocidos, más preferiblemente de AAV1, AAV2, AAV5, AAV6 o AAV8.

La invención también contempla viriones que comprenden una cápside y un genoma vírico recombinante, en donde se ha insertado o sustituido una secuencia exógena de direccionamiento en la cápside nativa. El virión se dirige preferiblemente (es decir, dirigida a un tipo o tipos particulares de célula) mediante la sustitución o inserción de la secuencia exógena de direccionamiento en la cápside. Expresado de forma alternativa, la secuencia exógena de direccionamiento preferiblemente confiere un tropismo alterado al virión. Como una exposición adicional alternativa, la secuencia de direccionamiento aumenta la eficacia de distribución del vector dirigido a una célula.

La(s) secuencia(s) exógena(s) de direccionamiento pueden cambiar o sustituir parte de o toda una subunidad de la cápside, alternativamente, más de una subunidad de la cápside. Como una alternativa adicional, se puede introducir más de una secuencia exógena de direccionamiento (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco o más secuencias) en la cápside del virión. En formas de realización alternativas, se prefieren las inserciones y sustituciones en las subunidades minoritarias de la cápside (por ejemplo, VP1 y VP2 de AAV). Para cápsides AAV, las inserciones o sustituciones en VP2 y VP3 también son preferidas.

En formas de realización más preferidas, la secuencia exógena de direccionamiento puede ser una secuencia de aminoácidos que codifica un péptido o proteína, que se inserta o sustituye en la cápside del virión para cambiar el tropismo del virión. El tropismo del virión nativo se puede reducir o eliminar mediante inserción o sustitución de la secuencia de aminoácidos. Alternativamente, la inserción o sustitución de la secuencia exógena de aminoácidos puede dirigir el virión a un tipo de células particular. La secuencia exógena de direccionamiento puede ser cualquier secuencia de aminoácidos que codifique una proteína o péptido que cambia el tropismo del virión. En formas de realización particulares, el péptido o proteína de direccionamiento puede ser natural o, de forma alternativa, completa o parcialmente sintética. Péptidos y proteínas ejemplares incluyen ligandos y otros péptidos que se unen a receptores de la superficie celular presentes en células de hígado incluyen ligandos capaces de unirse al receptor Sr-B1 para apolipoproteína E, lectinas específicas de galactosa y lactosa, ligandos del receptor de lipoproteínas de baja densidad, ligandos de asialoglicoproteína (galactosa-terminal) y similares.

De forma alternativa, la secuencia exógena de direccionamiento puede ser un anticuerpo o un grupo de reconocimiento del antígeno del mismo. El término “anticuerpo” como se usa aquí se refiere a todos los tipos de inmunoglobulinas, incluyendo IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE. Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales y pueden ser de cualquier especie de origen, incluyendo (por ejemplo) ratón, rata, conejo, caballo, o ser humano, o pueden ser anticuerpos quiméricos. El término “anticuerpo” también abarca anticuerpos biespecíficos o “de puente” conocidos por los expertos en la materia. Los

fragmentos de anticuerpos dentro del ámbito de la presente invención incluyen, por ejemplo, fragmentos Fab, F(ab')₂ y Fc, y los fragmentos correspondientes obtenidos de anticuerpos diferentes de IgG. Tales fragmentos se pueden producir por técnicas conocidas. Marcadores hepáticos de superficie que pueden ser usados para el direccionamiento de los rAAV de la invención incluyen, sin limitación, el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B y LDL.

La secuencia exógena de aminoácidos insertada en la cápside del virión puede ser una que facilite la purificación o detección del virión. Según este aspecto de la invención, no es necesario que la secuencia exógena de aminoácidos también cambie el virión del parvovirus modificado. Por ejemplo, la secuencia exógena de aminoácidos puede incluir una secuencia de poli-histidina que es útil para purificar el virión sobre una columna de níquel, como saben los expertos en la materia o se puede emplear un péptido o proteína antigénicos para purificar el virión mediante técnicas estándar de inmunopurificación. Alternativamente, la secuencia de aminoácidos puede codificar un ligando de receptor o cualquier otro péptido o proteína que se puede usar para purificar el virión modificado mediante purificación de afinidad o cualquier otro método conocido en la técnica (por ejemplo técnicas de purificación basadas en tamaño, densidad, carga, o punto isoeléctrico diferencial, cromatografía de intercambio iónico, o cromatografía de péptidos). Las inserciones de secuencias exógenas de direccionamiento o de purificación se pueden insertar en cualquier proteína de la cápsida siempre que la inserción no implique la capacidad de dicha proteína de ensamblarse. En particular, es preferible insertar la secuencia exógena de aminoácidos en las subunidades Cap minoritarias del AAV, por ejemplo en las subunidades VP1 y VP2 de AAV. De forma alternativa, es posible realizar las inserciones en VP2 o VP3. Los viriones AAV preferidos pueden ser modificados para reducir la respuesta del huésped (véase, por ejemplo, Russell (2000, J. Gen. Virol. 81:2573-2604), US20080008690 y Zaldumbide y Hoeben (Gene Therapy, 2008:239-246).

Los viriones recombinantes de la invención se pueden preparar usando tecnología estándar para la preparación de AAV. Típicamente, los rAAV se preparan mediante la introducción en una célula hospedadora adecuada del genoma viral de acuerdo a la

invención y la co-expresión en dicha célula de proteína rep de AAV, una proteína cap de AAV y, opcionalmente, una secuencia de ácidos nucleico que codifica funciones víricas y/o celulares de las que depende AAV para la replicación.

Para facilitar el empaquetamiento, el genoma del vector recombinante es generalmente de alrededor del 80% hasta alrededor del 105% del tamaño del genoma salvaje y comprende una señal de empaquetamiento adecuada. Para facilitar el empaquetamiento en una cápside AAV, el genoma es preferiblemente aproximadamente 5,2 kb de tamaño o menos. En otras formas de realización, el genoma es preferiblemente mayor de alrededor de 3,6, 3,8, 4,0, 4,2 ó 4,4 kb de longitud y/o menos de alrededor de 5,4, 5,2, 5,0 ó 4,8 kb de longitud. Dicho de forma alternativa, la(s) secuencia(s) heteróloga(s) de nucleótidos serán típicamente de menos de alrededor de 5,0 kb de longitud (más preferiblemente menos de alrededor de 4,8 kb, todavía más preferiblemente menos de alrededor de 4,4 kb de longitud, aún más preferiblemente menos de alrededor de 4,2 kb de longitud) para facilitar el empaquetamiento del genoma recombinante por la cápside de AAV.

Las secuencias de ácidos nucleicos necesarias para la producción del virión de la invención son las denominadas “funciones auxiliares de AAV” y comprenden una, o ambas de las ORF principales de AAV, es decir las regiones que codifican rep y cap, u homólogos funcionales de las mismas. Secuencias de ácido nucleico adecuadas que codifican las proteínas rep y cap para su uso en el método de la invención se han descrito en detalle anteriormente en relación con los viriones de la invención. El experto en la materia apreciará, sin embargo, que las secuencias auxiliares que codifican las proteínas rep y cap de los AAV se pueden proporcionar a partir de uno, dos o más vectores en varias combinaciones. Como se usa aquí, el término “vector” incluye cualquier elemento genético, tal como un plásmido, fago, transposón, cósmido, cromosoma, cromosoma artificial, virus, virión, etc., que es capaz de replicación cuando se asocia con los elementos de control adecuados y que puede transferir secuencias de genes entre células. De esta manera, el término incluye vehículos de clonación y expresión, así como vectores virales. Alternativamente, los genes rep y/o cap de AAV se pueden proporcionar de forma alternativa por una célula empaquetadora que expresa

estos genes establemente (ver, por ejemplo, Gao et al., (1998) *Human Gene Therapy* 9:2353; Inoue et al., (1998) *J. Virol.* 72:7024; patente de EE.UU. No. 5837484; WO 98/27207; patente de EE.UU. No. 5658785; WO 96/17947).

En una forma de realización preferida, los polinucleótidos que codifican las proteínas rep y cap se pueden proporcionar a partir de un único vector individual, al que normalmente se refiere como un vector de función auxiliar de AAV. Ejemplos de vectores adecuados para su uso con la presente invención incluyen pHLP19, descrito en la patente de EE.UU. No. 6001650, y el vector pRep6cap6, descrito en la patente de EE.UU. No. 6156303, la divulgación de las cuales se incorpora aquí mediante referencia en su totalidad.

En otras formas de realización particulares, las secuencias adicionales están en forma de un virus adenovirus auxiliar que puede ser un virus auxiliar híbrido que codifica las proteínas Rep y/o de la cápside de AAV. Los vectores híbridos ayudantes Ad/AAV que expresan los genes rep y/o cap de AAV y métodos para producir las reservas de AAV usando estos reactivos son conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, patente de EE.UU. No. 5589377; y patente de EE.UU. No. 5871982, patente de EE.UU. No. 6251677; y patente de EE.UU. No. 6387368). Preferiblemente, el Ad híbrido de la invención expresa las proteínas de la cápside de AAV (es decir, VP1, VP2 y VP3). De forma alternativa, o adicional, el adenovirus híbrido puede expresar una o más de las proteínas Rep de AAV (es decir, Rep40, Rep52, Rep68 y/o Rep78). Las secuencias de AAV pueden estar operativamente asociadas con un promotor específico de tejido o inducible.

El componente optativo para la generación de viriones recombinantes puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica funciones víricas no derivadas de AAV y/o celulares de las que AAV depende para la replicación (es decir, “funciones accesorias”). Las funciones accesorias incluyen aquellas funciones requeridas para la replicación de AAV, incluyendo, sin limitación, aquellos grupos implicados en la activación de la transcripción génica de AAV, ajuste de ARNm de AAV específico de fase, replicación de ADN de AAV, síntesis de productos de expresión de cap, y

ensamblaje de la cápside de AAV. Las funciones accesorias basadas en virus pueden derivar de cualquiera de los virus auxiliares conocidos tales como adenovirus, herpesvirus (diferentes del virus del herpes simple de tipo 1), y virus de la vacuna. Típicamente, el plásmido de empaquetamiento del vector AAV según la invención contiene como secuencias de ADN de virus auxiliar los genes E2A, E4 y VA de Ad5, que pueden derivar del plásmido pDG descrito en la solicitud de patente alemana DE196 44 500.0-41, y que están controladas por el promotor original respectivo o por promotores heterólogos.

Alternativamente, es posible la expresión de los componentes estructurales de los AAV y la puesta en contacto de éstos con el genoma viral de la invención de forma que la encapsidación tenga lugar in vitro. Para la preparación de las proteínas estructurales, se puede usar cualquier tipo de célula hospedadora adecuada. Preferiblemente, se usan células de insecto tal y como ha sido descrito por Urabe et al., (Hum. Gene Ther. 2002, 13: 1935-1943; US6723551 y US20040197895). Líneas celulares adecuadas para la expresión de los componentes estructurales de los rAAV incluyen, sin limitación, la líneas celulares de *Spodoptera frugiperda*, líneas celulares de *Drosophila*, o líneas celulares de mosquito, por ejemplo, líneas celulares derivadas de *Aedes albopictus*. La células o líneas celulares de insecto preferidas son de especies de insecto que son susceptible de infección por baculovirus, incluyendo, por ejemplo, Se301, SeIZD2109, SeUCR1, Sf9, Sf900+, Sf21, BTI-TN-5B1-4, MG-I, Tn368, HzAml, Ha2302, Hz2E5, High Five (Invitrogen, CA, EE.UU.) y expresSF+® (US 6,103,526; Protein Sciences Corp., CT, EE.UU.).

Una vez que se han ensamblado los viriones de la invención, es posible la purificación de los mismos para separarlos de aquellos componentes que no hayan pasado a formar parte de los viriones. Típicamente, los viriones se separan del resto de componentes mediante un gradiente de densidad, típicamente un gradiente de iodixanol. Tras la recuperación de la fracción que contiene los rAAV, es posible la posterior purificación de esta mediante el uso de cromatografía, que puede ser una cromatografía de intercambio iónico o de hidroxipatito. Este tipo de purificación es el preferido para la

purificación de viriones que tienen cápsides que contienen proteínas de los serotipos 1 y 5 de AAV porque estos serotipos no se unen a columnas de heparina.

Para la purificación de viriones rAAV2, la cromatografía en heparina-agarosa es preferida. Ver, por ejemplo, la patente de EE.UU. No. 6146874.

Los viriones también se purifican usando cromatografía en ausencia de centrifugación en gradiente de densidad. Como ejemplo, los lisados de células infectadas se pueden someter directamente a cromatografía para la purificación de viriones rAAV. Para métodos de producción a gran escala de vectores rAAV que implican cromatografía, ver Potter et al. (Methods Enzymol., 2002, 346:413–430).

Los viriones recombinantes se pueden usar o se puede incluir un paso adicional de purificación por afinidad de los vectores viriones usando un anticuerpo anti-AAV, preferiblemente un anticuerpo inmovilizado. El anticuerpo anti-AAV preferiblemente es un anticuerpo monoclonal. Un anticuerpo particularmente adecuado es un anticuerpo de camélido de cadena sencilla o un fragmento del mismo, obtenible por ejemplo, de camellos o llamas (ver, por ejemplo, Muyldermans, 2001, Biotechnol. 74: 277-302). El anticuerpo para la purificación por afinidad de rAAV preferiblemente es un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo de una proteína de la cápside de AAV, en donde el epítipo preferiblemente es un epítipo que está presente en proteínas de la cápside de más de un serotipo de AAV. Por ejemplo el anticuerpo se puede producir o seleccionar en base de la unión específica a la cápside de AAV2 pero al mismo tiempo también se puede unir específicamente a las cápsides de AAV1, AAV3 y AAV5.

MÉTODO IN VITRO PARA LA EXPRESIÓN IN VITRO DE POLINUCLEÓTIDO DE INTERÉS

Las construcciones génicas, vectores y viriones de la invención permiten la expresión in vitro de polinucleótidos de interés en una célula de origen hepático. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método in vitro para la expresión en una célula de origen hepático de un polinucleótido de interés que comprende las etapas de

- (i) poner en contacto dicha célula con una construcción génica de la invención, con un vector de la invención, con un genoma viral de la invención o con un virión de la invención en condiciones adecuadas para la entrada en la célula de dicha construcción, de dicho vector o de dicho virión y
- (ii) poner en contacto la célula con el agente inductor durante el tiempo necesario para que se produzca la expresión del polinucleótido de interés.

Células de origen hepático en las que se puede expresar un polinucleótido de interés usando el método in vitro de la presente invención incluyen no sólo células de cultivos primarios de hepatocitos, sino células inmortalizadas de origen hepático tales como las líneas celulares de hepatoma HepG2, COLO 587, FaO, HTC, HuH-6, HuH-7, PLC, Hep3B, BPRCL, MCA-RH777, BEL-7404, SMMC-7221, L-02, CYNK-1, PLC/PRF/5 y MCA-RH8994, así como líneas inmortalizadas de forma experimental mediante la expresión de oncogenes virales o celulares, tales como las células de las líneas Fa2N-4 y Ea1C-35.

El método de expresión in vitro de acuerdo a la invención comprende una primera etapa en el que la célula de origen hepático se pone en contacto con una construcción génica, un vector, un genoma viral o con un virión de la invención en condiciones adecuadas para la entrada en la célula de dicha construcción, de dicho vector o de dicho virión. Métodos adecuados para promover la entrada de un ácido nucleico al interior de una célula incluyen, sin limitación, la inyección directa de ADN desnudo, métodos balísticos, transferencia mediada por liposomas, transferencia mediada por receptores (complejo ligando-ADN), electroporación, y precipitación con fosfato cálcico (véase, por ejemplo, US 4970154, WO 96/40958, US 5679559, US 5676954 y US 5593875). En el caso de que la construcción génica se aporte en forma de virión, la entrada en la célula del material genético tiene lugar gracias a la capacidad intrínseca de los viriones de unirse a la superficie de la célula hepática y de liberar el material genético en su interior. En este sentido y tal como se mencionó anteriormente, es preferible el uso de rAAV en los que las proteínas de la cápsida pertenezcan a los serotipos AAV1, AAV8 y

AAV5 tal y como ha sido descrito con anterioridad (Nathwani et al., 2007, Blood 109: 1414–1421; Kitajima et al., 2006, Atherosclerosis 186:65-73).

En la segunda etapa del método de la invención, las células que contienen en su interior la construcción génica de la invención se ponen en contacto con un agente inductor, de forma que se active la transcripción tanto del transactivador como del polinucleótido de interés. La concentración óptima de agente inductor así como el tiempo adecuado de incubación de las células con dicho agente inductor deberán ser determinados de forma experimental.

La determinación de la expresión del polinucleótido de interés en respuesta al agente inductor se puede determinar usando técnicas conocidas para un experto en la materia para la determinación de los niveles de ARNm en una muestra (RT-PCR, Northern blot y similares) o para la determinación de los niveles de proteína (ELISA, Western blot, RIA y similares)

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS Y USOS TERAPEÚTICOS DE LA INVENCION

Los compuestos de la invención resultan de utilidad para la expresión controlada temporal y hepatoespecífica de productos de interés terapéutico. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una preparación farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de una construcción génica de la invención, de un vector de la invención, de un virión de la invención y un vehículo (carrier) o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una construcción génica de la invención, un vector de la invención o un virión de la invención para su uso en medicina.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser administradas por cualquier ruta, incluyendo, sin ser limitante, oral, intravenosa, intramuscular, intrarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, subcutánea,

intraperitoneal, intranasal, entérica, tópica, sublingual o rectal. Una revisión de las distintas formas de administración de principios activos, de los excipientes a utilizar y de sus procedimientos de fabricación puede encontrarse en el Tratado de Farmacia Galénica, C. Faulí i Trillo, Luzán 5, S.A. de Ediciones, 1993 y en Remington's Pharmaceutical Sciences (A.R. Gennaro, Ed.), 20ª edición, Williams & Wilkins PA, USA (2000). Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables son conocidos en el estado de la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones aceite/agua, diferentes tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Las composiciones que comprenden dichos vehículos se pueden formular por procedimientos convencionales conocidos en el estado de la técnica.

En el caso de que se administren ácidos nucleicos (los polinucleótidos de la invención, los vectores, las construcciones génicas o los vectores virales), la invención contempla composiciones farmacéuticas especialmente preparadas para la administración de dichos ácidos nucleicos. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender dichos ácidos nucleicos en forma desnuda, es decir, en ausencia de compuestos que protejan a los ácidos nucleicos de su degradación por las nucleasas del organismo, lo que conlleva la ventaja de que se elimina la toxicidad asociada a los reactivos usados para la transfección. Rutas de administración adecuadas para los compuestos desnudos incluyen intravascular, intratumoral, intracraneal, intraperitoneal, intraesplénica, intramuscular, subretinal, subcutánea, mucosa, tópica y oral (Templeton, 2002, DNA Cell Biol., 21:857-867). Alternativamente, los ácidos nucleicos pueden administrarse formando parte de liposomas, conjugadas a colesterol o conjugados a compuestos capaces de promover la translocación a través de membranas celulares tales como el péptido Tat derivado de la proteína TAT de HIV-1, la tercera hélice del homeodominio de la proteína Antennapedia de *D.melanogaster*, la proteína VP22 del virus del herpes simplex, oligómeros de arginina y péptidos tales como los descritos en WO07069090 (Lindgren, A. et al., 2000, Trends Pharmacol. Sci, 21:99-103, Schwarze, S.R. et al., 2000, Trends Pharmacol. Sci., 21:45-48, Lundberg, M et al., 2003, Mol. Therapy 8:143-150 y Snyder, E.L. y Dowdy, S.F., 2004, Pharm. Res. 21:389-393).

En caso de que se administren viriones, la cantidad de éstos y el tiempo de administración dependerán de las circunstancias y deberán ser optimizadas en cada caso por el experto en la materia usando tecnología estándar. Así, es posible la administración de cantidades terapéuticamente eficaces de viriones de la invención mediante una única administración, tal como por ejemplo, una única inyección de un número suficiente de partículas infecciosas para proporcionar beneficio terapéutico al paciente que se somete a tal tratamiento. De forma alternativa, en algunas circunstancias, puede ser deseable proporcionar administraciones múltiples o sucesivas de las composiciones de viriones, bien durante un periodo de tiempo relativamente corto o relativamente prolongado, como puede ser determinado por el médico que supervisa la administración de tales composiciones. Por ejemplo, el número de partículas infecciosas administrado a un mamífero puede ser del orden de alrededor de 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , o incluso mayor, partículas infecciosas/ml dadas como una dosis única, o divididas en dos o más administraciones como se pueda requerir para alcanzar la terapia de la enfermedad o trastorno particular que se va a tratar. De hecho, en ciertas formas de realización, puede ser deseable administrar dos o más composiciones de diferentes de vectores de viriones, bien solas o en combinación con uno o más fármacos para alcanzar los efectos deseados de la pauta terapéutica particular. En la mayoría de las pautas de terapia génica basada en viriones, el uso de un promotor específico de hígado para controlar la expresión del polinucleótido de interés resultará en que se requerirá un título menor de partículas infecciosas cuando se usan los viriones según la invención que comparado con protocolos de terapia génica convencionales.

En otra forma de realización, las composiciones y polinucleótidos de la invención se administran mediante la llamada “administración hidrodinámica” según ha sido descrito por Liu, F., et al., (Gene Ther, 1999, 6:1258-66). Según dicho método, los compuestos se introducen en el organismo por vía intravascular a alta velocidad y volumen, lo que resulta en unos elevados niveles de transfección con una distribución más difusa. Se ha demostrado que la eficacia del acceso intracelular depende de forma directa del volumen de fluido administrado y de la velocidad de la inyección (Liu et al., 1999, Science, 305:1437-1441). En ratones, la administración se ha optimizado en valores de

1ml/10 g de peso corporal en un periodo de 3-5 segundos (Hodges et al., 2003, Exp.Opin.Biol.Ther, 3:91-918). El mecanismo exacto que permite la transfección celular in vivo con polinucleótidos tras su administración hidrodinámica no es del todo conocido. En el caso de ratones, se piensa que la administración por la vena de la cola tiene lugar a un ritmo que excede el ritmo cardíaco, lo que provoca que el fluido administrado se acumule en la vena cava superior. Este fluido accede posteriormente a los vasos en los órganos y, posteriormente, a través de fenestraciones en dichos vasos, accede al espacio extravascular. De esta forma, el polinucleótido entra en contacto con las células del órgano diana antes de que se mezcle con la sangre reduciendo así las posibilidades de degradación por nucleasas.

Las composiciones de la invención pueden ser administradas en dosis de menos de 10 mg por kilogramo de peso corporal, preferiblemente menos de 5, 2, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01, 0.005, 0.001, 0.0005, 0.0001, 0.00005 ó 0.00001 mg por cada kg de peso corporal y menos de 200 nmol de agente ARN, es decir, en torno a 4.4×10^{16} copias por kg de peso corporal o menos de 1500, 750, 300, 150, 75, 15, 7.5, 1.5, 0.75, 0.15 ó 0.075 nmol por Kg de peso corporal. La dosis unitaria se puede administrar por inyección, por inhalación o por administración tópica. En el caso de que se administren viriones AAV, estos pueden ser administrados sistémicamente puesto que gracias a su tropismo por células hepáticas, accederán a este órgano. No obstante, en el caso de que se administren las construcciones génicas de la invención o los plásmidos de la invención, estos deben ser preferiblemente administrados de forma dirigida al hígado mediante la administración en la arteria hepática o mediante otros sistemas de administración hepática conocidos en el estado de la técnica tales como los descritos por Wen et al, (World J. Gastroenterol, 2004, 10, 244-9), Murao et al, (Pharm. Res., 2002, 19, 1808-14), Lin et al, (Gene Ther., 2003, 10, 180-7), Hong et al, (, J. Pharm. Pharmacol., 2003, 54, 51-8), Herrmann et al., (Arch Virol, 2004, 149, 1611-7) y Matsuno et al., (Gene Ther, 2003, 10, 1559-66). Las composiciones se pueden administran a dosis de entre 0.00001 mg a 3 mg, preferiblemente entre 0.0001 y 0.001 mg, aún más preferiblemente en torno a 0,03 y 3.0 mg por órgano, en torno a 0,1 y 3,0 mg por órgano o entre 0,3 y 3,0 mg por órgano.

La dosis a administrar de las composiciones de la invención depende de la severidad y respuesta de la condición a tratar y puede variar entre varios días y varios meses o hasta que se observe que la condición remite. La dosificación óptima se puede determinar realizando mediciones periódicas de las concentraciones de agente en el organismo del paciente. La dosis óptima se puede determinar a partir de los valores de EC50 obtenidos mediante ensayos previos *in vitro* o *in vivo* en modelos animales. La dosis unitaria se puede administrar una vez al día o menos de una vez al día, preferiblemente, menos de una vez cada 2, 4, 8 o 30 días. Alternativamente, es posible administrar una dosis inicial seguida de una o varias dosis de mantenimiento, generalmente de menos cantidad que la dosis inicial. El régimen de mantenimiento puede implicar tratar al paciente con dosis que oscilan entre 0,01 μg y 1,4 mg/kg de peso corporal por día, por ejemplo 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001, o 0,00001 mg por kg de peso corporal por día. Las dosis de mantenimiento se administran, preferiblemente, como mucho una vez cada 5, 10 ó 30 días. El tratamiento se debe continuar durante un tiempo que variará según el tipo de alteración que sufra el paciente, su severidad y el estado del paciente. Tras el tratamiento, se debe monitorizar la evolución del paciente para determinar si se debe incrementar la dosis en caso de que la enfermedad no responda al tratamiento o se disminuye la dosis si se observa una mejora de la enfermedad o si se observan efectos secundarios indeseados. La dosis diaria se puede administrar en una única dosis o en dos o más dosis según las circunstancias particulares. Si se desea una administración repetida o administraciones frecuentes, es aconsejable la implantación de un dispositivo de administración tal como una bomba, un catéter semipermanente (intravenoso, intraperitoneal, intracisternal o intracapsular) o un reservorio.

Dado que las construcciones de la invención permiten la expresión de un polinucleótido de interés de forma regulada cuando la célula que contienen dicha construcción se pone en contacto con un agente inductor, los usos terapéuticos de las construcciones génicas de la invención contemplan una segunda etapa de administración de agente inductor. El agente inductor puede administrarse en forma de prodroga, sal, solvato o clatrato, bien de forma aislada o bien en combinación con agentes activos adicionales. Excipientes preferidos para su uso en la presente invención incluyen azúcares, almidones, celulosas, gomas y proteínas. Los agentes inductores se pueden administrar como formulados en

una forma farmacéutica de administración sólida (por ejemplo comprimidos, cápsulas, grageas, gránulos, supositorios, sólidos estériles cristalinos o amorfos que pueden reconstituirse para proporcionar formas líquidas etc.), líquida (por ejemplo soluciones, suspensiones, emulsiones, elixires, lociones, ungüentos etc.) o semisólida (geles, pomadas, cremas y similares). La dosis de agente inductor, la vía de administración y el tiempo de espera entre la administración de la construcción génica o de los viriones y la administración del agente inductor pueden ser determinados en cada caso concreto de forma rutinaria por el experto en la materia.

Dada la capacidad de las construcciones de la invención de permitir la expresión regulada de forma temporal y espacial en el hígado, estas construcciones son particularmente adecuadas para la expresión en el hígado de polipéptidos cuya función es de utilidad para el tratamiento y prevención de enfermedades hepáticas. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con una construcción génica de la invención, con un vector de la invención, con un genoma viral de la invención, con un virión de la invención o con una composición farmacéutica de la invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad hepática. Alternativamente, la invención se relaciona con el uso de una construcción génica de la invención, de un vector de la invención, de un genoma viral de la invención, de un virión de la invención o de una composición farmacéutica de la invención para la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento de una enfermedad hepática. Alternativamente, la invención se relaciona con un método para el tratamiento de una enfermedad hepática que comprende la administración a un individuo que lo necesita de una construcción génica de la invención, de un vector de la invención, de un genoma viral de la invención, de un virión de la invención o de una composición farmacéutica de la invención.

El término “tratamiento”, como se usa aquí, se refiere al acto de revertir, mejorar o inhibir la evolución del trastorno o afección para el que se aplica tal término, o uno o más síntomas de tal trastorno o afección.

El término “prevención”, como se usa aquí, se refiere al acto de evitar que se produzca, exista, o de forma alternativa retrasar el inicio o reaparición de una enfermedad,

trastorno o afección para la cual se aplica tal término, o uno o más de los síntomas asociados con una enfermedad, trastorno o afección.

Trastornos hepáticos que pueden ser tratados o prevenidos de forma adecuada mediante el uso de las construcciones, vectores y viriones de la invención se muestran en la Tabla 1 junto el polipéptido que debería ser codificado por el polinucleótido de interés:

Polipéptido codificado por el polinucleótido de interés	Enfermedad
<u>IFNa5</u>	hepatitis crónica C hepatitis crónica B adyuvante vacunas hepatocarcinoma
<u>Oncostatina M</u>	hepatitis crónica C hepatitis crónica B hepatocarcinoma
<u>Cardiotrofina</u>	Transplante hepático Transplante renal Hepatectomías hepatitis crónica C hepatitis crónica B hepatocarcinoma
<u>IL6</u>	Transplante hepático Transplante renal Hepatectomías
<u>Anfiregulina</u>	Transplante hepático Hepatectomías
<u>EDA:</u>	Adyuvante de vacunas
<u>IL15</u>	Adyuvante inmunoterapia hepatitis crónica C hepatitis crónica B hepatocarcinoma
<u>IL12</u>	Hepatocarcinoma Adyuvante inmunoterapia hepatitis crónica C hepatitis crónica B
<u>CD134:</u>	Adyuvante inmunoterapia
<u>CD137:</u>	Adyuvante inmunoterapia
<u>PBGD:</u>	Porfiria aguda intermitente
<u>p17(inhibidor TGF-β1)</u>	Adyuvante en el cáncer de colon Fibrosis Pulmonar Metástasis a hueso
<u>p144(inhibidor TGF-β1)</u>	Adyuvante en el cáncer de colon Prótesis mamarias Esclerosis sistémica Morfea Quemaduras Fibrosis cardíaca Fibrosis renal
<u>Inhibidores IL10</u>	Infecciones virales Infecciones bacterianas Infecciones parasitarias Linfoma no Hodgking
<u>Inhibidores FoxP3</u>	Adyuvante inmunoterapia

	(bloqueo células T reguladoras)
<i>Inhibidores TNFα</i>	Artritis reumatoide
<i>Inhibidores VEGF</i>	Antiangiogénesis
<i>Inhibidores PD-1</i>	Adyuvante inmunoterapia
<i>Inhibidores CD152</i>	Adyuvante inmunoterapia
<i>IGF-I</i>	cirrosis

Tabla 1: Polinucleótidos de interés que pueden ser incorporados en las construcciones génicas de la invención y trastornos en los que pueden ser utilizados.

En una forma de realización preferida, el polinucleótido de interés codifica IL-12 o una variante funcionalmente equivalente en cuyo caso la construcción génica de la invención, un vector de la invención, el genoma viral de la invención o el virión de la invención o la composición farmacéutica de la invención se emplean para el tratamiento del cáncer hepático. El término “cáncer hepático”, según se usa en la presente invención, se refiere tanto al cáncer primario como al cáncer secundario incluyendo el formado a partir de cualquier tipo de tumor primario. El tipo de cáncer hepático incluye, sin limitación, carcinoma hepatocelular (llamado a veces hepatoma o HCC), carcinoma, HCC fibrolamelar, colangiocarcinoma, hemangioma, adenoma hepáticos, hiperplasia focal nodular, angiosarcoma y hepatoblastoma.

CONSTRUCCIONES Y VECTORES DE USO GENERAL DE LA INVENCIÓN

El experto en la materia apreciará que el promotor bidireccional hepatoespecífico de acuerdo a la invención no tiene porque encontrarse necesariamente formando parte de una construcción génica que comprende adicionalmente un activador transcripcional y un polinucleótido de interés sino que puede ser usado aisladamente como elemento integrante de otros vectores, genomas virales o construcciones génicas.

Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un operador-promotor inducible bidireccional adecuado para la expresión hepatoespecífica e inducible por un agente inductor de dos polinucleótidos de interés que comprende

- (i) al menos un elemento de respuesta al transactivador en su forma activa, es decir en presencia del inductor,

- (ii) una primera secuencia promotora hepatoespecífica y
- (iii) una segunda secuencia promotora hepatoespecífica,

en donde la primera y la segunda secuencia promotora hepatoespecífica actúan de forma divergente con respecto al elemento de respuesta al agente inductor y en donde la actividad promotora de la primera y la segunda secuencia promotora hepatoespecífica se ve aumentada en presencia de un transactivador que tras la administración del agente inductor se une al elemento de respuesta.

Los elementos que forman el operador inducible bidireccional, en concreto, el elemento de respuesta al transactivador en su forma activa, la primera secuencia promotora hepatoespecífica y la segunda secuencia promotora hepatoespecífica han sido descritos en detalle con anterioridad y se interpretan de la misma forma que se ha descrito anteriormente en relación con la construcción génica de la invención.

En una forma preferida de realización, el operador-promotor bidireccional regulable comprende al menos un elemento de respuesta a transactivador+tetraciclina. En una forma de realización aún más preferida, el elemento de respuesta a la tetraciclina comprende una secuencia de ácidos nucleicos definida en SEQ.ID.NO.:1.

En otra forma preferida de realización, la primera secuencia promotora hepatoespecífica y la segunda secuencia promotora hepatoespecífica son iguales. En una forma de realización aún más preferida, la primera secuencia promotora hepatoespecífica y la segunda secuencia promotora hepatoespecífica comprenden el promotor del gen de albúmina o una variante funcionalmente equivalente del mismo. En una forma de realización aún más preferida, el promotor del gen de albúmina comprende una secuencia seleccionada del grupo de SEQ.ID.NO.:2 y SEQ.ID.NO.:3.

En otra forma preferida de realización, el operador-promotor inducible bidireccional comprende la SEQ.ID.NO.: 4.

Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con una construcción génica adecuada para la expresión hepatoespecífica e inducible por un agente inductor de un polinucleótido de interés que comprende

- (a) Un operador-promotor inducible bidireccional que comprende
 - (i) al menos un elemento de respuesta al transactivador en su forma activa, es decir en presencia del inductor,
 - (ii) una primera secuencia promotora hepatoespecífica y
 - (iii) una segunda secuencia promotora hepatoespecífica,
- (b) una secuencia nucleotídica que codifica un transactivador activable por dicho agente inductor que se encuentra operativamente acoplada a la primera secuencia promotora hepatoespecífica y una señal de poliadenilación situada en posición 3' con respecto a la región que codifica el transactivador,

en donde la primera y la segunda secuencia promotora hepatoespecífica actúan de forma divergente con respecto al elemento de respuesta al agente inductor y en donde la actividad promotora de la primera y la segunda secuencia promotora hepatoespecífica se ve aumentada en presencia de dicho agente inductor y en presencia de un transactivador que se une al elemento de respuesta en el operador-promotor inducible bidireccional .

Los elementos que forman el operador inducible bidireccional, en concreto, el elemento de respuesta al agente inductor, el tipo de transactivador, la primera secuencia promotora hepatoespecífica, la segunda secuencia promotora hepatoespecífica y la señal de poliadenilación han sido descritos en detalle con anterioridad y se interpretan de la misma forma que se ha descrito anteriormente en relación con la primera construcción génica de la invención.

En una forma preferida de realización, el operador-promotor bidireccional regulable comprende al menos un elemento de respuesta a una tetraciclina. En una forma de realización aún más preferida, el elemento de respuesta a la tetraciclina comprende una secuencia de ácidos nucleicos definida en SEQ.ID.NO.:1.

En otra forma preferida de realización, el transactivador es un transactivador reverso dependiente de tetraciclina. En una forma de realización aún más preferida, el transactivador activable por tetraciclinas reverso rtTA es rtTA-M2.

En otra forma preferida de realización, la primera secuencia promotora hepatoespecífica y la segunda secuencia promotora hepatoespecífica son iguales. En una forma de realización aún más preferida, la primera secuencia promotora hepatoespecífica y la segunda secuencia promotora hepatoespecífica comprenden el promotor del gen de albúmina o una variante funcionalmente equivalente del mismo. En una forma de realización aún más preferida, el promotor del gen de albúmina comprende una secuencia seleccionada del grupo de SEQ.ID.NO.: 2 y SEQ.ID.NO.:3.

En otra forma preferida de realización, el operador-promotor inducible bidireccional comprende la SEQ.ID.NO.: 4.

En otra forma preferida de realización, la señal de poliadenilación es una señal de poliadenilación bidireccional. En una forma de realización aún más preferida, la señal de poliadenilación es una señal de poliadenilación bidireccional del virus SV40.

La segunda construcción génica de la invención puede aportarse de forma aislada o, preferiblemente, puede aportarse formando parte de un vector para facilitar su propagación y manipulación. En una forma preferida de realización, el vector comprende, adicionalmente y en posición 3' con respecto a la segunda secuencia promotora hepatoespecífica uno o varios sitios que permite el clonaje de polinucleótidos de interés de forma que puedan ser expresados de forma hepatoespecífica en respuesta a la adición del agente activador. Preferiblemente, los sitios de clonaje se encuentran agrupados formando un sitio de clonaje múltiple tal y como aparece frecuentemente en vectores de clonaje. Así, el término "sitio de clonaje múltiple", tal y como se usa en la presente invención, se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que comprende una serie de dos o más secuencias diana para endonucleasas de restricción próximas entre sí. Sitios de clonaje múltiple incluyen dianas para endonucleasas de restricción que permite la inserción de fragmentos que muestran extremos romos, extremos 5' protuberantes o

extremos 3' protuberantes. La inserción de polinucleótidos de interés se lleva a cabo usando métodos estándar de biología molecular tal y como se describen, por ejemplo, por Sambrook et al (*supra.*)

La invención se describe a continuación por medio de los siguientes ejemplos que tienen carácter meramente ilustrativo y en ningún caso limitativo de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Construcción y caracterización del virus recombinante rAAV-pTet_{bid}-pCMV-luc.

El objetivo principal era obtener un vector inducible basado en AAV8 que permitiera regular la expresión del transgén en el tiempo, variando la dosis de inductor administrada, y que dirigiera la expresión del transgén específicamente a los hepatocitos, actuando de esta manera en el sitio diana de nuestra terapia, y evitando posibles efectos adversos tóxicos del transgén. Dado que el AAV8 transduce mayoritariamente el hígado con alta eficiencia, quisimos averiguar si el sistema rAAV-pTet_{bid}-pCMV-luc cumplía con las características anteriormente explicadas al ser administrado mediante vía intravenosa por la vena de la cola.

Este sistema había sido previamente caracterizado por Chtarto *y cols* (Chtarto, A., et al. Gene Ther, 2003. 10: 84-94), pero su administración había sido intracerebral, por lo cual se desconocía la biodistribución del sistema tras su administración sistémica.

Para ello se utilizó como gen reportero el gen de la luciferasa, que permitió analizar *in vivo* la biodistribución de la expresión del transgén, además de permitir su cuantificación. Para ello se reemplazó el gen de la eGFP presente en el plásmido, amablemente cedido por la Dra. Lilianne Tenenbaum de la Universidad de Libre de Bruselas, por el gen de la luciferasa de luciérnaga, para obtener el sistema rAAV-pTet_{bid}-pCMV-luc (Figura 2.A) con el cual produjimos los viriones rAAV2/8-pTet_{bid}-pCMV-luc.

1.1 Construcción del vector

Detalladamente, el plásmido que contiene el genoma recombinante de AAV con el sistema inducible pTet_{bid}-pCMV-luc (pAC1M2-pCMV-luc) se generó de la siguiente manera: se amplificó el gen de la luciferasa a partir del plásmido pAlb-luc (Kramer G. et al. *Molecular Therapy* 2003, 7: 375-385) con los cebadores A (cebador sentido) y B (cebador antisentido) (A: GTCGAC ATG GAA GAC GCC AAA AAC (SEQ.ID.NO.:11) y B: GCGGCCGC TTA CAC GGC GAT CTT TCC (SEQ.ID.NO.:12) que contienen en sus extremos 5', los sitios Sall (cebador sentido), y NotI (cebador antisentido). Este fragmento se subclonó en el vector de clonaje pCDNA3.1/V5-His TOPO TA (Invitrogen), y se extrajo de él mediante digestión con las enzimas anteriormente mencionadas. El fragmento extraído se insertó en el vector pAC1M2-EGFP (Chtarto, A., et al. *Gene Ther*, 2003. 10: 84-94; Chtarto, A., et al. *Exp Neurol*, 2007, 204: 387-399) previamente digerido con las mismas enzimas, obteniendo el plásmido pAC1M2-pCMV-luc.

Una vez obtenido el plásmido conteniendo el sistema pTet_{bid}-pCMV-luc, se produjeron viriones rAAV2/8 mediante transfección con PEI en células HEK 293T para lo que se siguió el siguiente protocolo:

Veinticuatro horas antes de la transfección se plaquearon $8,5 \times 10^6$ células/placa en medio DMEM completo, y en placas de 150 mm de diámetro (30 placas aproximadamente/producción), para alcanzar una confluencia del 70-80% en el momento de la transfección. Momentos antes de la transfección se cambió el medio por DMEM al 1-2%.

Se prepararon los complejos PEI-ADN de la siguiente manera:

- a) Preparación de la solución de ADN: Se preparó una solución de ADN con la cantidad apropiada de los plásmidos p δ F6 (40 μ g/placa), p518 (20 μ g/placa) y el que contenía al genoma de AAV-2 recombinante correspondiente (20 μ g/placa), en

solución salina o suero fisiológico estéril, en un volumen final de 1 ml por placa. Se mezcló e incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Las características de los plásmidos se describen al final del protocolo.

- b) Preparación de la solución de PEI: Simultáneamente a la preparación de la solución de ADN se preparó la solución del agente de transfección, PEI, en un volumen final de 1ml de suero fisiológico estéril por placa. Para calcular el volumen de PEI 10mM que se disolvió en suero salino por placa utilizamos la ecuación $\mu\text{lPEI} = \frac{\mu\text{gADN} \times 3 \times (\text{N/P})}{\text{concentraciónPEI}}$, en la cual: $\mu\text{g ADN} = 80$; el cociente $\text{N/P}=10$; y la concentración de PEI = 10mM. Se mezcló el volumen de PEI calculado y se incubó durante 5 min a T.amb.
- c) Una vez transcurridos los 5 minutos, se agregó la solución del PEI sobre la ADN y se agitó vigorosamente con vortex durante 15 segundos, tras lo cual se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación y estabilización de los complejos PEI-ADN.

Posteriormente se añadieron 2 ml de los complejos PEI-ADN por placa, gota a gota utilizando micropipetas y distribuyéndose por toda la placa. Se agitó suavemente la placa en forma de cruz, y se incubó a 37°C durante 4-6 horas. Transcurrido ese periodo de tiempo, se agregaron 10 ml de medio DMEM al 5% de FBS por placa, y se incubó a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂, durante 48 horas.

A las 48 horas post-transfección se quitó el medio a las células, y se despegaron mecánicamente, utilizando raspador (Costar, Corning). Se lavó cada placa con 3 ml de medio DMEM limpio y se recogieron en tubo Falcon de 50 ml. Se centrifugaron las células a 1800 rpm durante 5 minutos, y se descartó el sobrenadante. El total de células se resuspendió en 18,5 ml de medio DMEM limpio y se congeló a -80 °C para su posterior purificación.

Para liberar el virus producido en el interior de las células 293T se realizaron 3 pasos sucesivos de congelación y descongelación a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente. A continuación se centrifugó a 3000 rpm y $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos para eliminar los restos celulares. El sobrenadante se incubó con 0.1 mg por placa de DNAsa I y RNAsa A (Roche) durante 30 minutos a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se filtró empleando filtros de un tamaño de poro de $0.22\text{ }\mu\text{m}$ (MILLIPORE).

Nota: a) el plásmido p δ F6 fue cedido amablemente por la empresa AMT (Amsterdam Molecular Therapeutics). Contiene los genes de adenovirus necesarios para la replicación viral de un AAV, b) el plásmido p518 fue cedido amablemente por la empresa AMT (Amsterdam Molecular Therapeutics). Contiene los genes que codifican las proteínas Rep del serotipo AAV-2 y las proteínas VP del serotipo 8.

Para la purificación de los vectores adeno-asociados se empleó el método de ultracentrifugación en gradiente de iodixanol. Para preparar las fases, se preparó el tampón 7,4X PBS-MK fresco (500 ml PBS sin Mg^{2+} y sin Ca^{2+} + 50 ml de 1M MgCl_2 + 125 ml 1M KCl). En la Tabla 2 se resume la preparación de las fases del gradiente utilizado.

Iodixanol %	Iodixanol	7,4X PBS-MK	NaCl 5M	Agua destilada estéril	Volumen total
15	125 ml	67,57 ml	100 ml	207,43 ml	500 ml
25	125 ml	40,5 ml	-	134,5 ml	300 ml
40	200 ml	40,5 ml	-	59,5 ml	300 ml
60	60 ml	-	-	-	60 ml

Tabla 2: Composición de las fases del gradiente utilizado para la purificación de los AAV

Los volúmenes totales de cada fase preparados dependen de la cantidad de purificaciones a realizar en cada ocasión.

Todos los tampones utilizados en este protocolo se esterilizaron por filtración utilizando filtros con un tamaño de poro de 0,22 μm (MILLIPORE). Para la ultracentrifugación se utilizaron tubos de 25x89 mm Quick-Seal-Ultra-Clear (Beckman). El gradiente de iodixanol se formó utilizando pipetas pasteur de vidrio de 23 mm. Se introdujo una pipeta hasta el fondo del tubo y se comenzó a preparar el gradiente por la fase menos densa, constituida por el lisado celular enriquecido con los vectores adeno-asociados (18,5 ml), seguido de 9 ml de la solución de iodixanol al 15%, 5 ml de la solución al 25%, 5 ml de la solución al 40% y finalmente 3 ml de la solución al 60%. Se equilibraron los tubos y se sellaron. Posteriormente se realizó la ultracentrifugación a 69000 rpm y 16 °C durante 1 hora, utilizando el rotor Beckman 70 Ti.

Tras la ultracentrifugación, las partículas de AAV concentradas en la interfase 40%-60% de iodixanol, se recogieron pinchando el fondo del tubo con aguja y jeringa de 5 ml. Los 5 ml obtenidos, enriquecidos en partículas virales (fracción 1), se lavaron y concentraron en PBS + sacarosa al 5%, utilizando centricon (Amicon Ultra-15, Centrifugal Filter Devices-MILLIPORE). Para ello los centricones se centrifugaron a 5000 rpm y 4 °C durante 10 minutos. La cantidad de lavados y los tiempos de centrifugación varían en cada producción, y se realizaron hasta que se observó ausencia de viscosidad propia del iodixanol. El virus se concentró en 1 ml de PBS 5% sacarosa, y se almacenó a - 80°C hasta su utilización. El porcentaje de recuperación fue de aproximadamente 94%.

1.2 Medida de actividad luciferasa en animal vivo mediante determinación de bioluminiscencia con cámara CCD.

Para realizar las mediciones de la actividad luciferasa obtenida tras la administración de los viriones rAAV2/8 conteniendo el sistema inducible rAAV-pTet_{bidi}-pCMV-luc, los ratones fueron anestesiados con ketamina/xilacina y se les administró, por vía intraperitoneal, 100 μl de D-luciferina (Xenogen/Alameda, EE.UU) diluida en PBS a

una concentración de 30 mg/ml. Tras 5 minutos, los animales se colocaron en una cámara oscura luminométrica (CCD, del inglés: “cooled-charged couple device”, IVIS, Xenogen Corp., Alameda, EE.UU) y se obtuvo una imagen de luminiscencia superpuesta a una fotografía en escala de grises. La imagen de luminiscencia representa la intensidad de luz mediante una escala de color, siendo el azul la intensidad menor, y el rojo la intensidad mayor. Para el tratamiento de estas imágenes se utilizó el programa informático *LivingImage* (Xenogen Corp., Alameda, EE.UU.) que permite cuantificar la señal. Las unidades empleadas para medir la bioluminiscencia son fotones/segundo. Los fundamentos de la metodología utilizada se describen en los siguientes artículos: Bronstein I, *et al.*, *Chemiluminescent and Bioluminescent Reporter Gene Assays*. *Anal Biochem*, 1994. 219: p.196-181; y Contag CH, *et al.*, *Advances in in vivo bioluminescence imaging of gene expression*. *Annu Rev Biomed Eng.*, 2002. 4: p.235-60.

1.3 Expresión basal e inducibilidad del sistema en ratones BALB/c:

Como primera aproximación a la caracterización del sistema rAAV2/8-pTet_{bid}-pCMV-luc, inyectamos 3 dosis diferentes de virus por vía intravenosa, en 3 grupos de 4 hembras BALB/c: 1×10^{11} , 3×10^{10} , y 1×10^{10} gv/ratón. Esperamos 15 días (ya que la transducción hepática por un rAAV8 tarda 14 días aproximadamente en llegar a su máximo de expresión (Pañeda, A., *et al.* *Hum. Gene Ther.* 2009, 20: 908-917), y medimos los niveles de actividad de la luciferasa en ausencia de inductor, o expresión en estado basal. El día 15 post inyección, realizamos una inyección intraperitoneal (i.p.) de 50 mg/Kg de dox, y al día siguiente mantuvimos la inducción mediante la administración de la doxiciclina en agua de bebida durante 6 días consecutivos (2 mg/ml de dox, y 5% de sacarosa). Este protocolo de inducción fue puesto a punto en nuestro departamento para otro sistema inducible TetON (Zabala, M., *et al.*, *Cancer Res.* 2004; 64: 2799-2804), y fue con el cual se obtuvieron mayores niveles de inducción del transgén, sin llegar a niveles de toxicidad mediada por el inductor.

Las mediciones de actividad de luciferasa se realizan delimitando un área de interés elegida por el usuario. En este caso, elegimos el área abdominal superior o hepática,

representada por una circunferencia en la Figura 3.A, y el área total del animal, representada por un óvalo en la Figura 3.B.

Las mediciones de bioluminiscencia a lo largo del tiempo se muestran en la Figura 4.

Como se puede comprobar en la Figura 4, los niveles de actividad de luciferasa total, es decir cuando se analiza todo el animal, son significativamente superiores a los niveles obtenidos al medir solamente el área abdominal superior o hepática tanto en el estado basal como en el inducido, y durante todo el periodo de inducción, indicando que el transgén se expresa considerablemente en otros órganos aparte del hígado, como también se observa en las imágenes de bioluminiscencia capturadas por la cámara CCD, que no se muestran por poseer un código de colores imposible de interpretar en escala de grises.

Por otra parte, la actividad basal o residual del sistema es dependiente de la dosis de virus administrada. Considerando que el ruido de fondo de la cámara de bioluminiscencia para el área seleccionada es aproximadamente 1×10^5 , podemos decir que la actividad basal de luciferasa en el área hepática es relativamente baja en los tres casos, siendo muy cercana al ruido de fondo con la menor dosis de virus utilizada.

Como se puede ver en la Figura 4, tras la administración de la doxiciclina, se observa un aumento de aproximadamente 3 a 4 veces en la expresión de luciferasa en todos los grupos, tanto en el área hepática como en el animal completo. Por otra parte, se comprueba que la expresión del transgén se mantiene estable durante los 7 días de inducción mediante la administración de doxiciclina en agua de bebida.

Respecto a la cinética de inducibilidad del sistema se observa que, a las 10 horas post administración intraperitoneal de doxiciclina, el transgén alcanza el mismo nivel de expresión que a las 24 horas (sin haber agregado aún la dox en agua de bebida). Por lo tanto, de aquí en adelante, tras la administración de una inyección i.p. de doxiciclina, se medirá la actividad luciferasa del estado de inducción 24 horas post administración de la droga.

1.4 Dosis-respuesta del sistema a la doxiciclina y toxicidad.

En vista de que los niveles de actividad de luciferasa obtenidos en el estado inducido fueron muy bajos, se decidió aumentar la dosis de inductor. Para ello, se administraron dos dosis consecutivas de 100 y 200 mg/kg de dox i.p separadas por un período de 14 días.

Se midió la actividad luciferasa del área hepática, 24 horas post inducción. Comparando los niveles de actividad luciferasa en estado inducido se observa una respuesta lineal respecto a la dosis de dox administrada (Figura 5), pero esta linealidad se pierde al alcanzar la dosis de 200mg/Kg de dox. Al llegar a este punto, varios ratones murieron y el resto fueron sacrificados, ya que mostraban síntomas de toxicidad mediada por dox (fiebre, adherencias abdominales, etc). Estos síntomas también se observaron en los ratones control, sin vector. La tasa de inducción máxima del sistema se alcanza a una dosis de 100 mg/Kg de dox, y es aproximadamente de 10 veces.

1.5 Biodistribución de rAAV-pTet_{bid}-pCMV-luc

Para realizar un estudio de la biodistribución de la actividad del transgén obtenida tras la inducción del sistema rAAV-pTet_{bid}-pCMV-luc en ratones de ambas cepas y sexos, se indujeron 4-8 ratones por grupo (que habían sido infectados 21 días antes con 1×10^{11} gv/ratón del rAAV2/8 con el correspondiente sistema de inducción), con 50 mg/Kg de dox i.p. A las 24 hs se determinó la actividad de luciferasa *in vivo* en la cámara CCD y posteriormente, se sacrificaron los animales y se extrajeron varios de sus órganos, congelándolos inmediatamente para luego medir la actividad luciferasa de cada uno de ellos y normalizarla por la cantidad de proteína total.

En la Figura 11 se observa claramente como en hembras de las dos cepas estudiadas (BALB/c y C57BL/6), el sistema rAAV2/8-pTet_{bid}-pCMV-luc se expresa tanto en hígado como en corazón, útero y ovario, lo que se corresponde con las imágenes *in vivo* recogidas de la cámara luminométrica, en las cuales hay una distribución de la

bioluminiscencia dispersa por todo el animal, pero más intensa en la zona abdominal baja (datos no mostrados). Estos datos también corroboran lo observado en un estudio con varios serotipos de AAV realizado en nuestro grupo (Pañeda, A., et al. *Hum. Gene Ther.* 2009, 20: 908-917). Además, transduce otros órganos como el páncreas, el músculo esquelético, etc, en concordancia con lo descrito para el serotipo AAV8 con promotores constitutivos por varios autores (Nakai, H., et al. *J. Virol.* 2005, 79: 214-224; Wang, Z., et al., *Nat. Biotechnol.* 2005, 23: 321-328).

En el caso de los machos, los patrones de biodistribución de la actividad de luciferasa de ambos sistemas son muy similares entre las dos cepas de ratón (Figura 12), al igual que lo observado en las hembras, y se corresponde con las imágenes de bioluminiscencia obtenidas con la cámara CCD antes del sacrificio (datos no mostrados). Encontramos expresión de luciferasa principalmente en el hígado y en el corazón, seguido de los riñones, el estómago, intestino y músculo.

En conclusión, el virus rAAV-pTet_{bidi}-pCMV-luc diseñado no es adecuado para regular la expresión transgénica en hígado, ya que su tasa de inducción máxima es reducida (aproximadamente 10), y la biodistribución de la actividad del transgén no se restringe mayoritariamente al hígado, sino que se dispersa por varios órganos del animal.

Ejemplo 2. Construcción y caracterización del virus recombinante rAAV-pTet_{bidi}-pAlb-luc.

Tras comprobar que el vector con el sistema rAAV-pTet_{bidi}-pCMV-luc presentaba muy pobre inducibilidad y una significativa expresión fuera del hígado, se intentó construir un sistema que lograra, por una parte, una tasa de inducción máxima mayor que el anterior, y por otra, una expresión localizada del transgén en el órgano de nuestro interés, el hígado. Para ello, se sustituyeron los promotores CMV mínimos por promotores de la albúmina (pAlb). Estudios realizados por Zabala *y cols.* (Zabala, M., et al., *Cancer Res.* 2004; 64: 2799-2804) habían demostrado que el pAlb tiene una expresión residual baja (aún menor que el pCMV mínimo), cuando se utiliza en otros sistemas inducibles, y sin embargo, presenta muy alta tasa de inducibilidad cuando se

sitúa junto a los sitios TetO7. Por otra parte, ya se conocía que su expresión es específica de hepatocitos (Frain, M., et al. *Mol Cell Biol*, 1990, 10: 991-999; Cereghini, S., et al. *Cell*, 1987, 50: 627-633). Sin embargo, los niveles máximos de inducción alcanzados con este promotor precedido de los sitios TetO7 eran significativamente menores a los obtenidos con el promotor CMV mínimo (también precedido por los sitios TetO7), en el contexto de un sistema inducible por tetraciclina en el cual el transactivador se expresaba constitutivamente a partir del promotor CMV (Zabala, M., et al., *Cancer Res.* 2004; 64: 2799-2804).

Este nuevo sistema se denomina rAAV2/8-pTet_{bidi}-pAlb-luc (Figura 2.B).

2.1 Construcción del vector

El plásmido que contiene el genoma recombinante de AAV con el sistema inducible pTet_{bidi}-pAlb-luc (pAC1M2-pAlb-luc) se generó de la siguiente manera: se amplificó el fragmento que contiene los 7 sitios operadores de respuesta a tetraciclina y el promotor de la albúmina (TetO7-pAlb) a partir del plásmido pTonL2(T)-mIL12 generado en nuestro departamento (Zabala, M., et al., *Cancer Res.* 2004; 64: 2799-2804) con los cebadores C (cebador sentido) y D (cebador antisentido) (C: AGC GCT TTA CGC GTC GAG TTT ACC ACT (SEQ.ID.NO.:13); D: GTCGAC TTA GTG GGG TTG ATA GGA AAG (SEQ.ID.NO.:14)) que contienen en sus extremos 5', los sitios AfeI (cebador sentido), y SalI (cebador antisentido). Este fragmento se subclonó en el vector de clonaje pCDNA3.1/V5-His TOPO TA (Invitrogen) y se denominó: pCDNA3.1-TetO7-pAlb.

Por otra parte se amplificó el promotor de la albúmina a partir del plásmido pAlb-luc (Kramer G. et al. *Molecular Therapy* 2003, 7: 375-385) con los cebadores E (sentido) y F (antisentido) (E: AGC GCT ACA GCT CCA GAT GGC AAA (SEQ.ID.NO.:15); F: AGC GCT GAA TTC TTA GTG GGG TTG ATA GGA AAG (SEQ.ID.NO.:16)) que contienen en sus extremos 5', los sitios AfeI (cebador sentido) y los sitios AfeI, y EcoRI (cebador antisentido). Este fragmento se subclonó en el vector de clonaje pCDNA3.1/V5-His TOPO TA (Invitrogen) y se denominó: pCDNA3.1-pAlb. El

promotor de la albúmina se extrajo de este vector mediante digestión con AfeI, y se insertó en el plásmido: pCDNA3.1-TetO7-pAlb, digerido con la misma enzima. Se seleccionaron los plásmidos cuya digestión con EcoRI/SalI dieron como resultado una banda de aproximadamente 700 pb, correspondiente al fragmento pAlb-TetO7-pAlb. Este fragmento de digestión se insertó en el plásmido pAC1M2-pCMV-luc digerido con las mismas enzimas, obteniendo el plásmido pAC1M2-pAlb-luc.

La producción y la purificación del vector rAAV8-pTet_{bid}-pAlb-luc se realizó de la misma forma que la descrita para el sistema inducible anterior.

2.2 Expresión basal e inducibilidad del sistema en ratones BALB/c

Como primera aproximación se inyectó una dosis de virus rAAV2/8-pTet_{bid}-pAlb-luc de 1×10^{11} gv/ratón a 4 ratones hembras BALB/c por vía intravenosa, y se midió tanto la actividad basal (a los 14 días post inyección intravenosa del vector) como inducida (24 hs post administración i.p de 50 mg/Kg de dox, y día 22 post administración del vector) de luciferasa en el área hepática y en el animal total. Se eligió esta dosis de dox i.p. para estar seguros de no inducir efectos tóxicos no deseados debido a una excesiva dosis de inductor.

Al comparar la actividad de luciferasa tanto en el estado basal como inducido, en el área abdominal superior (hepática) y en el animal total, se observó que no existen diferencias significativas entre ellas (Figura 6) indicando que el sistema rAAV2/8-pTet_{bid}-pAlb-luc se expresa específicamente en el área hepática. Por ello, a partir de ahora, siempre que se muestren datos de actividad luciferasa se referirán a la medida en el área hepática de los ratones.

Por otra parte, al comparar los datos de las mediciones del área hepática con los correspondientes para el sistema rAAV2/8-pTet_{bid}-pCMV-luc (con la misma dosis de vector, y la misma dosis de dox administrada), se observa que en el estado basal, la actividad de luciferasa es significativamente menor con el sistema rAAV2/8-pTet_{bid}-pAlb-luc, aunque no despreciable (Figura 7).

Sin embargo, el dato más destacable es la tasa de inducción obtenida con el nuevo sistema rAAV2/8-pTet_{bidi}-pAlb-luc tras la administración de una dosis i.p. de 50 mg/Kg de dox, que es aproximadamente 250 (Figura 7), casi 85 veces mayor que la tasa de inducción del sistema rAAV2/8-pTet_{bidi}-pCMV-luc, dato no esperado, a la vista de los resultados obtenidos por Zabala *et al* en un ya citado estudio (Zabala, M., et al., Cancer Res. 2004; 64: 2799-2804). Además, la diferencia en el estado inducido entre ambos sistemas para esta dosis de dox es altamente significativa.

2.3 Re-inducibilidad del sistema a largo plazo

Una de las características importantes que debe cumplir todo sistema inducible es su capacidad de re-inducirse a lo largo del tiempo, por lo cual se realizaron administraciones repetidas de dox i.p. (50 mg/Kg), separadas por intervalos de 15 días (entre la 1^a y 2^a, y entre la 2^a y 3^a inducción) y 80 días (entre la 3^a y 4^a). Se midió la expresión de luciferasa 24 horas post inducción. La Figura 8 muestra que tanto a dosis de 1×10^{10} como de 1×10^{11} gv/ratón, la capacidad de re-inducción del sistema se mantiene durante al menos 4 meses. Sin embargo, se puede observar que la tasa de inducción máxima es dependiente de la dosis de virus administrada, dado que la obtenida con la dosis más baja de virus es aproximadamente 10, mientras que la obtenida con la dosis alta es 250.

2.4 Dosis-respuesta a la doxiciclina en ratones C57B6/L y comparación de la inducibilidad del sistema entre sexos.

Al comparar los niveles de luciferasa obtenidos en el estado basal e inducido con el sistema rAAV2/8-pTet_{bidi}-pAlb-luc en hembras C57BL/6 vs. hembras BALB/c, observamos que ambos niveles son significativamente superiores en las hembras C57BL/6, sugiriendo que el rAAV2/8 transduce mejor el hígado de esta cepa de ratón que el de la cepa BALB/c, sin embargo, no encontramos diferencias significativas en la tasa de inducción del sistema en este experimento. A partir de aquí, se seguirá caracterizando el sistema inducible rAAV2/8-pTet_{bidi}-pAlb-luc en ratones C57BL/6.

Se quiso evaluar, por una parte, la dependencia existente entre la actividad del transgén en el estado inducido y la dosis de inductor administrada. La existencia de una linealidad entre ambos parámetros permite un control preciso de la expresión de transgén, lo cual es importante cuando el rango terapéutico del transgén es acotado, o cuando la toxicidad del mismo requiere un control estricto de sus niveles.

Por otra parte, dada la diferencia entre sexos que existe en la transducción hepática del rAAV8, y nos pareció interesante estudiar su influencia sobre el sistema inducible. Por ello se quiso comparar la dosis respuesta a dox en hembras y en machos de la misma cepa.

Para ello, se formaron 5 grupos de 5 animales cada uno, para cada sexo, a los cuales se les inyectó una dosis de virus rAAV2/8-Tet_{bid}pAlb-luc de 1×10^{11} gv/ratón. Se midió la actividad basal a los 14 días post-inyección del virus (pre-inducción), y a los 21 días post-inyección del vector, les administramos una dosis i.p. de dox a cada grupo: 2, 10, 25, 50 y 100 mg/Kg. La actividad luciferasa se midió a las 24 horas post-inducción.

Se observan diferencias significativas entre los niveles de luciferasa en estado inducido de machos y hembras a partir de la dosis de 2 mg/Kg de dox, y hasta la dosis de 50 mg/Kg, siendo la actividad luciferasa en los machos superior que en las hembras (Figura 9A). La tasa de inducción máxima del sistema rAAV2/8-pTet_{bid}-pAlb-luc en esta cepa se alcanza a la dosis de 100 mg/kg en el caso de las hembras (ya que a una dosis mayor los efectos tóxicos de la dox impedirían ver un aumento en los niveles de luciferasa) y es 650, mientras que en los machos se alcanza a la dosis de 50 mg/kg y es 450.

Tras la administración de la dosis de 100 mg/kg de dox, se observa que tanto machos como hembras alcanzan niveles similares de actividad luciferasa. Esto, y el hecho de que los machos alcancen los mismos niveles de actividad luciferasa cuando se inducen con 50 y con 100 mg/kg de dox, sugiere que se está alcanzando el estado de saturación

del sistema, en el cual todos los sitios operadores del sistema presentes en la célula se encuentran ocupados por el complejo transactivador-inductor.

En la Figura 9.B, se muestran los valores logarítmicos de las actividades de luciferasa observadas en la Figura 9.A, que se ajustan a una curva sigmoidea propia de sistemas saturables, que nos permiten estimar la actividad luciferasa a una dosis de inductor determinada dentro del rango lineal de cada curva (2 a 25 mg/kg de dox para los machos, y de 10 a 50 mg/kg para las hembras).

2.5 Evaluación de la vía de administración oral de inductor.

Otro punto a tener en cuenta es la toxicidad de la droga inductora en función de la vía de administración utilizada. Está descrito que la administración oral de dox es mucho más segura que la intraperitoneal, en términos de toxicidad asociada, en modelos animales. El hecho de que se utilice la administración intraperitoneal en modelos animales es debido a razones de reproducibilidad, ya que el investigador se asegura la administración correcta de la dosis calculada, mientras que oralmente (en agua de bebida en el caso de pequeños animales) se corren mayores riesgos de dispersión de los datos, debido a las cantidades dispares de agua consumida por animal. De todas maneras, la forma clínica de administración oral de este antibiótico también asegura la correcta dosificación de la droga. Por todo ello se quiso estudiar si la inducibilidad del sistema se veía afectada por la vía de administración del inductor, y para ello indujimos el sistema mediante administración oral de dox en agua de bebida (2 mg/ml dox, 5% sacarosa). Como se observa en la Figura 10, los niveles de actividad luciferasa en estado inducido obtenidos mediante la administración oral de la droga son algo menores (un 50% aproximadamente) que los obtenidos a las 24 horas de inducción i.p. con 50 mg/kg de dox, lo que indica que la vía oral puede ser utilizada eficazmente y de forma segura para inducir este sistema, aunque no alcanza los mayores niveles alcanzados por las dosis i.p. de dox más elevadas. No se han ensayado concentraciones mayores de dox en agua de bebida, sino que se han usado protocolos similares a los ya descritos para los sistemas de inducción por tetraciclina en la literatura.

2.6 Biodistribución de rAAV-pTet_{bidi}-pAlb-luc.

Ya se había observado que la actividad luciferasa se encontraba más restringida al hígado al comparar los niveles medidos en el área hepática versus el animal total (Figura 6) en animales vivos utilizando cámara CCD.

Ahora bien, para realizar un estudio más detallado y exhaustivo de la biodistribución de la actividad del transgén obtenida tras la inducción del nuevo sistema en ratones de ambas cepas y sexos, indujimos 4-8 ratones por grupo (que habían sido infectados 21 días antes con 1×10^{11} gv/ratón del rAAV2/8 con el correspondiente sistema de inducción), con 50 mg/Kg de dox i.p. A las 24 hs medimos la actividad de luciferasa *in vivo* en la cámara CCD y posteriormente, sacrificamos los animales y extrajimos varios de sus órganos, congelándolos inmediatamente para luego medir la actividad luciferasa de cada uno de ellos y normalizarla por la cantidad de proteína total. Este protocolo es el mismo que se aplicó para el caso del anterior sistema inducible.

Tanto en hembras como en machos, se observa expresión de luciferasa exclusivamente en el hígado de los animales de ambas cepas con el sistema rAAV-pTet_{bidi}-pAlb-luc (Figura 11 y 12). Si se fija la atención en cada órgano, la expresión debida a este sistema es siempre mayor (y en casi todos los casos de forma significativa) que la debida a la del sistema rAAV-pTet_{bidi}-pAlb-luc, con excepción del hígado. En el hígado, vemos que el sistema rAAV-pTet_{bidi}-pAlb-luc alcanza niveles de inducción de la actividad de luciferasa mayores que el sistema rAAV-pTet_{bidi}-pCMV-luc en ambas cepas, lo que corrobora lo predicho por las mediciones de bioluminiscencia *in vivo*, realizadas en la zona hepática con ambos sistemas. De esta manera queda demostrada la hepato-especificidad del sistema inducible rAAV2/8-pTet_{bidi}-pAlb-luc en ratones hembras y machos de ambas cepas.

En conclusión, el sistema rAAV-pTet_{bidi}-pAlb-luc es el primer sistema inducible y hepato-específico descrito para vectores adeno-asociados (ya han sido descrito sistemas inducibles hepato-específicos vehiculizados mediante inyección hidrodinámica (Zabala,

M., et al., *Cancer Res.* 2004; 64: 2799-2804), y mediante adenovirus de alta capacidad (Wang, L., et al. *Gastroenterology*, 2004. 126: 278-289) cuyo tamaño es superior al máximo aceptado por los rAAVs), y constituye una herramienta muy importante para el tratamiento a largo plazo de enfermedades hepáticas que requieran una regulación estricta de la expresión del transgén, ya sea por presentar un rango terapéutico acotado (como en el caso de la IGF-1 en modelos de cirrosis hepáticas), como por presentar efectos tóxicos al ser expresado incontroladamente (como en el caso de varias citoquinas inmunopotenciadoras como la IL-12, el IFN γ , el IFN α , etc).

Ejemplo 3. Construcción y caracterización del virus recombinante rAAV-pTet_{bid}-pAlb-IL12.

Numerosos estudios preclínicos mostraron la eficacia antitumoral derivada de la transferencia génica de la IL-12. Estos datos impulsaron la realización de un ensayo clínico fase I para el tratamiento de tumores digestivos utilizando un adenovirus de primera generación, portador de IL-12 (Sangro, B., et al. *J Clin Oncol.* 2004, 22: 1389-1397). El ensayo clínico puso en evidencia la necesidad de una expresión mas prolongada de la IL-12 para lograr obtener un efecto terapéutico. En este sentido en el departamento se está trabajando desarrollando vectores virales de larga expresión portadores de sistemas de expresión inducibles de IL-12 (Wang, L., et al. *Gastroenterology*, 2004. 126: 278-289).

Dentro de los vectores virales con los que contamos, el AAV representa un candidato muy prometedor, ya que se trata de un vector de larga expresión y su producción en grado clínico y en altas dosis ya había sido constatada (Meghrou, J., et al. *Biotechnol Prog.* 2005, 21:154-160).

Por ello se intentó desarrollar un vector adenoasociado capaz de producir de forma inducible y hepatoespecífica la IL-12 y testar su actividad antitumoral en modelos animales.

La implantación de ciertas líneas de cáncer de colon en el hígado de ratones singénicos, como la línea MC38 en ratones C57, constituye un tipo de modelo de cáncer intrahepático muy utilizado en aproximaciones de inmunoterapia y otras terapias pre-clínicas (Heijstek, M.W., et al. *Dig Surg*, 2005, 22: 16-25), por lo que va a ser el modelo elegido para probar el nuevo vector terapéutico.

Se utilizó la mIL-12 de simple cadena (mIL-12 sc), formada por las subunidades p40 y p35 fusionadas en una sola secuencia proteica. La mIL-12 sc tiene un tamaño bastante menor que la construcción que habitualmente se usa para expresar la IL-12, que consta de la subunidad P35, un elemento IRES (del inglés: "Internal Ribosomal Entry Site") y la subunidad P40 (Waehler, R., et al. *Hum Gene Ther*, 2005, 16: 307-317). Esto permite subclonarla en el esqueleto viral del rAAV y generar el virus recombinante correspondiente. Además, se ha descrito que la proteína resultante de la expresión de esta construcción es más activa que aquella obtenida de la construcción en la cual ambas subunidades se encuentran asociadas mediante una secuencia de unión interna de ribosoma o IRES.

Por lo tanto, se sustituyó el gen de la luciferasa por el de la mIL-12 sc obteniendo la construcción que se muestra en la Figura 2.C. Esta nueva construcción se denomina rAAV-pTet_{bid}-pAlb-mIL12. Posteriormente se pasó a producir el virus rAAV2/8-pTet_{bid}-pAlb-mIL12.

3.1 Construcción del vector

Para generar el plásmido pAC1M2-pAlbIL12 que contiene el genoma recombinante de AAV con el sistema inducible pTet_{bid}-pAlb-mIL12, se amplificó por PCR la mIL12sc a partir del plásmido pCDNA3.1-mIL12sc (Cedido amablemente por el Dr. Crettaz de nuestro departamento. La construcción y secuencia de la mIL12sc se encuentran detalladas en Lieschke, G.J., et al. (*Nat. Biotechnol.* 1997, 15: 35-40) con los cebadores G (sentido) y H (antisentido) (G: GTC GAC ATG GGT CCT CAG AAG (SEQ.ID.NO.:17), H: GCG GCC GCT TAG GCG GAG CTC AGA TAG CC (SEQ.ID.NO.:18) que contienen en sus extremos 5' los sitios SalI (cebador sentido), y NotI (cebador antisentido). Este fragmento se subclonó en el vector de clonaje

pCDNA3.1/V5-His TOPO TA (Invitrogen), y se extrajo de él mediante digestión con las enzimas anteriormente mencionadas. El fragmento extraído se insertó en el vector pAC1M2-pAlb-luc, previamente digerido con Sall/NotI, obteniendo el plásmido pAC1M2-pAlb-mIL12sc.

La producción y purificación del virus rAAV2/8-pTet_{bidi}-pAlb-mIL12, se realizó de la misma forma que la descrita para los otros vectores ya descritos.

3.2 Protocolo antitumoral.

Descripción del modelo tumoral

Como se menciona anteriormente, se utilizará el modelo de metástasis hepáticas de cáncer colorrectal implantando células MC38 en el hígado de ratones singénicos C57BL/6. El procedimiento utilizado consiste en la implantación hepática (mediante laparotomía) de 500.000 células MC38 en el lóbulo mayor del hígado). Siete días tras la implantación hepática de las células se detectan tumores de 4-6 mm de diámetro (mediante laparotomía), que crecen ininterrumpidamente hasta producir la muerte del ratón alrededor de 30-50 días post-implantación.

El protocolo que se siguió fue el siguiente: se administraron 3 dosis distintas del vector rAAV2/8-pTet_{bidi}-pAlb-IL12 por vía intravenosa, a 3 grupos de ratones hembras C57BL/6 (N=5): 3×10^{10} , 1×10^{10} y 3×10^9 gv/ratón. Tras un mes de la inyección del vector, se implantaron 5×10^5 células MC38 en el lóbulo mayor del hígado (se añadieron 5 ratones control, a los que no se les había administrado el vector previamente), y 10 días después se realizó una inducción i.p. de dox 50mg/Kg mantenida durante una semana en agua de bebida (2mg/ml de dox) al 5% de sacarosa. Se esperó un mes antes de implantar las células tumorales con el objeto de prevenir una posible respuesta inmune contra la cápside del rAAV8 que pudiera estar presente a tiempos cortos tras la administración del vector. Se extrajo sangre de los ratones en varios puntos, y se midió la concentración en suero de mIL12sc, mIFN γ , y transaminasas (Figura 13).

Se corroboró una relación lineal entre los niveles de mIL-12 sc e mIFN γ en el estado inducido y la dosis de virus administrada. La expresión de mIL12sc fue transitoria, descendiendo hasta niveles indetectables a día 7 de inducción (inhibición mediada por mIFN γ , ya descrita por Reboredo, M., et al (Reboredo, M., et al. Gene Ther. 2008, 15: 277-288). Los niveles de mIFN γ alcanzaron su pico de expresión a día 7 de inducción. La expresión de ambas citoquinas fue indetectable para las tres dosis de virus administradas en el estado basal, previo a la inducción, medida mediante ELISA.

3.3 Ausencia de toxicidad.

Uno de los problemas más importantes a la hora de utilizar la IL-12 como agente anti-tumoral es su alta toxicidad sistémica cuando su expresión es alta y no regulada. Por ello se quiso analizar los efectos tóxicos debidos a la expresión de la mIL-12 sc por el vector en el hígado. Para ello se midieron las transaminasas séricas (AST: aspartato aminotransferasa, y ALT: alanina aminotransferasa) durante y después de la inducción.

En ningún caso se observaron efectos tóxicos visibles en los animales, y las mediciones de transaminasas séricas indican ausencia de fallo hepático importante en los puntos de tiempo elegidos (Figura 14), aunque se observan aumentos puntuales y transitorios de ambas enzimas, principalmente 24 horas post inducción i.p. de dox. Esto indica que la inducción regulada de IL-12 es segura en términos de toxicidad.

3.4 Eficacia antitumoral en profilaxis: Supervivencia

La primera forma de medir la eficacia antitumoral del tratamiento fue la determinación del porcentaje de supervivencia de los diferentes grupos de ratones en el tiempo. Se dio por finalizado el experimento a día 132 del protocolo, correspondiente al día 102 post-implantación de las células tumorales (Figura 13). Los ratones que a este día estaban vivos no presentaba tumores intrahepáticos, sin embargo, todos los animales que murieron durante el estudio presentaban tumores de gran tamaño (aproximadamente 4 cm³). No se observó mortalidad debida a la expresión de IL-12. Todos los ratones control y los inyectados con la dosis más baja del virus murieron, aunque en estos últimos se observa un ligero retraso en el crecimiento del tumor. En la Figura 15 se

muestra que la dosis mínima de virus rAAV2/8-pTet_{bid}-pAlb-mIL12 terapéutica fue 1×10^{10} gv/ratón, obteniéndose el 100% de ratones libres de tumor. La dosis de 3×10^{10} gv/ratón produjo un porcentaje del 80% de ratones libres de tumor.

3.5 Eficacia antitumoral: Evaluación de la respuesta inmune de memoria.

Para evaluar la eficacia de la respuesta inmune memoria inducida por la administración del vector, realizamos un rechallenge (o segundo desafío) de células MC38 (1×10^6 células/ratón) administradas subcutáneamente en aquellos ratones. La Figura 16 muestra la progresión tumoral en el tiempo de los ratones previamente tratados, comparados con 5 ratones no tratados, control. Se observa protección en el 40 % de los ratones previamente tratados, mientras que el tamaño tumoral al final del experimento (día 42 post rechallenge y día 132 del protocolo) es significativamente menor en los grupos tratados, que en los ratones sin tratar. Estos datos indican el desarrollo de una respuesta memoria efectora eficaz en los ratones tratados, frente a aquellos sin tratar.

Por otra parte, se marcó y analizó el porcentaje de PBLs CD8⁺-MC38Tet⁺ (tetrámeros específicos cargados con péptido inmunodominante de la línea MC38) presentes a día 23 post rechallenge (día 113 del protocolo) en todos los grupos. Se observó que el grupo tratado, en el que se agrupan los ratones tratados con las dos dosis más altas de vector por no presentar diferencias significativas entre ellos, presentaba niveles significativamente mayores que los controles sin tratar de estos linfocitos (Figura 17).

Por último, se analizó la presencia de estos linfocitos efectores en el entorno tumoral, para lo cual se sacrificaron los animales y se marcaron los CD8⁺ presentes en el homogeneizado tumoral. Se analizó mediante FACS y el programa FlowJo, el porcentaje de linfocitos CD8⁺ específicos del tetrámero de MC38 utilizado anteriormente, y positivos para el marcador de activación CD44. Ya que no se observaron diferencias significativas entre los grupos tratados, se presentan los datos agrupados en la Figura 18. Se observan diferencias significativas entre los ratones previamente tratados y los controles, indicando que no solamente existen células efectoras memoria en sangre periférica, sino que también se localizan en el tumor, donde realizarán su función citotóxica. Aproximadamente el 50% de los linfocitos CD8⁺

efectores son específicos de tetrámero y se encuentran activados en los ratones que recibieron tratamiento.

En conclusión, se demuestra que el sistema inducible rAAV-pTet_{bidi}-pAlb codificante para la mIL12 de cadena única constituye un buen tratamiento antitumoral para metástasis hepáticas de carcinoma colorrectal, con ausencia de efectos tóxicos asociados a la expresión de IL-12, y el desarrollo de una respuesta celular efectiva. Además, observamos la inducción mediada por el vector, de una eficiente respuesta celular de tipo memoria al volver a desafiar a los ratones tratados con las mismas células transformadas. Esta podría constituir una posible aplicación al sistema inducible y hepato-específico presentado en este trabajo.

3.6 Eficacia antitumoral terapéutica: Supervivencia

Tras comprobar que el tratamiento lograba prevenir el desarrollo de tumores comprobamos si el mismo tratamiento era capaz de eliminar tumores ya implantados. Para ello en primer lugar se implantaron las células tumorales MC38 siete días mas tarde se inyectó una única dosis del vector terapéutico. Siete días tras la inyección del vector se comenzó la inducción de la expresión de IL-12 (Figura 19). Se dio por finalizado el experimento al día 100 post-implantación de las células tumorales. Los ratones que a este día estaban vivos no presentaba tumores intrahepáticos, sin embargo, todos los animales que murieron durante el estudio presentaban tumores de gran tamaño (aproximadamente 4 cm³). No se observó mortalidad debida a la expresión de IL-12. Todos los ratones control murieron (Figura 20).

REIVINDICACIONES

1. Una construcción génica que permite la expresión inducible hepatoespecífica de un polinucleótido de interés en respuesta a un agente inductor que comprende
 - (i) un operador-promotor inducible bidireccional que comprende al menos un elemento de respuesta a dicho agente inductor flanqueado por una primera secuencia promotora hepatoespecífica y por una segunda secuencia promotora hepatoespecífica en donde ambas secuencias promotoras hepatoespecíficas actúan de forma divergente,
 - (ii) una primera secuencia nucleotídica que comprende una secuencia que codifica un transactivador activable por dicho agente inductor y una señal de poliadenilación situada en posición 3' con respecto a la región que codifica el transactivador, en donde dicha secuencia que codifica un transactivador se encuentra operativamente acoplada a la primera secuencia promotora hepatoespecífica y
 - (iii) una segunda secuencia nucleotídica que comprende un polinucleótido que se encuentra operativamente acoplado a la segunda secuencia promotora hepatoespecífica y una señal de poliadenilación situada en posición 3' con respecto al polinucleótido de interés,en donde la actividad promotora de dichas primera y segunda secuencias promotoras hepatoespecíficas se induce como consecuencia de la unión del transactivador a la región operadora del operador-promotor en presencia del agente inductor.
2. Una construcción génica según la reivindicación 1 en donde el elemento de respuesta al agente inductor comprende al menos un elemento de respuesta a tetraciclina y el transactivador es un transactivador de tetraciclina reverso.
3. Una construcción según la reivindicación 2 en donde el elemento de respuesta tetraciclina comprende la secuencia de ácidos nucleicos definida en SEQ.ID.NO.:1.

4. Una construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3 en donde el transactivador de tetraciclina reverso está codificado por un polinucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO:6.
5. Una construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en donde la primera secuencia promotora hepatoespecífica y la segunda secuencia promotora hepatoespecífica son iguales.
6. Una construcción génica según la reivindicación 5 en donde la primera secuencia promotora hepatoespecífica y la segunda secuencia promotora hepatoespecífica comprenden el promotor del gen de albúmina o una variante funcionalmente equivalente del mismo.
7. Una construcción génica según la reivindicación 6 en donde el promotor del gen de albúmina comprende una secuencia seleccionada del grupo de SEQ.ID.NO.: 2 y SEQ.ID.NO.:3.
8. Una construcción génica según la reivindicación 7 en donde el operador-promotor inducible bidireccional comprende la SEQ.ID.NO.: 4.
9. Una construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en donde al menos una de las señales de poliadenilación es una señal de poliadenilación bidireccional.
10. Una construcción génica según la reivindicación 9 en donde la señal de poliadenilación es una señal de poliadenilación bidireccional del virus SV40.
11. Una construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en el que el polinucleótido de interés codifica la cadena pesada y/o la cadena ligera de IL-12 o una variante funcionalmente equivalente de las mismas.

12. Una construcción génica según la reivindicación 11 en donde el polinucleótido de interés codifica una IL-12 de cadena sencilla.
13. Un vector que comprende una construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
14. Un genoma viral recombinante que comprende una construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
15. Un genoma viral según la reivindicación 14 en donde dicho genoma es de un virus adeno-asociado recombinante.
16. Un virión obtenible expresando un genoma viral según las reivindicaciones 14 ó 15 en una célula empaquetadora adecuada.
17. Un método *in vitro* para la expresión en una célula de origen hepático de un polinucleótido de interés que comprende las etapas de
 - (i) poner en contacto dicha célula con una construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, con un vector según la reivindicación 13, con un genoma viral según cualquiera de las reivindicaciones 14 o 15 o con un virión según la reivindicación 15 en condiciones adecuadas para la entrada en la célula de dicha construcción, de dicho vector o de dicho virión y
 - (ii) poner en contacto la célula con el agente inductor durante el tiempo necesario para que se produzca la expresión del polinucleótido de interés.
18. Una composición farmacéutica que comprende una construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, un vector según la reivindicación 13, un genoma viral según las reivindicaciones 14 ó 15 o un virión según la reivindicación 16 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

19. Una construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, un vector según la reivindicación 13, un genoma viral según las reivindicaciones 14 ó 15 o un virión según la reivindicación 16 o una composición farmacéutica según la reivindicación 18 para uso como medicamento.
20. Una construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, un vector según la reivindicación 13, un genoma viral según las reivindicaciones 14 ó 15 o un virión según la reivindicación 16 o una composición farmacéutica según la reivindicación 18 para su uso en el tratamiento de un enfermedad hepática.
21. Una construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, un vector según la reivindicación 13, un genoma viral según las reivindicaciones 14 ó 15 o un virión según la reivindicación 16 o una composición farmacéutica según la reivindicación 18 en donde el polinucleótido de interés codifica IL-12 o una variante funcionalmente equivalente de la misma para su uso en el tratamiento del cáncer hepático.
22. Un operador-promotor inducible bidireccional adecuado para la expresión hepatoespecífica e inducible por un agente inductor de dos polinucleótidos de interés que comprende
 - (i) al menos un elemento de respuesta a dicho agente inductor,
 - (ii) una primera secuencia promotora hepatoespecífica y
 - (iii) una segunda secuencia promotora hepatoespecífica,en donde la primera y la segunda secuencia promotora hepatoespecífica actúan de forma divergente con respecto al elemento de respuesta al agente inductor y en donde la actividad promotora de la primera y la segunda secuencia promotora hepatoespecífica se ve aumentada en presencia de dicho agente inductor y en presencia de un transactivador que se une al elemento de respuesta.
23. Un operador inducible bidireccional según la reivindicación 22 en donde el elemento de respuesta al agente inductor en el operador-promotor bidireccional regulable comprende al menos un elemento de respuesta a una tetraciclina.

24. Un operador inducible bidireccional según la reivindicación 23 en donde el elemento de respuesta a la tetraciclina comprende un secuencia de ácidos nucleicos definida en SEQ.ID.NO.:1.
25. Un operador inducible bidireccional según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24 en donde la primera secuencia promotora hepatoespecífica y la segunda secuencia promotora hepatoespecífica son iguales.
26. Un operador inducible bidireccional según la reivindicación 25 en donde la primera secuencia promotora hepatoespecífica y la segunda secuencia promotora hepatoespecífica comprenden el promotor del gen de albúmina o una variante funcionalmente equivalente del mismo.
27. Un operador inducible bidireccional según la reivindicación 26 en donde el promotor del gen de albúmina comprende una secuencia seleccionada del grupo de SEQ.ID.NO.: 2 y SEQ.ID.NO.:3.
28. Un operador inducible bidireccional según la reivindicación 27 en donde la secuencia nucleotídica del operador-promotor inducible bidireccional comprende la SEQ.ID.NO.: 4.
29. Una construcción génica adecuada para la expresión hepatoespecífica e inducible por un agente inductor de un polinucleótido de interés que comprende
 - (a) Un operador-promotor inducible bidireccional que comprende
 - (i) al menos un elemento de respuesta a dicho agente inductor,
 - (ii) una primera secuencia promotora hepatoespecífica y
 - (iii) una segunda secuencia promotora hepatoespecífica,
 - (b) una secuencia nucleotídica que codifica un transactivador activable por dicho agente inductor que se encuentra operativamente acoplada a la primera secuencia promotora hepatoespecífica y una señal de

poliadenilación situada en posición 3' con respecto a la región que codifica el transactivador,

en donde la primera y la segunda secuencia promotora hepatoespecífica actúan de forma divergente con respecto al elemento de respuesta al agente inductor y en donde la actividad promotora de la primera y la segunda secuencia promotora hepatoespecífica se ve aumentada en presencia de dicho agente inductor y en presencia de un transactivador que se une al elemento de respuesta en el operador-promotor inducible bidireccional.

30. Una construcción génica según la reivindicación 29 en donde el elemento de respuesta al agente inductor en el operador-promotor bidireccional regulable comprende al menos un elemento de respuesta a una tetraciclina y el transactivador es activable por dicha tetraciclina.
31. Una construcción según la reivindicación 30 en donde el elemento de respuesta a la tetraciclina comprende una secuencia de ácidos nucleicos definida en SEQ.ID.NO.:1.
32. Una construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 30 ó 31 en el que el transactivador inducible por tetraciclinas reverso está codificado por un polinucleótido que comprende la secuencia SEQ ID NO:2.
33. Una construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 29 a 32 en donde la primera secuencia promotora hepatoespecífica y la segunda secuencia promotora hepatoespecífica son iguales.
34. Una construcción génica según la reivindicación 33 en donde la primera secuencia promotora hepatoespecífica y la segunda secuencia promotora hepatoespecífica comprenden el promotor del gen de albúmina o una variante funcionalmente equivalente del mismo.

35. Una construcción génica según la reivindicación 34 en donde el promotor del gen de albúmina comprende una secuencia seleccionada del grupo de SEQ.ID.NO.: 2 y SEQ.ID.NO.:3.
36. Una construcción génica según la reivindicación 35 en donde la secuencia nucleotídica del operador-promotor inducible bidireccional comprende la SEQ.ID.NO.: 4.
37. Una construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 29 a 36 en donde la señal de poliadenilación es una señal de poliadenilación bidireccional.
38. Una construcción génica según la reivindicación 37 en la que la señal de poliadenilación es una señal de poliadenilación bidireccional del virus SV40.

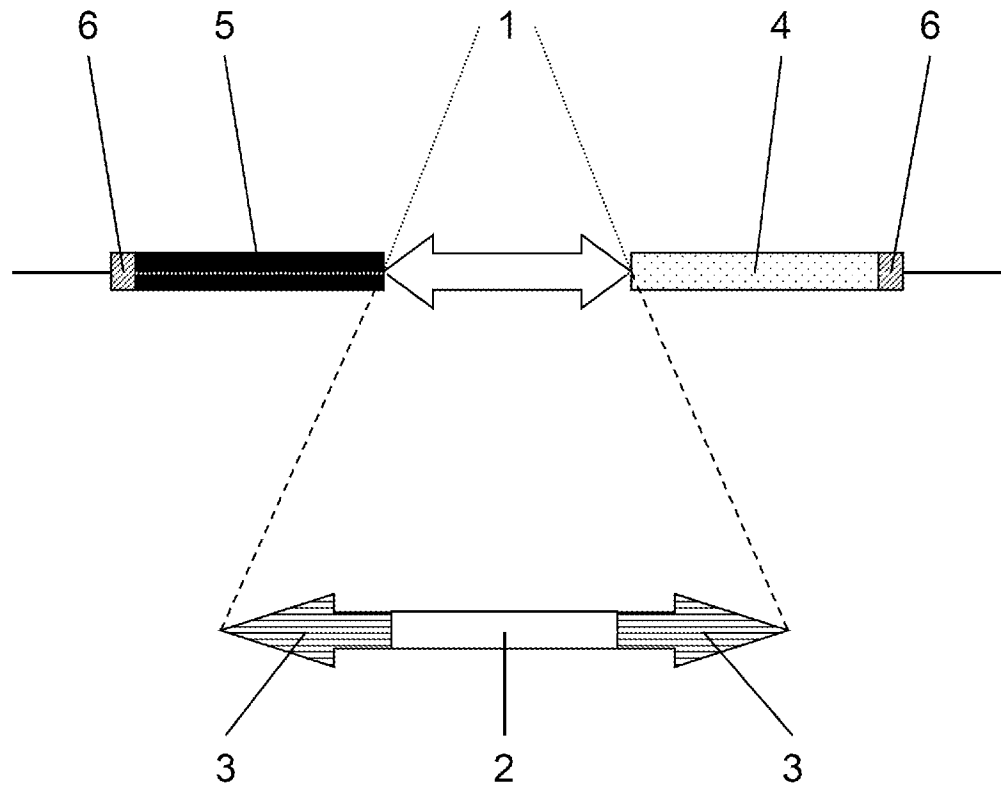


FIGURA 1

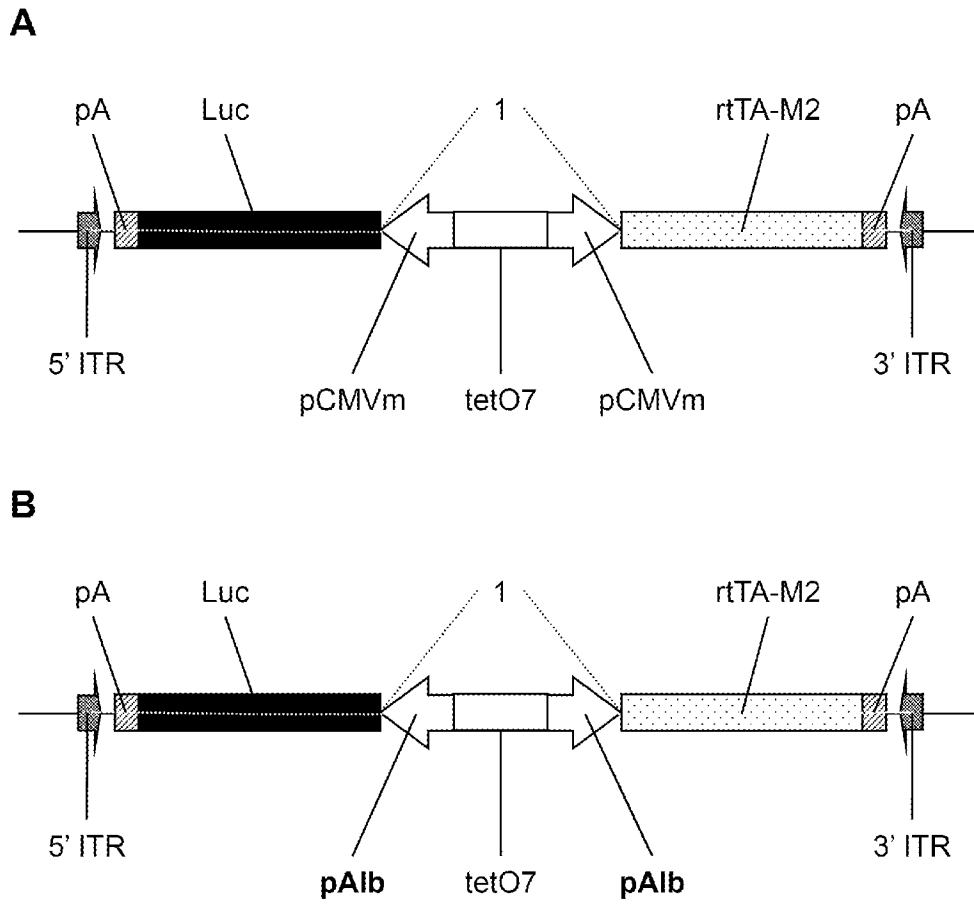


FIGURA 2

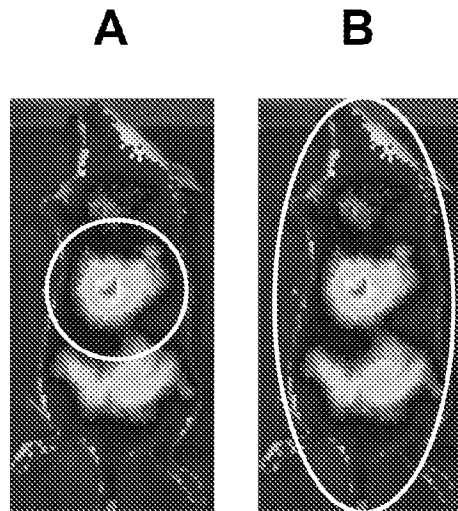


FIGURA 3

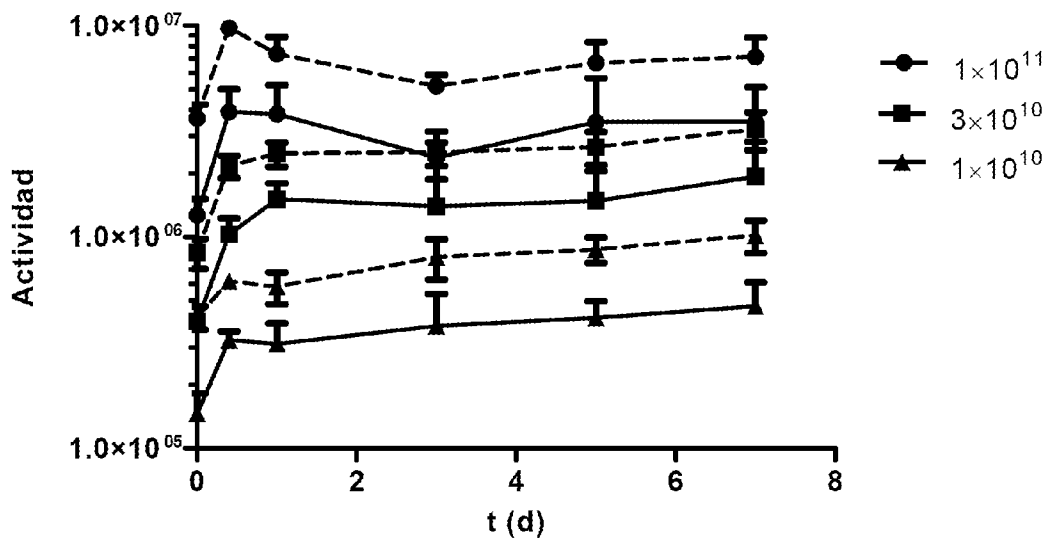


FIGURA 4

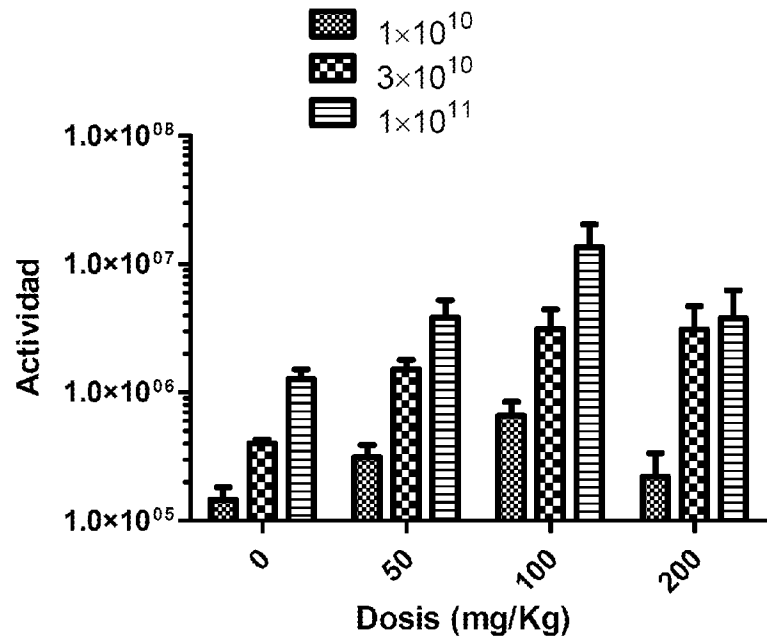


FIGURA 5

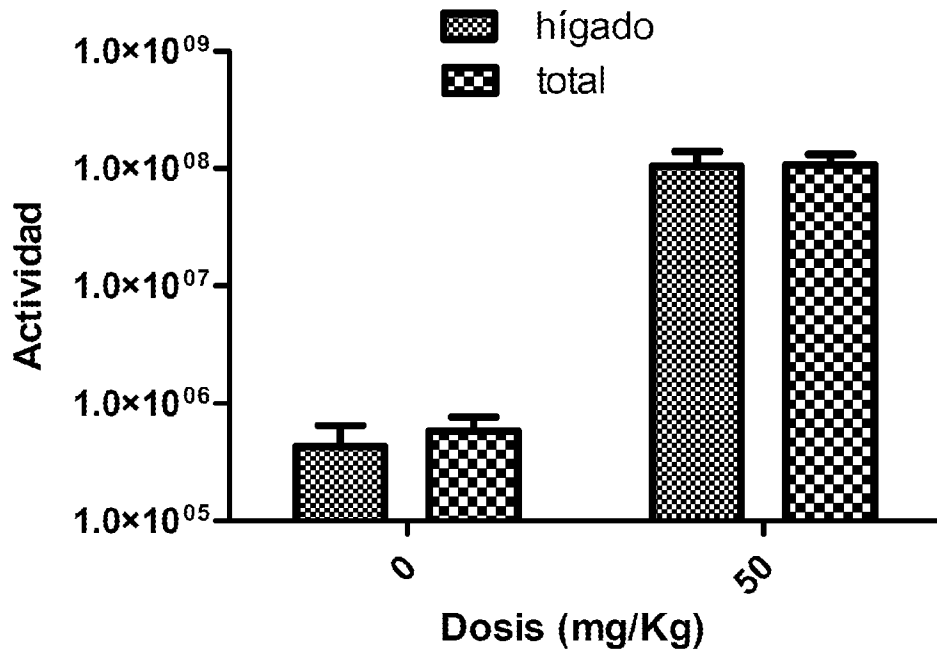


FIGURA 6

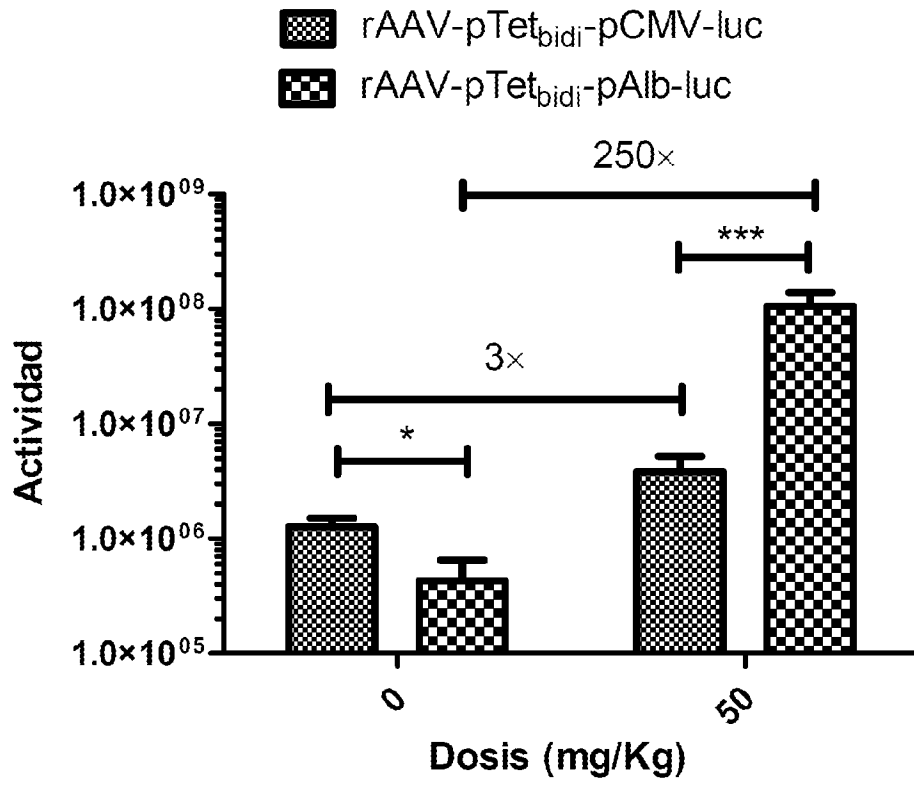


FIGURA 7

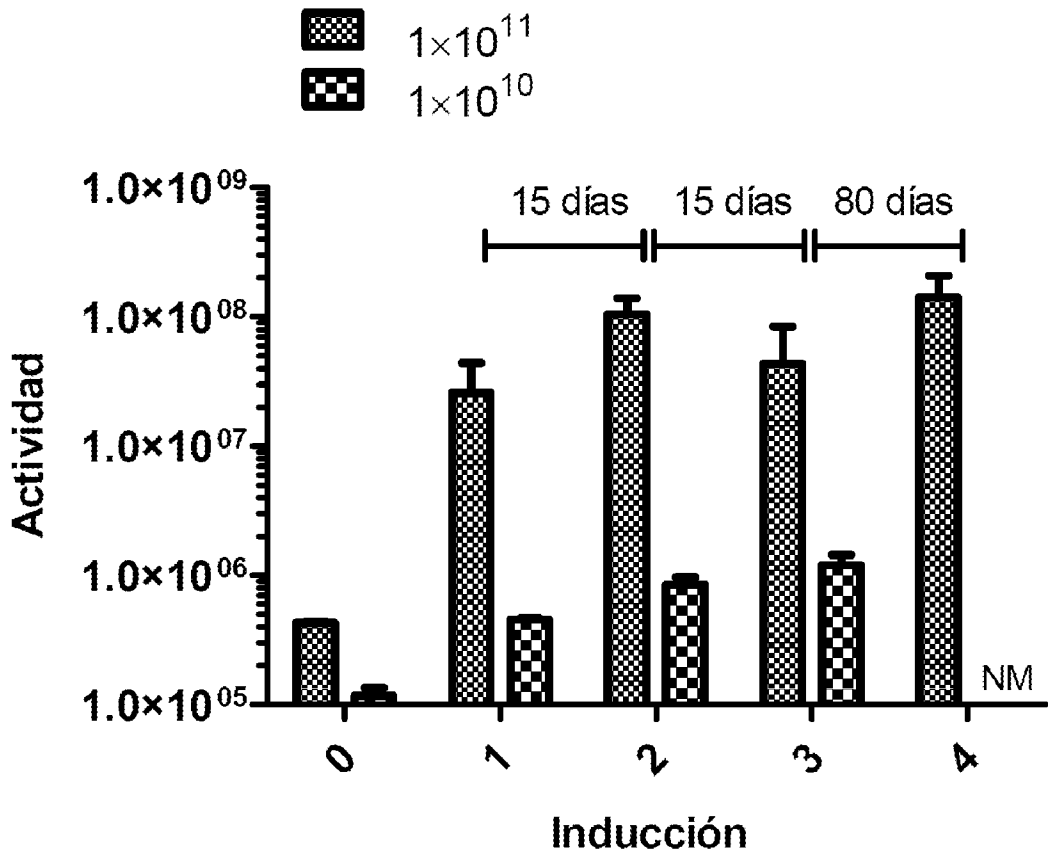


FIGURA 8

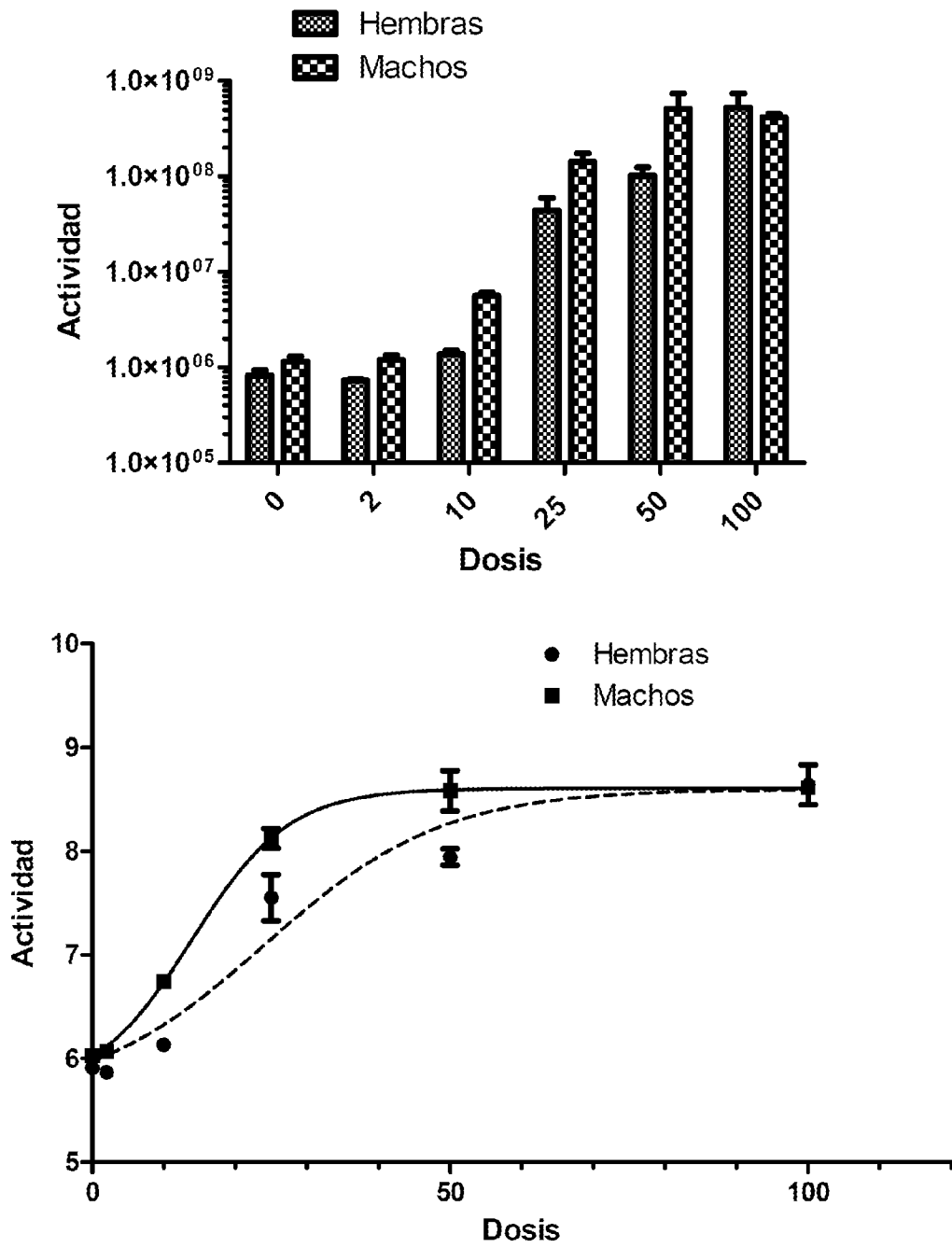


FIGURA 9

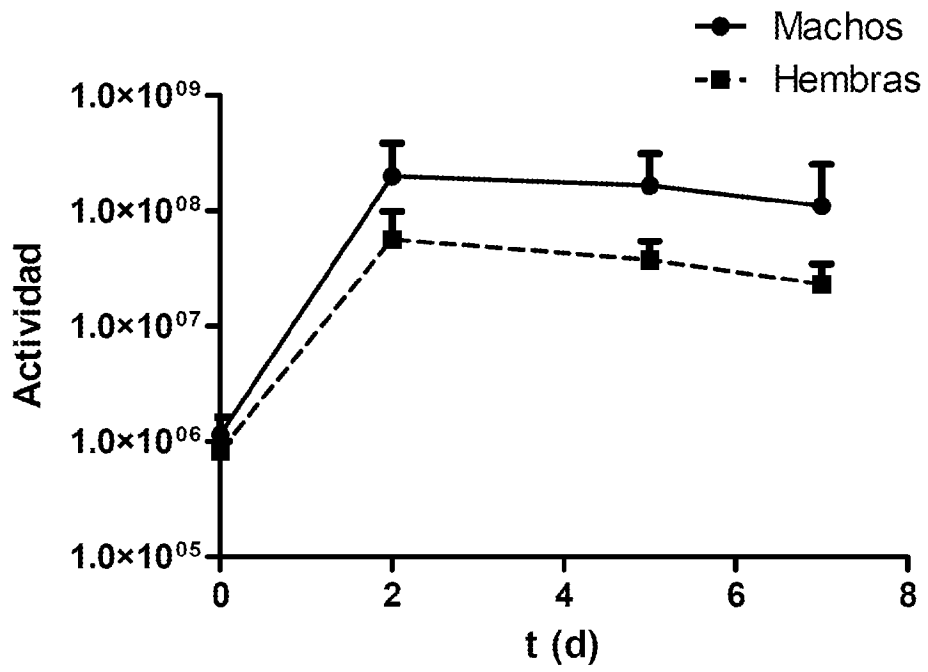


FIGURA 10

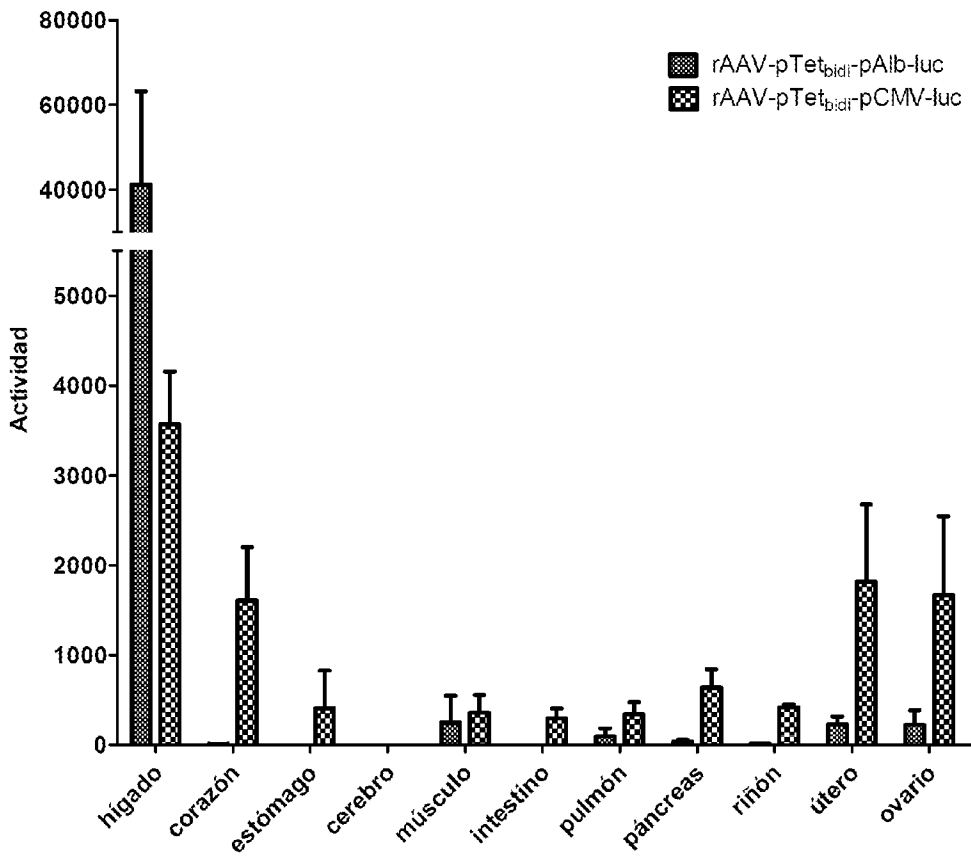
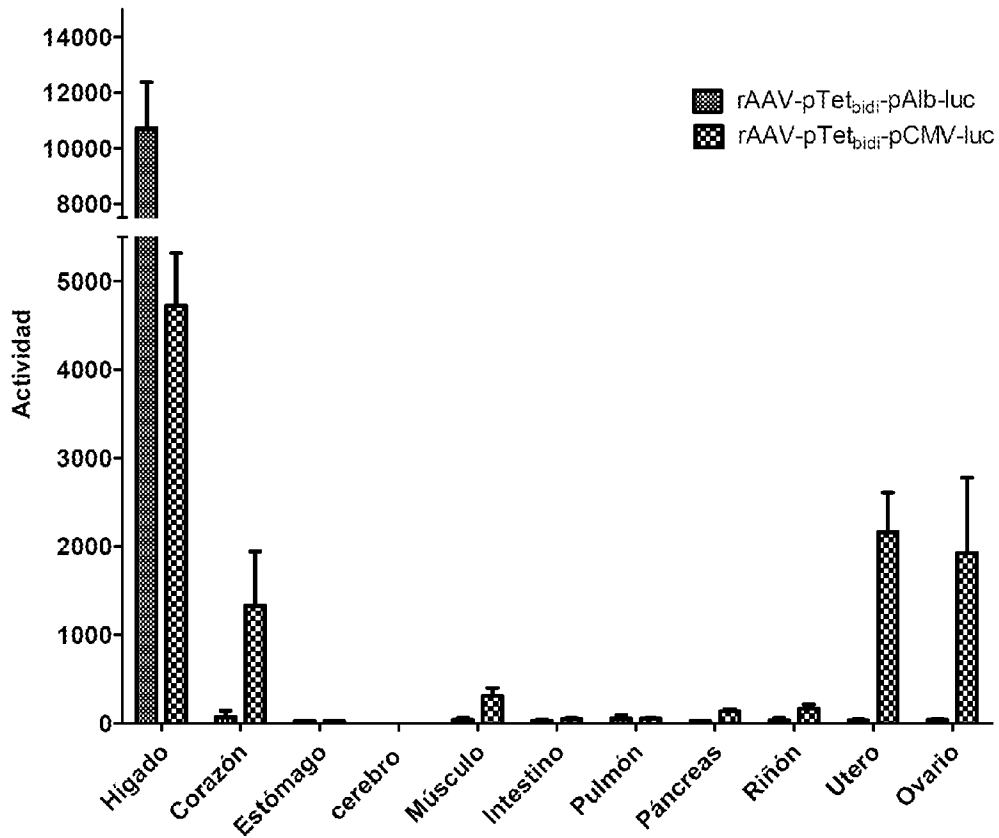


FIGURA 11

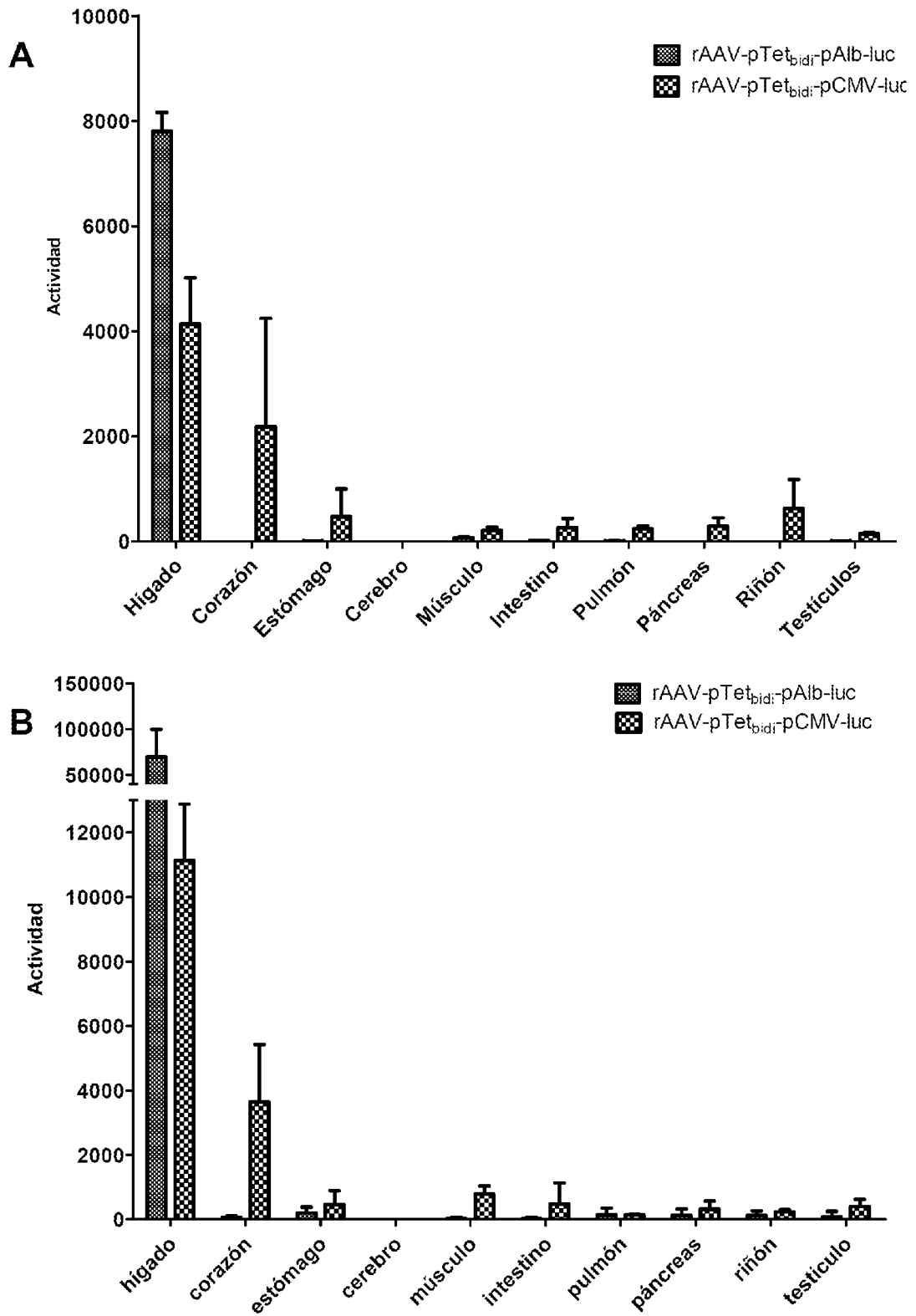


FIGURA 12

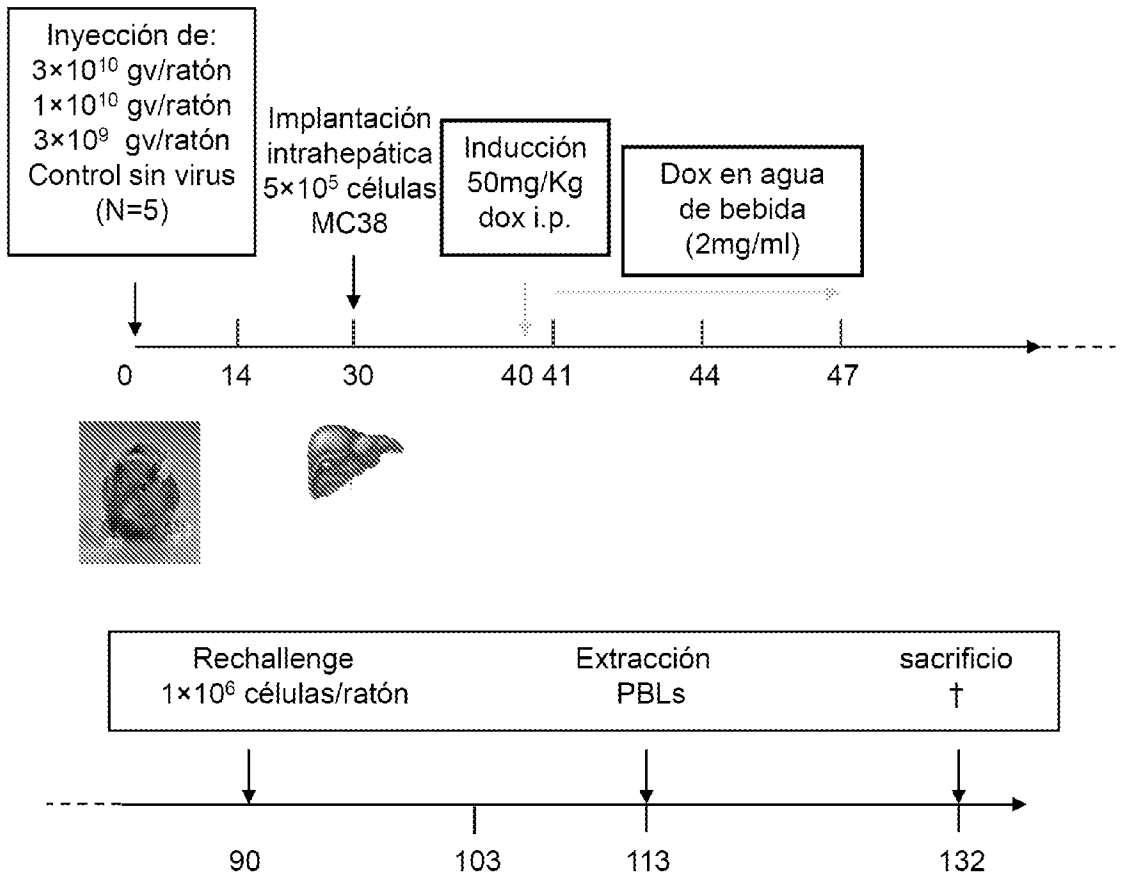


FIGURA 13

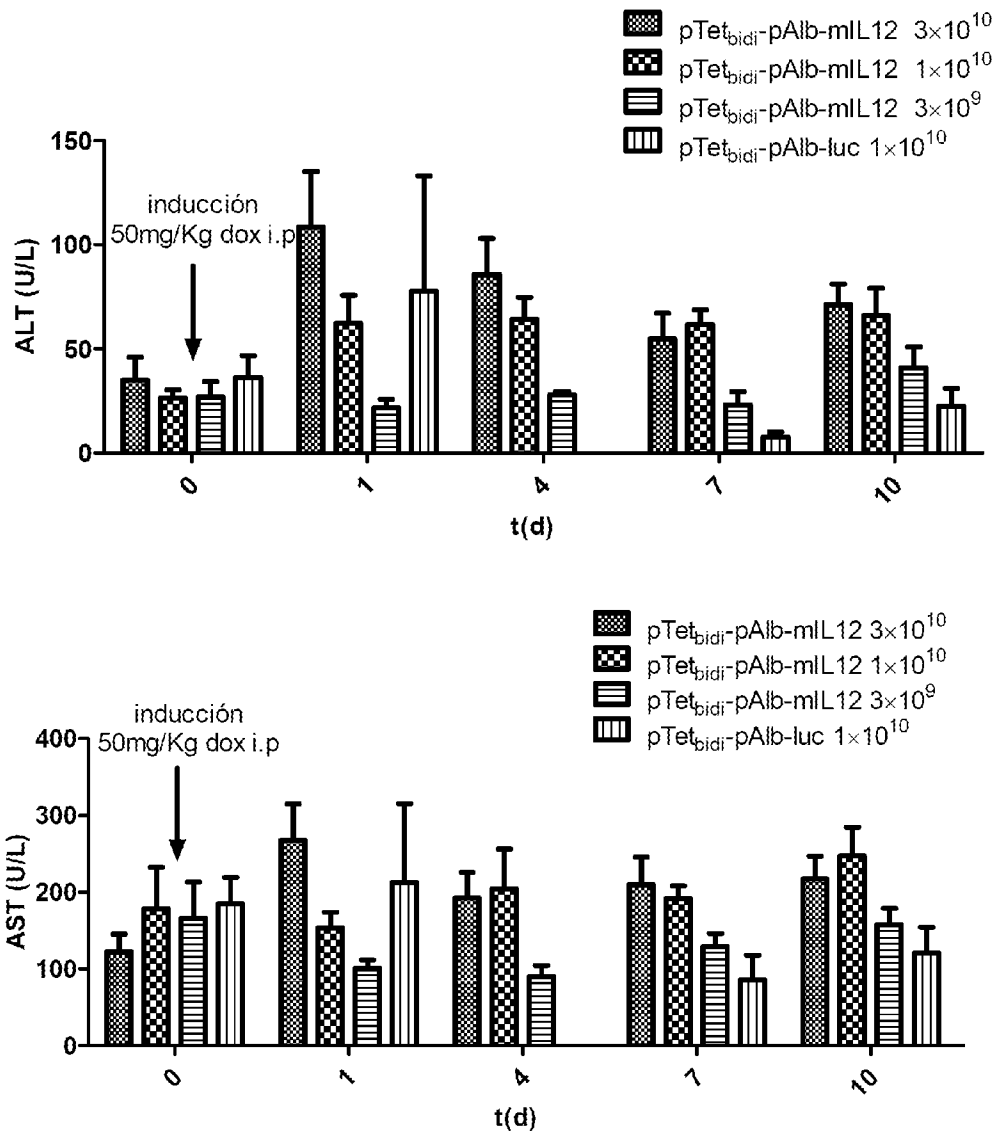


FIGURA 14

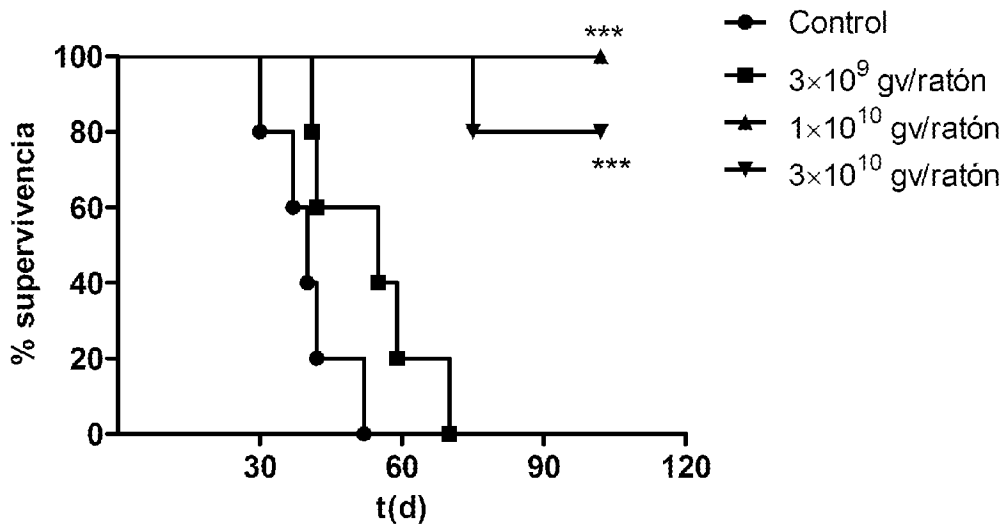


FIGURA 15

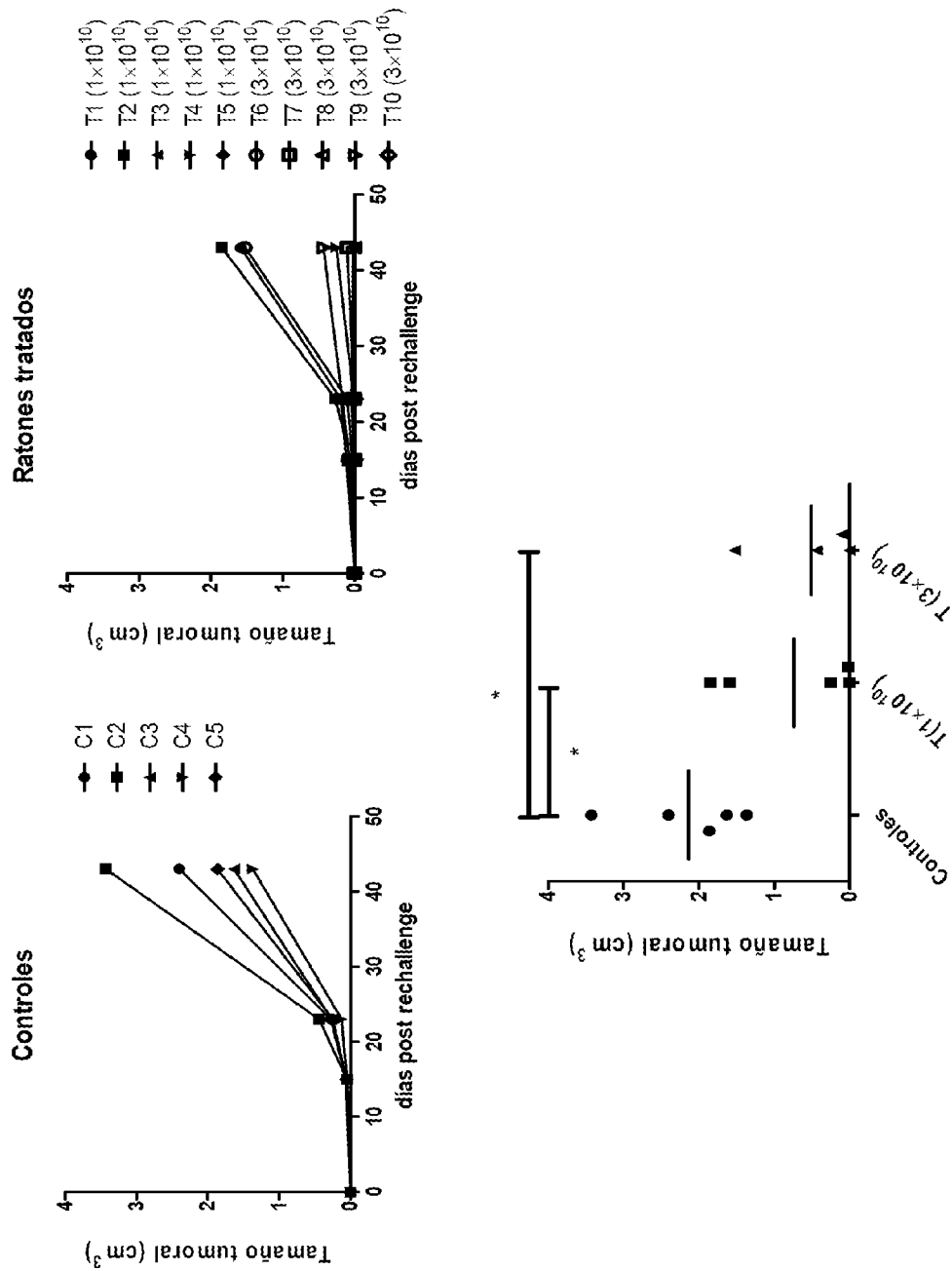


FIGURA 16

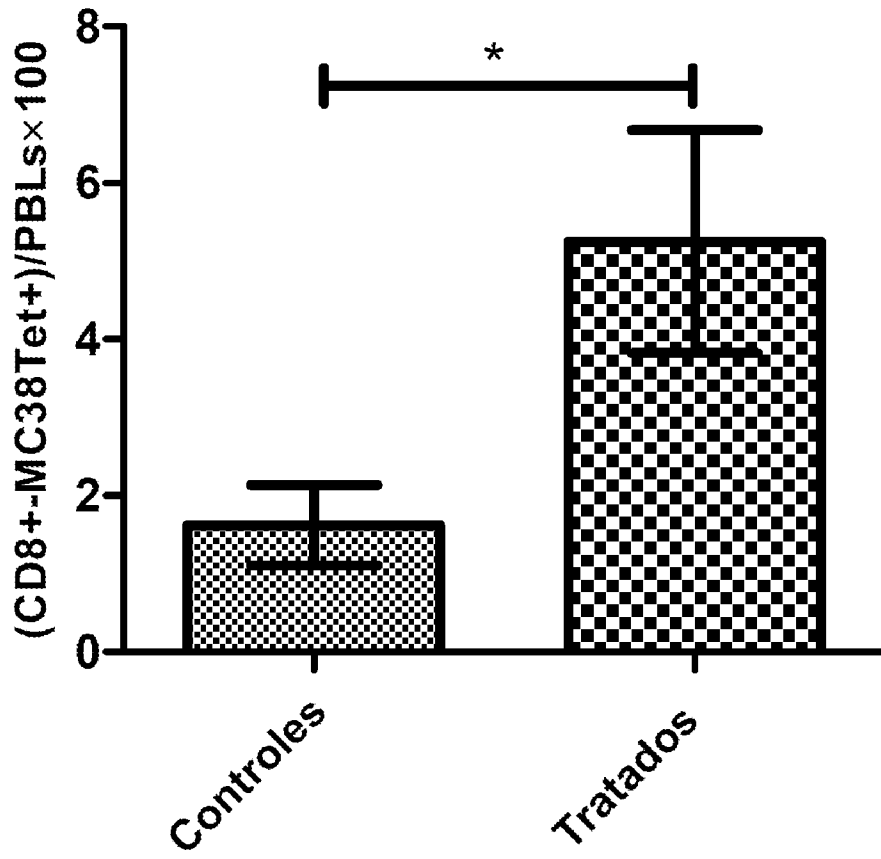


FIGURA 17

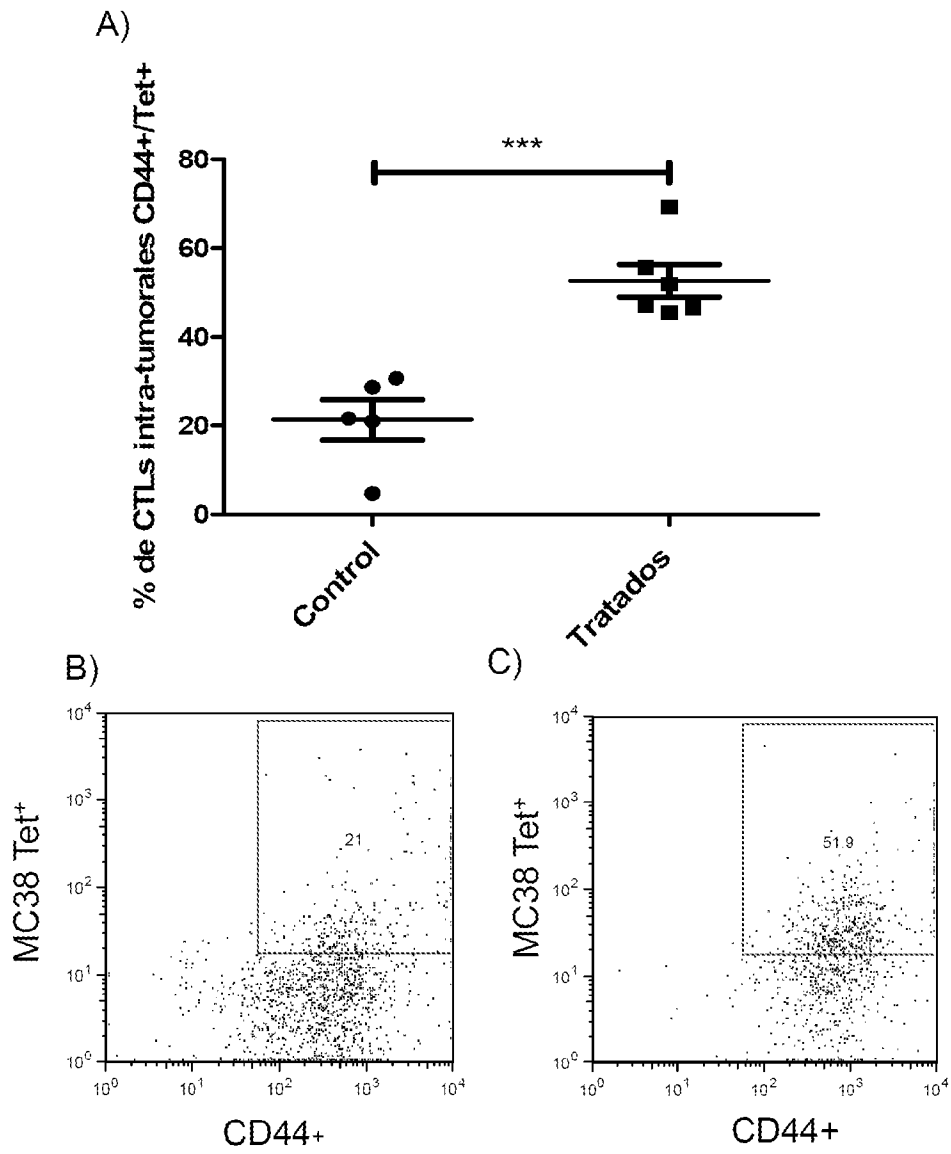


FIGURA 18

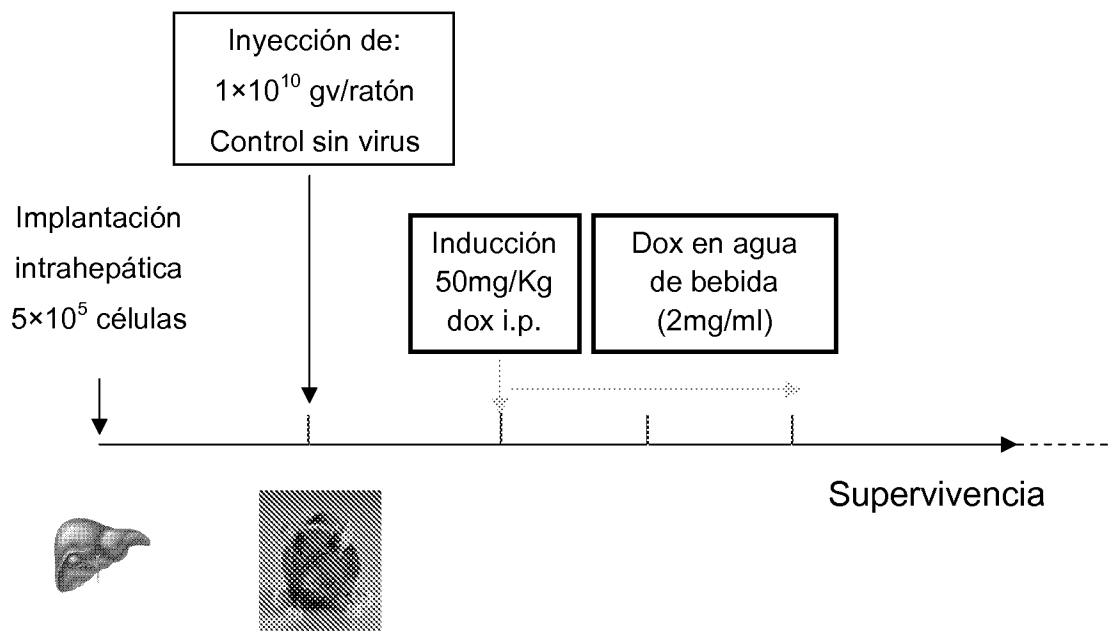


FIGURA 19

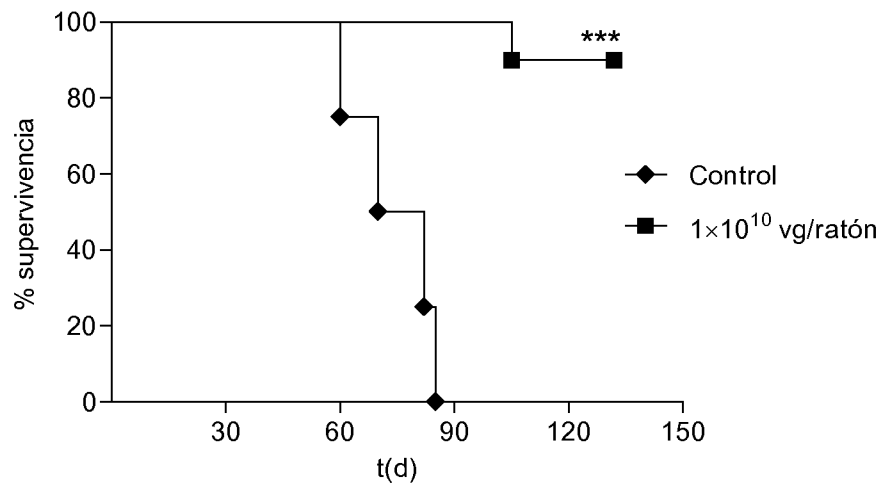


FIGURA 20

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES2010/070715

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

INV. C12N15/63 C12N15/86

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPO-Internal, BIOSIS, COMPENDEX, Sequence Search, EMBASE, FSTA, WPI Data

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
Y	<p>CHTARTO A ET AL: "Tetracycline-inducible transgene expression mediated by a single AAV vector", GENE THERAPY, MACMILLAN PRESS LTD., BASINGSTOKE, GB, vol. 10, no. 1, 01 de Enero 2003 (01-01-2003), P áginas 84-94 XP002540413, ISSN: 0969-7128, DOI: DOI:10.1038/SJ.GT.3301838 Citado en la aplicación Todo el Documento, en particular Fig. 1d</p> <p style="text-align: center;">-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-38

En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

<p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>“A” documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>“E” solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>“L” documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>“O” documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>“P” documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p>	<p>“T” documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</p> <p>“X” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>“Y” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p> <p>“&” documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p>
--	--

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional
21 February 2011	10/03/2011

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional	Funcionario autorizado
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Bassias, Ioannis
N° de fax	N° de teléfono

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES2010/070715

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
Y	<p>CHTARTO ET AL: "Controlled delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor by a single tetracycline-inducible AAV vector", EXPERIMENTAL NEUROLOGY, ACADEMIC PRESS, NEW YORK, NY, US, vol. 204, no. 1, 03 de Marzo 2007 (03-03-2007), Páginas 387-399, XP005927105, ISSN: 0014-4886, DOI: DOI:10.1016/J.EXPNEUROL.2006.11.014 Citado en la aplicación Todo el Documento, en particular Fig. 1c -----</p>	1-38
Y	<p>FECHNER ET AL: "A bidirectional Tet-dependent promotor construct regulating the expression of E1A for tight control of oncolytic adenovirus replication", JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 127, no. 4, 22 de Diciembre 2006 (22-12-2006), Páginas 560-574, XP005810970, ISSN: 0168-1656, DOI: DOI:10.1016/J.JBIOTEC.2006.09.011 Todo el Documento, en particular Fig. 1 -----</p>	1-38
Y	<p>BARON U ET AL: "CO-REGULATION OF TWO GENE ACTIVITIES BY TETRACYCLINE VIA A BIDIRECTIONAL PROMOTER", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 23, no. 17, 11 de Septiembre 1995 (11-09-1995) XP000775822, ISSN: 0305-1048 Todo el Documento, en particular Fig. 1 -----</p>	1-38
Y	<p>ZABALA MAIDER ET AL: "Optimization of the Tet-on system to regulate interleukin 12 expression in the liver for the treatment of hepatic tumors", CANCER RESEARCH, vol. 64, no. 8, 15 de Abril 2004 (15-04-2004), Páginas 2799-2804, XP002624074, ISSN: 0008-5472 Citado en la aplicación Todo el Documento -----</p>	1-38

-/--

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES2010/070715

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
Y	<p>WANG ET AL: "Prolonged and inducible transgene expression in the liver using gutless adenovirus: A potential therapy for liver cancer", GASTROENTEROLOGY, ELSEVIER, PHILADELPHIA, PA, vol. 126, no. 1, 01 de Enero 2004 (01-01-2004), Páginas, 278-289, XP005313326, ISSN: 0016-5085, DOI: DOI:10.1053/J.GASTRO.2003.10.075 Citado en la aplicación Todo el documento -----</p>	1-38
Y	<p>KRAMER M GABRIELA ET AL: "In vitro and in vivo comparative study of chimeric liver-specific promoters.", MOLECULAR THERAPY : THE JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF GENE THERAPY MAR 2003 LNKD- PUBMED:12668133, vol. 7, no. 3, Marzo 2003 (03-2003), Páginas 375-385, XP002624075, ISSN: 1525-0016 Todo el documento -----</p>	1-38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/ES2010/070715

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/63 C12N15/86
ADD.
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, COMPENDEX, Sequence Search, EMBASE, FSTA, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>CHTARTO A ET AL: "Tetracycline-inducible transgene expression mediated by a single AAV vector", GENE THERAPY, MACMILLAN PRESS LTD., BASINGSTOKE, GB, vol. 10, no. 1, 1 January 2003 (2003-01-01), pages 84-94, XP002540413, ISSN: 0969-7128, DOI: DOI:10.1038/SJ.GT.3301838 cited in the application the whole document, in particular Fig. 1d ----- -/--</p>	1-38

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 February 2011

Date of mailing of the international search report

10/03/2011

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer
Bassias, Ioannis

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/ES2010/070715

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>CHTARTO ET AL: "Controlled delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor by a single tetracycline-inducible AAV vector", EXPERIMENTAL NEUROLOGY, ACADEMIC PRESS, NEW YORK, NY, US, vol. 204, no. 1, 3 March 2007 (2007-03-03), pages 387-399, XP005927105, ISSN: 0014-4886, DOI: DOI:10.1016/J.EXPNEUROL.2006.11.014 cited in the application the whole document, in particular Fig. 1C</p> <p>-----</p>	1-38
Y	<p>FECHNER ET AL: "A bidirectional Tet-dependent promotor construct regulating the expression of E1A for tight control of oncolytic adenovirus replication", JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 127, no. 4, 22 December 2006 (2006-12-22), pages 560-574, XP005810970, ISSN: 0168-1656, DOI: DOI:10.1016/J.JBIOTEC.2006.09.011 the whole document, in particular Fig. 1</p> <p>-----</p>	1-38
Y	<p>BARON U ET AL: "CO-REGULATION OF TWO GENE ACTIVITIES BY TETRACYCLINE VIA A BIDIRECTIONAL PROMOTER", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 23, no. 17, 11 September 1995 (1995-09-11), XP000775822, ISSN: 0305-1048 the whole document, in particular Fig. 1</p> <p>-----</p>	1-38
Y	<p>ZABALA MAIDER ET AL: "Optimization of the Tet-on system to regulate interleukin 12 expression in the liver for the treatment of hepatic tumors", CANCER RESEARCH, vol. 64, no. 8, 15 April 2004 (2004-04-15), pages 2799-2804, XP002624074, ISSN: 0008-5472 cited in the application the whole document</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/ES2010/070715

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>WANG ET AL: "Prolonged and inducible transgene expression in the liver using gutless adenovirus: A potential therapy for liver cancer", GASTROENTEROLOGY, ELSEVIER, PHILADELPHIA, PA, vol. 126, no. 1, 1 January 2004 (2004-01-01), pages 278-289, XP005313326, ISSN: 0016-5085, DOI: DOI:10.1053/J.GASTRO.2003.10.075 cited in the application the whole document</p>	1-38
Y	<p>-----</p> <p>KRAMER M GABRIELA ET AL: "In vitro and in vivo comparative study of chimeric liver-specific promoters.", MOLECULAR THERAPY : THE JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF GENE THERAPY MAR 2003 LNKD- PUBMED:12668133, vol. 7, no. 3, March 2003 (2003-03), pages 375-385, XP002624075, ISSN: 1525-0016 the whole document</p> <p>-----</p>	1-38