

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 024 480**

51 Int. Cl.:

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/67 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.02.2018** **PCT/US2018/019056**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.08.2018** **WO18156658**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.02.2018** **E 18758507 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.05.2025** **EP 3585443**

54 Título: **Regulación de la expresión génica mediante la accesibilidad de señales de poliadenilación mediada por aptámeros.**

30 Prioridad:

21.02.2017 US 201762461689 P

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

04.06.2025

73 Titular/es:

MEIRAGTX UK II LIMITED (100.00%)
92 Britannia Walk
London N1 7NQ, GB

72 Inventor/es:

GUO, XUECUI;
HAN, JOONHEE y
ZHONG, ZHAOJING

74 Agente/Representante:

ABRIL ABOGADOS, S.L.P.

ES 3 024 480 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Regulación de la expresión génica mediante la accesibilidad de señales de poliadenilación mediada por aptámeros

5 **Campo de la invención**

La invención proporciona construcciones de polinucleótido para la regulación de la expresión génica mediante la modulación basada en aptámeros de la accesibilidad de una o más señales de poliadenilación y métodos para utilizar las construcciones de polinucleótido para regular la expresión génica en respuesta a la presencia o ausencia de un ligando que se une al aptámero. La construcción de polinucleótido contiene un ribointerruptor ("riboswitch") que comprende un aptámero y una horquilla efectora, en donde la horquilla efectora comprende una secuencia señal de poliadenilación.

15 **Antecedentes de la invención**

En las células eucariotas, los ARN mensajeros (ARNm) se producen a partir de transcritos de preARNm mediante un amplio procesamiento postranscripcional, incluyendo el bloqueo ("capping") del extremo 5', la eliminación de intrones por corte y empalme, y la escisión del extremo 3' y poliadenilación. El extremo 3' de casi todos los ARNm eucariotas comprende una cola de poli(A), un homopolímero de 20 a 250 residuos de adenosina. La cola de poli(A) se añade al preARNm en el núcleo mediante escisión y poliadenilación, un proceso catalizado por un gran complejo de proteínas. La adición de una cola de poli(A) depende de la presencia de múltiples elementos, incluida la secuencia señal de poliadenilación altamente conservada AATAAA (o su variante ATTAAA) que se encuentra en dirección 5' del sitio de poliadenilación, y otros elementos en dirección 5' ("USE"), así como un elemento en dirección 3' ("DSE") rico en T o GT. La adición de una cola de poli(A) al ARNm protege el mensaje de la degradación, entre otras funciones.

El documento WO 2010/141085 A1 (Myung J. et al.) enseña un método para inducir la terminación de la transcripción mediada por ribointerruptor utilizando un promotor operativamente ligado a un aptámero de ribointerruptor. Los ribointerruptores que regulan el corte y empalme del ARN se describen en el documento US 2010/221821 A1 (Breaker, R. et al.). Un artículo de revisión de Berens, C. et al. (*Biotechnology Journal*, 10(2), 246-257) analiza los ribointerruptores en la regulación de la expresión génica. El documento WO 2016/126747 A1 (Boyne, A. et al.) divulga el uso de los ribointerruptores para regular la expresión génica mediante el control del corte y empalme alternativo. El documento WO 2016/205764 A1 (Severinov, K. et al.) se refiere a un método de regulación dirigida de la expresión génica usando una proteína efectora CRISPR dirigida a ARN y al menos un componente de ácido nucleico dirigido tal como un ARN guía (ARNg).

35 **Sumario de la invención**

La invención se expone en el conjunto de reivindicaciones adjuntas. En un aspecto, la presente invención proporciona un casete de polinucleótido para la regulación de la expresión de un gen diana que comprende un ribointerruptor en donde el ribointerruptor comprende una horquilla efectora y un aptámero, en donde la horquilla efectora comprende una señal de poliadenilación, y en donde el aptámero y la horquilla efectora están unidos por un brazo del tallo alternativamente compartido que comprende una secuencia complementaria al brazo no compartido del tallo del aptámero y al brazo no compartido de la horquilla efectora. En una realización, el aptámero se une a una pequeña molécula ligando.

En las realizaciones, la parte del brazo del tallo alternativamente compartido que es complementaria a la secuencia en el tallo del aptámero y a la secuencia en la horquilla efectora es de 4 a 8 nucleótidos, de 5 a 7 nucleótidos, 5 nucleótidos o 6 nucleótidos. En las realizaciones, el tallo del aptámero es de 6 a 12 pares de bases, de 7 a 10 pares de bases, 8 pares de bases o 9 pares de bases. En las realizaciones, el tallo de la horquilla efectora es de 4 a 24 pares de bases, de 5 a 20 pares de bases, de 9 a 14 pares de bases, 9 pares de bases, 10 pares de bases, 11 pares de bases o 12 pares de bases.

En una realización, la horquilla efectora se sitúa 3' del aptámero, de modo que el brazo del tallo alternativamente compartido comprende la totalidad o una parte del brazo del tallo del aptámero 3' y la totalidad o una parte del brazo 5' del tallo efectora. En una realización, la horquilla efectora se sitúa 5' del aptámero, de modo que el brazo del tallo alternativamente compartido comprende todo o una parte del brazo 5' del tallo del aptámero y todo o una parte del brazo 3' del tallo efectora. En una realización, la señal de poliadenilación es AATAAA o ATTAAA. En una realización, la señal de poliadenilación es un elemento en dirección 3' (DSE). En una realización, la señal de poliadenilación es un elemento de secuencia en dirección 5' (USE).

En una realización, el casete de polinucleótido comprende dos ribointerruptores de la presente invención, en donde la horquilla efectora del primer ribointerruptor comprende toda o parte de la señal de poliadenilación AATAAA o ATTAA y la horquilla efectora del segundo ribointerruptor comprende todo o parte del elemento en dirección 3' (DSE). En una realización, los dos ribointerruptores comprenden cada uno un aptámero que se une al mismo ligando. En una realización, los dos ribointerruptores comprenden diferentes aptámeros que se unen a diferentes

ligandos.

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para modular la expresión de un gen diana que comprende

(a) insertar uno o más de los casetes de polinucleótido de la presente invención en la región 3' no traducida de un gen diana,

(b) introducir el gen diana que comprende el casete de polinucleótido en una célula *in vitro* o *ex vivo*, y

(c) exponer la célula a un ligando que se une al aptámero en una cantidad eficaz para aumentar la expresión del gen diana.

En una realización, el ligando es una molécula pequeña. En una realización, la horquilla efectora se sitúa 3' del aptámero, de modo que el brazo del tallo alternativamente compartido comprende todo o una parte del brazo 3' del tallo del aptámero y todo o una parte del brazo 5' del tallo efector. En una realización, la señal de poliadenilación es AATAAA o ATATAA. En una realización, la horquilla efectora se sitúa 5' del aptámero, de modo que el brazo del tallo alternativamente compartido comprende todo o una parte del brazo 5' del tallo del aptámero y todo o una parte del brazo 3' del tallo efector. En una realización, la señal de poliadenilación es un elemento en dirección 3' (DSE). En una realización, se insertan dos ribointerruptores en la región 3' no traducida ("UTR") del gen diana, en donde la horquilla efectora del primer ribointerruptor comprende toda o parte de la señal de poliadenilación AATAAA o ATATAA y la horquilla efectora del segundo ribointerruptor comprende todo o parte del elemento en dirección 3' (DSE). En una realización, los dos ribointerruptores comprenden cada uno un aptámero que se une al mismo ligando. En una realización, los dos ribointerruptores comprenden diferentes aptámeros que se unen a diferentes ligandos. En una realización, los dos o más casetes de polinucleótido comprenden el mismo aptámero.

En una realización, el gen diana que comprende el casete de polinucleótido se incorpora a un vector para la expresión del gen diana. En una realización, el gen diana comprende además un casete de regulación génica que modula la expresión del gen diana mediante la regulación mediada por aptámeros del corte y empalmen alternativo. En una realización, el vector es un vector vírico. En una realización, el vector vírico se selecciona del grupo que consiste en vector adenovírico, vector del virus adenoasociado y vector lentivírico.

En un aspecto, la presente invención proporciona un vector que comprende un gen diana que contiene un casete de polinucleótido descrito en el presente documento. En una realización, el vector es un vector vírico. En una realización, el vector vírico se selecciona del grupo que consiste en vector adenovírico, vector del virus adenoasociado y vector lentivírico. En una realización, el gen diana comprende además un casete de regulación génica que modula la expresión del gen diana mediante la regulación mediada por aptámeros del corte y empalmen alternativo.

En un aspecto adicional, la invención se refiere al casete de polinucleótido o al vector descrito en el presente documento para su uso en el tratamiento del cáncer, trastornos inmunitarios, enfermedades metabólicas, enfermedades raras tales como la HPN, angiogénesis ocular, DMAE seca, diabetes de tipo I, diabetes de tipo II, síndrome metabólico, trastornos del crecimiento o deficiencia de la hormona del crecimiento, anemia debida a enfermedad renal crónica, anemia debida a mielodisplasia, anemia debida a la quimioterapia contra el cáncer, fibrosis quística, hemofilia, distrofia muscular, talasemia, anemia de células falciformes, hemofilia A o hemofilia B. Otro aspecto de la invención se refiere al casete de polinucleótido o al vector descrito en el presente documento para su uso en la modulación de la expresión del gen diana. En otro aspecto más, la invención proporciona el casete de polinucleótido o el vector descrito en el presente documento para su uso como medicamento.

En un aspecto, el casete de polinucleótido de la presente invención se usa junto con otros mecanismos para la regulación de la expresión del gen diana. En una realización, un casete de polinucleótido de la presente invención se usa junto con un casete de regulación génica que modula la expresión del gen diana mediante la regulación mediada por aptámeros del corte y empalme alternativo, como se describe en el documento WO 2016/126747 (PCT/US2016/016234). En otras realizaciones, el casete de polinucleótido de la presente invención usado junto con un casete de regulación génica que modula la expresión del gen diana mediante la regulación mediada por aptámeros de ribozimas de autoescisión como se describe en el documento PCT/US2017/016303. En otras realizaciones, el casete de polinucleótido de la presente invención usado junto con un casete de regulación génica que modula la expresión del gen diana mediante la modulación de la poliadenilación mediada por aptámeros, como se describe en el documento PCT/US1207/016279.

Breve descripción de las figuras

Figura 1a. Un esquema de una realización de la invención en la que el brazo del tallo 3' de un aptámero está unido al brazo del tallo 5' de la horquilla efectora a través de un brazo del tallo alternativamente compartido (es decir, un brazo del tallo que puede formar una estructura tallo con el tallo del aptámero o con el tallo efector, pero no ambos al mismo tiempo), y una secuencia señal de poliadenilación (en este caso AATAAA) se encuentra en el tallo de la

horquilla efectora.

Figura 1b. Esquemas de una realización de la invención en la que la accesibilidad de una señal de poliadenilación (en este caso AATAAA) está regulada por la presencia o ausencia de un ligando del aptámero. En la UTR 3' se inserta un aptámero unido a una horquilla efectora (con la secuencia AATAAA incrustada en el tallo). La secuencia complementaria del brazo 5' de la estructura horquilla seguida de la secuencia aptámera se une al brazo 5' de la estructura horquilla. En ausencia del ligando del aptámero (panel superior), la secuencia AATAAA está bloqueada por la estructura horquilla formada por la horquilla efectora, inhibiendo la poliadenilación y suprimiendo de este modo la expresión génica. En presencia del ligando del aptámero, la unión aptámero/ligando facilita la formación del tallo del aptámero P1, alterando de este modo la estructura horquilla efectora y provocando la liberación de la AATAAA secuestrada. La secuencia que se comparte entre el tallo de la estructura horquilla y el tallo del aptámero P1 se indica con una línea gruesa.

Figura 1c y Figura 1d. Regulación de la expresión de la luciferasa mediante la modulación de la accesibilidad de AATAAA mediada por aptámeros. Se transfectaron células HEK 293 con las construcciones indicadas y se trataron con DMSO (Figura 1c) o NaOH (Figura 1d) como disolvente control o 500 μ M de guanosina (Figura 1c) o guanina (Figura 1d). La actividad luciferasa se expresó como $\text{media} \pm \text{DE}$. ($n=3$), y el coeficiente de inducción se expresó como el cociente de la actividad de la luciferasa obtenida en presencia de guanosina o guanina dividido por el valor obtenido en ausencia de guanosina o guanina.

Figura 1e. Regulación de la expresión de EGFP mediante la modulación de la accesibilidad de AATAAA mediada por aptámeros. Se transfectaron células HEK 293 con las construcciones indicadas y se trataron con NaOH como disolvente control o con 500 μ M de guanina. La intensidad de fluorescencia de GFP se expresó como $\text{media} \pm \text{DE}$. ($n=3$), y el coeficiente de inducción se expresó como el cociente de la intensidad de fluorescencia obtenida en presencia de guanina dividido por el valor obtenido en ausencia de guanina.

Figura 2a. Esquemas de la modulación de la accesibilidad de DSE en una horquilla mediante la unión aptámero/ligando. En la UTR 3' se inserta una estructura que forma una horquilla con la secuencia DSE incrustada en el tallo. La secuencia del aptámero está unida al brazo 3' de la estructura que forma la horquilla, seguida de la secuencia complementaria del brazo 3' de la estructura horquilla. En ausencia del ligando del aptámero (panel superior), la secuencia DSE se bloquea mediante la formación de una estructura horquilla, inhibiendo de este modo la poliadenilación y suprimiendo la expresión del gen diana. En presencia del ligando del aptámero (panel inferior), la unión aptámero/ligando facilita la formación del tallo del aptámero P1, alterando de este modo la estructura horquilla y provocando la liberación de la secuencia DSE de su secuestro. La secuencia compartida entre el tallo de la estructura horquilla efectora y el tallo del aptámero P1 se indica con una línea gruesa.

Figura 2b y Figura 2c. Regulación de la expresión de la luciferasa mediante la modulación de la accesibilidad de DSE mediada por aptámeros. Se transfectaron células HEK 293 con las construcciones indicadas y se trataron con DMSO (Figura 2b) o NaOH (Figura 2c) como disolvente control o 500 μ M de guanosina (Figura 2b) o guanina (Figura 2c). La actividad de la luciferasa se presenta como $\text{media} \pm \text{DE}$. ($n=3$), y el coeficiente de inducción se expresó como el cociente de la actividad de la luciferasa obtenida en presencia de guanosina o guanina dividido por el valor obtenido en ausencia de guanosina o guanina.

Figura 3. Regulación de la expresión de la luciferasa mediante la modulación mediada por aptámeros del acceso a una secuencia sintética de poliA.

Figura 4. La secuencia del bucle en la estructura horquilla afecta a la actividad del ribointerruptor basado en poliA. stbl_ATA_Gua1 tiene un bucle TTCG más estable, ATA_Gua_1 tiene el bucle GAAA y gaat_ATA_Gua_1 tiene el bucle GAAT.

Figura 5a. Esquemas de la modulación de la accesibilidad de las secuencias AATAAA y DSE simultáneamente mediante un aptámero. En la UTR 3' de un gen diana se insertan dos estructuras horquilla, cada una con una secuencia AATAAA o DSE, y los aptámeros se unen a cada estructura horquilla como se describe en la Figura 1b y la Figura 2a. El aptámero 1 y el aptámero 2 representan el mismo aptámero o aptámeros diferentes que se unen al mismo ligando o a ligandos diferentes. En ausencia del ligando del aptámero (panel superior), tanto AATAAA como DSE están secuestradas en las estructuras horquilla, por lo que se suprime la expresión génica. En presencia del ligando del aptámero (panel inferior), cuando ambos aptámeros se unen a sus ligandos, tanto la secuencia AATAAA como la DSE se liberan de la estructura horquilla, permitiendo la expresión del gen diana.

Figura 5b. Se transfectaron células HEK 293 con las construcciones indicadas y se trataron con NaOH como disolvente control o con 500 μ M de guanina. La actividad luciferasa se expresó como $\text{media} \pm \text{DE}$. ($n=3$), y el coeficiente de inducción se expresó como el cociente de la actividad de la luciferasa obtenida en presencia de guanina dividido por el valor obtenido en ausencia de guanina. El secuestro simultáneo del elemento de secuencia AATAAA y DSE en la secuencia de poliA disminuye aún más el nivel basal de la expresión de luciferasa en la construcción ATA_DSE_Gua.

Figura 6a. Esquemas de la construcción de doble interruptor en el que el ribointerruptor ATA_Gua está en la UTR 3' y el ribointerruptor G15 está insertado en la secuencia codificante de la luciferasa.

Figura 6b. Actividad luciferasa de células HEK 293 transfectadas con las construcciones indicadas y tratadas con o sin 500 μ M de guanina. La construcción con dos interruptores pFLuc-G15_ATA_Gua generó un mayor aumento de la inducción que la construcción con un único ribointerruptor.

Figura 7. Regulación de la expresión de la luciferasa a través de la modulación mediada por aptámero de adenina de la accesibilidad de AATAAA. Se transfectaron células HEK 293 con las construcciones indicadas y se trataron con NaOH como disolvente control o con 1 mM de adenina. La actividad luciferasa se expresó como media $\pm$ DE. (n=3), y el coeficiente de inducción se expresó como el cociente de la actividad de la luciferasa obtenida en presencia de adenina dividido por el valor obtenido en ausencia de adenina.

Figura 8. La UTR 3' de las construcciones utilizadas en los ejemplos. La secuencia codificante del gen de la luciferasa está en mayúsculas; AATAAA y DSE están resaltados en gris; la secuencia del aptámero está subrayada; la secuencia de la horquilla está subrayada con ondas; y la secuencia del tallo del aptámero P1 aparece en cursiva.

Descripción detallada de la invención

La regulación de la expresión de un gen diana (por ejemplo, un transgén terapéutico) es útil o necesario en diversas situaciones. En el contexto de la expresión terapéutica de genes, las técnicas que permiten la expresión regulada de transgenes tienen el potencial de mejorar la seguridad mediante la regulación del nivel de expresión y su calendario. Un sistema regulado para controlar la expresión de proteínas tiene efectos prácticos y, en algunos casos, funciones esenciales para unas aplicaciones terapéuticas seguras y eficaces. La invención proporciona construcciones de polinucleótido para la regulación de la expresión génica mediante la modulación de la poliadenilación basada en aptámeros secuestrando una o más señales de poliadenilación en una estructura horquilla (horquilla efectora) que está unida al aptámero y métodos para usar las construcciones para regular la expresión génica en respuesta a la presencia o ausencia de un ligando que se une al aptámero.

La construcción de polinucleótido contiene al menos un ribointerruptor que comprende una horquilla efectora y un aptámero en donde la horquilla efectora comprende una secuencia señal de poliadenilación. El aptámero y la horquilla efectora están unidos por un brazo del tallo compartido que puede formar alternativamente un tallo con el tallo del aptámero o con el tallo efector en función de la presencia de un ligando del aptámero. Cuando un ligando del aptámero está presente y unido al aptámero, el tallo del aptámero (el tallo del aptámero P1) se estabiliza y forma un tallo con el brazo del tallo alternativamente compartido. Por tanto, en presencia de ligando, la estructura horquilla formada por la horquilla efectora está desfavorecida y la señal de poliadenilación es accesible, permitiendo que se produzca la poliadenilación que conduce a una mayor expresión del gen diana. En ausencia de ligando, la horquilla efectora forma una estructura de tallo con el brazo del tallo alternativamente compartido, secuestrando de este modo la secuencia señal de poliadenilación, impidiendo la poliadenilación y disminuyendo la expresión del gen diana.

En una realización, la horquilla efectora se sitúa 3' del aptámero de modo que el brazo del tallo alternativamente compartido comprende todo o una parte del brazo del tallo del aptámero 3' y todo o una parte del brazo 5' de la horquilla efectora (véase, por ejemplo, Figuras 1a y 1b). En una realización, la horquilla efectora se sitúa 5' del aptámero de modo que el brazo del tallo alternativamente compartido comprende todo o una parte del brazo del tallo del aptámero 5' y todo o una parte del brazo 3' de la horquilla efectora (véase, por ejemplo, la Figura 3).

El casete de polinucleótido de regulación génica se refiere a una construcción de ADN recombinante que, cuando se incorpora al ADN de un gen diana en la UTR 3', proporciona la capacidad de regular la expresión del gen diana mediante la regulación de la poliadenilación mediada por aptámero/ligando. Como se usa en el presente documento, un casete o construcción de polinucleótido es un ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN) que comprende elementos derivados de diferentes fuentes (por ejemplo, organismos diferentes, genes diferentes del mismo organismo y similares).

Ribointerruptor

El casete de polinucleótido comprende un ribointerruptor. El término "ribointerruptor", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un segmento regulador de un polinucleótido de ARN (o del ADN que codifica el ribointerruptor). En el contexto de la presente invención, un ribointerruptor contiene una región sensor (es decir, un aptámero) y una horquilla efectora que juntos son responsables de detectar la presencia de un ligando (por ejemplo, una molécula pequeña) y de modular la accesibilidad de una secuencia de poliadenilación situada en la horquilla efectora. En una realización, el ribointerruptor es recombinante, utilizando polinucleótidos de dos o más fuentes. El término "sintético" como se utiliza en el presente documento en el contexto de un ribointerruptor se refiere a un ribointerruptor que no se produce de forma natural.

Horquilla efectora

La horquilla efectora del ribointerruptor comprende una secuencia de ARN (o ADN que codifica la secuencia de ARN) que, en ausencia de un ligando que se une a la región sensor (es decir, un aptámero), forma una estructura tallo (es decir, una región de doble cadena) que reduce la accesibilidad de una secuencia señal de poliadenilación.

El tallo efector comprende una señal de poliadenilación. En una realización, la horquilla efectora comprende una secuencia de señal de poliadenilación y una secuencia complementaria de una secuencia de señal de poliadenilación. En algunas realizaciones, la parte de tallo de la horquilla efectora comprende sólo una parte de la secuencia de señal de poliadenilación. En algunas realizaciones, parte de la secuencia señal de poliadenilación se encuentra en la parte de bucle de la horquilla efectora.

La secuencia señal de poliadenilación puede ser cualquier secuencia en la UTR 3' del gen diana que participe en la poliadenilación eficiente del ARNm transcrito desde el gen diana, incluyendo AATAAA (o secuencias relacionadas), un elemento de secuencia en dirección 3' (DSE) (por ejemplo, secuencia rica en T o GT), o un elemento de secuencia en dirección 5' (USE). En algunas realizaciones, la secuencia señal de poliadenilación es una secuencia endógena de la UTR 3' del gen diana. En otras realizaciones, la secuencia señal de poliadenilación es una secuencia exógena (por ejemplo, secuencia de un gen diferente o de un organismo diferente) o una secuencia señal de poliadenilación sintética.

Uno de los brazos de tallo de la horquilla efectora está unido a un aptámero a través de un tallo del aptámero (véase, por ejemplo, Figuras 1a, 1b y 2a). Cuando el aptámero no está unido a su ligando, la horquilla efectora se encuentra en un contexto que inhibe el acceso a una secuencia señal de poliadenilación, inhibiendo la poliadenilación y provocando la degradación del mensaje. Cuando el aptámero se une a su ligando, la horquilla efectora se encuentra en una conformación que no inhibe el acceso a la secuencia señal de poliadenilación, permitiendo la poliadenilación del mensaje y el aumento de la expresión del gen diana.

La parte de tallo de la horquilla efectora debe tener una longitud (y un contenido de GC) suficiente para promover la formación de la estructura horquilla y, de este modo, inhibir la accesibilidad a la secuencia señal de poliadenilación cuando el ligando del aptámero no esté presente en cantidades suficientes. En realizaciones de la invención, la parte de tallo de la horquilla efectora comprende la secuencia de tallo además de la secuencia de señal de poliadenilación y su secuencia complementaria. La longitud y la secuencia de la parte de tallo pueden modificarse utilizando técnicas conocidas para identificar tallos que permitan una expresión de fondo aceptable del gen diana cuando no hay ligando presente y niveles de expresión aceptables del gen diana cuando el ligando está presente. Si el tallo es, por ejemplo, demasiado largo puede ocultar el acceso a la secuencia señal de poliadenilación en presencia o ausencia de ligando. Si el tallo es demasiado corto, puede no formar una estructura horquilla estable capaz de secuestrar la secuencia señal de poliadenilación, en cuyo caso la poliadenilación del mensaje (que conduce a la expresión del gen diana) se producirá en presencia o ausencia de ligando. En una realización, la longitud total del tallo efector (es decir, la parte que forma el tallo de la horquilla efectora) es de 4 a 24 pares de bases, de 5 a 20 pares de bases, de 9 a 14 pares de bases, 9 pares de bases, 10 pares de bases, 11 pares de bases o 12 pares de bases. Además de la longitud del tallo, el contenido de pares de bases GC del tallo puede alterarse para modificar la estabilidad del tallo. En algunas realizaciones, el tallo de la región efectora contiene uno o más nucleótidos con emparejamiento incorrecto que no se emparejan bases con la parte complementaria del tallo de la región efectora.

Brazo de tallo alternativamente compartido

La horquilla efectora y el aptámero se unen a través de un brazo del tallo alternativamente compartido que comprende una secuencia que es complementaria tanto al brazo no compartido de la horquilla efectora como al brazo no compartido del tallo del aptámero. Debido a la secuencia que es complementaria tanto al aptámero como a los tallos efectores en el brazo no compartido, el brazo del tallo compartido puede formar alternativamente un tallo con el tallo del aptámero o con el tallo del efector (pero no con ambos simultáneamente) dependiendo de la presencia de un ligando del aptámero. En las realizaciones, la parte del brazo del tallo alternativamente compartido que es complementaria a la secuencia en el tallo del aptámero y a la secuencia en la horquilla efectora (es decir, secuencia alternativamente compartida) es de 4 a 8 nucleótidos, de 5 a 7 nucleótidos, 5 nucleótidos o 6 nucleótidos. En algunas realizaciones, el brazo del tallo alternativamente compartido comprende una secuencia adicional que es complementaria a solo uno de los tallos efectores no compartidos o al tallo del aptámero. En algunas realizaciones, además de la secuencia alternativamente compartida, el brazo del tallo alternativamente compartido comprende (a) una secuencia complementaria al brazo del tallo efector no compartido, pero no complementaria al brazo del tallo del aptámero no compartido; (b) secuencia que es complementaria al brazo del tallo del aptámero no compartido, pero no complementaria al brazo del tallo efector no compartido; o (c) ambos.

Aptámero/Ligando

La región sensor comprende un aptámero. El término "aptámero", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un polinucleótido de ARN que se une específicamente a un ligando. El aptámero está unido a la horquilla efectora a través de un tallo del aptámero. El tallo del aptámero puede, o no, comprender la secuencia que normalmente forma parte del aptámero (por ejemplo, la secuencia del tallo del aptámero de tipo salvaje). Como

tales, la referencia al tallo del aptámero no implica que el tallo del aptámero comprenda ninguna secuencia en particular. Por tanto, el tallo del aptámero puede comprender una secuencia del aptámero y/o una secuencia adicional capaz de formar un tallo tras la unión del ligando/aptámero.

- 5 Como en el caso del tallo de la horquilla efectora analizada anteriormente, la horquilla del aptámero debe tener una longitud suficiente (y un contenido de GC) de modo que el aptámero forme el tallo del aptámero en presencia del ligando del aptámero y la horquilla efectora forme un tallo cuando el ligando no esté presente. La longitud y la secuencia del tallo del aptámero pueden modificarse utilizando técnicas conocidas para identificar tallos que permitan una expresión de fondo aceptable del gen diana cuando no está presente el ligando y unos niveles de expresión aceptables del gen diana cuando el ligando está presente. En las realizaciones, el tallo del aptámero es de 6 a 12 pares de bases, de 7 a 10 pares de bases, 8 pares de bases o 9 pares de bases.

15 El término "ligando" se refiere a una molécula que está específicamente unida a un aptámero. En una realización, el ligando es una molécula de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 1.000 Daltons) que incluye, por ejemplo, lípidos, monosacáridos, segundos mensajeros, cofactores, iones metálicos, otros productos naturales y metabolitos, ácidos nucleicos, así como la mayoría de los fármacos terapéuticos. En una realización, el ligando es un polinucleótido con dos o más bases nucleotídicas.

20 En una realización, el ligando se selecciona del grupo que consiste en 8-azaguanina, adenosina 5'-monofosfato monohidrato, anfotericina B, avermectina B1, azatioprina, acetato de clormadinona, mercaptopurina, clorhidrato de moricizina, N6-metiladenosina, nadida, progesterona, clorhidrato de promazina, pamoato de pirvinio, sulfaguanidina, propionato de testosterona, tioguanosina, tiloxapol y vorinostat.

25 Los ligandos del aptámero también pueden ser componentes endógenos de las células que aumentan significativamente en condiciones fisiológicas/patológicas específicas, tales como la transformación oncogénica - pueden incluir moléculas de segundo mensajero tales como GTP o GDP, calcio; ácidos grasos o ácidos grasos que se metabolizan incorrectamente tal como 13-HODE en el cáncer de mama (Flaherty, JT et al., *Plos One*, vol. 8, e63076, 2013); aminoácidos o metabolitos de aminoácidos; metabolitos de la vía de la glucólisis que suelen tener niveles más altos en las células cancerosas o en las células normales en las enfermedades metabólicas; y moléculas asociadas al cáncer tales como Ras o la proteína Ras mutante, EGFR mutante en el cáncer de pulmón, indoleamina-2,3-dioxigenasa (IDO) en muchos tipos de cáncer. Entre los ligandos endógenos se incluyen los metabolitos de la progesterona en el cáncer de mama, como se ha divulgado en JP Wiebe (*Endocrine-Related Cancer* (2006) 13:717-738). Los ligandos endógenos también incluyen metabolitos con niveles aumentados como resultado de mutaciones en enzimas metabólicas clave en el cáncer de riñón, tal como lactato, glutatión, kinurenina como se ha divulgado en Minton, DR y Nanus, DM (*Nature Reviews, Urology*, vol. 12, 2005).

40 Los aptámeros tienen regiones de unión capaces de formar complejos con una molécula diana prevista (es decir, el ligando). La especificidad de la unión puede definirse en términos de las constantes de disociación comparativas (K_d) del aptámero para su ligando en comparación con la constante de disociación del aptámero para moléculas no relacionadas. Por tanto, el ligando es una molécula que se une al aptámero con mayor afinidad que al material no relacionado. Normalmente, la K_d para el aptámero con respecto a su ligando será al menos aproximadamente 10 veces menor que la K_d para el aptámero con moléculas no relacionadas. En otras realizaciones, la K_d será al menos aproximadamente 20 veces menor, al menos aproximadamente 50 veces menor, al menos aproximadamente 100 veces menor, y al menos aproximadamente 200 veces menor. Normalmente, un aptámero tendrá entre aproximadamente 15 y aproximadamente 200 nucleótidos de longitud. Más comúnmente, un aptámero tendrá entre aproximadamente 30 y aproximadamente 100 nucleótidos de longitud.

50 Los aptámeros que pueden incorporarse como parte del ribointerruptor pueden ser un aptámero de origen natural, o modificaciones del mismo, o aptámeros diseñados de novo y/o cribados mediante evolución sistémica de los ligandos por enriquecimiento exponencial (SELEX) u otros métodos de cribado. Entre los ejemplos de aptámeros que se unen a ligandos de moléculas pequeñas se incluyen, aunque no de forma limitativa, teofilina, dopamina, sulforodamina B, celobiosa, kanamicina A, lividomicina, tobramicina, neomicina B, viomicina, cloranfenicol, estreptomycin, citocinas, moléculas de la superficie celular y metabolitos. Para una revisión de los aptámeros que reconocen moléculas pequeñas, véase, por ejemplo, Famulok, *Science* 9:324-9 (1999) y McKeague, M. & DeRosa, M.C. *J. Nuc. Aci.* 2012. En otra realización, el aptámero es un polinucleótido complementario.

Métodos de identificación de aptámero/ligando

60 En una realización, el aptámero está diseñado para unirse, en particular, a un ligando de molécula pequeña. En el documento WO/2018/025085 se divulgan métodos para diseñar y seleccionar aptámeros que se unen a ligandos particulares. Se incluyen otros métodos para el cribado de aptámeros, por ejemplo, SELEX. Los métodos para diseñar aptámeros que se unen selectivamente a una molécula pequeña mediante SELEX se divulgan en, por ejemplo, las patentes de EE. UU. N.º 5.475.096, 5.270.163, y Abdullah Ozer, et al. *Nuc. Aci.* 2014. Las modificaciones del proceso SELEX se describen en las patentes de EE. UU. N.º 5.580.737 y 5.567.588.

65 Las técnicas de selección para identificar aptámeros suelen implicar la preparación de un gran conjunto de

moléculas de ADN o ARN de la longitud deseada que contengan una región aleatorizada o mutagenizada. Por ejemplo, un conjunto de oligonucleótidos para la selección de aptámeros podría contener una región de 20-100 nucleótidos aleatorizados flanqueada por regiones de secuencia definida de aproximadamente 15-25 nucleótidos de longitud y útiles para la unión de cebadores de PCR. El conjunto de oligonucleótidos se amplifica utilizando técnicas convencionales de PCR, u otros medios que permitan la amplificación de secuencias seleccionadas de ácido nucleico. El conjunto de ADN puede transcribirse *in vitro* para producir un conjunto de transcritos de ARN cuando se desee un aptámero de ARN. El conjunto de oligonucleótidos de ARN o ADN se somete, a continuación, a una selección basada en su capacidad y otras condiciones que imitan las condiciones fisiológicas normales. Las técnicas de selección incluyen, por ejemplo, cromatografía de afinidad, aunque puede utilizarse cualquier protocolo que permita la selección de ácidos nucleicos basada en su capacidad de unirse específicamente a otra molécula. Las técnicas de selección para identificar aptámeros que se unen a moléculas pequeñas y funcionan dentro de una célula pueden implicar métodos de cribado basados en células. En el caso de la cromatografía de afinidad, los oligonucleótidos se ponen en contacto con el ligando diana que se ha inmovilizado en un sustrato en una columna o en perlas magnéticas. El oligonucleótido se selecciona preferentemente para la unión del ligando en presencia de concentraciones salinas, temperaturas y otras condiciones que imitan las condiciones fisiológicas normales. Los oligonucleótidos del conjunto que se unen al ligando quedan retenidos en la columna o perla, y las secuencias que no se unen son lavadas. A continuación, los oligonucleótidos que se unen al ligando se amplifican (tras la transcripción inversa si se han utilizado transcritos de ARN) mediante PCR (normalmente tras la elución). El proceso de selección se repite en las secuencias seleccionadas durante un total de aproximadamente tres a diez rondas iterativas del procedimiento de selección. A continuación, se amplifican los oligonucleótidos resultantes, se clonan y se secuencian usando procedimientos convencionales para identificar las secuencias de los oligonucleótidos capaces de unirse al ligando diana. Una vez identificada una secuencia de aptámero, el aptámero puede optimizarse aún más realizando rondas adicionales de selección a partir de un conjunto de oligonucleótidos que comprenden una secuencia de aptámero mutagenizada.

El cribado de aptámeros *in vivo* puede usarse tras una o más rondas de selección *in vitro* (por ejemplo, SELEX). Por ejemplo, König, J. et al. (RNA. 2007, 13(4):614-622) describen la combinación de SELEX y un sistema de tres híbridos de levadura para la selección *in vivo* de aptámeros.

Genes diana

El casete de regulación génica de la presente invención es una plataforma que puede usarse para regular la expresión de cualquier gen diana que pueda expresarse en una célula diana, tejido u organismo con un ARNm que está poliadenilado. La expresión "gen diana" se refiere a un polinucleótido que se introduce en una célula y es capaz de transcribirse en ARN y traducirse y/o expresarse en condiciones adecuadas. Como alternativa, el gen diana es endógeno a la célula diana, y el casete de regulación génica de la presente invención se sitúa en la UTR 3' del gen diana. Un ejemplo de gen diana es un polinucleótido que codifica un polipéptido terapéutico. En una realización, el gen diana es exógeno a la célula en la que se va a transcribir la construcción de ADN recombinante. En otra realización, el gen diana es endógeno a la célula en la que se va a transcribir la construcción de ADN recombinante.

El gen diana de acuerdo con la presente invención puede ser un gen que codifica una proteína. El gen diana puede ser, por ejemplo, un gen que codifica una proteína estructural, una enzima, una proteína de señalización celular, una proteína mitocondrial, una proteína de dedo de cinc, una hormona, una proteína de transporte, un factor de crecimiento, una citocina, una proteína intracelular, una proteína extracelular, una proteína transmembrana, una proteína citoplasmática, una proteína nuclear, una molécula receptora, una proteína de unión a ARN, una proteína de unión a ADN, un factor de transcripción, maquinaria de traducción, una proteína de canal, una proteína motora, una molécula de adhesión celular, una proteína mitocondrial, una enzima metabólica, una cinasa, una fosfatasa, factores de cambio, una proteína chaperona y moduladores de cualquiera de las mismas. En las realizaciones, el gen diana codifica la eritropoyetina (Epo), la hormona de crecimiento humana (hGH), las nucleasas efectoras de tipo activador transcripcional (TALEN), insulina humana, la proteína 9 asociada a CRISPR (cas9), o una inmunoglobulina (o parte de la misma), incluyendo, por ejemplo, un anticuerpo terapéutico.

Construcciones de expresión

La presente invención contempla el uso de un vector recombinante para su introducción en células diana, *in vitro* o *ex vivo*, de un polinucleótido que codifica un gen diana y contiene un casete de regulación génica descrito en el presente documento. En muchas realizaciones, la construcción de ADN recombinante de esta invención incluye elementos de ADN adicionales que incluyen segmentos de ADN que permiten la replicación del ADN en una célula hospedadora y la expresión del gen diana en dicha célula a niveles adecuados. El experto sabe que las secuencias de control de la expresión (promotores, potenciadores y similares) se seleccionan en función de su capacidad para promover la expresión del gen diana en la célula diana. "Vector" significa un plásmido recombinante, cromosoma artificial de levadura (YAC), minicromosoma, minicírculo de ADN o virus (incluidas las secuencias derivadas de virus) que comprende un polinucleótido que debe administrarse a una célula hospedadora, ya sea *in vitro* o *in vivo*. En una realización, el vector recombinante es un vector vírico o una combinación de múltiples vectores víricos.

En la técnica se conocen vectores víricos para la expresión mediada por aptámeros de un gen diana en una célula diana, tejido u organismo e incluyen vectores adenovíricos (AV), vectores de virus adenoasociado (AAV), vectores retrovíricos y lentivíricos, y vectores del Herpes simplex tipo 1 (HSV1).

- 5 Los vectores adenovíricos incluyen, por ejemplo, los basados en el adenovirus humano de tipo 2 y el adenovirus humano de tipo 5 cuya replicación se ha hecho defectuosa mediante delecciones en las regiones E1 y E3. El casete transcripcional puede insertarse en la región E1, obteniendo un vector AV recombinante E1/E3 sometido a delección. Los vectores adenovíricos también incluyen vectores adenovíricos de alta capacidad dependientes de ayudante (también conocidos como vectores de alta capacidad, "gutless" o "guttet"), que no contienen secuencias
- 10 codificantes víricas. Estos vectores, contienen los elementos cis necesarios para la replicación y el empaquetado del ADN vírico, principalmente las secuencias de repetición terminal invertida (ITR) y la señal de empaquetado (Ψ). Estos genomas de vectores AV dependientes de ayudantes tienen el potencial de transportar desde unos pocos cientos de pares de bases hasta aproximadamente 36 kb de ADN extraño.
- 15 Los vectores de virus adenoasociados recombinantes "rAAV" incluyen cualquier vector derivado de cualquier serotipo de virus adenoasociado, incluyendo, sin limitación, AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-7 y AAV-8, AAV-9, AAV-10 y similares. Los vectores rAAV pueden tener uno o más de los genes AAV de tipo salvaje sometidos a delección total o parcialmente, preferentemente los genes de Rep y/o Cap, pero conservan las secuencias de flanqueo funcional ITR. Se conservan las secuencias ITR funcionales para el rescate, la replicación,
- 20 el empaquetado y la posible integración cromosómica del genoma del AAV. Las ITR no necesitan ser las secuencias de nucleótidos de tipo salvaje, y pueden estar alteradas (por ejemplo, mediante la inserción, delección o sustitución de nucleótidos) siempre que las secuencias permitan el rescate funcional, la replicación y el empaquetado.
- 25 Como alternativa, otros sistemas tales como los vectores lentivíricos pueden usarse en realizaciones de la invención. Los sistemas basados en lentivíricos pueden transducir tanto células que no se dividen como células que se dividen, lo que los hace útiles para aplicaciones dirigidas, por ejemplo, las células no divididas del SNC. Los vectores lentivíricos se derivan del virus de la inmunodeficiencia humana y, como ese virus, se integran en el genoma del hospedador, lo que proporciona la posibilidad de una expresión génica a largo plazo.
- 30 Los polinucleótidos, incluidos los plásmidos, YAC, minicromosomas y minicírculos, que portan el gen diana que contiene el casete de regulación génica también puede introducirse en una célula u organismo mediante sistemas de vectores no víricos utilizando, por ejemplo, lípidos catiónicos, polímeros, o ambos, como portadores. También pueden usarse sistemas de polímeros conjugados de poli-L-lisina (PLL) y polietilenimina (PEI) para administrar el vector a las células. Otros métodos para administrar el vector a las células incluyen la inyección hidrodinámica y la electroporación, así como el uso de ultrasonidos, tanto para cultivos celulares como para organismos. Para una revisión de los sistemas víricos y no víricos de administración para la administración génica, véase Nayerossadat, N. et al. (*Adv. Biomed. Res.* 2012; 1:27).

40 **Métodos para modular la expresión de un gen diana**

- En un aspecto, esta invención proporciona un método para modular la expresión de un gen diana (por ejemplo, un gen terapéutico), mediante (a) la inserción de uno o más casetes de polinucleótido de regulación génica de la presente invención en la UTR 3' de un gen diana; (b) introducir el gen diana que comprende el casete de regulación
- 45 génica en una célula *in vitro* o *ex vivo* y (c) exponer la célula a un ligando que se une al aptámero. En una realización, el ligando es una molécula pequeña. En algunos aspectos, la expresión del gen diana en las células diana confiere una propiedad deseada a una célula en la que se introdujo, o conduce de otro modo a un resultado terapéutico deseado. Las células diana son células eucariotas, por ejemplo, células de mamíferos. En las realizaciones, las células diana son células humanas procedentes de un tejido diana, incluyendo, por ejemplo, adiposo, sistema nervioso central (SNC), músculo, cardíaco, ocular, hepático y similares.
- 50

- En una realización, se insertan uno o más casetes de regulación génica en la región 3' no traducida del gen diana. En una realización, se inserta un único casete de regulación génica en la UTR 3' de un gen diana. En una realización, se insertan dos ribointerruptores en la región 3' no traducida del gen diana, en donde la horquilla
- 55 efectora del primer ribointerruptor comprende toda o parte de la señal de poliadenilación AATAAA (o ATTA) y la horquilla efectora del segundo ribointerruptor comprende todo o parte del elemento en dirección 3' (DSE).

- En una realización, cuando se insertan múltiples casetes de regulación génica en un gen diana, cada uno de ellos puede contener el mismo aptámero de modo que pueda usarse un único ligando para modular la expresión del gen diana. En otras realizaciones, cuando se insertan múltiples casetes de regulación génica en un gen diana, cada uno de ellos puede contener un aptámero diferente, de modo que la exposición a múltiples ligandos de moléculas pequeñas modula la expresión del gen diana.
- 60

- El casete de polinucleótido de la presente invención puede usarse junto con otros mecanismos para la regulación de la expresión del gen diana. En una realización, un casete de polinucleótido de la presente invención se usa junto con un casete de regulación génica que modula la expresión del gen diana mediante la regulación mediada
- 65

por aptámeros del corte y empalme alternativo, como se describe en el documento WO 2016/126747. La presente invención también puede combinarse con las construcciones de polinucleótido y los métodos descritos en PCT/US2017/016303 y PCT/US1207/016279.

5 Usos médicos y composiciones farmacéuticas

Un aspecto de la invención proporciona el casete de polinucleótido o vector descrito en el presente documento para su uso en un método de regulación del nivel de una proteína terapéutica administrada mediante terapia génica. En esta realización, el "gen diana" puede codificar la proteína terapéutica. El "gen diana" puede codificar una

proteína endógena o exógena a la célula.

La secuencia génica terapéutica que contiene el casete regulador con el ribointerruptor dirigido por aptámeros se administra a las células diana *in vitro* o *ex vivo*, por ejemplo, por un vector. La especificidad celular del "gen diana" puede estar controlada por el promotor u otros elementos dentro del vector. La administración de la construcción de vector que contiene el gen diana y el casete de polinucleótido, y la transfección de los tejidos diana que resulta en una transfección estable del gen diana regulado, suele ser el primer paso en la producción de la proteína terapéutica.

Sin embargo, debido a la presencia del casete regulador dentro de la secuencia del gen diana, el gen diana no se expresa a niveles significativos (o se expresa a niveles más bajos), es decir, se encuentra en "estado desactivado" en ausencia del ligando específico que se une al aptámero contenido dentro del ribointerruptor de casete reguladora. Sólo cuando se administra el ligando específico del aptámero (o está presente de otro modo en cantidades suficientes) se activa o aumenta la expresión del gen diana.

La administración de la construcción de vector que contiene el gen diana con el casete de polinucleótido y la administración del ligando activador generalmente están separadas en el tiempo. La administración del ligando activador controlará cuándo se expresa el gen diana, así como el nivel de expresión de proteínas. El ligando puede suministrarse por diversas vías, que incluyen, aunque no de forma limitativa, oral, intramuscular (IM), intravenosa (IV), intraocular o tópica.

El momento de administración del ligando dependerá del requisito de activación del gen diana. Por ejemplo, si la proteína terapéutica codificada por el gen diana se requiere constantemente, un ligando oral de molécula pequeña puede administrarse diariamente o varias veces al día, para garantizar la activación continua del gen diana y, por tanto, la expresión continua de la proteína terapéutica. Si el gen diana tiene un efecto prolongado, el ligando inductor puede dosificarse con menor frecuencia.

Esta invención permite controlar temporalmente la expresión del transgén terapéutico, de una manera determinada por la dosificación temporal del ligando específico del aptámero dentro del ribointerruptor del casete de polinucleótido regulador. El aumento de la expresión del transgén terapéutico sólo sobre la administración del ligando aumenta la seguridad de un tratamiento de terapia génica al permitir que el gen diana esté desactivado en ausencia del ligando.

Se pueden usar diferentes aptámeros para permitir que diferentes ligandos activen los genes diana. En determinadas realizaciones de la invención, cada gen terapéutico que contenga un casete regulador tendrá un aptámero específico dentro del casete que será activado por una molécula pequeña específica. Esto significa que cada gen terapéutico sólo puede ser activado por el ligando específico del aptámero alojado dentro del mismo. En estas realizaciones, cada ligando sólo activará un gen terapéutico. Esto permite la posibilidad de que varios "genes diana" diferentes puedan ser administrados a un individuo y que cada uno se active en la administración del ligando específico para el aptámero contenido dentro del casete regulador alojado en cada gen diana.

Esta invención permite que cualquier proteína terapéutica cuyo gen se pueda administrar al cuerpo (tal como la eritropoyetina (EPO) o un anticuerpo terapéutico) sea producida por el cuerpo cuando se administra el ligando activador. Este método de administración de proteínas terapéuticas puede sustituir a la fabricación de dichas proteínas terapéuticas fuera del cuerpo que luego se inyectan o infunden, por ejemplo, anticuerpos utilizados en el cáncer o para bloquear enfermedades inflamatorias o autoinmunes. El cuerpo que contiene el gen diana regulado se convierte en la fábrica de fabricación de compuestos biológicos, que se activa cuando se administra el ligando específico del gen.

Los niveles y el momento de dosificación de una proteína terapéutica pueden ser importantes para el efecto terapéutico. Por ejemplo, en la administración de AVASTIN (anticuerpo anti-VEGF) contra el cáncer. La presente invención aumenta la facilidad de dosificación en respuesta a la monitorización de los niveles y efectos terapéuticos de las proteínas.

En una realización, el gen diana puede codificar una nucleasa que puede dirigirse y editar una secuencia de ADN particular. Dichas nucleasas incluyen la Cas9, nucleasas con dedos de zinc o TALEN. En el caso de estas nucleasas, la proteína nucleasa puede ser necesaria sólo durante un corto periodo de tiempo que es suficiente

para editar los genes endógenos diana. Sin embargo, si se administra en el cuerpo un gen de nucleasa no regulado, esta proteína puede estar presente durante el resto de la vida de la célula. En el caso de las nucleasas, existe un riesgo creciente de edición no deseada cuanto más tiempo esté presente la nucleasa. La regulación de la expresión de tales proteínas tiene una importante ventaja en materia de seguridad. En este caso, el vector que contiene el gen diana de la nucleasa con un casete regulador podría administrarse a las células apropiadas del cuerpo. El gen diana se encuentra en estado "desactivado" en ausencia del ligando específico del casete, por lo que no se produce nucleasa. Sólo cuando se administra el ligando activador, se produce la nucleasa. Cuando haya transcurrido el tiempo suficiente para que se produzca la edición, el ligando se retirará y no se volverá a administrar. Por tanto, el gen de la nucleasa se encuentra a partir de entonces en estado "desactivado" y no se produce más nucleasa, por lo que la edición se para. Este planteamiento puede usarse para corregir las condiciones genéticas, incluyendo una serie de retinopatías hereditarias tales como la LCA10 causada por mutaciones en CEP290 y la enfermedad de Stargardt causada por mutaciones en ABCA4.

La administración de un gen diana regulado que codifica una proteína terapéutica que se activa sólo con la administración de un ligando específico puede usarse para regular genes terapéuticos con el fin de tratar muchos tipos diferentes de enfermedades, por ejemplo, cáncer con anticuerpos terapéuticos, trastornos inmunitarios con proteínas inmunomoduladoras o anticuerpos, enfermedades metabólicas, enfermedades raras tales como la HPN con anticuerpos anti-C5 o fragmentos de anticuerpos como gen regulado, o la angiogénesis ocular con anticuerpos terapéuticos, y la DMAE seca con proteínas inmunomoduladoras.

Una amplia diversidad de genes diana específicos, que permiten el tratamiento de una amplia diversidad de enfermedades y afecciones específicas, son adecuados para su uso en la presente invención. Por ejemplo, la insulina o un análogo de la insulina (preferentemente insulina humana o un análogo de la insulina humana) puede usarse como gen diana para tratar la diabetes de tipo I, la diabetes tipo II o el síndrome metabólico; la hormona de crecimiento humana puede usarse como gen diana para tratar a niños con trastornos del crecimiento o adultos con deficiencia de la hormona de crecimiento; la eritropoyetina (preferentemente eritropoyetina humana) puede usarse como gen diana para tratar la anemia debida a la enfermedad renal crónica, la anemia debida a mielodisplasia o la anemia debida a quimioterapia contra el cáncer.

La presente invención puede ser especialmente adecuada para tratar enfermedades causadas por defectos de un solo gen, tales como la fibrosis quística, hemofilia, distrofia muscular, talasemia o anemia de células falciformes. Por tanto, la β -, γ -, δ - o ζ -globina humana puede usarse como gen diana para tratar la β -talasemia o la anemia de células falciformes; el Factor VIII o el Factor IX humanos pueden usarse como gen diana para tratar la hemofilia A o la hemofilia B.

Los ligandos utilizados en la presente invención se combinan generalmente con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables para formar composiciones farmacéuticas adecuadas para su administración a un paciente. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen disolventes, aglutinantes, diluyentes, disgregantes, lubricantes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares, de uso general en las técnicas farmacéuticas. Las composiciones farmacéuticas pueden estar en la forma de comprimidos, píldoras, cápsulas, troches y similares, y están formuladas para ser compatibles con su vía de administración prevista. Los ejemplos de las vías de administración incluyen parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, intranasal, subcutánea, oral, inhalación, transdérmica (tópica), transmucosa y rectal.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden ligandos se administran a un paciente en un programa de dosificación de modo que se administra al paciente una cantidad de ligando suficiente para regular de forma deseable el gen diana. Cuando el ligando es una molécula pequeña y la forma farmacéutica es un comprimido, cápsula o similar, preferentemente, la composición farmacéutica comprende desde 0,1 mg hasta 10 g de ligando; desde 0,5 mg hasta 5 g de ligando; desde 1 mg hasta 1 g de ligando; desde 2 mg hasta 750 mg de ligando; desde 5 mg hasta 500 mg de ligando; o desde 10 mg hasta 250 mg de ligando.

Las composiciones farmacéuticas pueden dosificarse una vez al día o múltiples veces al día (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más veces al día). Como alternativa, las composiciones farmacéuticas pueden dosificarse con menos frecuencia que una vez al día, por ejemplo, una vez cada 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 días, o una vez al mes o una vez cada varios meses. En algunas realizaciones de la invención, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse a un paciente sólo un pequeño número de veces, por ejemplo, una vez, dos veces, tres veces, etc.

La presente invención proporciona un uso del casete de polinucleótido o vector descrito en el presente documento para su uso en un método de tratamiento de un paciente que necesita la expresión regulada de una proteína terapéutica codificada por un gen diana. El método comprende administrar al paciente una composición farmacéutica que comprende un ligando para un aptámero, cuando al paciente se le haya administrado previamente un vector recombinante que comprende el gen diana, donde el gen diana contiene un casete de regulación génica de la presente invención que proporciona la capacidad de regular la expresión del gen diana mediante el ligando del aptámero a través de la accesibilidad de una o más señales de poliadenilación. La

administración del ligando aumenta la expresión de la proteína terapéutica.

Artículos de fabricación y kits

- 5 También se describen en el presente documento kits o artículos de fabricación para su uso en los métodos descritos en el presente documento. Los kits pueden comprender las composiciones del presente documento (por ejemplo, para composiciones para la administración de un vector que comprende el gen diana que contiene el casete de regulación génica) en un envasado adecuado. Los envases adecuados para las composiciones (como las composiciones oculares para inyección) descritas en el presente documento son conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, viales (tales como viales sellados), recipientes, ampollas, botellas, frascos, envases flexibles (por ejemplo, Mylar sellado o bolsas de plástico) y similares. Estos artículos de fabricación pueden además esterilizarse y/o sellarse.

15 La presente divulgación también describe kits que comprenden composiciones descritas en el presente documento y que además pueden comprender instrucciones de uso de la composición, tales como usos descritos en el presente documento. Los kits descritos en el presente documento pueden incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones para llevar a cabo la administración, incluyendo, por ejemplo, cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. Por ejemplo, el kit puede comprender rAAV para la expresión del gen diana que comprende el casete de regulación génica de la presente invención, un vehículo farmacéuticamente aceptable apto para inyección, y uno o más de: un tampón, un diluyente, un filtro, una aguja, una jeringa y un prospecto con instrucciones para realizar las inyecciones. El kit puede ser adecuado para inyección intraocular, inyección intramuscular, inyección intravenosa y similares.

25 "Homología" y "homólogo", como se usan en el presente documento, se refieren al porcentaje de identidad entre dos secuencias polinucleotídicas o entre dos secuencias polipeptídicas. La correspondencia entre una secuencia y otra puede determinarse mediante técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, la homología puede determinarse mediante una comparación directa de dos moléculas polipeptídicas alineando la información de la secuencia y utilizando programas informáticos fácilmente disponibles. Dos secuencias polinucleotídicas o dos secuencias polipeptídicas son "sustancialmente homólogas" entre sí cuando, tras una alineación óptima con las inserciones o supresiones adecuadas, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, y al menos aproximadamente el 95 % de los nucleótidos o aminoácidos, respectivamente, coinciden en una longitud definida de las moléculas, según se determinó usando los métodos anteriores.

35 "Porcentaje de identidad de secuencia" con respecto a una secuencia polipeptídica o de ácido nucleico de referencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos o nucleótidos de una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos o nucleótidos de la secuencia polipeptídica o de ácido nucleico de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia. La alineación para determinar el porcentaje de identidad de secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos puede lograrse de formas conocidas por los expertos, por ejemplo, utilizando programas informáticos de acceso público, incluido el programa informático BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR).

45 La expresión "ácido nucleico" o el término "polinucleótido" como se usan en el presente documento se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sean ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos. Por tanto, este término incluye, aunque no de forma limitativa, ADN o ARN mono, bi o multicatenario, ADN genómico, ADNc, híbridos de ADN-ARN o un polímero que comprende bases de purina y pirimidina u otras bases de nucleótidos naturales, modificadas química o bioquímicamente, no naturales o derivatizadas.

50 "Heterólogo" o "exógeno" quiere decir que se deriva de una entidad genotípicamente distinta de la del resto de la entidad con la que se compara o en la que se introduce o incorpora. Por ejemplo, un polinucleótido introducido mediante técnicas de ingeniería genética en un tipo de célula diferente es un polinucleótido heterólogo (y, cuando se expresa, puede codificar un polipéptido heterólogo). De forma similar, una secuencia celular (por ejemplo, un gen o una porción del mismo) que se incorpora a un vector vírico es una secuencia de nucleótidos heteróloga con respecto al vector.

Se entiende y se espera que un experto en la materia pueda realizar variaciones en los principios de la invención divulgados en el presente documento. Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención, no deben interpretarse como limitativos del alcance de la invención de ninguna manera.

60 EJEMPLOS

Ejemplo 1. Regulación de la expresión de genes diana mediante la modulación mediada por aptámeros de la accesibilidad del elemento señal de poliA AATAAA

65 Procedimiento experimental:

Construcciones de plásmido: el gen de EGFP del vector pEGFP-C1 (Clontech) se sustituyó por la secuencia codificadora del gen de la luciferasa de luciérnaga para generar el vector pLuc-SV40 que contiene la secuencia señal de poliadenilación temprana del SV40. Se sintetizaron (IDT) un segmento de ADN que contenía secuencias para el aptámero de xpt-guanina, una estructura horquilla efectora y secuencias de poliA tempranas del SV40. Los fragmentos de ADN sintetizados se digirieron con las enzimas de restricción HpaI y MluI y se clonaron en pLuc-SV40 digerido con HpaI y MluI. Las secuencias de la construcción se verificaron mediante secuenciación del ADN (Genewiz).

Transfección y tratamiento con ligando del aptámero: se sembraron $3,5 \times 10^4$ células HEK 293 en una placa de fondo plano de 96 pocillos el día anterior a la transfección. Se añadió ADN plasmídico (500 ng) a un tubo o a una placa de 96 pocillos con fondo en U. Por separado, se añadió reactivo TransIT-293 (Mirus; 1,4 μ l) a 50 μ l de medio opti-mem I (Life Technologies), y se dejó reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente ("TA"). A continuación, se añadieron 50 μ l de este reactivo de transfección diluido al ADN, se mezclaron y se incubaron a TA durante 20 minutos. Por último, se añadieron 7 μ l de esta solución a un pocillo de células en una placa de 96 pocillos. Cuatro horas después de la transfección, se aspiró el medio y se añadió medio nuevo con (i) DMSO (0,5 %) o 500 μ M de guanosina; o (ii) NaOH (2 mM) como disolvente control o 500 μ M de guanina. El coeficiente de inducción se expresó como el cociente de la actividad de la luciferasa obtenida en presencia del ligando del aptámero dividido por el valor obtenido en ausencia del ligando del aptámero.

Ensayo de luciferasa de luciérnaga en células cultivadas: Veinticuatro horas después del cambio de medio, las placas se sacaron de la incubadora y se equilibraron a temperatura ambiente durante varios minutos en una mesa de laboratorio, a continuación, se aspiró. Se añadió tampón de glo-lisis (Promega, 100 μ l, TA) y se dejaron las placas a TA durante al menos 5 minutos. A continuación, el contenido de los pocillos se mezcló mediante trituración de 50 μ l, y 20 μ l de cada muestra se mezclaron con 20 μ l de reactivo bright-glo (Promega) que se había diluido al 10 % en tampón de glo-lisis. Se espaciaron 96 pocillos en una placa blanca opaca de 384 pocillos. Tras una incubación de 5 minutos a TA, la luminiscencia se midió utilizando una máquina Tecan con un tiempo de lectura de 500 ms. La actividad de la luciferasa se expresó como la media de la unidad de luz relativa (RLU) $\pm$ DE.

Transfección y medición de la fluorescencia de la GFP: se colocaron $3,5 \times 10^4$ células HEK 293 en una placa de fondo plano de 96 pocillos el día anterior a la transfección. Se añadió ADN plasmídico (500 ng) a un tubo o a una placa de 96 pocillos con fondo en U. Por separado, se añadió reactivo TransIT-293 (Mirus; 1,4 μ l) a 50 μ l de medio Opti-mem I (Life Technologies) y se dejó reposar durante 5 minutos a TA. A continuación, se añadieron 50 μ l de este reactivo de transfección diluido al ADN, se mezclaron y se incubaron a TA durante 20 minutos. Por último, se añadieron 7 μ l de esta solución a un pocillo de células en una placa de 96 pocillos. La intensidad de fluorescencia de la GFP se midió mediante un lector de placas Tecan, usando la longitud de onda de excitación a 484 nm, Longitud de onda de emisión a 510 nm y ancho de banda de excitación a 5 nm. La intensidad de fluorescencia GFP se expresó como el valor generado por las construcciones GFP restado por el valor generado por las células sin transfección.

Resultados:

La cola poliadenilada del extremo 3' del ARNm desempeña un papel importante en la estabilidad del ARNm, la exportación nuclear y la eficacia de la traducción. Para regular el proceso de poliadenilación del preARNm y de este modo regular la expresión del gen diana, se desarrollaron estrategias que modulan la accesibilidad de los elementos de secuencia de poliadenilación AATAAA (o sus variantes cercanas) o el elemento de secuencia en dirección 3' (DSE) rico en T o GT.

En una estrategia (estrategia 1), como se ilustra en las Figuras 1a y 1b, una estructura horquilla (la horquilla efectora), en la que el elemento de la secuencia señal de poliadenilación AATAAA está incrustado en el tallo de la estructura que forma la horquilla (la horquilla efectora). El extremo 3' de un aptámero se unió al extremo 5' de esta estructura formadora de horquilla, por un brazo del tallo compartido que contiene secuencia complementaria a una parte del brazo del tallo 5' del aptámero y complementaria a una parte del brazo del tallo 3' de la horquilla efectora (véase, por ejemplo, Figuras 1a y 1b). En esta configuración, en ausencia del ligando del aptámero, la estructura horquilla secuestra el elemento AATAAA, suprimiendo de este modo la poliadenilación y la expresión génica. Sin embargo, en presencia del ligando del aptámero, la unión aptámero/ligando da lugar a la formación del tallo del aptámero P1, alterando de este modo la estructura horquilla, lo que conduce a la liberación del elemento AATAAA desde su secuestro y a la posterior expresión génica. Por tanto, esta configuración de elementos genéticos crea ribointerruptor activado ("on-riboswitch") sensible a ligando del aptámero.

Esta estrategia se probó utilizando un aptámero de xpt-guanina con la secuencia de poliA temprana del SV40, en donde se demostró que la secuencia en dirección 5' del elemento AATAAA en la UTR 3' del SV40 es indispensable para la poliadenilación. Mediante esta estrategia, se generaron 4 construcciones, ATA_Gua_1 a 4 (SEQ ID NO: 1-4), cada una de las cuales tenía la misma secuencia aptámera de xpt-guanina unida al extremo 5' de la estructura horquilla y el elemento de secuencia AATAAA incrustado en el tallo de la estructura horquilla. Racionalizamos que la longitud y la composición de la secuencia para el tallo de la estructura horquilla pueden afectar a la estabilidad

de la estructura horquilla, por tanto, la disponibilidad del elemento AATAAA secuestrado para la expresión génica. Por lo tanto, se crearon tallos de 9, 10, 12 y 14 pares de bases (pb), respectivamente, en cada una de las construcciones. El tallo del aptámero P1 era de 8 pb. Como se muestra en la Figura 1c, en ausencia del ligando del aptámero guanosina, la actividad luciferasa era aproximadamente similar en todas las construcciones, y menor

5 que en la construcción control pFLuc-SV40 (datos no mostrados), lo que indica que el elemento AATAAA estaba siendo secuestrado por la estructura horquilla. Tras el tratamiento con guanosina, cada construcción mostró una mayor actividad de la luciferasa en comparación con las muestras tratadas con DMSO (control), con ATA_Gua_1 generando una inducción 6,7 veces mayor.

10 Estas construcciones se probaron utilizando guanina como ligando del aptámero. Como se muestra en la Figura 1d, en ausencia de tratamiento con guanina, se redujo la expresión de nivel basal de la construcción ATA_Gua_1 a 4, con ATA_Gua_4 que tiene la expresión basal más baja (16 % del vector de control pFLuc). Tras el tratamiento con guanina, la expresión de la luciferasa aumentó en comparación con las muestras sin guanina, generando una inducción de aproximadamente 2,5 veces para todas las construcciones.

15 Estas construcciones de ribointerruptor (estrategia 1) también se usaron para regular la expresión de GFP. Las construcciones ATA_Gua_2 y 4, que tienen una expresión de nivel basal relativamente inferior en el gen de la luciferasa (Figura 1c, 1d), se usaron para generar las construcciones pEGFP_ATA_Gua_2 y 4. Como se muestra en la Figura 1e, en ausencia de tratamiento con guanina, la expresión de GFP disminuye en comparación con la construcción pEGFP-C1. El tratamiento con guanina produjo un aumento de 1,5 y 1,6 veces en la expresión de GFP (para las construcciones ATA_Gua_2 y ATA_Gua_4, respectivamente). La construcción control, sin embargo, no tiene un aumento de la expresión de GFP en respuesta al tratamiento con guanina.

20

25 Estos datos demuestran que un ribointerruptor activado de mamífero sensible a ligando es eficaz para regular la expresión del gen diana modulando la accesibilidad de un elemento de secuencia señal de poliadenilación en una estructura horquilla a través de un aptámero adyacente. El coeficiente de inducción puede mejorarse disminuyendo el nivel de expresión basal y aumentando la expresión inducida del gen diana de la construcción mediante la optimización de la longitud y la secuencia del tallo del aptámero P1 y del tallo en la estructura horquilla efectora. En esta configuración probada de elementos genéticos, se usaron un aptámero de guanina y la secuencia de poliA temprana del SV40. Se pueden utilizar estrategias similares para generar ribointerruptores utilizando diversos aptámeros en la modulación de diversas secuencias de poliA, incluidas secuencias sintéticas de poliA.

30

Ejemplo 2. Modulación de la expresión del gen diana mediante poliadenilación mediada por aptámero/ligando a través de la accesibilidad de un elemento de secuencia en dirección 3'.

35

Procedimientos experimentales: como se describe en el Ejemplo 1.

Resultados:

40 Se desarrolló otra estrategia (estrategia 2) para modular la poliadenilación mediante la modulación de la accesibilidad del elemento de secuencia en dirección 3' (DSE) rico en T o GT. En esta estrategia, como se ilustra en la Figura 2a, se creó una estructura horquilla, en la que la secuencia DSE estaba incrustada en el tallo de la estructura horquilla. Se unió una secuencia aptámera al extremo 3' de esta estructura horquilla seguida de la secuencia complementaria del brazo 3' de la estructura horquilla. En esta configuración, en ausencia del ligando del aptámero, la estructura horquilla secuestra la secuencia DSE, inhibiendo la poliadenilación y suprimiendo de este modo la expresión génica. Sin embargo, en presencia del ligando del aptámero, la unión aptámero/ligando da como resultado la formación del tallo del aptámero P1, alterando la estructura horquilla efectora y liberando la secuencia DSE de su secuestro, y permitiendo la expresión del gen. Por tanto, similar a la estrategia demostrada en el Ejemplo 1, esta configuración de elementos genéticos crea un ribointerruptor activado sensible a ligando del aptámero.

45

50

Esta estrategia se probó utilizando el aptámero de xpt-guanina con la secuencia de poliA temprana del SV40, en donde la secuencia DSE, junto con el elemento AATAAA en la UTR 3' del SV40, se muestra como responsable de la poliadenilación del preARNm. Mediante esta estrategia, se generaron 4 construcciones, DSE_Gua_1 a 4 (SEQ ID NO: 5-8), cada una de las cuales tenía la misma secuencia aptámera de xpt-guanina unida al extremo 3' de la estructura horquilla con la secuencia DSE incrustada en el tallo de la estructura horquilla. Racionalizamos que la longitud y la composición de la secuencia para el tallo de la estructura horquilla pueden afectar a la estabilidad de la estructura horquilla, por tanto, la disponibilidad de la secuencia DSE secuestrada para la expresión génica. Por lo tanto, se crearon tallos de 9, 10, 12 y 14 pares de bases (pb), respectivamente, en cada una de estas construcciones. En estas construcciones se utilizó un tallo de aptámero P1 de 8 pb o 9 pb. Como se muestra en la Figura 2b, en ausencia del ligando del aptámero guanosina, la actividad de la luciferasa fue aproximadamente similar en las construcciones DSE_Gua_1 a 3, siendo DSE_Gua_4 la más baja, inferior a la construcción control pFLuc-SV40 (datos no mostrados), lo que indica que el elemento DSE fue secuestrado por la estructura horquilla en ausencia del ligando del aptámero. En cambio, tras el tratamiento con guanosina, cada construcción mostró una mayor actividad de la luciferasa en comparación con las muestras tratadas con DMSO, con DSE_Gua_2, por ejemplo, generando una inducción 3,7 veces mayor.

55

60

65

Estas construcciones también se probaron usando guanina como ligando del aptámero. Como se muestra en la Figura 2c, en ausencia de tratamiento con guanina, la actividad de la luciferasa disminuyó aproximadamente un 68 % en el caso de las construcciones DSE_Gua_1 a 3, y un 80 % en el caso de la construcción DSE_Gua_4, en comparación con la construcción control pFLuc. En presencia de guanina, la expresión de luciferasa aumentó aproximadamente 2,4 veces en todas las construcciones en comparación con las muestras sin tratamiento con guanina. El coeficiente de inducción se puede mejorar aún más reduciendo la expresión de nivel basal y aumentando la expresión del gen inducido de la construcción mediante la optimización de la longitud y la secuencia del tallo en la estructura horquilla, así como para el tallo del aptámero P1. Estos datos demuestran además la creación de un ribointerruptor activado de mamífero sensible a ligando del aptámero que regula la expresión génica mediante la modulación de la accesibilidad del elemento de secuencia de poliadenilación a través de un aptámero. En esta configuración probada de elementos genéticos, se usó un aptámero de guanina y una secuencia de poliA temprana del SV40. Pueden usarse estrategias similares para generar ribointerruptores que contengan diversos aptámeros en la modulación de diversas secuencias de poliA, incluidas secuencias sintéticas de poliA.

Ejemplo 3. Uso de aptámero de guanina para modular la accesibilidad de elementos sintéticos de secuencia de poliA en la UTR 3'

Procedimiento experimental:

Construcción del plásmido: se sintetizaron (IDT) fragmentos de ADN que contenían secuencias de poliA sintética (SPA) (Levitt, N. et al., Definition of an efficient synthetic poly(A) site, *Genes & Development*. 1989; 3:1019-1025), o SPA de pGLuc-Basic_2 (NEB) denominado en el presente documento mtSPA, o aptámero de xpt-guanina, estructura horquilla y secuencias de poliA sintética. Los fragmentos de ADN sintetizados se digirieron con las enzimas de restricción XhoI y NheI y se clonaron en la construcción Con8 digerida con XhoI y XbaI para generar Con8-SPA (SEQ ID NO: 9), SPA_ATA_Gua (SEQ ID NO: 10), SPA_DSE_Gua (SEQ ID NO: 11), mtCon8-SPA (SEQ ID NO: 12) y mtSPA_ATA_Gua (SEQ ID NO: 13). Las secuencias de la construcción se verificaron mediante secuenciación del ADN (Genewiz).

Transfección, tratamiento con ligando del aptámero y ensayo de luciferasa en células cultivadas: como se describe en el Ejemplo 1.

Resultados:

En los Ejemplos 1 y 2 se demuestra la regulación de la expresión del gen diana mediante la modulación mediada por aptámeros de la accesibilidad de la secuencia de poliA del SV40. La poliadenilación modulada por aptámeros, se probó también usando una secuencia de poliA sintética (SPA). Utilizando la misma estrategia como se demuestra el Ejemplo 1, la construcción SPA_ATA_Gua se generó con la secuencia aptámera de xpt-guanina unida al extremo 5' de la estructura horquilla y el elemento secuencial AATAAA de la secuencia de poliA sintética incrustado en el tallo de la estructura horquilla. También se generó una construcción SPA_DSE_Gua utilizando la misma estrategia demostrada en el Ejemplo 2. Como se muestra en la Figura 3, en ausencia de tratamiento con guanina, la unión de la estructura horquilla y el aptámero de xpt-guanina no dio como resultado una reducción de la actividad de la luciferasa en la construcción SPA_ATA_Gua, lo que sugiere un secuestro ineficaz en la horquilla del elemento de secuencia AATAAA de la secuencia de poliA sintética. Para abordar esto, se usó otra secuencia de SPA (mtSPA), que tiene 2 nt de diferencia, pero muestra una funcionalidad similar en comparación con Con8-SPA. Para fortalecer el tallo, se añadieron 2 pares de bases GC en el tallo, junto con los 7 nt de la secuencia de poliA y su secuencia complementaria, se generó un tallo de 9 pb. Con esta construcción mtSPA_ATA_Gua, la expresión de nivel basal de la actividad de la luciferasa disminuyó en comparación con mtCon8-SPA en ausencia de tratamiento con guanina. En cambio, en presencia de tratamiento con guanina, la actividad de la luciferasa se reguló por aumento ligeramente hasta 1,7 veces en comparación con las muestras sin tratamiento con guanina. Con la construcción SPA_DSE_Gua, la secuencia del aptámero de xpt-guanina se ligó al extremo 3' de la estructura horquilla con la secuencia DSE incrustada en el tallo de la estructura horquilla. Como se muestra en la Figura 3, el tratamiento con guanina reguló por aumento la actividad de la luciferasa de la construcción SPA_DSE_Gua hasta 1,9 veces en comparación con las muestras sin tratamiento con guanina. Estos resultados demuestran la capacidad de regulación de la expresión del gen diana mediante la modulación de la accesibilidad de los elementos de la secuencia de poliA.

Ejemplo 4. Modulación de la secuencia de bucle de la estructura horquilla para mejorar la regulabilidad del ribointerruptor basado en poliA

Procedimiento experimental: como se describe en el Ejemplo 1.

Resultados:

Con todas las construcciones que tienen aptámeros y estructuras horquillas unidas a las secuencias de poliA de los Ejemplos 1 y 2, la expresión de nivel basal de la luciferasa se reduce hasta un 20-45 % del vector control.

Aunque el nivel inducido de expresión del gen diana alcanza como máximo el 80 % de la construcción control, la expresión de nivel basal hace que el coeficiente de inducción sea inferior. Para reducir la expresión basal, las estructuras horquilla pueden reforzarse o estabilizarse para secuestrar o bloquear eficazmente los elementos de secuencia AATAAA o DSE en ausencia de la unión aptámero/ligando. Para reforzar la estabilidad de la estructura de la horquilla, se comprobó el efecto de la composición de la secuencia del bucle de la estructura horquilla sobre la expresión de nivel basal del gen de la luciferasa. La secuencia de bucle GAAA en ATA_Gua_1 se sustituyó por una secuencia de bucle más estable TTCG (V.P. Antao, S. Y. Lai e I. Tinoco, A thermodynamic study of unusually stable RNA and DNA hairpins. *Nucleic Acids Research*. 1991; 19(21):5901-5905), generando la construcción Stbl_ATA_Gua_1 (SEQ ID NO: 14). Como se muestra en la Figura 4, comparando con ATA_Gua_1, Stbl_ATA_Gua_1 expresó una menor actividad de la luciferasa en ausencia de tratamiento con guanina, lo que sugiere una mejora del secuestro de la señal AATAAA. En cambio, en presencia de tratamiento con guanina, la actividad de la luciferasa inducida para Stbl_ATA_Gua_1 fue similar a la de ATA_Gua_1, generando así un mayor coeficiente de inducción. Por el contrario, la construcción que contenía el bucle GAAT, gaat_ATA_Gua_1 (SEQ ID NO: 15), expresó un nivel basal de luciferasa superior al de ATA_Gua_1 o Stbl_ATA_Gua_1, generando un coeficiente de inducción ligeramente inferior al de estas dos construcciones. Estos resultados indican que se puede conseguir una regulación más estricta del gen diana modificando la estructura horquilla.

Ejemplo 5. Modulación simultánea de la accesibilidad de tanto AATAAA como DSE de la secuencia de poliA en UTR 3'.

Procedimiento experimental:

Se sintetizó la secuencia que contenía los interruptores ATA_Gua_1 y DSE_Gua_1 y se clonó en un vector pFLuc digerido con HpaI y MluI para generar la construcción ATA_DSE_Gua (SEQ ID NO: 16).

Transfección y ensayo de luciferasa en células cultivadas: como se describe en el Ejemplo 1.

Resultados:

Una tercera estrategia para regular la expresión del gen diana (estrategia 3), como se ilustra en la Figura 5a, se desarrolló combinando la estrategia 1 y la estrategia 2, modulando de este modo la accesibilidad de las secuencias AATAAA y DSE simultáneamente. En esta configuración, en ausencia del ligando del aptámero, tanto las secuencias AATAAA como las DSE son secuestradas por las estructuras horquilla, por lo que se suprime la expresión génica. Cada estructura horquilla está conectada a una secuencia aptámera que puede responder a la misma o a diferentes moléculas ligando. El bloqueo simultáneo de ambos elementos esenciales de la secuencia de poliA puede reducir el nivel basal de la expresión génica en ausencia del ligando o ligandos. En presencia del ligando del aptámero, la unión aptámero/ligando facilita la formación del tallo del aptámero P1, alterando las estructuras horquilla y liberando las secuencias AATAAA y DSE de su secuestro. En esta configuración, sólo puede expresarse eficazmente cuando están presentes los ligandos de ambos aptámeros, permitiendo potencialmente una regulación más estricta de la expresión del gen diana.

De hecho, como se muestra en la Figura 5b, en ausencia de tratamiento con guanina, el secuestro de las secuencias AATAAA y DSE a través de las estructuras horquilla (ATA_DSE_Gua) redujo aún más la expresión de luciferasa al 20 % de la construcción control pFLuc, mientras que ATA_Gua_1 y DSE_Gua_1 se redujeron en un 45 % y un 35 %, respectivamente. En presencia de tratamiento con guanina, la actividad de la luciferasa se restauró aproximadamente 2,1 veces en la muestra ATA_DSE_Gua en comparación con las muestras no tratadas, lo que indica una regulación génica más estricta.

Ejemplo 6. Uso combinado de un ribointerruptor basado en poliA y un segundo ribointerruptor para mejorar la regulabilidad del gen diana

Procedimiento experimental:

El casete de ribointerruptor G15 (véase los ejemplos 5 y 8 y SEQ ID NO: 46 del documento WO 2016/126747) o un casete control sin aptámero se clonó en pFLuc para generar pFLuc-G15 o pFLuc-Con1, usando la estrategia de clonación Golden Gate. Para generar la construcción pFLuc-G15_ATA_Gua, el fragmento que contenía el aptámero de guanina, la estructura horquilla y las secuencias de poliA del SV40 se liberaron de la construcción ATA_Gua_1 mediante la digestión con HpaI y MluI y se clonaron en la construcción pFLuc-G15 digerida con las mismas enzimas de restricción.

Transfección y ensayo de luciferasa en células cultivadas: como se describe en el Ejemplo 1.

Resultados:

Las construcciones de expresión que contienen los ribointerruptores ATA_Gua y DSE_Gua tienen un grado de expresión basal del gen diana. El uso combinado de estos interruptores con un segundo interruptor en tándem

puede reforzar la expresión basal y, por lo tanto, mejorar la regulabilidad de los genes.

Para demostrar esto, el ribointerruptor G15 se combinó con el ribointerruptor basado en poliA. El ribointerruptor G15 se basa en un mecanismo de corte y empalme alternativo modulado por aptámero de xpt-guanina y tiene cierta expresión de nivel basal, que reduce el coeficiente de inducción en respuesta al tratamiento con el ligando del aptámero guanina. Para reducir la expresión de nivel basal de la construcción pFLuc-G15, la secuencia de poliA se substituyó por ATA_Gua_1, generando la construcción pFLuc-G15-ATA_Gua (Figura 6a). Como se muestra en la Figura 6b, en ausencia de ligando del aptámero (guanina), la expresión de nivel basal de luciferasa de pFLuc-G15 se reduce sustancialmente en comparación con la construcción control pFLuc-Con1. pFLuc-G15-ATA_Gua, la construcción con interruptores dobles, tiene una expresión de nivel basal aún más reducida en comparación con pFLuc-G15. En presencia de tratamiento con guanina, el nivel inducido de la actividad de la luciferasa es ligeramente inferior al de pFLuc-G15, pero igual que la actividad de la luciferasa inducida de la construcción ATA_Gua_1, generando un mayor coeficiente de inducción que las construcciones ATA_Gua_1 y pFLuc-G15 (Figura 6b).

Estos resultados demuestran que se puede generar un interruptor más estricto combinando en tándem dos interruptores que tienen una expresión de nivel basal superior. Los aptámeros de este interruptor doble pueden ser los mismos aptámeros o diferentes que se unen a los mismos o diferentes ligandos, como se demuestra en el presente documento, o aptámeros que responden a diferentes ligandos.

Ejemplo 7. Uso de un aptámero de adenina para modular la accesibilidad del elemento de secuencia de poliA AATAAA en UTR 3'

Procedimiento experimental:

Construcción del plásmido: se sintetizaron (IDT) un fragmento de ADN que contenía secuencias para el aptámero de adenina ydhl-A (M. Mandal y R.R. Breaker, Adenine riboswitches and gene activation by disruption of a transcription terminator. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2004; 11: 29-35), la estructura horquilla y las secuencias de poliA tempranas del SV40. Los fragmentos de ADN sintetizados se digirieron con las enzimas de restricción HpaI y MluI y se clonaron en pFLuc-SV40 digerido con HpaI y MluI. Las secuencias de la construcción se verificaron mediante secuenciación del ADN (Genewiz).

Transfección y ensayo de luciferasa en células cultivadas: como se describe en el Ejemplo 1.

Cuatro horas después de la transfección, se aspiró el medio y se añadió un nuevo medio con NaOH (1 mM) o 1 mM de adenina (Calbiochem). El coeficiente de inducción se expresó como el cociente de la actividad de la luciferasa obtenida en presencia del ligando del aptámero dividido por el valor obtenido en ausencia del ligando del aptámero.

Resultados:

Se estudió el uso de pares de aptámero/ligando adicionales para controlar la expresión del gen diana. Con la misma estrategia demostrada en el Ejemplo 1, se insertó una estructura horquilla (SL) (el bucle estable TTCCG), en la que el elemento de secuencia AATAAA está incrustado en el tallo de 9 pb de la estructura SL. Al extremo 5' de esta estructura SL, se insertó en la UTR 3' la secuencia complementaria del brazo 5' de la estructura SL seguida de la secuencia del aptámero de adenina ydhl-A, generando la construcción ATA Ydhl (SEQ ID NO: 17). En esta construcción, la longitud del tallo del aptámero ydhl P1 es de 10 pb. Como se muestra en la Figura 7, en ausencia de tratamiento con adenina, la construcción ATA_Ydhl expresó un nivel reducido de luciferasa, aproximadamente el 52 % de la construcción pFLuc control, presumiblemente a través del bloqueo de la accesibilidad del elemento de secuencia AATAAA. En presencia de adenina, la expresión de la luciferasa aumentó en comparación con las muestras sin tratamiento con adenina, a aproximadamente el 82 % de la construcción pFLuc control en presencia de tratamiento con adenina. El tratamiento con adenina aumentó la actividad de la luciferasa 2,5 veces en la construcción control mediante un mecanismo no relacionado con el aptámero. Sin embargo, la construcción ATA ydhl generó un aumento de 4,0 veces en la expresión de luciferasa, lo que indica un efecto específico de la adenina/aptámero.

REIVINDICACIONES

1. Un casete de polinucleótido para la regulación de la expresión de un gen diana que comprende un ribointerruptor en donde el ribointerruptor comprende una horquilla efectora y un aptámero, en donde el tallo efector comprende una señal de poliadenilación, y en donde el aptámero y la horquilla efectora están unidos por un brazo del tallo alternativamente compartido que comprende una secuencia complementaria al brazo no compartido del tallo del aptámero y al brazo no compartido de la horquilla efectora.
2. El casete de polinucleótido de la reivindicación 1, en donde
 - (a) el aptámero se une a un ligando de molécula pequeña;
 - (b) la parte del brazo del tallo alternativamente compartido que es complementaria a la secuencia en el tallo del aptámero y a la secuencia en la horquilla efectora es de 4 a 8 nucleótidos, de 5 a 7 nucleótidos, 5 nucleótidos o 6 nucleótidos;
 - (c) el tallo del aptámero es de 6 a 12 pares de bases, de 7 a 10 pares de bases, 8 pares de bases o 9 pares de bases; o
 - (d) el tallo de la horquilla efectora es de 4 a 24 pares de bases, de 5 a 20 pares de bases, de 9 a 14 pares de bases, 9 pares de bases, 10 pares de bases, 11 pares de bases o 12 pares de bases.
3. Un casete de polinucleótido que comprende dos ribointerruptores de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la horquilla efectora del primer ribointerruptor comprende toda o parte de la señal de poliadenilación AATAAA o ATAAAA y la horquilla efectora del segundo ribointerruptor comprende todo o parte del elemento en dirección 3' (DSE).
4. El casete de polinucleótido de la reivindicación 3, en donde los dos ribointerruptores
 - (a) comprenden cada uno un aptámero que se une al mismo ligando; o
 - (b) comprenden diferentes aptámeros que se unen a diferentes ligandos.
5. Método para modular la expresión de un gen diana que comprende
 - (a) insertar uno o más de los casetes de polinucleótido de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2 en la región 3' no traducida de un gen diana,
 - (b) introducir el gen diana que comprende el casete de polinucleótido en una célula *in vitro* o *ex vivo*, y
 - (c) exponer la célula a un ligando que se une al aptámero en una cantidad eficaz para aumentar la expresión del gen diana;opcionalmente, en donde el ligando es una molécula pequeña.
6. El casete de polinucleótido de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 o el método de la reivindicación 5, en donde la horquilla efectora está situada 3' del aptámero, de modo que el brazo del tallo alternativamente compartido comprende todo o una parte del brazo del tallo del aptámero 3' y todo o una parte del brazo 5' del tallo efector.
7. El casete de polinucleótido o el método de la reivindicación 6, en donde la señal de poliadenilación es AATAAA o ATAAAA.
8. El casete de polinucleótido de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 o el método de la reivindicación 5, en donde la horquilla efectora está situada 5' del aptámero, de modo que el brazo del tallo alternativamente compartido comprende todo o una parte del brazo del tallo del aptámero 5' y todo o una parte del brazo 3' del tallo efector.
9. El casete de polinucleótido de la reivindicación 8, en donde la señal de poliadenilación es un elemento en dirección 3' (DSE).
10. El método de la reivindicación 5, en donde se insertan dos ribointerruptores en la UTR 3' del gen diana, en donde la horquilla efectora del primer ribointerruptor comprende toda o parte de la señal de poliadenilación AATAAA o ATAAAA y la horquilla efectora del segundo ribointerruptor comprende todo o parte del elemento en dirección 3' (DSE).
11. El método de la reivindicación 10, en donde

- (a) los dos ribointerruptores comprenden cada uno un aptámero que se une al mismo ligando;
 - (b) los dos ribointerruptores comprenden diferentes aptámeros que se unen a diferentes ligandos; o
- 5 (c) los dos o más casetes de polinucleótidos comprenden el mismo aptámero.
12. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, en donde
- (a) el gen diana que comprende el casete de polinucleótido se incorpora a un vector para la expresión del gen diana; o
 - (b) el gen diana comprende además un casete de regulación génica que modula la expresión del gen diana mediante la regulación mediada por aptámeros del corte y empalme alternativo.
- 10
- 15 13. Un vector que comprende un gen diana que contiene un casete de polinucleótido de las reivindicaciones 1-9.
14. El método de la reivindicación 12 o el vector de la reivindicación 13, en donde el vector es un vector vírico, opcionalmente, en donde el vector vírico se selecciona del grupo que consiste en el vector adenovírico, vector del virus adenoasociado y vector lentivírico.
- 20 15. El vector de la reivindicación 13, en donde el gen diana comprende además un casete de regulación génica que modula la expresión del gen diana mediante la regulación mediada por aptámeros del corte y empalme alternativo.
- 25 16. El casete de polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o 6-9, o el vector de las reivindicaciones 13 o 15 para su uso en el tratamiento del cáncer, trastornos inmunitarios, enfermedades metabólicas, enfermedades raras tales como la HPN, angiogénesis ocular, DMAE seca, diabetes de tipo I, diabetes de tipo II, síndrome metabólico, trastornos del crecimiento o deficiencia de la hormona del crecimiento, anemia debida a enfermedad renal crónica, anemia debida a mielodisplasia, anemia debida a la quimioterapia contra el
- 30 cáncer, fibrosis quística, hemofilia, distrofia muscular, talasemia, anemia de células falciformes, hemofilia A o hemofilia B.
17. El casete de polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o 6-9, o el vector de las reivindicaciones 13 o 15 para su uso en la modulación de la expresión del gen diana.
- 35 18. El casete de polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o 6-9, o el vector de las reivindicaciones 13 o 15 para su uso como medicamento.

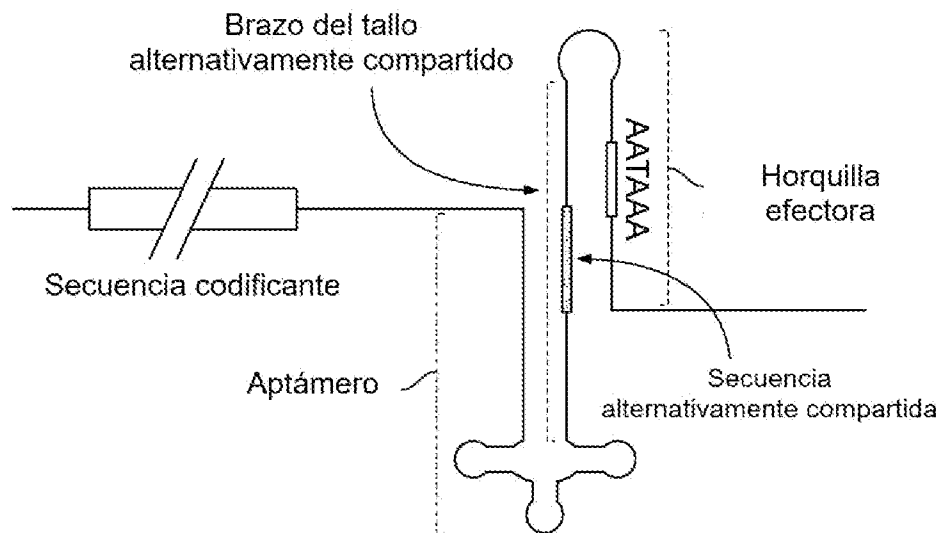


FIG. 1a

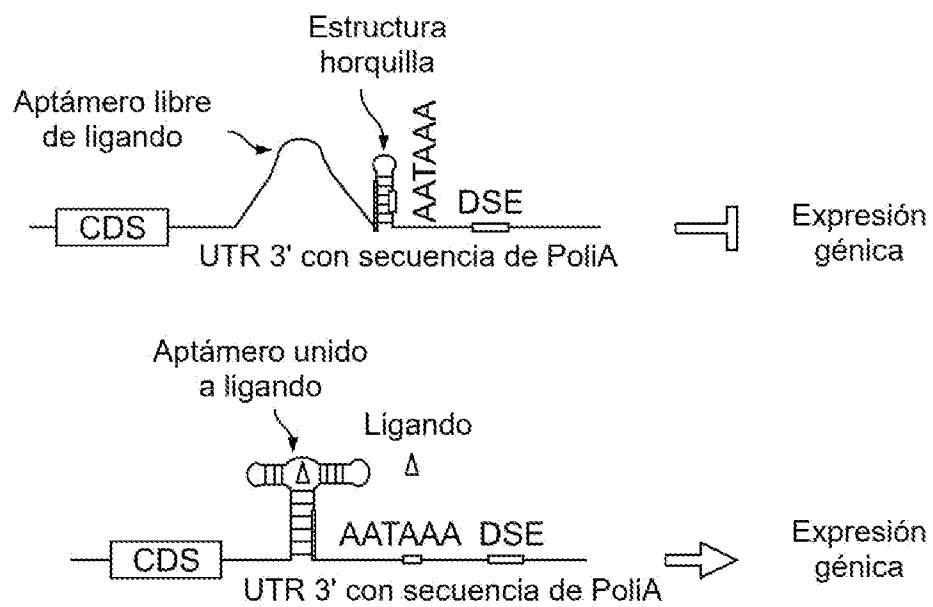


FIG. 1b

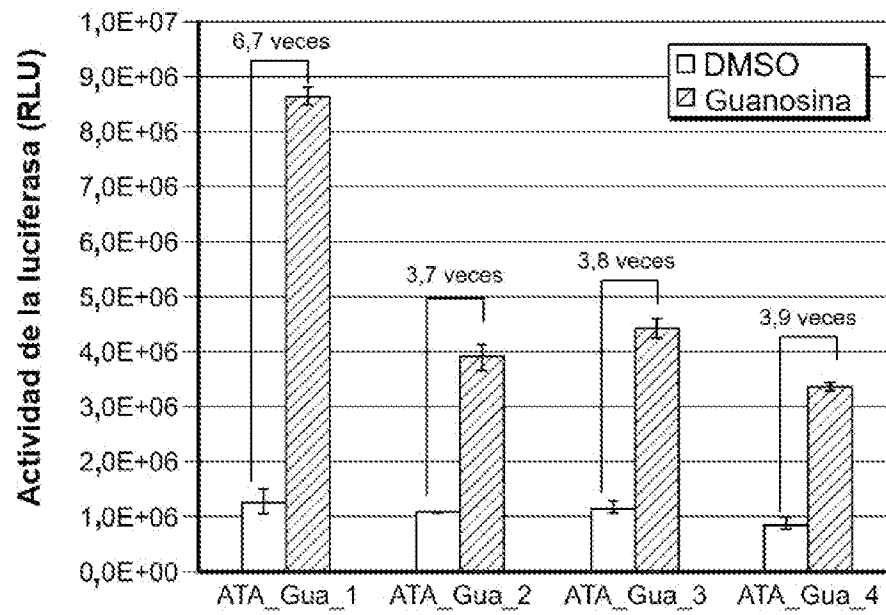


FIG. 1c

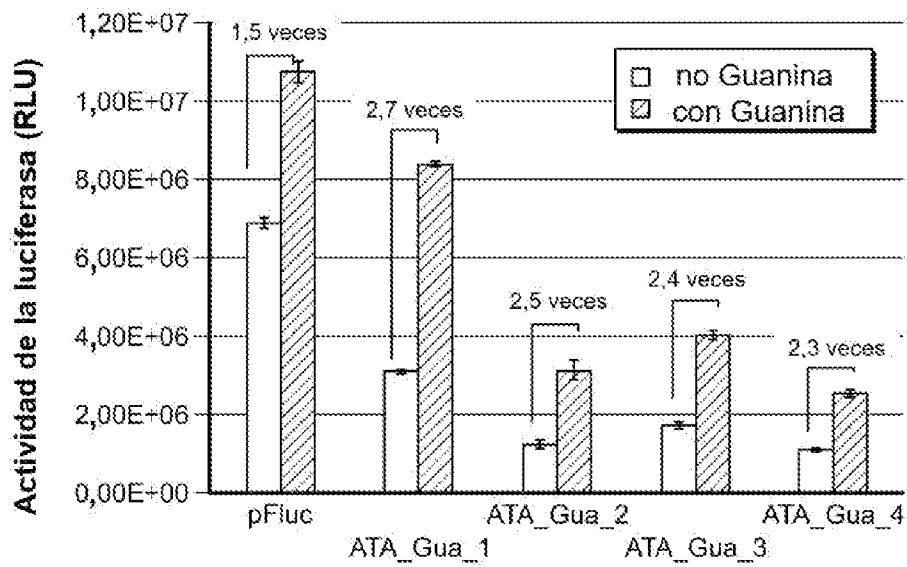


FIG. 1d

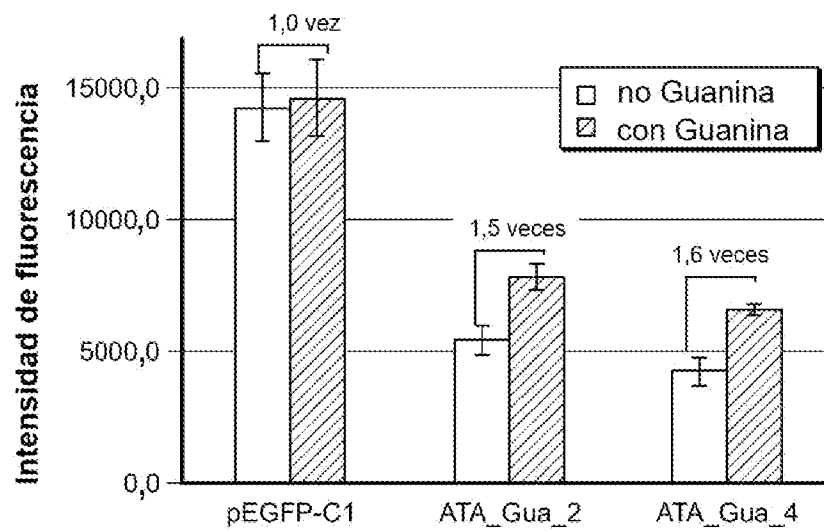


FIG. 1e

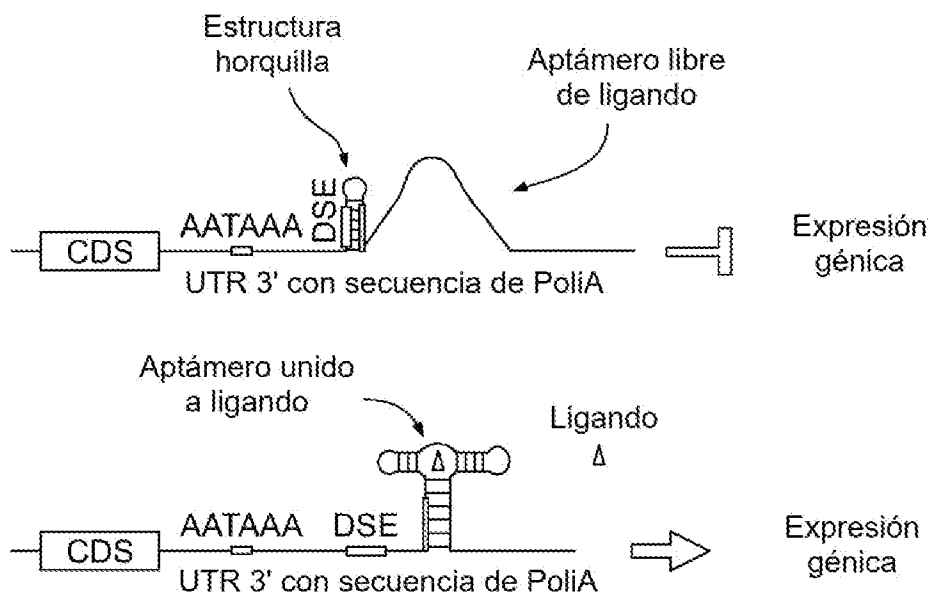


FIG. 2a

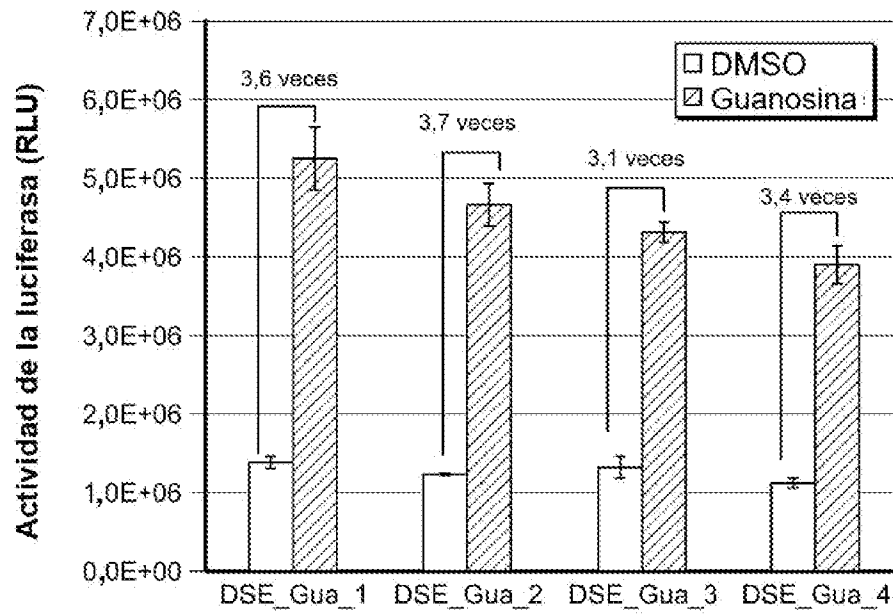


FIG. 2b

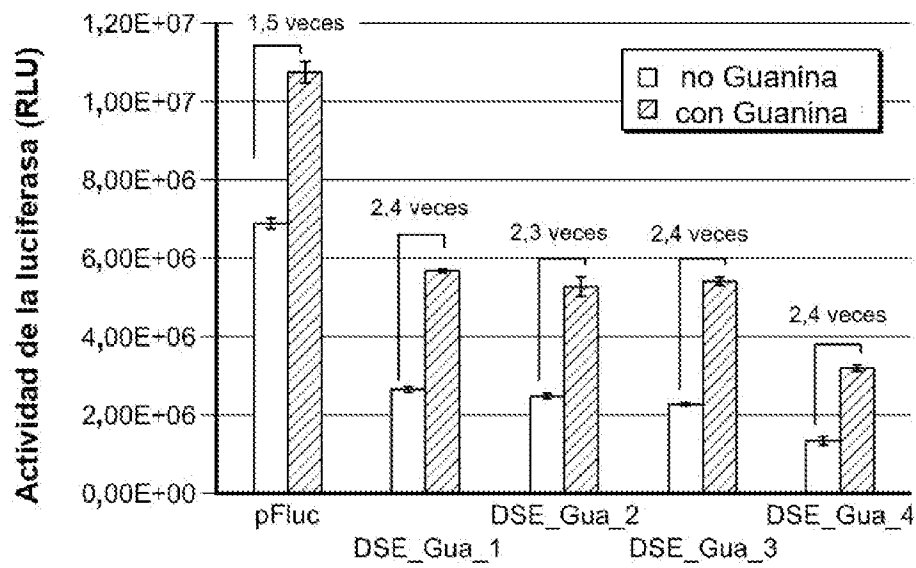


FIG. 2c

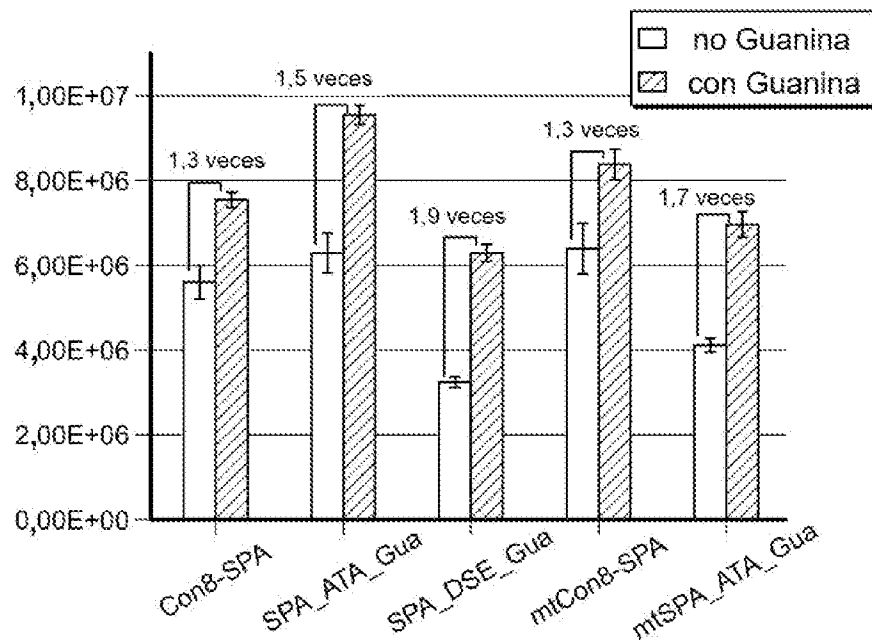


FIG. 3

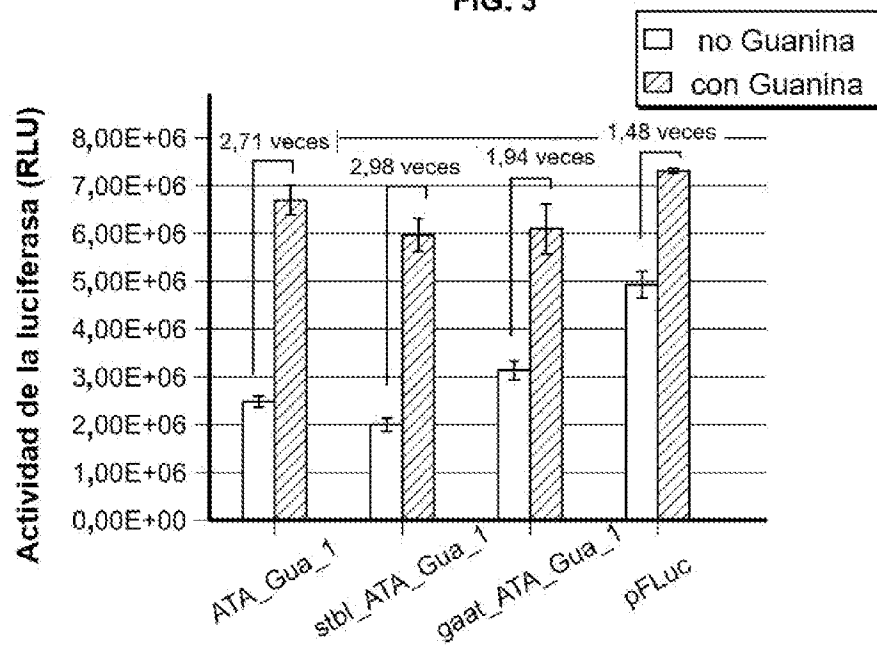


FIG. 4

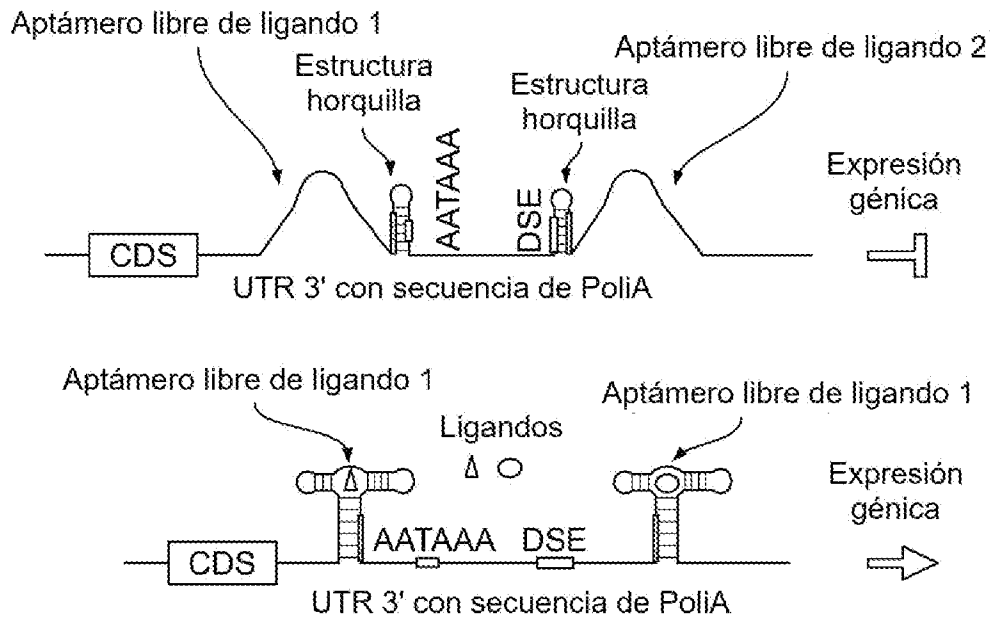


FIG. 5a

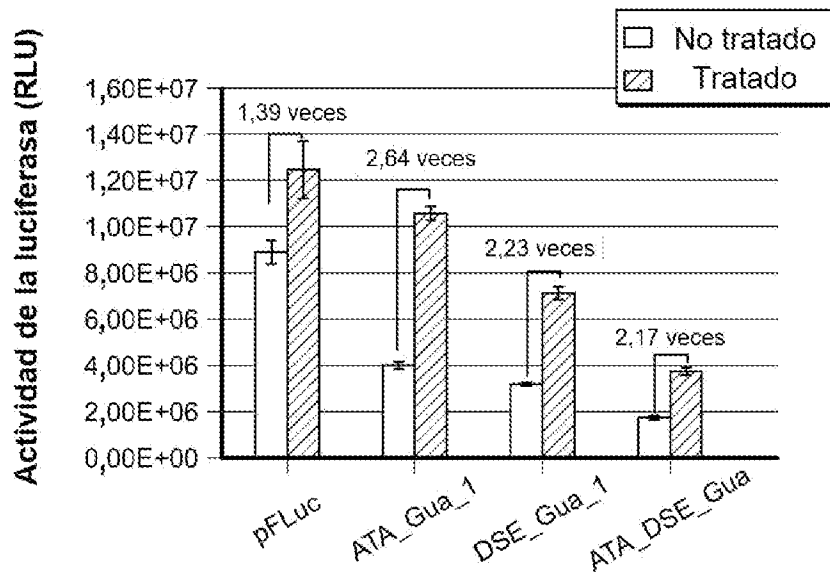


FIG. 5b

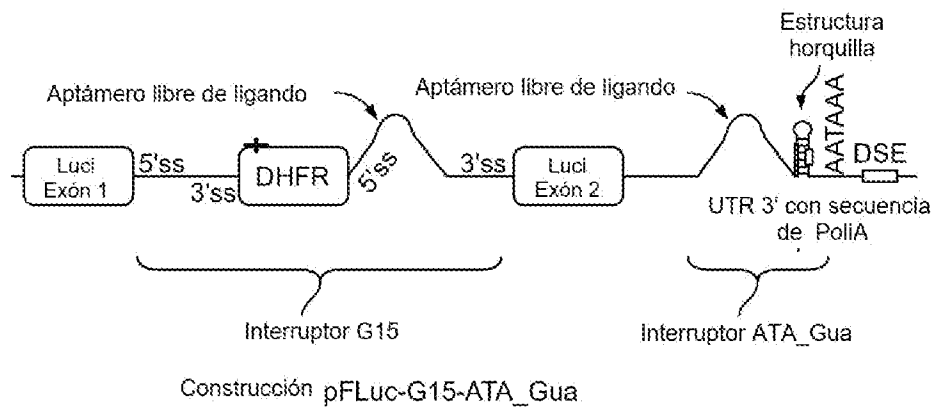


FIG. 6a

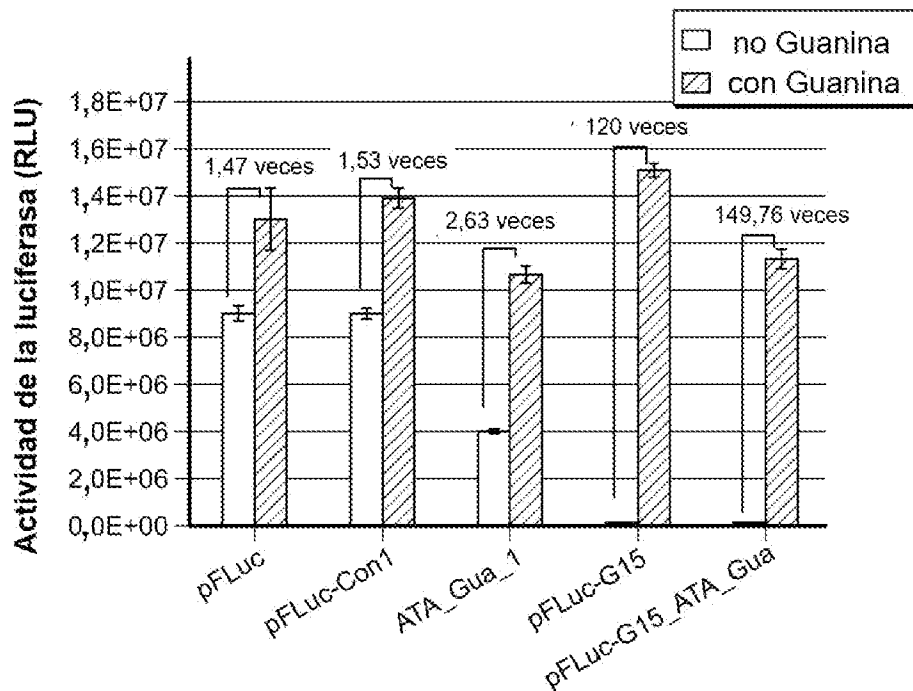


FIG. 6b

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

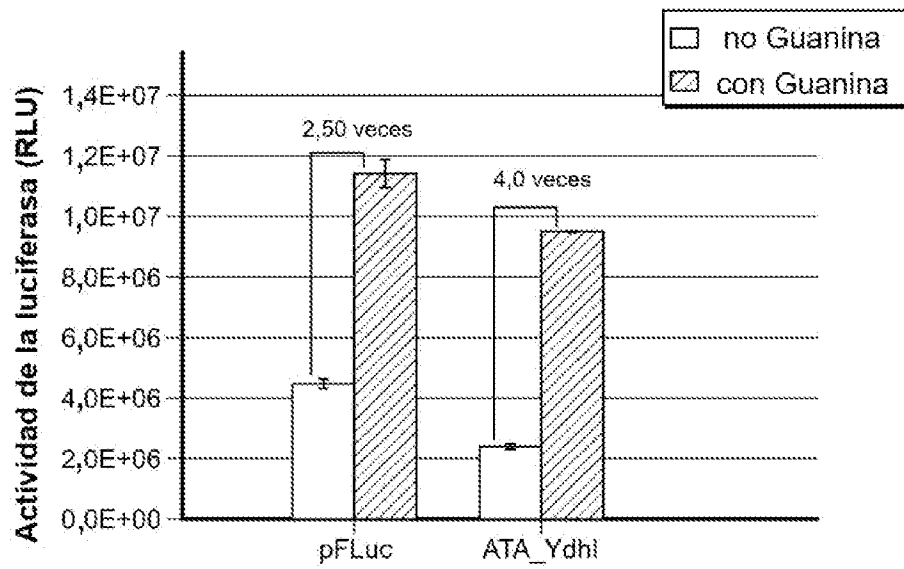


FIG. 7

ATA Gua 1 (SEQ ID NO: 1):

AAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAGccataccacattgtagaggtttacttgctttaa
aaacctcccacacctcccctgaacctgaacataaaatgaatgaattgtgtgttaactgtttatgcagcttataatggttacaanaa
agcaatagcatcacaaatttcaagggtataatccgttgatagccacgaagtttaccggtccaccgtaaatgtccgacttctt
tttggaaaatataatgcatttttcactgcatttgaattgtgttttccaaactcatcaatgtatcttaacgcgt

ATA Gua 1 (SEQ ID NO: 2):

AAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAGccataccacattgtagaggtttacttgctttaa
aaacctcccacacctcccctgaacctgaacataaaatgaatgaattgtgtgttaactgtttatgcagcttataatggttacaanaa
agcaatagcatcacaaatttcaatgaatgaatgcgttgatagccacgaagtttaccggtccaccgtaaatgtccgacttctt
atttggaaatataatgcatttttcactgcatttgaattgtgttttccaaactcatcaatgtatcttaacgcgt

ATA Gua 3 (SEQ ID NO: 3):

AAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAGccataccacattgtagaggtttacttgctttaa
aaacctcccacacctcccctgaacctgaacataaaatgaatgaattgtgtgttaactgtttatgcagcttataatggttacaanaa
agcaatagcatcacaaatttcaatgaatgaatgcgttgatagccacgaagtttaccggtccaccgtaaatgtccgacttctt
gttggaaatgaatataatgcatttttcactgcatttgaattgtgttttccaaactcatcaatgtatcttaacgcgt

ATA Gua 4 (SEQ ID NO: 4):

AAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAGccataccacattgtagaggtttacttgctttaa
aaacctcccacacctcccctgaacctgaacataaaatgaatgaattgtgtgttaactgtttatgcagcttataatggttacaanaa
agcaatagcatcacaaatttcaatgaatgaatgcgttgatagccacgaagtttaccggtccaccgtaaatgtccgacttctt
tgtggaaatgaatataatgcatttttcactgcatttgaattgtgttttccaaactcatcaatgtatcttaacgcgt

DSE Gua 1 (SEQ ID NO: 5):

AAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAGccataccacattgtagaggtttacttgctttaa
aaacctcccacacctcccctgaacctgaacataaaatgaatgaattgtgtgttaactgtttatgcagcttataatggttacaanaa
agcaatagcatcacaaatttcaatgaatgaatgcgttgatagccacgaagtttaccggtccaccgtaaatgtccgacttctt
tatggcaccgaagtttaccggtccaccgtaaatgtccgacttgggttaactcatcaatgtatcttaacgcgt

DSE Gua 2 (SEQ ID NO: 6):

AAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAGccataccacattgtagaggtttacttgctttaa
aaacctcccacacctcccctgaacctgaacataaaatgaatgaattgtgtgttaactgtttatgcagcttataatggttacaanaa
agcaatagcatcacaaatttcaatgaatgaatgcgttgatagccacgaagtttaccggtccaccgtaaatgtccgacttctt
atatggcaccgaagtttaccggtccaccgtaaatgtccgacttgggttaactcatcaatgtatcttaacgcgt

DSE Gua 3 (SEQ ID NO: 7):

AAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAGccataccacattgtagaggtttacttgctttaa
aaacctcccacacctcccctgaacctgaacataaaatgaatgaattgtgtgttaactgtttatgcagcttataatggttacaanaa
agcaatagcatcacaaatttcaatgaatgaatgcgttgatagccacgaagtttaccggtccaccgtaaatgtccgacttctt
ggatatggcaccgaagtttaccggtccaccgtaaatgtccgacttgggttaactcatcaatgtatcttaacgcgt

DSE Gua 4 (SEQ ID NO: 8):

AAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAGccataccacattgtagaggtttacttgctttaa
aaacctcccacacctcccctgaacctgaacataaaatgaatgaattgtgtgttaactgtttatgcagcttataatggttacaanaa
agcaatagcatcacaaatttcaatgaatgaatgcgttgatagccacgaagtttaccggtccaccgtaaatgtccgacttctt
gttgatatggcaccgaagtttaccggtccaccgtaaatgtccgacttgggttaactcatcaatgtatcttaacgcgt

FIG. 8

Cons8-SPA (SEQ ID NO: 9):

AAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAggatccaagctatcgtaccctcgacctcgagg
gccacagatctcgccgcacaaagatcttatcttcatagatctgctgctgcttctgctctctgagaataattctctctgcat

SPA ATA Gua (SEQ ID NO: 10)

AAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAggatccagctatcgatacggcgacctcgagg
gccagatctggcgcaaaaggtgtaacccctggatggagcgcgaattctccggcgaccgtaaaagtcgcactcctttattg
gaagatgaaggaattatattcattagatcctgctgctttttgtgtctcagaataattctact

SPA DSE Gua (SEQ ID NO: 11):

[illegible]

mtCon8-SPA (SEQ ID NO: 12):

AAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCGTGTAAggatccaagcttatcgataccgtcgactcgagg
gccagatcgccgcctatcaaatatttatttattacatctcttgaagcttttgcgtctagaatatttact

miSPA ATA Gus (SEQ ID NO: 13):

AAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAggatccagctatcagatccggcgcacccgaggc
gccagatcgcgggaaagggaatcgcgcgaatggcaccgaaagcclaccggcgccglaaagtcgcactatctttatgcc
aaagcctaaatctatcttattcttaccatctgaaatggttttgcctcaggaataatctctact

Stbl ATA GUA 1 (SEQ ID NO: 14):

AAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAgcctaccacattgtaggggttactgtctaa
aaactctccacacccccctgaacctgaacataaataatgaatgcantgtgtgttgaactgtttatgcagcctatataagttgacaaat
agcaatgpcatcacaaatttctaaagttatgaacccgtgcatatggcaccgaagtctaccggcaccctaatatgccacacacctt
tttttgcggcctaaagcatttttactgcattcatttgccttgcacaaatcacaatgtaacacgcgt

gaat ATA Gua 1 (SEQ ID NO: 15):

AAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAgcataccacatitgtagaggcttactgtctttaa
aaactctccacacctcccctgaacclgaacataaataatgaatgcatttgggtglaactglttatgtcgcgtatataagcttacaataaa
agcaatagcatcacaaattctaaaggtataatgcgtgtatattgacacgaagtcttaccggccacgttaattctccatctaccttca
tttgaatgcttgaacacatitcttactgcatctgcttgaatgcttcccaactcacaatgtatcttcaacgt

ATA DSE Gua (SEQ ID NO: 16):

AAGGCCAAGAAGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAgcataccacattgtagaggttactgctttaa
aaacctcccaacaccccccctgaacctgaacataaattgattgcaattgttgttgaactgtttatggcagcttataaagggttaacaataa
agcaatagatcacaataattcctaaagctataatcccggttgatggtccgaagttgagccggccacgttaaatgtccgactacttctt
tttgcagaaatgaaatgacatttttactgctgattgtgtgtttttgcgaagaaagctaaatctaaatctaaatctgataatgacacgaat
ttacacccgctgcacctaattgtccacatccgtttgaaactatcaataattttaaagcgt

ATA ydhl (SEO ID NO: 17):

AAGCCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAAgaccataccacattgtagagggttactgtctttaa
 aaacctcccaaccccccctgaaccggaacataaaatgaatgcaattgttggttaactgtttatfagcgttataatggttacaataaa
 agcaatagcatcacaataaaffcaataaaggtttaaaccataatattggttgaaggtgtcaccaggaacccgttaaaacccgttgcctt
 affcttgcgtttaaagcatttttactgcatttgaattgtttgttccaaactcacaatgacttgaacgtt

FIG. 8 (Cont.)