

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 021 683**

51 Int. Cl.:

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.01.2020 PCT/GB2020/050107**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.07.2020 WO20148555**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.01.2020 E 20701859 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2025 EP 3911751**

54 Título: **Promotores inducibles específicos del hígado y métodos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

18.01.2019 GB 201900741

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

27.05.2025

73 Titular/es:

**ASKBIO INC. (100.00%)
20 T.W. Alexander Drive Suite 110
Research Triangle Park, NC 27709, US**

72 Inventor/es:

**ROBERTS, MICHAEL;
WHYTESIDE, GRAHAM y
BRAAE, ANNE**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 3 021 683 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

Promotores inducibles específicos del hígado y métodos de uso de los mismos

La presente invención se refiere a promotores y vectores inducibles específicos del hígado, especialmente vectores de terapia génica que los comprenden, y a métodos para su utilización.

5 Antecedentes de la invención

La siguiente discusión se proporciona para ayudar al lector a comprender la divulgación y no constituye ninguna admisión en cuanto al contenido o la relevancia de la técnica anterior.

10 El metabolismo de las enzimas del citocromo P450 microsomal hepático (CYP) desempeña un papel importante en la desintoxicación de xenotóxicos como medicamentos farmacéuticos y contaminantes ambientales. La transcripción genética inducible por exposición a xenotóxicos es característica de los CYP, lo que aumenta la capacidad de defensa del organismo contra la toxicidad y la carcinogenicidad. Basándose en el descubrimiento de la inducción de genes CYP2B por PB, el PB ha servido como prototipo para un gran grupo de xenotóxicos estructural y funcionalmente diversos que inducen genes CYP2B. Se identificó un módulo potenciador sensible a PB (PBREM) como un elemento de 51 pb en *Cyp2b10* de ratón y *CYP2B1* de rata, y se identificó un elemento de ADN casi idéntico en *CYP2B2* de rata. También se ha identificado una secuencia del PBREM en humanos, donde se asocia con *CYP2B6*. El heterodímero del receptor nuclear CAR-RXR se ha identificado como el transactivador de PBREM. (ver Negishi et al., "The Repressed Nuclear Receptor CAR Responds to Phenobarbital in Activating the Human CYP2B6 Gene"; J. Biol. Chem. 1999, 274: 6043-6046)

20 En muchas áreas, incluida la terapia génica, es deseable proporcionar secuencias de ácidos nucleicos reguladoras que sean capaces de impulsar la expresión de un gen para producir una proteína o un producto de expresión de ácido nucleico dentro de una célula, tejido u órgano deseado.

25 La expresión en el hígado es de particular interés ya que está involucrada en una amplia gama de funciones esenciales en el cuerpo, incluida la síntesis de muchas proteínas involucradas en el metabolismo, la homeostasia y la protección contra infecciones. Dado que muchas enfermedades están relacionadas con la alteración de la expresión génica en el hígado, existe un interés significativo en desarrollar estrategias de terapia génica que permitan la expresión de un transgén en el hígado para producir un producto de expresión terapéutico. Los ejemplos de enfermedades del hígado asociadas con la expresión anormal de genes incluyen la hemofilia (incluida la hemofilia A o B), la hipercolesterolemia familiar, la deficiencia de ornitina transcarbamilasa, la deficiencia de α -antitripsina, la infección por el virus de la hepatitis, la hepatitis no viral, el cáncer de hígado y varias otras enfermedades del hígado (como la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) y la enfermedad hepática relacionada con el alcohol (ARLD)).

35 Un desafío importante en el uso de la terapia génica para tratar enfermedades hepáticas es la capacidad de proporcionar expresión génica terapéutica específica del hígado (también conocida como hepatoespecífica). Se sabe que su objetivo son los hepatocitos de mamíferos inyectando ADN o vectores virales en el parénquima hepático, la arteria hepática o la vena porta. También se ha informado que los vectores adenovirales se dirigen principalmente al hígado en ratones. Sin embargo, también infectan otros tejidos, en particular los pulmones y el músculo esquelético, lo que produce efectos "fuera del objetivo". Algunas formas de vectores virales adenoasociados (AAV) o vectores lentivirales transducen preferentemente hepatocitos, pero nuevamente surgen efectos fuera del objetivo.

40 Por lo tanto, es deseable proporcionar sistemas para regular la expresión génica de una manera específica del hígado. Idealmente, estos sistemas son altamente específicos del hígado (evitando o minimizando así la expresión fuera del objetivo en tejidos no objetivo) y también son potentes, es decir, impulsan altos niveles de expresión en el hígado. Se ha propuesto el uso de elementos reguladores que actúan en cis para proporcionar tanto especificidad como actividad. Normalmente, se trata de secuencias potenciadoras reguladoras en cis, es decir, secuencias de ácidos nucleicos que actúan en cis para aumentar la actividad de un promotor. Los potenciadores suelen ser activos independientemente de su orientación y pueden actuar a distancias de hasta varias kilobases del promotor en algunos casos, aunque normalmente también actúan cuando están mucho más cerca del promotor.

50 También existe el deseo de proporcionar sistemas inducibles de expresión génica, de modo que la expresión génica pueda inducirse según sea necesario. La inducibilidad significa que la expresión de un producto de expresión génica terapéutica puede inducirse cuando sea necesario. Además, si la inducción depende de la dosis, entonces los niveles de expresión del producto de expresión génica terapéutica se pueden modular ajustando la cantidad de inductor administrado.

55 Por lo tanto, existe una necesidad de secuencias reguladoras para controlar la expresión génica en muchos contextos, especialmente en la expresión génica terapéutica en la terapia génica y similares. En particular, existe una necesidad de secuencias reguladoras que permitan la expresión génica inducible. Las secuencias reguladoras que permiten la expresión génica inducible en el hígado son de particular interés.

Honkakoski et al., (1996) J. Biol. Chem. (1996-04-19), p9746-268 describe la caracterización de la transcripción del gen Cyp2b10 de ratón inducible por fenobarbital en hepatocitos primarios. Los documentos US2003/15004A1 y US 2004/006775A1 divulgan sistemas y métodos de detección para identificar moduladores del metabolismo xenobiótico. El documento WO 2008/073303A2 describe elementos reguladores de la transcripción de vías biológicas, herramientas y métodos. Muangmoonchai et al., (2001) Biochemical Journal 355(1) p71-78 divulga que la inducción xenobiótica del citocromo P450 2B1 está mediada por el receptor androstano constitutivo del receptor nuclear huérfano, y requiere el coactivador esteroide 1 y el factor de transcripción SP1. Chuah et al., (2014) Mol. Ther 22(2) p1605-1613 describe cómo la identificación de módulos transcripcionales específicos del hígado mediante análisis *in silico* de todo el genoma puede permitir una terapia génica eficiente en ratones y primates no humanos.

Resumen de la invención

Los diversos aspectos y realizaciones preferidas de la presente invención se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

La invención proporciona un vector de terapia génica que comprende un casete de expresión, comprendiendo el casete de expresión un promotor inducible sintético específico del hígado unido operativamente a un gen, comprendiendo el promotor inducible sintético específico del hígado un elemento regulador en cis (CRE) que es capaz de unirse y activarse por un heterodímero de CAR y RXR, en donde el CRE que puede unirse y activarse por un heterodímero CAR-RXR comprende o consiste en una variante funcional de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2, en donde la variante funcional de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2 comprende una de las siguientes secuencias:

- [TG TACTTTCCTGACCN-S]_n (SEQ ID NO: 29);
- [CTG TACTTTCCTGACCN-S]_n (SEQ ID NO: 30); y
- [NCTG TACTTTCCTGACCNTG-S]_n (SEQ ID NO: 31),

donde S es un espaciador opcional y n es de 1 a 5, opcionalmente de 2 a 4, y preferiblemente 3.

La invención también proporciona un casete de expresión que comprende un promotor inducible sintético específico del hígado unido operativamente a un gen, comprendiendo el promotor inducible sintético específico del hígado un CRE que puede unirse y activarse mediante un heterodímero de CAR y RXR como se define en las reivindicaciones.

La invención también proporciona un promotor inducible sintético específico del hígado que comprende una secuencia como se define en las reivindicaciones.

La invención también proporciona un virión recombinante que comprende un vector de terapia génica, un casete de expresión o un promotor como se define en las reivindicaciones.

La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un vector de terapia génica, un casete de expresión, un promotor o un virión como se define en las reivindicaciones.

La invención también proporciona una célula que comprende un vector de terapia génica, un casete de expresión, un promotor o un virión como se define en las reivindicaciones.

La invención también proporciona un vector de terapia génica, un casete de expresión, un promotor, un virión o una composición farmacéutica de la invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad.

La invención también proporciona un método para producir un producto de expresión, comprendiendo el método:

- proporcionar células que comprenden un casete de expresión que comprende un promotor inducible sintético específico del hígado unido operativamente a un gen, comprendiendo el promotor inducible sintético específico del hígado un elemento regulador en cis (CRE) que puede unirse y activarse mediante un heterodímero de CAR y RXR de acuerdo con la invención; y
- administrando a dichas células un inductor que es capaz de inducir la expresión del producto de expresión del gen unido operativamente al promotor inducible en dicho casete de expresión.

La invención también proporciona un método para producir un producto de expresión, comprendiendo el método las etapas de:

- a) proporcionar una población de células eucariotas que comprende un casete de expresión que comprende un promotor inducible sintético específico del hígado unido operativamente a un gen, comprendiendo el promotor inducible sintético específico del hígado un elemento regulador en cis (CRE) que puede unirse y activarse mediante un heterodímero de CAR y RXR de acuerdo con la invención;

que varía en no más de 2, preferiblemente no más de 1 posición de nucleótido de la secuencia TGTA⁵CTTTTCCTGACCN (SEQ ID NO: 20). Preferiblemente, una variante funcional de un elemento del PBREM comprende la secuencia CTGTA⁵CTTTTCCTGACCN (SEQ ID NO: 21) (por ejemplo, CTGTA⁵CTTTTCCTGACC[T/C] (SEQ ID NO: 22), es decir, CTGTA⁵CTTTTCCTGACCT (SEQ ID NO: 23) o CTGTA⁵CTTTTCCTGACCC (SEQ ID NO: 24)), o una secuencia que varía en no más de 2, preferiblemente no más de 1 posición de nucleótido de la secuencia SEQ ID NO: 21; esta secuencia incluye la C conservada ubicada en 5' de la secuencia NR1 tanto en PBREM humano como en ratón, como se representa arriba. De manera adecuada, una variante funcional de una secuencia del PBREM comprende la secuencia NCTGTA⁵CTTTTCCTGACCNTG (SEQ ID NO: 25) (por ejemplo, [T/A]CTGTA⁵CTTTTCCTGACC[C/T]TG (SEQ ID NO: 26), TCTGTA⁵CTTTTCCTGACCTTG (SEQ ID NO: 27) o ACTGTA⁵CTTTTCCTGACCCTG (SEQ ID NO: 28)), o una secuencia que varía en no más de 2, preferiblemente no más de 1 posición de nucleótido de la secuencia SEQ ID NO: 25; esta secuencia incluye los dos nucleótidos ubicados en cada uno de los extremos 5' y 3' de la secuencia NR1 del PBREM humano y de ratón, como se representa arriba. Cuando N está presente en una secuencia de ácido nucleico en el presente documento, representa cualquier nucleótido. Cuando los nucleótidos se muestran entre corchetes, indica que uno de los nucleótidos indicados dentro de los corchetes está presente en esa ubicación.

En algunas realizaciones, la variante funcional de un elemento del PBREM comprende adecuadamente dos o más, adecuadamente tres o más, secuencias que contienen motivos NR1 unidas operativamente.

Por lo tanto, en algunas realizaciones, el CRE que puede unirse y activarse mediante un heterodímero CAR-RXR comprende adecuadamente dos o más, adecuadamente tres o más, motivos NR1 operativamente unidos. Los motivos NR1 pueden en algunas realizaciones proporcionarse adyacentes entre sí (e.g., en tándem), y pueden estar inmediatamente adyacentes entre sí o separados por un espaciador. Por consiguiente, un CRE que puede unirse y activarse por un heterodímero CAR-RXR comprende adecuadamente la estructura general NR1-S-NR1, en donde NR1 representa cualquier motivo NR1 como se analiza en este documento, y S representa un espaciador opcional. Cuando hay un espaciador, puede tener cualquier secuencia y ser de cualquier longitud adecuada, e.g., de 2 a 50, de 3 a 40, de 4 a 30, de 5 a 20, de 6 a 10, de 7 a 9 u 8 nucleótidos de longitud.

En la presente invención, el CRE que puede unirse y activarse mediante un heterodímero CAR-RXR comprende o consiste en una variante funcional de una secuencia del PBREM que comprende una de las siguientes secuencias:

- [TGTA⁵CTTTTCCTGACCN-S]_n (SEQ ID NO: 29);
- [CTGTA⁵CTTTTCCTGACCN-S]_n (SEQ ID NO: 30);
- [NCTGTA⁵CTTTTCCTGACCNTG-S]_n (SEQ ID NO: 31),

donde S es un espaciador opcional y n es de 1 a 5, opcionalmente de 2 a 4, y adecuadamente 3. Por lo tanto, la variante funcional de una secuencia del PBREM puede comprender un múltiplo de las secuencias que contienen el motivo NR1. Se analizan más arriba varios motivos NR1 preferidos y, por supuesto, podrían utilizarse en esta realización. En algunas realizaciones, n es de 1 a 10, de 1 a 6 o de 2 a 4. En algunas realizaciones de la invención, n es 3.

En algunas realizaciones preferidas, está presente un espaciador entre secuencias adyacentes que contienen el motivo NR1. Cuando está presente un espaciador, puede tener cualquier longitud adecuada, e.g., de 2 a 50, de 3 a 40, de 4 a 30, de 5 a 20, de 6 a 10, de 7 a 9 u 8 nucleótidos de longitud.

En algunas realizaciones de la presente invención, el CRE que puede unirse y activarse mediante un heterodímero CAR-RXR comprende o consiste en una variante funcional de una secuencia del PBREM que comprende una de las siguientes secuencias:

- TGTA⁵CTTTTCCTGACCN-S-TGTA⁵CTTTTCCTGACCN (SEQ ID NO: 32);
- TGTA⁵CTTTTCCTGACCN-S-TGTA⁵CTTTTCCTGACCN-S-TGTA⁵CTTTTCCTGACCN (SEQ ID NO: 33);
- CTGTA⁵CTTTTCCTGACCN-S-CTGTA⁵CTTTTCCTGACCN (SEQ ID NO: 34);
- CTGTA⁵CTTTTCCTGACCN-S-CTGTA⁵CTTTTCCTGACCN-S-CTGTA⁵CTTTTCCTGACCN (SEQ ID NO: 35);
- NCTGTA⁵CTTTTCCTGACCNTG-S-NCTGTA⁵CTTTTCCTGACCNTG (SEQ ID NO: 36); y
- NCTGTA⁵CTTTTCCTGACCNTG-S-NCTGTA⁵CTTTTCCTGACCNTG-S-NCTGTA⁵CTTTTCCTGACCNTG (SEQ ID NO: 37),

donde S es un espaciador opcional. Cuando hay un espaciador, puede tener cualquier longitud adecuada, e.g., de 2 a 50, de 3 a 40, de 4 a 30, de 5 a 20, de 6 a 10, de 7 a 9 u 8 nucleótidos de longitud. Se analizan más arriba varios motivos NR1 preferidos y, por supuesto, podrían utilizarse en esta realización.

5 En algunas realizaciones de la presente invención, el CRE que puede unirse y activarse mediante un heterodímero CAR-RXR comprende o consiste en una variante funcional de una secuencia del PBREM que comprende adecuadamente una de las siguientes secuencias:

- TCTGTACTTTCTGACCTTG-S-TCTGTACTTTCTGACCTTG-S-TCTGTACTTTCTGACCTTG (SEQ ID NO: 38); o
- ACTGTACTTTCTGACCCTG-S-ACTGTACTTTCTGACCCTG-S-ACTGTACTTTCTGACCCTG (SEQ ID NO: 39),

donde S es un espaciador opcional, como se establece anteriormente.

10 En algunos casos, el espaciador puede tener la secuencia GATCGATC (SEQ ID NO: 40), pero se puede utilizar cualquier otra secuencia espaciadora adecuada.

15 En otras realizaciones de la presente invención, el CRE que puede unirse y activarse mediante un heterodímero CAR-RXR comprende cada uno de un elemento NR1, un elemento NF1 y un elemento NR2. Convenientemente, estos están presentes en el orden NR1-NF1-NR2. El elemento NR1 comprende o consiste adecuadamente en la secuencia TGGCACAGTGCCA (SEQ ID NO: 55) o TGAAGAGGTGGCA (SEQ ID NO: 56), o una secuencia que varía en 7 nucleótidos o menos (e.g., 6, 5, 4, 3, 2 o 1 nucleótidos) de la SEQ ID NO: 55 o 56. El elemento NR2 comprende o consiste adecuadamente en la secuencia TCAACTTGCCTGACAC (SEQ ID NO: 57) o TGGACTTTCTGAACC (SEQ ID NO: 58), o una secuencia que varía en 5 nucleótidos o menos (e.g., 4, 3, 2 o 1 nucleótidos) de la SEQ ID NO: 57 o 58.

20 Un CRE que puede unirse y activarse mediante un heterodímero CAR-RXR puede comprender o consistir en una variante funcional de una secuencia del PBREM que comprende una secuencia que es al menos 60 % idéntica a la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2, preferiblemente al menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2. PBREM de ratón (SEQ ID NO: 1) y PBREM humano (SEQ ID NO: 2) son 71% idénticos a lo largo de toda su longitud (es decir, 51 nucleótidos). El PBREM de ratón sigue siendo funcional en las células humanas, y la función humana en el PBREM sigue siendo funcional en las células de ratón. Por lo tanto, se puede tolerar al menos este nivel de diferencia de secuencia general en el elemento del PBREM.

30 Sin embargo, como se discutió anteriormente, hay un nivel muy alto de conservación en el motivo NR1 y, por lo tanto, generalmente se prefiere que una variante funcional de una secuencia del PBREM comprenda una secuencia que sea al menos 90% idéntica, preferiblemente al menos 95% idéntica y más preferiblemente perfectamente idéntica a la secuencia TCTGTACTTTCTGACCTTG (SEQ ID NO: 27) o ACTGTACTTTCTGACCCTG (SEQ ID NO: 28) y al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99 % idénticos en el resto de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2. Preferiblemente, la secuencia general es al menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2

40 Un CRE que puede unirse y activarse mediante un heterodímero CAR-RXR puede comprender o consistir en una variante funcional de una secuencia del PBREM que comprende una secuencia que es al menos 90% idéntica, preferiblemente al menos 95% idéntica y más preferiblemente perfectamente idéntica a la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2 en la región que abarca los nucleótidos 3 a 18 (preferiblemente la región que abarca los nucleótidos 1 a 20), y al menos 50%, 55%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99% idéntica en el resto de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2 (es decir, nucleótidos 1, 2 y 19 a 51, o nucleótidos 21 a 51). Los nucleótidos se numeran con referencia a la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2. Preferiblemente, la secuencia general es al menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99% idéntica a la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2. El CRE que puede unirse y activarse mediante un heterodímero CAR-RXR de la invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

Un CRE que puede unirse y activarse mediante un heterodímero CAR-RXR puede comprender o consistir en la siguiente secuencia:

50 NCTGTACTTTCTGACCNTGNNNNNGTGNCANCATNNACTTNCCTGANN CN (SEQ ID NO: 41), o una secuencia al menos 90%, preferiblemente 95%, más preferiblemente 99% idéntica a la misma. En este caso, la identidad se calcula con respecto a los nucleótidos específicamente definidos en lugar de las "N" no definidas. Las variantes funcionales de una secuencia del PBREM en las que se eliminan uno o más nucleótidos identificados como N se contemplan específicamente como parte de dichas realizaciones de la invención, e.g., en las que se eliminan hasta 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 nucleótidos marcados como N. Además, se contemplan

específicamente variantes funcionales de una secuencia del PBREM donde se insertan uno o más nucleótidos, e.g., donde se insertan hasta 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 nucleótidos. Como ejemplo específico, el elemento del PBREM de rata del gen CYP2B2 comprende una T insertada entre la T y la C en la posición 10-11, es decir, dentro de NR1 del elemento del PBREM. Es probable que el reemplazo, la eliminación o la inserción de nucleótidos en regiones fuera del motivo NR1 sean bien tolerados.

Variantes funcionales de una secuencia del PBREM que se asemejan más a los elementos del PBREM de ratón o humano de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2) son preferidos en algunos casos, ya que se cree que pueden demostrar propiedades particularmente deseables de baja expresión de fondo y altos niveles de inducibilidad. Estas propiedades son generalmente deseables cuando se debe mantener mínima la expresión de fondo de un gen proporcionado en un vector de la presente invención, es decir, cuando no se produce inducción de la expresión.

En algunas realizaciones de la invención, el CRE que puede unirse y activarse mediante un heterodímero CAR-RXR comprende o consiste en una porción del elemento del PBREM de cada una de dos o más especies diferentes, adecuadamente de especies de dos o más géneros diferentes (e.g., dos mamíferos diferentes). Estos elementos pueden denominarse "elementos del PBREM híbridos". Un elemento del PBREM híbrido generalmente comprende todos los motivos de un elemento del PBREM de tipo silvestre (es decir, los motivos NR1, NF1 y NR2), pero estos motivos se derivan de dos o más especies diferentes. En algunas realizaciones, un elemento del PBREM híbrido comprende una porción (e.g., los motivos NR1, NF1 y NR2) de una primera especie y una porción correspondiente de una segunda especie (e.g., los motivos NR1, NF1 y NR2 correspondientes). A modo de ejemplo no limitativo, un elemento del PBREM híbrido puede comprender porciones (e.g., los motivos NR1, NF1 y NR2) de elementos del PBREM de primates (e.g., humanos) y roedores (e.g., ratones). Por ejemplo, un elemento del PBREM híbrido puede comprender un motivo NR1 de primate (e.g., de humano) y un motivo NR2 de roedor (e.g., de ratón), o un motivo NR1 de roedor (e.g., ratón) y un motivo NR2 de primate (e.g., humano). Los motivos NR1 y NR2 de primates o roedores también se pueden combinar con un motivo NF1 de la especie correspondiente.

En algunas realizaciones, el elemento del PBREM híbrido comprende una de las siguientes combinaciones de motivos PBREM: hNR1-mNF1-hNR2; hNR1-mNF1-mNR2; mNR1-hNF1-mNR2; o mNR1-hNF1-hNR2 (donde "h" indica el motivo humano y m indica el motivo de ratón). Las secuencias de elementos del PBREM híbridos de ejemplo están subrayadas en las SEQ ID Nos: 61 a 64 en la Tabla 3; por supuesto, se podrían utilizar variantes funcionales de estas secuencias, e.g., secuencias que tengan una identidad del 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99% con las secuencias de elementos del PBREM híbridos subrayadas en las SEQ ID Nos: 61 a 64, opcionalmente con niveles más altos de identidad en el motivo NR1, como se discutió anteriormente.

Como se discutió anteriormente, y sin querer limitarse a la teoría, se cree que la inducción de la expresión génica a través del elemento del PBREM, o variantes del mismo, depende de la unión al mismo del heterodímero CAR-RXR. La capacidad de cualquier CRE dado que pueda ser unido y activado por un heterodímero CAR-RXR, e.g., una variante de un elemento del PBREM, para funcionar como se desea, es decir, ser inducible de la misma manera que los elementos del PBREM de ratón o humano de tipo silvestre, aunque no necesariamente en la misma medida, se puede determinar fácilmente experimentalmente. Por ejemplo, la variante CRE se puede insertar en el constructo como se establece en los ejemplos siguientes en lugar de la SEQ ID NO: 1, y se puede comparar la capacidad del constructo a ser inducido en comparación a cuando se incluyó la SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, se puede proporcionar una variante CRE en lugar de la SEQ ID NO: 1 en el constructo PB1-MinTK y probar en células hepáticas, preferentemente hepatocitos primarios, e.g., hepatocitos expandidos listos para ensayo AXOL (ARE) (Axol, ax3701) con inducción por 1 μ M de CITCO, como se describe en el Ejemplo 2. Alternativamente, se podría insertar una variante en el constructo pAAV-PB1-MinTk, como se describe en el Ejemplo 4. Alternativamente, el enfoque experimental utilizado en Sueyoshi, et al. (J. BIOL. CHEM. Vol. 274,10, pp. 6043-6046, 1999) se pueden utilizar, es decir, las secuencias variantes del PBREM putativas relevantes se pueden clonar delante del promotor tk (sitio BgIII) en el vector pGL3-Basic que contiene el gen reportero de la luciferasa de luciérnaga (Promega), dando como resultado plásmidos del gen de la VARIANTE del PBREM-tk-luciferasa y del reportero. En general, una variante funcional de un CRE debe proporcionar un nivel de inducibilidad que sea al menos 50%, preferiblemente 75%, más preferiblemente 80%, 85%, 90% o 95% tan inducible cuando se compara con el constructo equivalente que comprende el elemento del PBREM de tipo silvestre, e.g., la SEQ ID NO: 1 (medido en términos de aumento de veces en la expresión como resultado de la inducción, es decir, un aumento de 2 veces en la expresión de un gen informado tras la inducción se considera que es 50 % tan inducible como un aumento de 4 veces). En general, se desea que la variante funcional proporcione al menos una inducción de 2 veces, más preferiblemente una inducción de 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces o 7 veces cuando se proporciona en lugar del PBREM de tipo silvestre de ratón en el constructo PB1-MinTK descrito anteriormente y probado en células hepáticas, preferentemente hepatocitos primarios, e.g., hepatocitos expandidos listos para ensayo AXOL (ARE) (Axol, ax3701) con inducción por 1 μ M de CITCO, como se describe en el Ejemplo 2 a continuación. Una variante funcional preferiblemente da como resultado un nivel de expresión de fondo que no es más de tres veces más alto, preferiblemente no más de dos veces más alto y preferiblemente no más de 1.5 veces más alto en comparación

con el constructo equivalente que comprende el elemento del PBREM de ratón de tipo silvestre (e.g., nuevamente en el constructo PB1-MinTK y probado en hepatocitos ARE).

5 Se observará que el elemento del PBREM o variante funcional del mismo puede estar presente en cualquier orientación. El complemento inverso de los elementos del PBREM expuestos anteriormente forma parte así de la presente invención. Se observa que el elemento del PBREM humano está presente de forma natural en la orientación inversa en comparación con el elemento del PBREM del ratón, y que se demostró que el elemento del PBREM humano sigue siendo funcional en la orientación "inversa" (es decir, la misma orientación que el PBREM del ratón) en Sueyoshi, et al. (J. BIOL. CHEM. Vol. 274,10, pp. 6043-6046, 1999).

10 En algunas realizaciones de la invención, el promotor inducible sintético específico del hígado comprende adecuadamente una pluralidad de CRE que son cada uno de ellos capaces de ser unidos y activados por un heterodímero de CAR y RXR. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la invención proporciona un promotor inducible sintético específico del hígado que comprende un múltiplo de CRE que son cada uno capaces de unirse y activarse por un heterodímero de CAR y RXR. Visto de otra manera, el promotor inducible sintético específico del hígado comprende adecuadamente un módulo regulador en cis (CRM) que comprende una pluralidad de CRE que son cada uno capaces de ser unidos y activados por un heterodímero de CAR y RXR. Los CRE que puede unirse y activarse por un heterodímero de CAR y RXR pueden ser idénticos o pueden ser diferentes entre sí.

20 En dichas realizaciones, el promotor inducible sintético específico del hígado comprende adecuadamente de 2 a 10 CRE que son cada uno de ellos capaces de unirse y activarse por un heterodímero de CAR y RXR. El promotor inducible comprende adecuadamente de 2 a 7 CRE, de 2 a 5 CRE, de 2 a 4 CRE, opcionalmente 2 o 3 CRE, y en algunas realizaciones se prefiere que haya 3 CRE que sean capaces de ser unidos y activados por un heterodímero de CAR y RXR.

25 Como se discutió anteriormente, los CRE que pueden ser unidos y activados por un heterodímero de CAR y RXR son elementos del PBREM o variantes funcionales de los mismos tal como se define en las reivindicaciones adjuntas. Por lo tanto, en una realización preferida, el promotor inducible sintético específico del hígado comprende adecuadamente de 2 a 5, aún más preferiblemente de 2 a 4, y aún más preferiblemente 3 elementos del PBREM que comprenden la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2, o variantes funcionales de las mismas tal como se define en las reivindicaciones adjuntas. Más arriba se analizan en detalle varios elementos del PBREM y variantes funcionales de los mismos.

30 En algunas realizaciones preferidas de la invención, el promotor inducible sintético específico del hígado comprende de 2 a 4, opcionalmente 2 o 3, copias operativamente ligadas de un CRE que comprende la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2, o una variante funcional de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2 en donde la variante funcional de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2 comprende una de las siguientes secuencias:

- [TGACTTTCCTGACCN-S-], (SEQ ID NO: 29);
- [CTGTACTTTCCTGACCN-S-], (SEQ ID NO: 30); y
- [NCTGTACTTTCCTGACCNTG-S-], (SEQ ID NO: 31),

35 – donde S es un espaciador opcional y n es de 1 a 5, opcionalmente de 2 a 4, y preferiblemente 3.

40 Los CRE que pueden unirse y activarse mediante un heterodímero de CAR y RXR pueden separarse mediante una secuencia espaciadora. El espaciador puede tener cualquier longitud adecuada, e.g., de 2 a 100 nucleótidos, de 3 a 50 nucleótidos, de 5 a 30 nucleótidos y de 10 a 25 nucleótidos. En algunas realizaciones se indica que el espaciador tiene una longitud múltiplo de 5. Se ha descubierto que un espaciador de aproximadamente 20 nucleótidos de longitud es adecuado (e.g., de 18-22 nucleótidos de longitud).

En algunas realizaciones preferidas de la invención, el promotor inducible sintético específico del hígado comprende un CRM que comprende o consiste en una de las siguientes secuencias:

- NCTGTACTTTCCTGACCNTGNNNNNGTGNCANCATNNACTTNCCTGANNCN-S-
NCTGTACTTTCCTGACCNTGNNNNNGTGNCANCATNNACTTNCCTGANNCN (SEQ ID NO: 42); o
- NCTGTACTTTCCTGACCNTGNNNNNGTGNCANCATNNACTTNCCTGANNCN-S-
NCTGTACTTTCCTGACCNTGNNNNNGTGNCANCATNNACTTNCCTGANNCN-S-
NCTGTACTTTCCTGACCNTGNNNNNGTGNCANCATNNACTTNCCTGANNCN (SEQ ID NO: 43),

45 donde S es un espaciador opcional. El espaciador separa elementos del PBREM adyacentes o variantes funcionales de los mismos. Las opciones para el espaciador se detallan arriba. En algunas realizaciones, el

de fondo. Algunas realizaciones particularmente preferidas comprenden dos o tres CRE que pueden unirse y activarse por un heterodímero de CAR y RXR, tal como se define en las reivindicaciones, operativamente unido a un promotor mínimo; dichos promotores son particularmente fuertes en cuanto a inducibilidad.

5 En algunas realizaciones preferidas, el CRE que puede unirse y activarse mediante un heterodímero de CAR y RXR, como se define en las reivindicaciones, está separado del promotor mínimo o promotor proximal por una secuencia espaciadora. La secuencia espaciadora puede tener cualquier longitud adecuada. Por ejemplo, el espaciador entre el CRE que puede unirse y activarse por un heterodímero de CAR y RXR (o, cuando hay una pluralidad de CRE presentes, el CRE más proximal) y el promotor mínimo o proximal puede tener una longitud de entre 10 y 200 nucleótidos.

10 En los ejemplos que se exponen a continuación se emplearon con éxito espaciadores de diversas longitudes (incluidos 20, 46, 80 y 100 nucleótidos, por ejemplo).

15 En algunas realizaciones de la presente invención, el promotor inducible sintético específico del hígado comprende una secuencia de acuerdo con una cualquiera de las SEQ ID NOs: 7 a 18, o variante funcional de cualquiera de las mismas, como se define en las reivindicaciones. La variante funcional es adecuadamente al menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99% idéntica a una cualquiera de las SEQ ID NOs: 7 a 18. Como se mencionó anteriormente, se prefiere una identidad de secuencia del 90%, 95% o 99% o más en regiones correspondientes a motivos NR1.

20 En algunas realizaciones preferidas de la presente invención, el promotor inducible sintético específico del hígado comprende una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 11 o la SEQ ID NO: 12, o variante funcional de una cualquiera de las mismas, de acuerdo con se define en las reivindicaciones. La variante funcional es adecuadamente al menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99% idéntica a una cualquiera de la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 11 o la SEQ ID NO: 12. Como se mencionó anteriormente, se prefiere una identidad de secuencia del 90%, 95% o 99% o más en regiones correspondientes a motivos NR1. Estos promotores comprenden 1, 2, 3 y 4, respectivamente, copias de PBREM de ratón ligadas a un promotor mínimo MinTK. La SEQ ID NO: 10 y la SEQ ID NO: 11, o variantes funcionales de las mismas, son realizaciones particularmente preferidas de la invención en vista de sus propiedades especialmente deseables en términos de alta inducibilidad combinada con bajos niveles de expresión de fondo.

30 Se divulga un promotor inducible sintético específico del hígado que comprende o consiste en una secuencia de acuerdo con una cualquiera de las SEQ ID NOs: 59 a 71, o una variante funcional de las mismas. La variante funcional es adecuadamente al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99% idéntica a una cualquiera de las SEQ ID NOs: 59 a 71. Como se mencionó anteriormente, se prefiere una identidad de secuencia del 90%, 95% o 99% o más en regiones correspondientes a motivos de NR1.

35 Se divulga un promotor inducible sintético específico del hígado que comprende una secuencia de acuerdo con una cualquiera de las SEQ ID NOs: 68, 69, 70 o 71, o variante funcional de una cualquiera de las mismas. La variante funcional es adecuadamente al menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99% idéntica a una cualquiera de las SEQ ID NO: 60 o 61. Como se mencionó anteriormente, se prefiere una identidad de secuencia del 90%, 95% o 99% o más en regiones correspondientes a motivos de NR1. Estos promotores comprenden 2x MHM o 3x elementos del PBREM humano. De manera adecuada, el casete de expresión comprende secuencias que proporcionan o codifican uno o más de, y preferiblemente todos, un sitio de unión ribosómico, un codón de inicio, un codón de parada y una secuencia de terminación de la transcripción. De manera adecuada, el casete de expresión comprende un ácido nucleico que codifica un elemento regulador postranscripcional. De manera adecuada, el casete de expresión comprende un ácido nucleico que codifica un elemento poliA.

45 Un gen para su uso en la presente invención normalmente codifica un producto de expresión génica deseado, tal como un polipéptido (proteína) o ARN. El gen puede ser una secuencia de ADNc o ADN genómico de longitud completa, o cualquier fragmento, subunidad o mutante del mismo que tenga al menos alguna actividad biológica deseada.

50 Cuando el gen codifica una proteína, puede ser esencialmente cualquier tipo de proteína. A modo de ejemplo no limitativo, la proteína puede ser una enzima, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo (e.g., un anticuerpo monoclonal), una proteína viral (e.g., REP, CAP, REV, VSV-G o RD114), una proteína terapéutica o una proteína tóxica (e.g., caspasa 3, 8 o 9).

55 En algunas realizaciones preferidas de la presente invención, el gen codifica un producto de expresión terapéutica, preferiblemente una proteína terapéutica adecuada para su uso en el tratamiento de una enfermedad o condición asociada con el hígado. A estos genes se les puede llamar "genes terapéuticos". El producto de expresión terapéutica puede ser una proteína, e.g., una proteína secretable tal como, e.g., un factor de coagulación (e.g., factor IX o factor VIII), una citocina, un factor de crecimiento, un anticuerpo o nanocuerpo, una quimiocina, un factor plasmático, insulina, eritropoyetina, lipoproteína lipasa o una proteína tóxica.

Alternativamente, el producto de expresión terapéutica puede ser ARN, tal como un ARNip o un miARN. Una lista no exhaustiva de productos de expresión terapéuticos (y secuencias que los codifican) previstos para su uso en la presente invención incluye: factor VIII, factor IX, factor VII, factor X, factor de von Willebrand, eritropoyetina (EPO), interferón- α , interferón-B, interferón- γ , interleucina 1 (IL-1), interleucina 2 (IL-2),
 5 interleucina 3 (IL-3), interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 6 (IL-6), interleucina 7 (IL-7), interleucina 8 (IL-8), interleucina 9 (IL-9), interleucina 10 (IL-10), interleucina 11 (IL-11), interleucina 12 (IL-12), ligando 5 de quimiocina (motivo C-X-C) (CXCL5), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de células madre (SCF), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1), factor de necrosis tumoral (TNF), afamina (AFM), α 1-antitripsina, α -galactosidasa A, α -L-iduronidasa, ATP7b, ornitina transcarbamoilasa, fenilalanina hidroxilasa, lipoproteína lipasa, descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC), ATPasa transportadora de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico/endoplásmico 2 (ATP2A2), regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CTFR), proteína descarboxilasa del ácido glutámico de 65 kDa (GAD65), proteína descarboxilasa del ácido glutámico de 67 kDa (GAD67), lipoproteína lipasa (LPL), factor de crecimiento nervioso (NGF), neurturina (NTN), porfobilinógeno desaminasa (PBGD), sarcoglicano alfa (SGCA), tirosina quinasa soluble tipo fms-1 (sFLT-1), apolipoproteínas, receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL-R), albúmina, glucosa-6-fosfatasa, anticuerpos, nanocuerpos, aptámeros, proteínas dominantes negativas antivirales y fragmentos funcionales, subunidades o mutantes de los mismos. Preferiblemente, la proteína es una proteína de primate, más
 10 preferiblemente una proteína humana.

Las proteínas o polipéptidos de interés pueden ser, por ejemplo, anticuerpos, enzimas o fragmentos de los mismos, proteínas virales, citocinas, linfocinas, moléculas de adhesión, receptores y derivados o fragmentos de los mismos, antibióticos proteicos, proteínas de fusión de toxinas, conjugados carbohidrato-proteína, proteínas estructurales, proteínas reguladoras, vacunas y proteínas o partículas similares a vacunas, enzimas
 15 de proceso, factores de crecimiento, hormonas y cualquier otro polipéptido que pueda servir como agonista o antagonista y/o tener uso terapéutico o diagnóstico. De acuerdo con una realización preferida, la proteína es una inmunoglobulina, preferiblemente un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, más preferiblemente un anticuerpo Fab o scFv. De acuerdo con otra realización preferida la proteína es una proteína viral.

En algunas realizaciones de la invención, el casete de expresión sintético específico del hígado comprende un gen útil para la edición genética, e.g., un gen que codifica una nucleasa específica del sitio, tal como una meganucleasa, una nucleasa de dedo de zinc (ZFN), una nucleasa basada en efector de tipo activador de la transcripción (TALEN) o el sistema de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente
 20 interespaciadas (CRISPR-Cas). De manera adecuada, la nucleasa específica del sitio se adapta para editar un locus genómico objetivo deseado haciendo un corte (normalmente una rotura de doble cadena específica del sitio) que luego se repara mediante unión de extremos no homólogos (NHEJ) o reparación dependiente de homología (HDR), lo que da como resultado una edición deseada. La edición puede ser la reparación parcial o completa de un gen que es disfuncional, o la desactivación o eliminación de un gen funcional.

El producto de interés también puede ser un ácido nucleico, por ejemplo, un ARN, por ejemplo, un ARN antisentido, un microARN, un ARNip, un ARNt, ARNr, un ARN guía o cualquier otro ARN regulador, terapéutico
 25 o de otro modo útil.

En algunas realizaciones preferidas de la invención, el vector de terapia génica es un vector viral, tal como un vector retroviral, lentiviral, adenoviral o viral adenoasociado (AAV), pero también se contemplan otras formas de vector de terapia génica. En algunas realizaciones preferidas, el vector es un vector AAV. En algunas realizaciones preferidas, el AAV tiene un serotipo adecuado para la transducción hepática. En algunas
 30 realizaciones, el AAV se selecciona del grupo que consiste en: AAV2, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 o derivados de los mismos. Los vectores AAV se utilizan adecuadamente como vectores AAV bicatenarios autocomplementarios (scAAV) para superar una de las etapas limitantes en la transducción de AAV (es decir, la conversión de AAV monocatenario a bicatenario), aunque el uso de vectores AAV monocatenarios (AAVmc) también se abarca en este documento. En algunas realizaciones de la invención, el vector AAV es quimérico, lo que significa que comprende componentes de al menos dos serotipos de AAV, como los ITR de un AAV2 y la proteína de la cápside de un AAV5.

En algunas realizaciones de la invención, el vector es un plásmido. Un plásmido de este tipo puede incluir una variedad de otras secuencias de ácidos nucleicos funcionales, como uno o más marcadores seleccionables, uno o más orígenes de replicación, sitios de policlación y similares.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un casete de expresión que comprende un promotor inducible sintético específico del hígado unido operativamente a un gen, comprendiendo el promotor inducible sintético específico del hígado un CRE que puede unirse y activarse mediante un heterodímero de CAR y RXR como se define en las reivindicaciones. Se analizan más arriba varios promotores inducibles sintéticos en el contexto de un vector de terapia génica, y pueden utilizarse en este aspecto de la invención. Por lo tanto, la presente invención también abarca los promotores sintéticos específicos del hígado como se describe con
 35 40 45 50 55 60

respecto al primer aspecto en un casete de expresión tanto en un vector de terapia génica (como se describió en detalle anteriormente) y en otros contextos.

5 En algunas realizaciones de la invención, el casete de expresión está presente en un vector de expresión para la expresión en células eucariotas. Los ejemplos de vectores de expresión eucariotas incluyen, entre otros, pW-LNEO, pSV2CAT, pOG44, pXTI y pSG disponibles de Stratagene; pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL disponibles de Amersham Pharmacia Biotech; y pCMVDsRed2-express, pIRES2-DsRed2, pDsRed2-Mito, pCMV-EGFP disponibles de Clontech. Hay muchos otros vectores bien conocidos y disponibles comercialmente. Para los vectores adenovirales de células de mamíferos, las series de vectores pSV y pCMV son ejemplos no limitantes particularmente conocidos. Existen muchos vectores de expresión de levadura bien conocidos, incluidos, entre
10 otros, los plásmidos integrativos de levadura (YIp) y los plásmidos replicativos de levadura (YRp). Para las plantas, el plásmido Ti de Agrobacterium es un vector de expresión ejemplar, y los virus de plantas también proporcionan vectores de expresión adecuados, e.g., el virus del mosaico del tabaco (TMV), el virus X de la patata y el virus del mosaico del caupí.

15 En realizaciones de este aspecto de la invención, el gen preferiblemente no es un gen reportero. Lo adecuado es que el gen codifique un producto de expresión terapéutico (e.g., como se mencionó anteriormente) u otro producto de expresión que sea útil en la industria o la investigación. Por lo tanto, en algunas realizaciones preferidas de la invención, el casete de expresión es para la expresión de un producto que no es un reportero (tal como una proteína fluorescente, una proteína luminiscente o una proteína cromogénica), y preferiblemente es para la expresión de un producto de expresión terapéutico. Se analizan más arriba varios productos de
20 expresión adecuados. Al experto en la materia le resultará evidente otra expresión útil del producto.

25 En otro aspecto, la presente invención también proporciona un promotor inducible sintético específico del hígado que comprende un CRE que puede unirse y activarse mediante un heterodímero de CAR y RXR como se define en las reivindicaciones. Se considera que los diversos promotores inducibles sintéticos analizados anteriormente en el contexto de un vector de terapia génica son realizaciones de este aspecto de la presente invención. En otras palabras, varios promotores descritos anteriormente se consideran realizaciones de este aspecto de la invención independientemente de si están en el contexto de un vector de terapia génica. En particular, se divulgan varios promotores inducibles sintéticos específicos del hígado que tienen propiedades beneficiosas y que no se divulgan en la técnica. Estos tienen utilidad en la terapia génica, pero también tienen una amplia utilidad en otros contextos, como el cultivo celular y el bioprocesamiento, como se analiza más
30 adelante.

35 En particular, pero no exclusivamente, las realizaciones de este aspecto de la invención incluyen un promotor inducible sintético específico del hígado que comprende una secuencia de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NOs: 7 a 18, o variante funcional de cualquiera de las mismas, como se define en las reivindicaciones. La variante funcional es adecuadamente al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99% idéntica a una cualquiera de las SEQ ID NO: 7 a 18. Como se mencionó anteriormente, se prefiere una identidad de secuencia del 90%, 95% o 99% o más en regiones correspondientes a motivos NR1.

40 En algunas realizaciones preferidas, el promotor inducible sintético específico del hígado comprende una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 11 o la SEQ ID NO: 12, o variante funcional de cualquiera de las mismas, como se define en las reivindicaciones. La variante funcional es adecuadamente al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99% idéntica a cualquiera de la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 11 o la SEQ ID NO: 12. Estos promotores comprenden 1, 2, 3 y 4, respectivamente, copias de PBREM de ratón ligadas a un promotor mínimo MinTK.

45 En algunas realizaciones de la invención, el promotor inducible sintético específico del hígado comprende o consiste en una secuencia de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NOs: 59 a 71, o una variante funcional de la misma, tal y como se define en las reivindicaciones. La variante funcional es adecuadamente al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99% idéntica a cualquiera de las SEQ ID NOs: 59 a 71. Como se mencionó anteriormente, se prefiere una identidad de secuencia del 90%, 95% o 99% o más en regiones correspondientes a motivos NR1.

50 En algunas realizaciones preferidas de la presente invención, el promotor inducible sintético específico del hígado comprende una secuencia de acuerdo con cualquiera de la SEQ ID NO: 68, 69, 70 o 71, o variante funcional de una cualquiera de las mismas, como se define en las reivindicaciones. La variante funcional es adecuadamente al menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99% idéntica a una cualquiera de la SEQ ID NO: 68, 69, 70 o 71. Como se mencionó anteriormente, se prefiere una identidad de secuencia del 90%, 95% o 99% o más en regiones correspondientes a motivos NR1. Estos promotores comprenden 2x MHM
55 o 3x elementos del PBREM humanos.

Un CRE que puede unirse y activarse por un heterodímero CAR-RXR puede comprender o consistir en una variante funcional del elemento del PBREM. Adecuadamente, la variante PBREM es una variante de PBREM que no ocurre de manera natural, es decir, comprende una secuencia que no ocurre en la naturaleza. Por ejemplo, la variante puede no comprender la secuencia de elementos del PBREM humanos, de ratón o de rata

(e.g., la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2). Se describieron anteriormente varios CRE no naturales capaces de ser unidos y activados por un heterodímero CAR-RXR.

- 5 En algunas realizaciones, el CRE de la invención comprende o consiste en un elemento del PBREM híbrido, como se discutió anteriormente. A modo de ejemplo no limitativo, un elemento del PBREM híbrido puede comprender porciones de elementos del PBREM de primates (e.g., humanos) y roedores (e.g., ratones). Por ejemplo, un elemento del PBREM híbrido puede comprender un motivo NR1 de humano y un motivo NR2 de ratón, o un motivo NR1 de ratón y un motivo NR2 de humano. Los motivos NR1 y NR2 de ratón o humano también se pueden combinar con un motivo NR1 de la especie correspondiente. En algunas realizaciones, el elemento del PBREM híbrido comprende una de las siguientes combinaciones de motivos PBREM: hNR1-mNF1-hNR2; hNR1-mNF1-mNR2; mNR1-hNF1-mNR2; o mNR1-hNF1-hNR2 (donde "h" indica el motivo humano y m indica el motivo de ratón). Las secuencias de elementos del PBREM híbridos de ejemplo están subrayadas en las SEQ ID Nos: 61 a 64 en la Tabla 3; por supuesto, se podrían utilizar variantes funcionales de estas secuencias, e.g., secuencias que tengan una identidad del 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99% con las secuencias de elementos del PBREM híbridos subrayados en las SEQ ID Nos: 61 a 64.
- 10
- 15 En algunas realizaciones, el CRE que puede unirse y activarse mediante un heterodímero CAR-RXR comprende o consiste en una de las siguientes secuencias:

ACTGTACTTTTCCTGACCCTGAAGAGACTGTACTTTTCCTGACCCTGAAGAGACTGTACTTTCC
 TGACCCTGAAGAG (SEQ ID NO: #; NR1x3 humano);
 ACTGTACTTTTCCTGACCCTGGCACAGTGCCACCATGGACTTTCCTGAACCA (SEQ ID NO:
 72; HMM híbrido);
 ACTGTACTTTTCCTGACCCTGGCACAGTGCCACCATCAACTTGCCTGACACC (SEQ ID NO:
 73; HMM híbrido);
 TCTGTACTTTTCCTGACCTTGAAGAGGTGGCACCATCAACTTGCCTGACACC (SEQ ID NO:
 74; MHM híbrido); o
 TCTGTACTTTTCCTGACCTTGAAGAGGTGGCAGCATGGACTTTCCTGAACCA (SEQ ID NO:
 75; MHH híbrido);

o una variante funcional del mismo. La variante funcional comprende adecuadamente una secuencia que es 80%, 85%, 90%, 95% o 99% idéntica a cualquiera de dichas secuencias.

- 20 También se proporciona un CRM que comprende dos o más CRE que pueden unirse y activarse mediante un heterodímero CAR-RXR que comprende o consiste en una variante funcional del elemento del PBREM. Se describieron anteriormente varios CRM que comprenden dos o más CRE capaces de unirse y activarse por un heterodímero CAR-RXR. El CRM puede comprender al menos un CRE no natural como se discutió anteriormente, e.g., al menos un CRE híbrido.
- 25 En algunos ejemplos, el CRM comprende una de las siguientes secuencias:

TCTGTACTTTTCCTGACCTTGGCACAGTGCCACCATCAACTTGCCTGACACC-S-
 CTGTACTTTTCCTGACCTTGGCACAGTGCCACCATCAACTTGCCTGACACC (SEQ ID NO: 76;
 2x CRE del PBREM de ratón);
 TCTGTACTTTTCCTGACCTTGGCACAGTGCCACCATCAACTTGCCTGACACC-S-
 TCTGTACTTTTCCTGACCTTGGCACAGTGCCACCATCAACTTGCCTGACACC-S-
 TCTGTACTTTTCCTGACCTTGGCACAGTGCCACCATCAACTTGCCTGACACC-S-
 TCTGTACTTTTCCTGACCTTGGCACAGTGCCACCATCAACTTGCCTGACACC (SEQ ID NO:
 77; 3x CRE del PBREM de ratón);
 CTGTACTTTTCCTGACCTTGAAGAGGTGGCACCATCAACTTGCCTGACACC-S-
 TCTGTACTTTTCCTGACCTTGAAGAGGTGGCACCATCAACTTGCCTGACACC (SEQ ID NO:
 78; 2x CRE de MHM híbridos);
 ACTGTACTTTTCCTGACCCTGAAGAGGTGGCAGCATGGACTTTCCTGAACCA-S-
 ACTGTACTTTTCCTGACCCTGAAGAGGTGGCAGCATGGACTTTCCTGAACCA (SEQ ID NO:
 79; 2x CRE del PBREM humano);

ACTGTACTTTTCCTGACCCTGAAGAGGTGGCAGCATGGACTTTTCCTGAACCA-S-
 ACTGTACTTTTCCTGACCCTGAAGAGGTGGCAGCATGGACTTTTCCTGAACCA-S-
 ACTGTACTTTTCCTGACCCTGAAGAGGTGGCAGCATGGACTTTTCCTGAACCA (SEQ ID NO:
 80; 3x CRE del PBREM humano),

5 o una variante funcional de cualquiera de los mismos. La variante funcional comprende adecuadamente una secuencia que es 80%, 90%, 95% o 99% idéntica a cualquiera de dichas secuencias, y en donde S es un espaciador opcional. Cuando está presente, el espaciador puede tener cualquier longitud adecuada, e.g., de 2 a 100 nucleótidos, de 3 a 50 nucleótidos, de 5 a 30 nucleótidos y de 10 a 25 nucleótidos. En algunas realizaciones se indica que el espaciador tiene una longitud múltiplo de 5. Se ha descubierto que un espaciador de aproximadamente 20 nucleótidos de longitud es adecuado (e.g., de 18 a 22 nucleótidos de longitud).

En algunos ejemplos, el CRM comprende una de las siguientes secuencias:

TCTGTACTTTTCCTGACCTTGGCACAGTGCCACCATCAACTTGCCTGACACCCATTACTCGC
 ATCCATTCTCTCTGTACTTTTCCTGACCTTGGCACAGTGCCACCATCAACTTGCCTGACACC
 (SEQ ID NO: 81; 2x CRE del PBREM de ratón);

TCTGTACTTTTCCTGACCTTGGCACAGTGCCACCATCAACTTGCCTGACACCCATTACTCGC
 ATCCATTCTCTCTGTACTTTTCCTGACCTTGGCACAGTGCCACCATCAACTTGCCTGACACC
 GCACTGAAGGTCCTCAATCGTCTGTACTTTTCCTGACCTTGGCACAGTGCCACCATCAACTT
 GCCTGACACCCCTGACCTCCTGCCAGCAATATCTGTACTTTTCCTGACCTTGGCACAGTGCCA
 CCATCAACTTGCCTGACACC (SEQ ID NO: 82; 3x PBREM de ratón);

CTGTACTTTTCCTGACCTTGAAGAGGTGGCACCATCAACTTGCCTGACACCCATTACTCGCA
 TCCATTCTCTCTGTACTTTTCCTGACCTTGAAGAGGTGGCACCATCAACTTGCCTGACACC
 (SEQ ID NO: 83; 2x MHM híbridos);

ACTGTACTTTTCCTGACCCTGAAGAGGTGGCAGCATGGACTTTTCCTGAACCACATTACTCGC
 ATCCATTCTCACTGTACTTTTCCTGACCCTGAAGAGGTGGCAGCATGGACTTTTCCTGAACCA
 (SEQ ID NO: 84; 2x PBREM humano); o

ACTGTACTTTTCCTGACCCTGAAGAGGTGGCAGCATGGACTTTTCCTGAACCACATTACTCGC
 ATCCATTCTCACTGTACTTTTCCTGACCCTGAAGAGGTGGCAGCATGGACTTTTCCTGAACCA
 GCACTGAAGGTCCTCAATCGACTGTACTTTTCCTGACCCTGAAGAGGTGGCAGCATGGACTT
 10 TCCTGAACCA (SEQ ID NO: 85; 3x PBREM humano),

o una variante funcional de cualquiera de los mismos. La variante funcional comprende adecuadamente una secuencia que es 80%, 90%, 95% o 99% idéntica a cualquiera de dichas secuencias.

15 El elemento regulador en cis, módulo regulador en cis o promotor presentado en este documento, o variantes de los mismos, pueden mejorar o impulsar la expresión de un gen en un tejido no hepático o no derivado del hígado (e.g., bazo, músculo, corazón, pulmón y cerebro). La expresión génica en el tejido no hepático puede ser exclusiva o adicional a la expresión en una célula hepática. Cuando la expresión del gen se impulsa tanto en el tejido no hepático como en el hepático, el nivel de expresión en el tejido no hepático puede ser igual o mayor que el nivel de expresión en el tejido hepático. Por ejemplo, un promotor presentado en este documento, o una variante del mismo, puede impulsar la expresión igual de un gen en el hígado y el corazón.

20 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un virión recombinante (partícula viral) que comprende un vector de terapia génica de acuerdo con la presente invención, como se define en las reivindicaciones. El virión puede ser, por ejemplo, una partícula de AAV, una partícula retroviral, una partícula lentiviral o alguna otra forma de partícula viral de terapia génica.

25 Los vectores o viriones de terapia génica de la presente invención pueden formularse en una composición farmacéutica con un excipiente farmacéuticamente aceptable, es decir, una o más sustancias portadoras y/o aditivos farmacéuticamente aceptables, e.g., tampones, portadores, excipientes, estabilizantes, etc. La composición farmacéutica puede proporcionarse en forma de kit.

Por consiguiente, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un vector o virión de terapia génica como se estableció anteriormente. Los vectores o viriones de terapia génica de la presente invención pueden formularse en una composición farmacéutica con un excipiente farmacéuticamente aceptable, es decir, una o más sustancias portadoras y/o aditivos farmacéuticamente aceptables, e.g., tampones, portadores, excipientes, estabilizantes, etc. La composición farmacéutica puede proporcionarse en forma de kit.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una célula que comprende un vector de terapia génica, un casete de expresión, un promotor, CRE o CRM de acuerdo con los diversos aspectos de la invención, como se define en las reivindicaciones.

Apropiadamente la célula es una célula eucariota. La célula eucariota puede ser adecuadamente una célula fúngica (e.g., una célula de levadura), una célula animal (metazoo) (e.g., células de mamíferos) o una célula vegetal. Alternativamente, la célula puede ser una célula procariota.

En algunas realizaciones de la invención, la célula es *ex vivo*, e.g., en cultivo celular. La célula puede ser parte de un tejido o de un organismo multicelular.

En una realización preferida, la célula es una célula hepática (hepatocito), que puede ser *ex vivo* o *in vivo*. La célula del hígado puede ser una célula hepática primaria o una célula de una línea celular derivada del hígado, e.g., una línea celular inmortalizada. La célula puede estar presente dentro de un entorno de tejido hepático (e.g., dentro de un hígado) o puede estar aislada del tejido hepático, e.g., y puede estar en un cultivo celular. Apropiadamente la célula es una célula humana. Generalmente, las células del hígado expresan tanto CAR como RXR. Sin embargo, algunas líneas celulares derivadas del hígado no expresan CAR (e.g., la línea celular Huh7) y en tales casos es necesario proporcionar CAR exógeno. Esto se puede lograr proporcionando a la célula un constructo de expresión adecuado que comprende un ácido nucleico que codifica CAR unido operativamente a un promotor, e.g., un promotor constitutivamente activo. Se conocen enfoques adecuados en la técnica y se describen en los ejemplos.

En algunas realizaciones, la célula ha sido modificada para expresar CAR y/o RXR. De manera adecuada, en dichas realizaciones la célula es una célula que normalmente no expresa CAR, RXR o ambos CAR y RXR. Lo más conveniente es que la célula no sea una célula del hígado. Por consiguiente, en algunas realizaciones de la invención, los promotores, casetes de expresión y vectores de la presente invención se utilizan en células no hepáticas, que normalmente (es decir, en su estado natural) no expresan CAR y/o RXR; y, por lo tanto, los promotores de la presente invención normalmente no estarían activos en dichas células. Sin embargo, dichas células han sido modificadas de tal manera que sean capaces de expresar CAR y RXR y así se pueda inducir el promotor. A modo de ejemplo no limitativo, la célula puede ser cualquier tipo de célula primaria animal o línea celular animal.

El vector de terapia génica, el casete de expresión, el promotor, CRE o CRM de acuerdo con diversos aspectos de la invención, tal como se define en las reivindicaciones, puede insertarse en el genoma de la célula o puede estar presente en un vector episomal.

Las células adecuadas para la presente invención incluyen, pero no se limitan a, células eucariotas, tales como células de levadura, plantas, insectos o mamíferos. Por ejemplo, las células pueden ser cualquier tipo de células diferenciadas o pueden ser células madre hematopoyéticas u otras formas. En algunas realizaciones, las células son células animales (metazoo) (e.g., células de mamíferos). En algunas realizaciones preferidas, las células son células hepáticas (e.g., una célula Huh7, una célula HepaRG, una célula HEPG2, etc.; hay una amplia gama de células hepáticas disponibles en ATCC, DSMZ y otras fuentes). En algunas realizaciones, la célula es una célula de mamífero. En algunas realizaciones, la célula de mamífero es una célula humana, de simio, de murino, de rata, de conejo, de hámster, de cabra, de bovino, de oveja o de cerdo. Algunas células preferidas o "células hospedadoras" para la producción de productos de interés son líneas celulares humanas, de ratones, de ratas, de monos o de roedores. En algunas realizaciones se prefieren las células de hámster, e.g., células BHK21, BHK TK-, CHO, CHO-K1, CHO-DUKX, CHO-DUKX B1, CHO-S y CHO-DG44, o derivados/progenies de cualquiera de dichas líneas celulares. En realizaciones alternativas, la célula podría ser una célula humana. En algunas realizaciones preferidas, la célula humana podría ser una célula de riñón embrionario humano (HEK), preferiblemente una célula HEK 293. En otra realización preferida de la invención, la célula puede ser una célula retiniana, e.g., una célula del epitelio pigmentado de la retina (RPE), por ejemplo, ARPE-19 (ATCC CRL-2302). Además, las células de mieloma murino, preferiblemente las células NS0 y Sp2/0 o los derivados/progenies de cualquiera de dichas líneas celulares, también son bien conocidas como líneas celulares de producción de proteínas biofarmacéuticas. En la Tabla 1 se resumen ejemplos no limitativos de líneas celulares que se pueden utilizar en la presente invención y fuentes de las que se pueden obtener. Las células hospedadoras adecuadas se encuentran disponibles comercialmente, por ejemplo, en colecciones de cultivos como la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemania) o la American Type Culture Collection (ATCC).

Para aplicaciones de bioprocesamiento, puede ser preferible que las células se establezcan, adapten y cultiven completamente en condiciones libres de suero y, opcionalmente, en medios que estén libres de cualquier proteína/péptido de origen animal. Los medios disponibles comercialmente, como F12 de Ham (Sigma, Deisenhofen, Alemania), RPMI-1640 (Sigma), medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM; Sigma), medio esencial mínimo (MEM; Sigma), medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM; Sigma), CD-CHO (Invitrogen, Carlsbad, CA), CHO-S-SFMII (Invitrogen), medio CHO sin suero (Sigma), medio CHO sin proteínas (Sigma), medio EX-CELL (SAFC), CDM4CHO y SFM4CHO (HyClone) son soluciones nutritivas apropiadas a modo de ejemplo. Cualquiera de los medios puede complementarse, según sea necesario, con una variedad de compuestos, ejemplos de los cuales son hormonas y/u otros factores de crecimiento (como insulina, transferrina, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento similar a la insulina), sales (como cloruro de sodio, calcio, magnesio, fosfato), tampones (como HEPES), nucleósidos (como adenosina, timidina), glutamina, glucosa u otras fuentes de energía equivalentes, antibióticos, oligoelementos. También se pueden incluir otros suplementos necesarios en concentraciones apropiadas que serán conocidas por los expertos en la materia. En la presente invención se prefiere el uso de medio sin suero, pero también se pueden utilizar medios suplementados con una cantidad adecuada de suero para el cultivo de células huésped. Para el crecimiento y selección de células genéticamente modificadas que expresan un gen seleccionable, se añade un agente de selección adecuado al medio de cultivo.

La célula puede ser una célula procariota, e.g., una célula bacteriana. En algunas realizaciones de la invención, la célula puede ser una célula procariota; aunque las células procariotas no poseen los sistemas CAR/RXR asociados con la presente invención, las células procariotas pueden, no obstante, ser útiles en la producción de un vector u otras etapas en el manejo, transporte o almacenamiento de un vector.

En algunas realizaciones, la célula es una célula de empaquetamiento o productora para la producción de un vector viral. Por ejemplo, la célula puede ser una célula empaquetadora o productora para la producción de un vector AAV. En la técnica se conocen varias líneas celulares productoras o empaquetadoras. En una línea celular productora o de empaquetamiento, puede preferirse que el promotor de la presente invención esté unido operativamente a una proteína viral, e.g., Rep o Cap u otros genes virales estructurales o no estructurales.

En un aspecto adicional de la presente invención, un promotor de la presente invención puede estar asociado operativamente con un gen que codifica una proteína viral o ARN. La proteína viral puede ser una proteína estructural o no estructural. A modo de ejemplo no limitativo, la proteína viral puede ser una proteína de AAV, por ejemplo, la proteína Rep o Cap, o puede ser una proteína auxiliar viral como E1A, E1B, E2A o E4. En otras realizaciones, la proteína viral puede ser REV, VSV-G o RD114.

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona un vector de terapia génica, un casete de expresión, un promotor, un virión o una composición farmacéutica de acuerdo con varios aspectos de la presente invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad, preferiblemente una enfermedad asociada con la expresión génica aberrante, opcionalmente en el hígado (e.g., una enfermedad hepática genética).

La expresión en el hígado es de particular interés ya que está involucrada en una amplia gama de funciones esenciales en el cuerpo, incluida la síntesis de muchas proteínas involucradas en el metabolismo, la homeostasia y la protección contra infecciones. Dado que muchas enfermedades están relacionadas con la alteración de la expresión génica en el hígado, existe un interés significativo en desarrollar estrategias de terapia génica que permitan la expresión de un transgén en el hígado para producir un producto de expresión terapéutico. Las enfermedades asociadas con la expresión génica aberrante incluyen, entre otras, hemofilia (incluida la hemofilia A o B), hipercolesterolemia familiar, deficiencia de ornitina transcarbamilasa, fenilcetonuria, deficiencia de ornitina transcarbamilasa, enfermedad de almacenamiento de glucógeno, deficiencia de α 1-antitripsina, hemocromatosis hereditaria, tirosinemia tipo 1, aciduria argininosuccínica, infección por el virus de la hepatitis, hepatitis no viral, cáncer de hígado, colestasis genética, enfermedad de Wilson y varias otras enfermedades hepáticas (como la enfermedad del hígado graso no alcohólico [NAFLD] y la enfermedad hepática relacionada con el alcohol [ARLD]). El uso para el tratamiento de la hemofilia A o B representa realizaciones preferidas de los diversos aspectos de la invención.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para producir un producto de expresión, adecuadamente un producto de expresión terapéutico, en células, adecuadamente células hepáticas, comprendiendo el método:

- proporcionar células que comprenden un casete de expresión que comprende un promotor inducible sintético específico del hígado unido operativamente a un gen, comprendiendo el promotor inducible sintético específico del hígado un elemento regulador en cis (CRE) que puede unirse y activarse mediante un heterodímero de CAR y RXR, como se define en las reivindicaciones adjuntas; y
- administrar a dichas células un inductor que es capaz de inducir la expresión del producto de expresión del gen unido operativamente al promotor inducible en dicho casete de expresión.

El método comprende adecuadamente mantener dichas células en condiciones adecuadas para la expresión del producto de expresión del gen. En cultivo, esto puede comprender incubar la célula, o el tejido que comprende la célula, en condiciones de cultivo adecuadas. La célula puede, por supuesto, estar *in vivo*, e.g., en una o más células del hígado de un sujeto. Así pues, este aspecto de la invención proporciona, entre otros, métodos para producir un producto de interés en un cultivo celular (e.g., en una aplicación de bioprocesamiento) o la expresión de un producto terapéutico (e.g., *ex vivo*). Se analizan más arriba varias células adecuadas para su uso en este aspecto.

De manera adecuada, el método comprende la etapa de introducir el casete de expresión en el hígado. En la técnica se conocen una amplia gama de métodos de transfección de células hepáticas. Un método preferido para transfectar células hepáticas es transducir las células con un vector viral que comprende el casete de expresión sintético específico del hígado, e.g., un vector AAV. A continuación, se describen detalles de varios vectores para su uso en la presente invención.

El método puede incluir la recolección o aislamiento del producto de expresión. El experto en la materia conoce bien métodos adecuados para recolectar o aislar diversos productos de expresión (e.g., proteínas o ácidos nucleicos).

En algunas realizaciones, la célula es una célula del hígado. Generalmente, las células del hígado expresan tanto CAR como RXR. Sin embargo, algunas líneas celulares derivadas del hígado no expresan CAR (e.g., la línea celular Huh7) y en tales casos es necesario proporcionar CAR exógeno. Esto se puede lograr proporcionando un constructo de expresión adecuado para expresar CAR en la célula, por ejemplo, que comprende un ácido nucleico que codifica CAR unido operativamente a un promotor adecuado. En la técnica se conocen bien vectores de expresión adecuados y otros enfoques para expresar CAR en cualquier célula dada.

La expresión natural de CAR generalmente se limita a las células del hígado. En consecuencia, cuando la célula no expresa CAR (lo que es típico de las células no hepáticas), normalmente será necesario proporcionar CAR exógeno a la célula. Como se mencionó anteriormente, esto se puede lograr proporcionando un constructo de expresión adecuado para expresar CAR en la célula, e.g., que comprende un ácido nucleico que codifica CAR unido operativamente a un promotor adecuado. En la técnica se conocen bien vectores de expresión adecuados y otros enfoques para expresar CAR en cualquier célula dada.

El inductor para uso en la invención puede ser cualquier agente que sea adecuado para inducir la activación de CAR y la formación de un heterodímero CAR-RXR. Un inductor de este tipo puede inducir la expresión de un elemento del PBREM en una célula en la que está presente el casete de expresión. Existe una amplia gama de inductores de expresión de elementos del PBREM de ratón y humanos conocidos en la técnica anterior (véase, por ejemplo, HONKAKOSKI, et al., *Molecular Pharmacology*, 53: 597-601 (1998), y Cherian et al. "Small-molecule modulators of the constitutive androstane receptor", *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2015 July; 11(7): 1099-1114; Banerjee et al., "Targeting xenobiotic receptors PXR and CAR in human diseases", *Drug Discov. Today.* 2015 May; 20(5): 618-628; Omiecinski et al., "Multi-species Analyses of Direct Activators of the Constitutive Androstane Receptor", *Toxicological Sciences*, 123(2), 550-562 (2011)). Normalmente, estos inductores son ligandos activadores del CAR. El CAR se caracteriza por su amplia especificidad para diversos ligandos endógenos y exógenos con estructuras químicas variables, lo que le permite ser un sensor xenobiótico. La Tabla 1 de Cherian et al., enumera varios activadores de activadores de CAR en varias especies, que podrían usarse como inductores en cualquier aspecto de la presente invención.

Por ejemplo, y sin limitación, el inductor comprende adecuadamente uno o más agentes seleccionados de la siguiente lista:

fenobarbital (PB); un compuesto flavonoide, e.g., flavona, crisina, baicaleína o galangina; 1,4-Bis[2-(3,5-dicloropiridiloxi)]benceno (TCPOBOP); 6-(4Clorofenil)imidazo[2,1-b][1,3]tiazol-5-carbaldehído-O-(3,4-diclorobencil)oxima (CITCO); Acetaminofén; Buprenorfina; Fenitoína; Carbamazepina; Ácido valproico; Artemisinina y derivados; Clorpromazina; Efavirenz; Nevirapina; Rilpivirina; Etravirina; Diazepam; Ciclofosfamida; Ifosfamida; Cerivastatina; Simvastatina; Iovastatina; sulfonamidas sustituidas; Tiazolidin-4-ona; Estradiol; Estrona y análogos; 17 α -etinil-3; 17 β -estradiol (EE2); deshidroepiandrosterona (DHEA); 5 β -pregnano-3,20-diona; Dietilestilbestrol; Extracto de ginkgo biloba; Galangina; crisina; baicaleína; Sulfuro de dialilo; Ácido elálgico; Resveratrol; Escualestatina-1; Bilobalida; Triclocarbano; Triclosán; Diclorodifeniltricloroetano (DDT); Dieldrina; Metoxicloro; Metoflutrina; Permetrina; Piretrinas; Sulfoxaflor; Ftalato de dietilhexilo (DEHP); Ciproconazol; Fluconazol; Propiconazol; FL81; Fosfato de tri-p-metilfenilo (TMPP); UM104; y UM145.

En algunas realizaciones preferidas, el inductor es un fármaco (agente farmacéutico), e.g., un fármaco que tiene aprobación regulatoria en al menos un país (preferiblemente los Estados Unidos o un miembro de la Unión Europea) para su uso en humanos o animales (preferiblemente humanos) para tratar al menos una condición médica. Como alternativa, puede preferirse que el inductor tenga estatus GRAS en al menos un país (preferiblemente Estados Unidos o un miembro de la Unión Europea). En algunas realizaciones preferidas, el inductor comprende uno o más agentes seleccionados de la siguiente lista:

fenobarbital (PB); compuestos flavonoides, tales como flavona, crisina, baicaleína o galangina; Acetaminofén; Buprenorfina; Fenobarbital; Fenitoína; Carbamazepina; Acido valproico; Artemisinina y derivados; Clorpromazina; Efavirenz; Nevirapina; Rilpivirina; Etravirina; Diazepam; Ciclofosfamida; Ifosfamida; Cerivastatina; Simvastatina; lovastatina; sulfonamidas sustituidas; y Tiazolidin-4-ona.

- 5 Todos estos compuestos son fármacos conocidos o se consideran GRAS para su uso en humanos y, por lo tanto, en general se pueden utilizar para inducir la expresión en humanos con un grado adecuado de seguridad.

En algunas realizaciones de la invención el inductor es fenobarbital. En algunas otras realizaciones, el inductor es CITCO o TCPOBOP. En algunas otras realizaciones, el inductor es un flavonoide, e.g., flavona.

- 10 El inductor se puede administrar a las células de cualquier manera adecuada. Por ejemplo, en el cultivo celular, el inductor se puede añadir al medio de cultivo. Cuando las células están *in vivo*, e.g., las células están en el hígado de un animal, el inductor se puede administrar a las células a través de administración sistémica al animal o mediante administración local al tejido diana (e.g., hígado). Una persona experta en la materia puede determinar fácilmente una tasa de dosificación adecuada para cualquier inductor dado. De este modo, el experto en la materia puede determinar fácilmente, para cualquier inductor, una forma adecuada de administrar el inductor a las células y una concentración adecuada para utilizar. En el caso de CITCO, se ha demostrado en los ejemplos siguientes que la administración de una concentración de entre 0.5 μM y 3 μM , por ejemplo, aproximadamente 1 μM , a las células es adecuada para inducir la expresión. En el caso de administración de TCPOBOP, de una concentración de entre 50 nM y 150 nM a las células, se ha demostrado en los ejemplos a continuación que es adecuada para inducir la expresión. En el caso de la flavona, se ha demostrado en los ejemplos siguientes que la administración de una concentración de 30 μM a las células es adecuada para inducir la expresión. Sin embargo, se podrían utilizar otras concentraciones apropiadas y el experto en la materia puede determinar la dosis necesaria que debe administrarse a un paciente. Por consiguiente, en algunas realizaciones la presente invención contempla exponer las células que comprenden el casete de expresión de 0.1 μM a 15 μM de CITCO para inducir la expresión, e.g., de 0.25 μM a 6 μM , de 0.5 μM a 3 μM . En algunas realizaciones, la presente invención contempla exponer las células que comprenden el casete de expresión a 10 nM o 750 nM de TCPOBOP para inducir la expresión, e.g., de 25 nM a 300 nM, o de 50 nM a 150 nM. En algunas realizaciones, la presente invención contempla exponer las células que comprenden el casete de expresión de 6 μM a 150 μM de flavona para inducir la expresión, e.g., de 15 a 150 μM , o de 25 a 35 μM .

- 20 El método puede comprender adecuadamente dejar de administrar el inductor. La interrupción de la administración del inductor provocará al menos una reducción de la expresión del producto de expresión. Normalmente, la expresión del producto de expresión volverá a un nivel basal con el tiempo.

El método puede comprender adecuadamente variar la concentración del inductor administrado a las células a lo largo del tiempo. Esto se puede utilizar para modular el nivel de expresión del producto de expresión.

- 35 En algunas realizaciones de la invención, la concentración del inductor administrado a las células a lo largo del tiempo se varía para modular la dosis de un producto génico terapéutico proporcionado en un sujeto o para variar la producción de un producto de expresión en un cultivo celular. En el caso de la terapia en un sujeto (que se analiza con más detalle a continuación), la concentración del inductor se puede variar en respuesta a una alteración en la condición de un sujeto, el nivel de un biomarcador en un sujeto o cualquier otra razón.

- 40 En algunas realizaciones, el método implica administrar un inhibidor a las células. El inhibidor puede ser cualquier agente que sea adecuado para inhibir o disminuir la activación de CAR y la formación de un heterodímero CAR-RXR. Se puede utilizar la adición de un inhibidor para disminuir o eliminar la expresión del producto de expresión (es decir, disminuir o desactivar la expresión). A modo de ejemplo no limitativo, la metformina es un antagonista conocido de CAR, que puede utilizarse como inhibidor. Además, se sabe que el androstenol y varios isómeros del androstanol, los androstanos, son antagonistas endógenos del CAR y pueden administrarse como inhibidores. Se discuten varios inhibidores de CAR en Cherian et al., "Small-molecule modulators of the constitutive androstane receptor", *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2015 July; 11(7): 1099-1114 - ver la Figura 1 que divulga varios inhibidores de CAR humanos, de ratón y de rata. El experto en la materia podría, por supuesto, identificar otros inhibidores de CAR (o RXR) que sean adecuados para inhibir o disminuir la formación de un heterodímero CAR-RXR que se pueda utilizar en la presente invención. La persona experta en la materia puede determinar fácilmente una tasa de dosificación adecuada para cualquier inhibidor dado.

- 55 La presente divulgación también proporciona un método para expresar un transgén terapéutico en una célula hepática, comprendiendo el método introducir en la célula hepática un vector de terapia génica de acuerdo con la presente invención y posteriormente administrar a la célula un inductor. Los inductores adecuados se analizan más arriba. La célula hepática puede ser *in vivo* o *ex vivo*. Como se mencionó anteriormente, la concentración del inductor administrado a la célula puede variar con el tiempo. Se analizan más arriba genes terapéuticos ejemplares para su uso en este aspecto.

5 Será evidente para el experto en la materia que un vector de terapia génica, un casete de expresión, un virión o una composición farmacéutica de acuerdo con diversos aspectos de la invención se pueden utilizar para terapia génica. Por consiguiente, el uso de dichos vectores de terapia génica, casetes de expresión, viriones o composiciones farmacéuticas en terapia génica forma parte de la presente invención. Un aspecto de la invención proporciona así un vector de terapia génica, un casete de expresión, un virión o una composición farmacéutica como se establece en este documento para su uso en terapia génica, preferiblemente terapia génica a través de la expresión específica en el hígado de un gen terapéutico, adecuadamente para el tratamiento de una enfermedad que involucra una expresión génica aberrante en el hígado.

10 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un vector de terapia génica, un casete de expresión o un virión como se define en las reivindicaciones para su uso en un método de terapia génica de un sujeto, preferiblemente un ser humano, que lo necesita, comprendiendo el método:

- introducir en el hígado del sujeto un vector de terapia génica, un casete de expresión o un virión de la presente invención, que comprende un gen que codifica un producto terapéutico; y
- 15 - administrar un inductor al sujeto de tal manera que una cantidad terapéuticamente efectiva del producto terapéutico se exprese en el sujeto.

20 También se analizan más arriba los genes terapéuticos adecuados. Las condiciones que pueden tratarse también se discuten arriba, incluyendo pero no limitado a hemofilia (incluyendo hemofilia A o B), hipercolesterolemia familiar, deficiencia de ornitina transcarbamilasa, fenilcetonuria, deficiencia de ornitina transcarbamilasa, enfermedad de almacenamiento de glucógeno, deficiencia de α 1-antitripsina, hemocromatosis hereditaria, tirosinemia tipo 1, aciduria argininosuccínica, infección por el virus de la hepatitis, hepatitis no viral, cáncer de hígado, colestasis genética, enfermedad de Wilson y varias otras enfermedades hepáticas (como enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), enfermedad hepática relacionada con el alcohol (ARLD) y trastornos de almacenamiento lisosomal.

25 El método comprende adecuadamente expresar una cantidad terapéuticamente eficaz del producto terapéutico del gen en el hígado de dicho sujeto. El producto terapéutico puede tener un efecto terapéutico en el hígado o en otra localización del sujeto. Por ejemplo, el producto terapéutico puede liberarse en el torrente sanguíneo.

30 Se describieron anteriormente los inductores adecuados, así como los métodos de administración del inductor. Como se discutió anteriormente, la administración del inductor puede interrumpirse después de un período de tiempo, e.g., después de que se haya logrado un beneficio terapéutico adecuado. Alternativamente, la cantidad del inductor administrado al sujeto puede variarse con el tiempo. La cantidad del inductor administrado al sujeto puede ajustarse para obtener la expresión de una cantidad deseada (dosis) del producto terapéutico. Así, cuando existe una necesidad clínica de una mayor cantidad del producto terapéutico (e.g., debido a una respuesta insuficiente en el sujeto), se puede aumentar la cantidad del inductor administrado al sujeto, y viceversa (e.g., debido a una respuesta excesiva o efectos secundarios indeseables).

35 En algunas realizaciones, el método puede comprender las etapas de:

- determinar la cantidad del producto terapéutico expresada en el sujeto o evaluar la respuesta de un sujeto al producto terapéutico, y:
 - a) cuando se desea una mayor cantidad del producto terapéutico en el sujeto, aumentar la cantidad de inductor administrado al sujeto, o
 - 40 b) cuando se desea una cantidad menor del producto terapéutico en el sujeto, disminuir la cantidad de inductor administrado al sujeto.

Se pueden utilizar técnicas de laboratorio estándar para determinar la cantidad de producto terapéutico en el sujeto.

45 Al considerar que la cantidad de inductor administrado al sujeto puede variar con el tiempo, por supuesto se entenderá que el inductor normalmente no se administrará al paciente de forma continua, sino que normalmente se administrará a un nivel de dosis determinado en un intervalo de tiempo determinado. La presente invención contempla así variar la cantidad de inductor administrado al sujeto a lo largo del tiempo ajustando la dosis, ajustando el período de tiempo entre dosis o ambos. Así, por ejemplo, para aumentar la cantidad de inductor administrado a un sujeto se puede aumentar la dosis manteniendo constante el tiempo entre dosis, se puede mantener constante la dosis mientras se reduce el tiempo entre dosis, o se puede aumentar la dosis y reducir el tiempo entre dosis. Para disminuir la cantidad de inductor administrado a un sujeto, se puede disminuir la dosis manteniendo constante el período de tiempo entre dosis, se puede mantener constante la dosis mientras se reduce el período de tiempo entre dosis o se puede disminuir la dosis y aumentar el período de tiempo entre dosis.

Alternativamente, o adicionalmente, el método puede comprender cambiar el inductor para alterar la cantidad del producto terapéutico en el sujeto. Por ejemplo, un inductor débil puede ser reemplazado por un inductor más fuerte, o viceversa.

5 El método también puede comprender cambiar el inductor si, por ejemplo, el sujeto tiene una reacción adversa a un inductor, o se descubre que el inductor es ineficaz en el sujeto.

El método también puede comprender la administración de un inhibidor al sujeto. Se describieron anteriormente los inhibidores adecuados para su uso en la invención. El inhibidor se puede añadir para reducir o detener la producción del producto terapéutico en el sujeto. La cantidad de inhibidor administrada al sujeto puede ajustarse para obtener la expresión de una cantidad deseada (dosis) del producto terapéutico.

10 Se analizan más arriba los genes que codifican productos genéticos terapéuticos adecuados. Sin embargo, cabe mencionar específicamente las proteínas terapéuticas, como el factor VIII y IX, para el tratamiento de la hemofilia.

El método comprende adecuadamente administrar un vector o virión de acuerdo con la presente invención al sujeto. Lo más adecuado es que el vector sea un vector de terapia génica viral, preferiblemente un vector AAV.

15 En algunas realizaciones, el método comprende administrar el vector de terapia génica viral sistémicamente. La administración sistémica puede ser enteral (e.g., oral, sublingual y rectal) o parenteral (e.g., inyección). Las vías de inyección preferidas incluyen inyecciones intravenosas, intramusculares, subcutáneas, intraarteriales, intraarticulares, intratecales e intradérmicas.

20 En algunas realizaciones, el vector de terapia génica viral puede administrarse de manera concurrente o secuencial con uno o más agentes terapéuticos adicionales o con uno o más agentes saturantes diseñados para evitar la eliminación de los vectores por el sistema endotelial reticular.

Cuando el vector es un vector AAV, la dosis del vector puede ser de 1×10^{10} gc/kg a 1×10^{15} gc/kg o más, adecuadamente de 1×10^{12} gc/kg a 1×10^{14} gc/kg, convenientemente de 5×10^{12} gc/kg a 5×10^{13} gc/kg.

25 En general, el sujeto que lo necesite será un mamífero, y preferiblemente un primate, más preferiblemente un ser humano. Por lo general, el sujeto que lo necesita presentará síntomas característicos de una enfermedad. El método generalmente comprende mejorar los síntomas que presenta el sujeto que lo necesita, mediante la expresión de la cantidad terapéutica del producto terapéutico.

30 Los protocolos de terapia génica para la expresión de genes terapéuticos en células diana *in vitro* e *in vivo*, son bien conocidos en la técnica y no se discutirán en detalle en este documento. Brevemente, incluyen inyección intramuscular, inyección intersticial, instilación en las vías respiratorias, aplicación al endotelio, parénquima intrahepático y administración intravenosa o intraarterial (e.g., arteria intrahepática, vena intrahepática) de vectores de ADN plasmídico (desnudos o en liposomas) o vectores virales. Se han desarrollado varios dispositivos para mejorar la disponibilidad de ADN para la célula objetivo. Si bien un enfoque simple es contactar físicamente la célula objetivo con catéteres o materiales implantables que contengan el vector relevante, enfoques más complejos pueden utilizar dispositivos de inyección a chorro o similares. La transferencia de genes a células hepáticas de mamíferos se ha realizado utilizando procedimientos *ex vivo* e *in vivo*. El enfoque *ex vivo* generalmente requiere la recolección de células hepáticas, transducción *in vitro* con vectores de expresión adecuados, seguida de reintroducción de los hepatocitos transducidos en el hígado. La transferencia de genes *in vivo* se ha logrado inyectando ADN o vectores virales en el parénquima hepático, la arteria hepática o la vena porta.

40 Se divulga en este documento el uso de un promotor inducible sintético, un casete de expresión sintético, un vector o un virión de acuerdo con varios aspectos de la presente invención para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento de cualquier condición o enfermedad mencionada en este documento.

45 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para producir un producto de expresión, comprendiendo el método las etapas de:

50 (a) proporcionar una población de células eucariotas, preferiblemente células animales, más preferiblemente células de mamíferos y más preferiblemente células hepáticas, que comprende un casete de expresión que comprende un promotor inducible sintético específico del hígado unido operativamente a un gen, comprendiendo el promotor inducible sintético específico del hígado un elemento regulador en cis (CRE) que puede unirse y activarse mediante un heterodímero de CAR y RXR como se define en las reivindicaciones;

(b) cultivar dicha población de células; y

(c) administrar a dichas células un inductor que es capaz de inducir la expresión del producto de expresión del gen unido operativamente al promotor inducible en dicho casete de expresión; y

(d) recuperar el producto de expresión.

El método es preferiblemente un método de bioprocesamiento, es decir, un proceso que utiliza células vivas para obtener productos de expresión deseados. Se analizan más arriba los transgenes preferidos y los productos de interés que codifican. El producto de expresión puede ser útil para procesos terapéuticos, cosméticos, de investigación u otros procesos industriales. Los inductores y las células que son adecuados para este aspecto se analizan más arriba.

La etapa (b) normalmente comprende mantener dicha población de células en condiciones adecuadas para la proliferación de las células. Las condiciones normalmente preparan las células para la expresión del producto de expresión del transgén tras la inducción en la etapa (c). El experto en la materia conocerá las condiciones adecuadas para los distintos tipos de células contemplados. Por lo tanto, el método comprende adecuadamente incubar dicha población de células en condiciones adecuadas para el crecimiento de las células antes de la etapa (c) de tratamiento de dicha población de células para inducir la expresión.

La etapa de recuperación del producto de expresión típicamente comprende separar el producto de expresión de dicha población de células y, en algunos casos, de otros componentes del medio de cultivo celular. El método comprende preferiblemente la etapa de purificación del producto de expresión. Los métodos adecuados para recuperar y/o purificar un producto de expresión son convencionales en la técnica y dependerán de la naturaleza específica del producto de expresión.

Será evidente que la presente invención permite retrasar la producción del producto de expresión hasta un punto deseado en un proceso de cultivo celular. Esto puede, por ejemplo, permitir que la población de células se expanda hasta que se alcance un número o concentración de células deseado, o se alcance una fase de crecimiento deseada. Esto puede ser deseable por muchas razones, e.g., para permitir que las células crezcan en condiciones óptimas antes de la expresión del transgén, que puede inhibir el crecimiento. En el caso de proteínas tóxicas, por ejemplo, se puede evitar la producción de un producto de expresión tóxico hasta que el sistema de cultivo celular se encuentre en la etapa deseada. Una vez que se expresa la proteína tóxica, las células, por supuesto, se verán afectadas negativamente o morirán. Sin embargo, incluso para productos de expresión no tóxicos puede haber ventajas considerables en términos de eficiencia al retrasar la expresión del transgén hasta un punto deseado.

Los métodos se pueden llevar a cabo en cualquier reactor adecuado, incluidos, entre otros, biorreactores de tanque agitado, de elevación aérea, de fibra, de microfibra, de fibra hueca, de matriz cerámica, de lecho fluidizado, de lecho fijo y/o de lecho con boquilla. Tal como se utiliza en este documento, "reactor" puede incluir un fermentador o una unidad de fermentación, o cualquier otro recipiente de reacción y el término "reactor" se utiliza indistintamente con "fermentador". Por ejemplo, en algunos aspectos, una unidad de biorreactor de ejemplo puede realizar una o más, o todas, de las siguientes acciones: alimentación de nutrientes y/o fuentes de carbono, inyección de gas adecuado (e.g., oxígeno), flujo de entrada y salida de medio de fermentación o cultivo celular, separación de fases gaseosas y líquidas, mantenimiento de la temperatura, mantenimiento de oxígeno y niveles de CO₂, mantenimiento del nivel de pH, agitación (e.g., remover) y/o limpieza/esterilización. Las unidades de reactores de ejemplo, como una unidad de fermentación, pueden contener múltiples reactores dentro de la unidad; por ejemplo, la unidad puede tener de 1 a 10 o más biorreactores en cada unidad. En diversas realizaciones, el biorreactor puede ser adecuado para procesos de fermentación por lotes, semilotes alimentados, lotes alimentados, perfusión y/o continuos. En algunas realizaciones, el biorreactor puede tener un volumen de desde aproximadamente 100 mL hasta aproximadamente 50,000 litros, preferiblemente 10 litros o más. Además, los reactores adecuados pueden ser multiuso, de un solo uso, desechables o no desechables y pueden estar hechos de cualquier material adecuado. Las publicaciones de patente de los Estados Unidos n.º 2013/0280797, 2012/0077429, 2011/0280797, 2009/0305626, y las patentes de los Estados Unidos n.º 8,298,054, 7,629,167, y 5,656,491 describen sistemas ejemplares que pueden usarse en la presente invención.

En algunas realizaciones preferidas de la invención, el método es para la producción de vectores virales de terapia génica, e.g., partículas virales de rAAV. En esta realización, la célula es adecuadamente una célula de empaquetamiento o una célula productora, y una de las funciones auxiliares está bajo el control del promotor inducible. A modo de ejemplo no limitativo, los genes de ARN Rep, Cap, E1A, E1B, E2A, E4 y VA pueden colocarse bajo el control del promotor inducible. Debido a su toxicidad, controlar la expresión de Rep es de particular interés. Así, en otro aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de un promotor como se define en las reivindicaciones para controlar la expresión de una proteína viral en un método de producción de un producto de terapia génica viral, preferiblemente una proteína auxiliar viral, y más preferiblemente el gen Rep.

La divulgación también proporciona un recipiente reactor que comprende un cultivo celular que comprende células de la presente invención y un medio suficiente para soportar el crecimiento de la célula. Se describieron anteriormente varios reactores adecuados para la presente invención.

También se proporciona el uso de un vector o célula de bioprocesamiento en un método de bioprocesamiento para la fabricación de un producto de interés, e.g., un producto terapéutico.

Breve descripción de las Figuras

- La Figura 1A muestra la medición de la expresión de luciferasa del constructo PB1-MinTK después de la transfección en células Huh7 y el tratamiento con DMSO, 50 nM, 150 nM y 250 nM de TCPOBOP.
- 5 - La Figura 1B muestra la medición de la expresión de luciferasa del constructo PB1-MinTK después de la transfección en células Huh7, donde las células Huh7 fueron transfectadas con CAR o no fueron transfectadas con CAR.
- La Figura 1C muestra los datos de la Figura 1A representados como una relación del fuerte promotor viral CMV-IE. La Figura 1C también muestra que en ausencia de CAR, no hay expresión de luciferasa. Un elemento del PBREM en combinación con el promotor MinTK impulsa la expresión hasta un máximo del 40% de la expresión del gen CMV-IE.
- 10 - La Figura 1D muestra la medición de la expresión de EPO del constructo PB1-MinTK después de la transfección en células Huh7 y el tratamiento con DMSO, 0.5 μ M, 1 μ M, 2 μ M y 3 μ M de CITCO. Esta figura también muestra que la adición de CITCO no cambia la expresión de EPO del promotor del CMV-MP.
- 15 - La Figura 2A muestra la medición de la expresión de luciferasa de los constructos PB1-MinTK, PB1-CMV-MP y PB1-SV40-MP después de la transfección en hepatocitos AXOL ARE y el tratamiento con DMSO (izquierda) o 1 μ M de CITCO (derecha).
- La Figura 2B muestra los datos de la Figura 2A representados como una relación del fuerte promotor viral CMV-IE.
- 20 - La Figura 3A muestra la expresión de luciferasa de los constructos PB1-SV40, PB1-1-SV40, PB1-2-SV40 y PB1-3-SV40 que contienen 1, 2, 3 y 4 elementos del PBREM respectivamente. Los múltiplos del PBREM en combinación con el promotor SV40 son inducibles y aumentan el nivel de expresión, pero solo hasta 3 copias del elemento del PBREM.
- La Figura 3B muestra la expresión de luciferasa de los constructos PB1-CMV, PB1-1-CMV, PB1-2-CMV y PB1-3-CMV que contienen 1, 2, 3 y 4 elementos del PBREM respectivamente. Los múltiplos del PBREM en combinación con el promotor del CMV son inducibles y aumentan el nivel de expresión, pero solo hasta 3 copias del elemento del PBREM.
- 25 - La Figura 3C muestra la expresión de luciferasa de los constructos PB1-MinTK, PB1-1-MinTK, PB1-2-MinTK y PB1-3-MinTK que contienen 1, 2, 3 y 4 elementos del PBREM respectivamente. Los múltiplos del PBREM en combinación con el promotor MinTK son inducibles y aumentan el nivel de expresión, pero solo hasta 3 copias del elemento del PBREM.
- 30 - La Figura 4A muestra la expresión de luciferasa del constructo PB1-MinTK en el vector pGL4.10 en hepatocitos AXOL ARE, el constructo PB1-MinTK en el vector pAAV en células Huh7 y el constructo PB1-MinTK en el vector pAAV en hepatocitos AXOL ARE. La inducción de la expresión de luciferasa a partir del constructo PB1-MinTK es comparable entre vectores y tipos de células.
- 35 - La Figura 4B muestra la expresión de luciferasa del constructo PB1-2-MinTK en el vector pGL4.10 en hepatocitos AXOL ARE, el constructo PB1-2-MinTK en el vector pAAV en células Huh7 y el constructo PB1-2-MinTK en el vector pAAV en hepatocitos AXOL ARE. La inducción de la expresión de luciferasa a partir del constructo PB1-2-MinTK es comparable entre vectores y tipos de células.
- 40 - La Figura 5 muestra la expresión de luciferasa de los constructos PB1-MinTK y PB1-2-MinTK en el vector pAAV en hepatocitos AXOL ARE sin CITCO, con inducción de CITCO (1 μ M) y después de la retirada de CITCO.
- La Figura 6 muestra el elemento del PBREM del ratón.
- La Figura 7 muestra un mapa del plásmido del vector pGL4.10.
- 45 - La Figura 8 muestra resultados *in vivo* de los constructos PB1 y PB1-2. A) Imágenes bioluminiscentes de ratones representativos de 0 a 48 horas después de la inducción, B) Bioluminiscencia graficada para mostrar las diferentes cinéticas de inducción, C) Veces que se produce inducción observada para cada constructo (n = 5).
- La Figura 9 muestra el efecto de CITCO y Flavona en la inducción de los híbridos del PBREM en una línea celular HUH7 que expresa CAR humano de forma estable.
- 50 - La Figura 10 muestra el efecto de CITCO y Flavona en la inducción de los híbridos del PBREM en hepatocitos primarios.

- La Figura 11 muestra el efecto de CITCO y Flavona en la inducción de multímeros de los híbridos del PBREM en una línea celular Huh7 que expresa CAR humano de forma estable.

- La Figura 12 muestra el efecto de CITCO y Flavona en la inducción de multímeros de los híbridos del PBREM en hepatocitos primarios.

5 Descripción detallada de realizaciones de la invención y ejemplos

Si bien a continuación se analizan en detalle la fabricación y el uso de diversas realizaciones de la presente invención, debe apreciarse que la presente invención proporciona muchos conceptos inventivos aplicables que pueden implementarse en una amplia variedad de contextos específicos. Las realizaciones específicas que se analizan en este documento son meramente ilustrativas de formas específicas de realizar y utilizar la invención. El alcance de la invención está definido por las reivindicaciones adjuntas.

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro del conocimiento de la técnica. Estas técnicas se explican detalladamente en la literatura. Véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA); *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition*, (Sambrook et al, 2001, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait ed., 1984); patente de los Estados Unidos n.º 4,683,195; *Nucleic Acid Hybridization* (Harries and Higgins eds. 1984); *Transcription and Translation* (Hames and Higgins eds. 1984); *Culture of Animal Cells* (Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press, 1986); *Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); las series, *Methods in Enzymology* (Abelson and Simon, eds. -in-chief, Academic Press, Inc., New York), específicamente, los Vols.154 y 155 (Wu et al. eds.) y Vol. 185, "Gene Expression Technology" (Goeddel, ed.); *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells* (Miller and Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology* (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (Weir and Blackwell, eds., 1986); y *Manipulating the Mouse Embryo*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986).

La discusión de los antecedentes de la invención se incluye en el presente documento para explicar el contexto de la invención. Esto no debe tomarse como una admisión de que cualquiera de los materiales a los que se hace referencia fuera publicado, conocido o parte del conocimiento general común en cualquier país a la fecha de prioridad de cualquiera de las reivindicaciones.

A lo largo de esta divulgación se hace referencia a diversas publicaciones, patentes y especificaciones de patentes publicadas mediante una cita identificativa.

Para facilitar la comprensión de esta invención, a continuación, se definen una serie de términos. Los términos definidos en este documento tienen los significados comúnmente entendidos por una persona con conocimientos ordinarios en las áreas relevantes a la presente invención. Términos como "un", "uno, una" y "el, la" no pretenden referirse únicamente a una entidad singular, sino que incluyen la clase general de la que se puede utilizar un ejemplo específico para ilustrarla. La terminología utilizada en el presente documento se utiliza para describir realizaciones específicas de la invención, pero su uso no delimita la invención, excepto como se describe en las reivindicaciones.

El término "elemento regulador en cis" o "CRE", es un término bien conocido por el experto en la materia y significa una secuencia de ácido nucleico tal como un potenciador, promotor, aislante o silenciador, que puede regular o modular la transcripción de un gen vecino (es decir, *in cis*). Los CRE se encuentran en la proximidad de los genes que regulan. Los CRE generalmente regulan la transcripción genética uniéndose a los TF, es decir, incluyen TFBS. Un solo TF puede unirse a muchos CRE y, por lo tanto, controlar la expresión de muchos genes (pleiotropía). Los CRE suelen estar ubicados, aunque no siempre, más adelante del sitio de inicio de la transcripción (TSS) del gen que regulan. Los "potenciadores" son CRE que mejoran (es decir, sobrerregulan) la transcripción de los genes con los que están asociados operativamente y pueden encontrarse más adelante, más atrás e incluso dentro de los intrones del gen que regulan. Múltiples potenciadores pueden actuar de forma coordinada para regular la transcripción de un gen. "Silenciadores" en este contexto se refiere a CRE que se unen a TF llamados represores, que actúan para prevenir o subregular la transcripción de un gen. El término "silenciador" también puede referirse a una región en la región 3' no traducida del ARN mensajero, que se une a proteínas que suprimen la traducción de esa molécula de ARNm, pero este uso es distinto de su uso para describir un CRE. Los CRE de la presente invención son potenciadores inducibles específicos del hígado. En el presente contexto, se prefiere que el CRE esté ubicado a 1500 nucleótidos o menos del sitio de inicio de la transcripción (TSS), más preferiblemente a 1000 nucleótidos o menos del TSS, más preferiblemente a 500 nucleótidos o menos del TSS y, adecuadamente, a 250, 200, 150 o 100 nucleótidos o menos del TSS. Los CRE de la presente invención son preferiblemente comparativamente cortos en longitud, preferiblemente de 100 nucleótidos o menos de longitud, por ejemplo, pueden ser de 90, 80, 70, 60 nucleótidos o menos de longitud.

- El término "módulo regulador en cis" o "CRM" significa un módulo funcional compuesto por dos o más CRE; en la presente invención los CRE son potenciadores inducibles específicos del hígado. Por lo tanto, en la presente solicitud, un CRM normalmente comprende una pluralidad de CRE inducibles específicos del hígado.
- 5 Normalmente, los múltiples CRE dentro del CRM actúan juntos (e.g., de forma aditiva o sinérgica) para mejorar la transcripción de un gen con el que el CRM está asociado operativamente. Existe un margen conservable para mezclar (es decir, reordenar), invertir (es decir, invertir la orientación) y alterar el espaciado en los CRE dentro de un CRM. En consecuencia, las variantes funcionales de los CRM de la presente invención incluyen variantes de los CRM referenciados en donde los CRE dentro de ellos han sido barajados y/o invertidos, y/o el espaciado entre CRE ha sido alterado.
- 10 Tal como se utiliza en este documento, el término "promotor" se refiere a una región de ADN que generalmente se encuentra ubicada más adelante de una secuencia de ácido nucleico que se va a transcribir y que es necesaria para que se produzca la transcripción, es decir, que inicia la transcripción. Los promotores permiten la activación o represión adecuada de la transcripción de una secuencia codificante bajo su control. Un promotor generalmente contiene secuencias específicas que son reconocidas y unidas por una pluralidad de TF. Los TF
- 15 se unen a las secuencias promotoras y dan como resultado el reclutamiento de la ARN polimerasa, una enzima que sintetiza ARN a partir de la región codificante del gen. Se conocen un gran número de promotores en la técnica. Los promotores inducibles de la presente invención normalmente impulsan un nivel bajo de expresión antes de ser inducidos y, tras la inducción, impulsan un nivel de expresión significativamente más alto (e.g., un aumento de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o incluso 10 veces en la expresión después de la inducción).
- 20 Los promotores de la presente invención son promotores sintéticos. El término "promotor sintético" tal como se utiliza en este documento se refiere a un promotor que no existe en la naturaleza. En el presente contexto, normalmente comprende un CRE y/o CRM sintético de la presente invención unido operativamente a un promotor mínimo (o central) o a un promotor proximal específico del hígado. Los CRE y/o CRM de la presente invención sirven para proporcionar una transcripción inducible específica del hígado de un gen unido
- 25 operativamente al promotor. Es posible que partes del promotor sintético se encuentren de forma natural (e.g., el promotor mínimo o uno o más CRE en el promotor), pero el promotor sintético como entidad completa no se encuentra de forma natural.
- Como se utiliza en este documento, "promotor mínimo" (también conocido como "promotor central") se refiere a un segmento corto de ADN que es inactivo o en gran medida inactivo por sí mismo, pero que puede mediar la transcripción cuando se combina con otros elementos reguladores de la transcripción. La secuencia promotora mínima puede derivarse de varias fuentes diferentes, incluidos genes procariontes y eucariotes. Los ejemplos de promotores mínimos se analizan más arriba, e incluyen el promotor mínimo del gen de la dopamina beta-hidroxilasa, el promotor mínimo del gen temprano inmediato del citomegalovirus (CMV) (CMV-MP), el promotor mínimo de SV40 (SV40-MP) y el promotor mínimo de la timidina quinasa del herpes (MinTK). Sin embargo, el promotor proximal puede ser sintético. Un promotor mínimo generalmente incluye el sitio de inicio de la transcripción (TSS) y elementos directamente más adelante, un sitio de unión para la ARN polimerasa II y sitios de unión de factores de transcripción generales (a menudo una caja TATA).
- 30 Tal como se utiliza en este documento, "promotor proximal" se refiere al promotor mínimo más la secuencia proximal más adelante del gen que tiende a contener elementos reguladores primarios. A menudo se extiende aproximadamente 250 pares de bases más adelante del TSS e incluye TFBS específicos. En el presente caso, el promotor proximal es adecuadamente un promotor proximal específico del hígado de origen natural que se puede combinar con uno o más CRE o CRM de la presente invención. Sin embargo, el promotor proximal puede ser sintético.
- 40 Una "variante funcional" de un elemento regulador en cis, módulo regulador en cis, promotor u otra secuencia de ácido nucleico en el contexto de la presente invención es una variante de una secuencia de referencia que conserva la capacidad de funcionar de la misma manera que la secuencia de referencia, e.g., como un elemento potenciador regulador en cis inducible específico del hígado, un módulo regulador en cis inducible específico del hígado o un promotor inducible específico del hígado. Los términos alternativos para tales variantes funcionales incluyen "equivalentes biológicos" o "equivalentes".
- 45 Se apreciará que, como se discutió anteriormente, la capacidad de un elemento regulador en cis dado para funcionar como un potenciador inducible específico del hígado está determinada principalmente por la capacidad de la secuencia para unirse al heterodímero CAR-RXR de tal manera que se induce la expresión. En consecuencia, en la mayoría de los casos, una variante funcional de un elemento regulador en cis contendrá un sitio de unión adecuado para el heterodímero CAR-RXR. Se cree que el heterodímero CAR-RXR se une al motivo NR1 en el elemento del PBREM de tipo silvestre y, por lo tanto, se desea una secuencia que pueda funcionar como motivo NR1. Existe un grado muy alto de conservación de secuencia entre PBREM de ratón y humano en el motivo NR1, y por lo tanto normalmente se desea que se preserve un alto nivel de identidad con el motivo NR1 en cualquier variante funcional. Las secuencias adicionales en el elemento del PBREM de tipo silvestre pueden contribuir a minimizar la expresión de fondo y proporcionar altos niveles de inducibilidad y, por lo tanto, generalmente se prefiere que una variante funcional contenga al menos algún grado de identidad de secuencia en estas otras áreas. Por lo tanto, los niveles de identidad de secuencia entre una variante funcional
- 50
55
60

y una secuencia de referencia pueden ser un indicador de funcionalidad retenida. Los altos niveles de identidad de secuencia en el motivo NR1 del elemento regulador en cis son generalmente de mayor importancia que la identidad de secuencia en otras regiones (e.g., NF1 y NR2, donde hay considerablemente menos necesidad, si es que hay alguna, de conservación de la secuencia).

5 La capacidad del heterodímero CAR-RXR para unirse a un CRE determinado se puede determinar mediante cualquier medio relevante conocido en la técnica, incluidos, entre otros, ensayos de desplazamiento de electromovilidad (EMSA), ensayos de unión, inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) y secuenciación de ChIP (ChIP-seq). En una realización preferida, la capacidad del heterodímero CAR-RXR para unirse a una variante funcional dada se determina mediante EMSA. Los métodos para realizar EMSA son bien conocidos en la
10 técnica. Se describen enfoques adecuados en Sambrook et al. citado anteriormente. Hay muchos artículos relevantes que describen este procedimiento, por ejemplo: Hellman and Fried, Nat Protoc. 2007; 2(8): 1849-1861.

"Específico del hígado" o "expresión específica del hígado" se refiere a la capacidad de un elemento regulador en cis, un módulo regulador en cis o un promotor para mejorar o impulsar la expresión de un gen en el hígado
15 (o en células derivadas del hígado) de manera preferencial o predominante en comparación con otros tejidos (e.g., bazo, músculo, corazón, pulmón y cerebro). En el caso de la presente invención, dicha expresión debe ser inducible, es decir, la expresión del gen solo ocurre, o aumenta significativamente, cuando se administra un inductor adecuado (los inductores para uso en todos los aspectos de la presente invención se analizan más arriba). La expresión del gen puede ser en forma de ARNm o proteína. En realizaciones preferidas, la expresión
20 específica del hígado es tal que hay una expresión insignificante en otros tejidos o células (es decir, no hepáticos), es decir, la expresión es altamente específica del hígado.

La capacidad de un promotor para funcionar como un promotor inducible específico del hígado puede ser evaluada fácilmente por una persona experta. De este modo, el experto en la materia puede determinar fácilmente si alguna variante de los promotores específicos ejemplificados en este documento sigue siendo
25 funcional (es decir, es una variante funcional como se definió anteriormente). Por ejemplo, cualquier CRE que se vaya a evaluar se puede vincular operativamente a un promotor mínimo (e.g., ubicado más adelante de MinTK) y se mide la capacidad del elemento regulador en cis de proporcionar una expresión inducible específica del hígado de un gen (normalmente un gen reportero). Como alternativa, una variante de un CRE se puede sustituir en un promotor específico de hígado inducible en lugar de un CRE de referencia, y los efectos sobre
30 la expresión específica de hígado inducible impulsada por dicho promotor modificado se pueden determinar y comparar con la forma no modificada. De manera similar, la capacidad de un promotor para inducir la expresión específica del hígado puede ser evaluada fácilmente por una persona experta (e.g., como se describe en los ejemplos a continuación). Los niveles de expresión y la inducibilidad de un gen impulsado por una variante de un promotor de referencia se pueden comparar con los niveles de expresión y la inducibilidad de la secuencia
35 de referencia, y los enfoques adecuados se analizan más arriba.

La especificidad del hígado se puede identificar cuando la expresión de un gen (e.g., un gen terapéutico o reportero), cuando se induce, ocurre de manera preferencial o predominante en células derivadas del hígado. La expresión preferencial o predominante se puede definir, por ejemplo, donde el nivel de expresión cuando se induce es significativamente mayor en las células derivadas del hígado que en otros tipos de células (es decir,
40 células no derivadas del hígado). Por ejemplo, la expresión en células derivadas del hígado cuando se induce es adecuadamente al menos 5 veces mayor que en células no derivadas del hígado, preferiblemente al menos 10 veces mayor que en células no derivadas del hígado, y puede ser 50 veces mayor o más en algunos casos. Para mayor comodidad, la expresión específica del hígado se puede demostrar adecuadamente mediante una comparación de los niveles de expresión en una línea celular hepática (e.g., una línea celular derivada del
45 hígado, como las células Huh7 y/o HepG2) o células primarias del hígado, en comparación con los niveles de expresión en una línea celular derivada del riñón (e.g., HEK-293), una línea celular derivada del tejido cervical (e.g., HeLa) y/o una línea celular derivada del pulmón (e.g., A549).

Los promotores inducibles específicos del hígado de la presente invención preferiblemente tienen una expresión reducida a un nivel de al menos 4 veces menor que el promotor del CMV-IE en células no derivadas
50 del hígado, adecuadamente en células HEK-293, HeLa y/o A549 cuando se inducen.

Los promotores inducibles específicos del hígado de la presente invención son preferiblemente adecuados para promover la expresión en el hígado de un sujeto, e.g., impulsando la expresión específica del hígado de un transgén, preferiblemente un transgén terapéutico.

También debe tenerse en cuenta que los promotores específicos del hígado de la presente invención pueden,
55 en algunos casos, usarse en células no hepáticas. Generalmente, las células no hepáticas no expresan CAR y, por lo tanto, los promotores de la invención no funcionan en dichas células. Sin embargo, cuando se diseñan células no hepáticas para expresar CAR (y RXR si no expresan RXR de forma natural), dichas células no hepáticas pueden expresar de manera inducible genes vinculados a los promotores de la presente invención. En otras palabras, los promotores específicos del hígado de la presente invención también pueden funcionar
60 en células no hepáticas que han sido modificadas para tener un fenotipo similar al del hígado en términos de

expresión de CAR y RXR. El término "específico del hígado" debe interpretarse en consecuencia. Cuando las células del hígado no expresan CAR (e.g., la línea celular Huh-7) o RXR, también pueden modificarse para expresar la proteína relevante.

5 El término "ácido nucleico" tal como se utiliza en este documento normalmente se refiere a un oligómero o polímero (preferiblemente un polímero lineal) de cualquier longitud compuesto esencialmente de nucleótidos. Una unidad de nucleótido comúnmente incluye una base heterocíclica, un grupo azúcar y al menos uno, e.g., uno, dos o tres, grupos fosfato, incluidos grupos fosfato modificados o sustituidos. Las bases heterocíclicas pueden incluir, entre otras, bases de purina y pirimidina tal como adenina (A), guanina (G), citosina (C), timina (T) y uracilo (U), que están ampliamente distribuidas en los ácidos nucleicos naturales, otras bases naturales (e.g., xantina, inosina, hipoxantina), así como bases modificadas química o bioquímicamente (e.g., metiladas), no naturales o derivatizadas. Los grupos de azúcar pueden incluir, entre otros, grupos pentosa (pentofuranosa), tales como, preferiblemente, ribosa y/o 2-desoxirribosa, comunes en los ácidos nucleicos naturales, o grupos de azúcar arabinosa, 2-desoxiarabinosa, treosa o hexosa, así como grupos de azúcar modificados o sustituidos. Los ácidos nucleicos tal como se entienden en este documento pueden incluir nucleótidos naturales, nucleótidos modificados o mezclas de los mismos. Un nucleótido modificado puede incluir una base heterocíclica modificada, una fracción de azúcar modificada, un grupo fosfato modificado o una combinación de los mismos. Se pueden introducir modificaciones de grupos fosfato o azúcares para mejorar la estabilidad, la resistencia a la degradación enzimática o alguna otra propiedad útil. El término "ácido nucleico" abarca además preferiblemente ADN, ARN y moléculas híbridas de ADN ARN, incluyendo específicamente ARN_{nh}, pre-ARN_m, ARN_m, ADN_c, ADN genómico, productos de amplificación, oligonucleótidos y ADN, ARN o ADN ARN (e.g., sintetizados químicamente). Un ácido nucleico puede ser de origen natural, e.g., estar presente o aislado de la naturaleza; o puede ser de origen no natural, e.g., ser recombinante, es decir, producido mediante tecnología de ADN recombinante, y/o sintetizado química o bioquímicamente, en forma parcial o total. Un "ácido nucleico" puede ser bicatenario, parcialmente bicatenario o monocatenario. Cuando es de cadena sencilla, el ácido nucleico puede ser la cadena sentido o la cadena antisentido. Además, el ácido nucleico puede ser circular o lineal.

30 Los términos "identidad" e "idéntico" y similares se refieren a la similitud de secuencia entre dos moléculas poliméricas, e.g., entre dos moléculas de ácido nucleico, tal como entre dos moléculas de ADN. Las alineaciones de secuencias y la determinación de la identidad de secuencia se pueden realizar, e.g., utilizando la herramienta de búsqueda de alineación local básica (BLAST) descrita originalmente por Altschul et al. 1990 (J Mol Biol 215: 403-10), tal como el algoritmo de "secuencias de Blast 2" descrito por Tatusova y Madden 1999 (FEMS Microbiol Lett 174: 247-250).

35 Los métodos para alinear secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica. Se describen varios programas y algoritmos de alineación, por ejemplo, en: Smith and Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482; Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 443; Pearson and Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 2444; Higgins and Sharp (1988) Gene 73: 237-44; Higgins and Sharp (1989) CABIOS 5: 151-3; Corpet et al. (1988) Nucleic Acids Res. 16: 10881-90; Huang et al. (1992) Comp. Appl. Biosci. 8: 155-65; Pearson et al. (1994) Methods Mol. Biol. 24: 307-31; Tatiana et al. (1999) FEMS Microbiol. Lett. 174: 247-50. Se puede encontrar una consideración detallada de los métodos de alineación de secuencias y los cálculos de homología en, e.g., Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10.

40 La herramienta de búsqueda de alineación local básica (BLAST™; Altschul et al. (1990)) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) está disponible en varias fuentes, incluido el Centro Nacional de Información Biotecnológica (Bethesda, MD) y en la Internet, para su uso en conexión con varios programas de análisis de secuencias. Una descripción de cómo determinar la identidad de secuencia usando este programa está disponible en la Internet en la sección "ayuda" de BLAST™. Para comparaciones de secuencias de ácidos nucleicos, la función "secuencias de Blast 2" del programa BLAST™ (Blastn) puede emplearse utilizando los parámetros predeterminados. Las secuencias de ácidos nucleicos con una similitud aún mayor con las secuencias de referencia mostrarán un porcentaje de identidad creciente cuando se evalúen mediante este método. Normalmente, el porcentaje de identidad de secuencia se calcula sobre toda la longitud de la secuencia.

45 Por ejemplo, el algoritmo de Needleman-Wunsch encuentra adecuadamente una alineación global óptima con los siguientes parámetros de puntuación: Puntuación por coincidencia: +2. Puntuación por discordancia: -3; Penalizaciones por hueco: hueco abierto 5, ampliación de hueco 2. El porcentaje de identidad de la alineación global óptima resultante se calcula adecuadamente mediante la relación entre el número de bases alineadas y la longitud total de la alineación, donde la longitud de la alineación incluye tanto las coincidencias como las discordancias, multiplicada por 100.

50 "Sintético" en la presente solicitud significa una molécula de ácido nucleico que no existe en la naturaleza. Las construcciones de expresión de ácidos nucleicos sintéticos de la presente invención se producen artificialmente, típicamente mediante tecnologías recombinantes. Estos ácidos nucleicos sintéticos pueden contener secuencias naturales (e.g., promotor, potenciador, intrón y otras secuencias reguladoras similares), pero estas están presentes en un contexto no natural. Por ejemplo, un gen sintético (o porción de un gen)

típicamente contiene una o más secuencias de ácidos nucleicos que no son contiguas en la naturaleza (secuencias quiméricas), y/o pueden abarcar sustituciones, inserciones, eliminaciones y combinaciones de las mismas.

5 "Complementario" o "complementariedad", como se utiliza en este documento, se refiere al apareamiento de bases de Watson-Crick de dos secuencias de ácidos nucleicos. Por ejemplo, para la secuencia 5'-AGT-3' se une a la secuencia complementaria 3'-TCA-5'. La complementariedad entre dos secuencias de ácidos nucleicos puede ser "parcial", en la que sólo algunas de las bases se unen a su complemento, o puede ser completa, como cuando cada base de la secuencia se une a su base complementaria. El grado de complementariedad entre las cadenas de ácidos nucleicos tiene efectos significativos en la eficiencia y la fuerza de la hibridación
10 entre cadenas de ácidos nucleicos.

"Transfección" en la presente solicitud se refiere ampliamente a cualquier proceso de introducción deliberada de ácidos nucleicos en células, y cubre la introducción de vectores virales y no virales e incluye transformación, transducción y términos y procesos similares. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a: transfección con vectores virales; transformación con vectores plasmídicos; electroporación (Fromm et al. (1986) Nature 319: 791-3); lipofección (Feigner et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413-7); microinyección (Mueller et al. (1978) Cell 15: 579-85); Transferencia mediada por Agrobacterium (Fraley et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 4803-7); captación directa de ADN; transformación mediada por bigotes; y bombardeo de microproyectiles (Klein et al. (1987) Nature 327: 70).
15

Tal como se utiliza en este documento, la frase "transgén" se refiere a una secuencia de ácido nucleico exógena. En un ejemplo, un transgén es un gen que codifica un compuesto útil desde el punto de vista industrial o farmacéutico, o un gen que codifica un rasgo deseable. En otro ejemplo más, el transgén codifica una secuencia de ácido nucleico antisentido, en donde la expresión de la secuencia de ácido nucleico antisentido inhibe la expresión de una secuencia de ácido nucleico objetivo.
20

El término "vector" es bien conocido en la técnica y tal como se utiliza en el presente documento se refiere a una molécula de ácido nucleico, e.g., ADN bicatenario, que puede tener insertada en ella una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. Un vector se utiliza adecuadamente para transportar una molécula de ácido nucleico insertada a una célula huésped adecuada. Un vector normalmente contiene todos los elementos necesarios que permiten transcribir la molécula de ácido nucleico insertada y, preferiblemente, traducir la transcripción en un polipéptido. Un vector normalmente contiene todos los elementos necesarios para que, una vez que el vector está en una célula huésped, pueda replicarse independiente o coincidentemente con el ADN cromosómico del huésped; se pueden generar varias copias del vector y su molécula de ácido nucleico insertada. Los vectores de la presente invención pueden ser vectores episomales (es decir, que no se integran en el genoma de una célula huésped) o pueden ser vectores que se integran en el genoma de la célula huésped. Esta definición incluye tanto vectores virales como no virales. Los vectores no virales incluyen, entre otros, vectores plasmídicos (e.g., pMA-RQ, vectores pUC, vectores BlueScript (pBS) y pBR322 o derivados de los mismos que carecen de secuencias bacterianas (minicírculos)), vectores basados en transposones (e.g., vectores PiggyBac (PB) o vectores Sleeping Beauty (SB)), etc. Se pueden utilizar vectores más grandes, como cromosomas artificiales (bacterias (BAC), levaduras (YAC) o humanos (HAC)) para acomodar inserciones más grandes. Los vectores virales se derivan de virus e incluyen, entre otros, vectores retrovirales, lentivirales, virales adenoasociados, adenovirales, virales del herpes, virales de la hepatitis o similares. Por lo general, pero no necesariamente, los vectores virales tienen una replicación deficiente porque han perdido la capacidad de propagarse en una célula determinada debido a que los genes virales esenciales para la replicación se han eliminado del vector viral. Sin embargo, algunos vectores virales también pueden adaptarse para replicarse específicamente en una célula dada, como e.g., una célula cancerosa, y normalmente se utilizan para desencadenar la (onco)lisis específica de la célula (cáncer). Los virosomas son un ejemplo no limitante de un vector que comprende elementos tanto virales como no virales, en particular combinan liposomas con un virus VIH o influenza inactivado (Yamada et al., 2003). Otro ejemplo son los vectores virales mezclados con lípidos catiónicos.
25
30
35
40
45

El término "operativamente unido", "operativamente conectado" o expresiones equivalentes como se utilizan en este documento se refieren a la disposición de varios elementos de ácido nucleico entre sí de tal manera que los elementos están conectados funcionalmente y son capaces de interactuar entre sí de la manera prevista. Dichos elementos pueden incluir, sin limitación, un promotor, un potenciador y/o un elemento regulador, una secuencia de poliadenilación, uno o más intrones y/o exones, y una secuencia codificante de un gen de interés a expresar. Los elementos de la secuencia de ácidos nucleicos, cuando están orientados adecuadamente o unidos operativamente, actúan juntos para modular la actividad de cada uno y, en última instancia, pueden afectar el nivel de expresión de un producto de expresión. Por modular se entiende aumentar, disminuir o mantener el nivel de actividad de un elemento determinado. La posición de cada elemento con respecto a otros elementos se puede expresar en términos del extremo 5' y el extremo 3' de cada elemento, y la distancia entre cualquier elemento en particular se puede referenciar mediante el número de nucleótidos intermedios, o pares de bases, entre los elementos. Como lo entiende el experto en la materia, operativamente unido implica una actividad funcional y no está necesariamente relacionado con un enlace posicional natural. De hecho, cuando se utilizan en casetes de expresión de ácidos nucleicos, los elementos reguladores en cis
50
55
60

normalmente se ubicarán inmediatamente más adelante del promotor (aunque este es en general el caso, definitivamente no debe interpretarse como una limitación o exclusión de posiciones dentro del casete de expresión de ácidos nucleicos), pero este no tiene por qué ser el caso *in vivo*, e.g., una secuencia de un elemento regulador que se encuentra de forma natural más atrás de un gen cuya transcripción afecta puede funcionar de la misma manera cuando se encuentra más adelante del promotor. Por lo tanto, de acuerdo con una realización específica, el efecto regulador o potenciador del elemento regulador es independiente de la posición.

Una "secuencia espaciadora" o "espaciador" como se usa en este documento es una secuencia de ácido nucleico que separa dos secuencias de ácido nucleico funcionales (e.g., TFBS, CRE, CRM, promotores mínimos, etc.). Puede tener esencialmente cualquier secuencia, siempre que no impida que la secuencia de ácido nucleico funcional (e.g., el elemento regulador en cis) funcione como se desea (e.g., esto podría suceder si incluye una secuencia silenciadora, impide la unión del factor de transcripción deseado o algo similar). Por lo general, no es funcional, ya que está presente solo para espaciar secuencias de ácidos nucleicos funcionales adyacentes entre sí.

El término "farmacéuticamente aceptable" como se utiliza en este documento es consistente con la técnica y significa compatible con los demás ingredientes de la composición farmacéutica y no perjudicial para el receptor de la misma.

"Cantidad terapéuticamente eficaz" y frases similares significan una dosis o concentración plasmática en un sujeto que proporciona el efecto farmacológico específico deseado, e.g., para expresar un gen terapéutico en el hígado. Se enfatiza que una cantidad terapéuticamente efectiva puede no ser siempre efectiva para tratar las condiciones descritas en este documento, aun cuando los expertos en la materia consideren que dicha dosis es una cantidad terapéuticamente efectiva. La cantidad terapéuticamente eficaz puede variar de acuerdo con la vía de administración y la forma de dosificación, la edad y el peso del sujeto y/o la enfermedad o afección que se esté tratando.

Los términos "tratamiento" o "tratar" se refieren a reducir, mejorar o eliminar uno o más signos, síntomas o efectos de una enfermedad o condición.

Los términos "individuo", "sujeto" y "paciente" se utilizan indistintamente y se refieren a cualquier sujeto individual con una enfermedad o condición que necesite tratamiento. A los efectos de la presente divulgación, el sujeto puede ser un primate, preferiblemente un ser humano, u otro mamífero, tal como un perro, un gato, un caballo, un cerdo, una cabra o un bovino, y similares.

Introducción técnica

Receptores nucleares

Los receptores nucleares desempeñan un papel vital en la conversión de los cambios químicos en el entorno celular en cambios transcripcionales y, por lo tanto, biológicos. Esta función es esencial para mantener la homeostasis no sólo de las células sino de organismos enteros. Los receptores nucleares solo se encuentran en metazoos con una gran diferencia en el número entre especies, e.g., los humanos tienen 48 y *C. elegans* tiene 270.

Desde su descubrimiento, la importancia y el número de receptores nucleares ha crecido sustancialmente y estas proteínas ahora se reconocen como una superfamilia de proteínas. Esta familia incluye receptores que se unen y responden a esteroides, hormonas tiroideas, nutrientes y sustancias químicas xenobióticas. Una vez unidos por un ligando, los receptores experimentan un cambio conformacional y se unen al ADN, iniciando o reprimiendo así la expresión génica. Esta capacidad de unirse al ADN genómico es clave para la función de los receptores y su importancia en el destino celular, el desarrollo corporal y el metabolismo. Se ha demostrado que el número de ligandos que se unen a los receptores nucleares está en constante expansión y contradice la función del receptor afín. Los ligandos varían desde hormonas endógenas hasta vitaminas y xenobióticos, destacando su importancia para el metabolismo y la homeostasis celular. Debido al profundo efecto que estos receptores pueden tener en el transcriptoma, son excelentes objetivos para el tratamiento farmacológico y se estima que aproximadamente el 13 % de los medicamentos aprobados por la FDA se dirigen a los receptores nucleares.

50 Estructura

Los receptores nucleares tienen una masa entre 50-100 kDa y los polipéptidos maduros están organizados en 5 dominios:

A/B: Altamente variable entre receptores. Contiene la función de activación 1 (AF-1) que actúa como un activador transcripcional débil en ausencia de ligando, pero como un activador fuerte cuando el ligando está unido. Esto se debe a la interacción con el AF-2 en el dominio E.

C: Dominio altamente conservado que contiene 2 dedos de zinc que se unen al elemento de respuesta del ADN.

D: Dominio flexible que conecta y permite la interacción entre el LBD y el DBD. Importante en el tráfico celular y la distribución subcelular.

- 5 E: Altamente conservado en estructura, pero sólo moderada conservación en secuencia. Contiene la cavidad de unión del ligando y confiere especificidad del ligando en el receptor. Contribuye a la interfaz de dimerización junto con el DBD, también se une a coactivadores y represores. Contiene factor de activación 2 (AF2) cuya acción depende de la unión del ligando.

F: Dominio del C-terminal altamente variable.

10 Mecanismo de acción

Los receptores nucleares se pueden clasificar en 4 tipos de acuerdo con su mecanismo de acción. A continuación, se muestra un resumen de cada uno de los tipos:

- 15 Tipo I: Estos receptores se encuentran en el citoplasma de la célula y en estado inactivado. La unión del ligando provoca la disociación de las proteínas de choque térmico (HSP), la homodimerización, la translocación al núcleo y la unión al motivo de respuesta del ADN del receptor. Estos receptores se unen a un motivo de ADN que consta de 2 ½ sitios separados por una longitud variable de ADN (repeticiones directas 1-5 (DR1-5)) con el segundo ½ sitio es una repetición invertida de la 1^{era}. Algunos de esta clase de receptores se unen a repeticiones directas y pueden unirse como monómeros/dímeros o, en el caso del receptor de androstano constitutivo, como heterodímero con RXR.

- 20 Tipo II: Estos receptores, ya sean inactivos o activos, residen en el núcleo. Generalmente se unen al ADN como un heterodímero con RXR. En ausencia de ligando, estos receptores a menudo forman complejos con proteínas correpressoras.

Tipo III: Similares a los receptores de tipo I, pero se unen exclusivamente a repeticiones directas de secuencias de ADN.

- 25 Tipo IV: Estos pueden unirse como monómeros de dímeros, pero solo un único dominio de unión al ADN se une a un único medio sitio en el ADN.

El receptor constitutivo de androstano (CAR)

- 30 El receptor constitutivo de androstano (CAR), o receptor nuclear subfamilia 1, grupo I, miembro 3, es un miembro de la superfamilia de receptores nucleares que se expresa casi exclusivamente en las células del hígado. Es aquí donde el CAR, en conjunto con otro receptor nuclear, el receptor X de pregnano (PXR), actúa como sensor de sustancias químicas endobióticas y xenobióticas. Una vez unidos por sustancias activadoras, estos receptores modulan la actividad de numerosos genes, incluido el citocromo p450, y por lo tanto son responsables del metabolismo y la excreción de estos compuestos. Es a través de esta actividad de unión y activación genética que CAR y PXR desempeñan un papel importante en la desintoxicación de sustancias químicas extrañas en el cuerpo.

35

Función:

- 40 Como se indicó anteriormente, el CAR funciona como regulador clave del metabolismo xenobiótico y endobiótico. Se prevé que tenga 24 transcripciones en el hígado. Se ha demostrado que algunas de estas transcripciones son responsables de la actividad constitutiva de bajo nivel de este receptor, mientras que otras transcripciones son inducibles. Se cree que la actividad constitutiva está modulada por interacciones con coactivadores transcripcionales como el coactivador del receptor de esteroides 1 (SRC1). Esta actividad puede reprimirse mediante la unión de agonistas inversos como el androstano.

Activación del ligando:

- 45 El CAR inactivo está fosforilado y reside en el citoplasma de la célula. Aquí forma un complejo con la proteína de choque térmico 90 (hsp90) y la proteína de retención de CAR citoplasmática (CCRP), esta asociación es la que mantiene al CAR en el citoplasma y por lo tanto inactivo. Este CAR inactivo se puede activar de 2 maneras: 1) unión directa del ligando, como por ejemplo mediante TCPOBOP, un ligando CAR de ratón, o 2) mediante activación indirecta a través de fenobarbital. Ambas vías conducen a la disociación del CAR del complejo multiproteico y permiten su translocación al núcleo. En el núcleo, el CAR puede actuar como monómero o formar un heterodímero con el receptor X retinoide (RXR). El CAR nuclear se une al ADN en el elemento de respuesta al fenobarbital (PBREM) a través del cual activa los genes regulados por CAR, e.g., las subfamilias CYP2B, CYP2C y CYP3A.

50

Activación directa:

ES 3 021 683 T3

- Plásmido pcDNA6 que contiene el gen de la β -galactosidasa utilizado como control interno para la eficiencia de la transfección (ThermoFisher, V22020)
 - Plásmido de expresión del CAR de ratón de Jouan et al, 2016 (BioCat GmbH, EX-Z4288-M51-10-GC). Esto se utilizó porque Huh7 es deficiente en CAR.
 - 5 – Solución de sustrato de β -galactosidasa (ThermoFisher, 75707/75710)
 - Kit de BCA Pierce (23225)
 - LARII (Sistema de ensayo Dual Luciferase Reporter 1000, Promega, E1980)
 - Kit ELISA de EPO (Abcam, ab119522)

 - 10 **Método:**
Día 1
 - Las células se sembraron en una placa de 48 pocillos a una densidad de 25,000 células/300 μ L.Día 2
 - El día de la transfección, el ADN a transfectar (plásmido del CAR/PB1-MinTK unido operativamente con luciferasa o plásmido EPO/pcDNA6 como control interno) se diluyó con una solución madre de 100 ng/ μ L15 Por transfección de 48 pocillos:
 - Se mezclaron 45 ng de ADN (15 ng de cada plásmido, pcDNA6, CAR y plásmido de prueba) con 4.1 μ L de medio Optimem.
 - Se mezclaron 0.5 μ L de Fusion HD con 4 μ L de medio Optimem.20 – Estas 2 soluciones se mezclaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos.
 - Luego se añadió la solución final al pocillo gota a gota.
 - 3 horas después de la transfección, se añadió el inductor TCPOBOP a los pocillos apropiados en la concentración indicada.Día 3
 - 25 – 24 horas después de la inducción se retiró el medio de las células.
 - Las células se lavaron una vez en 300 μ L de DPBS.
 - Las células se lisaron utilizando 100 μ L de tampón de lisis pasiva y se incubaron con agitación durante 15 minutos.30 – Los restos celulares se sedimentaron mediante centrifugación de la placa a máxima velocidad en una centrífuga de sobremesa durante 1 minuto.
 - Para la luciferasa, se transfirieron 10 μ L de muestra a una placa blanca de 96 pocillos y se midió la luminiscencia mediante la inyección de 50 μ L de sustrato LARII.
 - La actividad de β -galactosidasa se midió de acuerdo con las instrucciones del fabricante (kit de ensayo de β -galactosidasa en mamíferos, 75707/75710, Thermo Scientific) utilizando 25 μ L de lisado. Se transfirieron 25 μ L de lisado a un pocillo de microplaca y se mezclaron con 25 μ L de reactivo de ensayo de β -galactosidasa, equilibrado a temperatura ambiente. La mezcla se incubó a 37 °C durante 30 minutos y se midió la absorbancia a 405 nm.35 – La actividad de β -galactosidasa se midió de acuerdo con las instrucciones del fabricante (kit de ensayo de β -galactosidasa en mamíferos, 75707/75710, Thermo Scientific) utilizando 25 μ L de lisado. Se transfirieron 25 μ L de lisado a un pocillo de microplaca y se mezclaron con 25 μ L de reactivo de ensayo de β -galactosidasa, equilibrado a temperatura ambiente. La mezcla se incubó a 37 °C durante 30 minutos y se midió la absorbancia a 405 nm.
- 40 – La concentración de proteínas se midió de acuerdo con las instrucciones del fabricante (kit de ensayo de proteínas Pierce™ BCA, 23225/23227, Thermo Scientific) utilizando 25
- μ
- L de lisado. Se transfirieron 25
- μ
- L de lisado a un pocillo de una microplaca y se mezclaron con 200
- μ
- L de solución de trabajo. La mezcla se incubó a 37 °C durante 30 minutos, se enfrió a temperatura ambiente y luego se midió la absorbancia alrededor de 562 nm. La concentración de proteína se calculó con respecto a la curva estándar de proteína preparada a partir de estándares de ensayo con concentración de proteína conocida.

Las lecturas de luciferasa se normalizaron tanto para la concentración de β -galactosidasa como de proteína en el lisado para producir unidades luminométricas relativas (RLU) normalizadas.

Para comparar entre experimentos, se comparó la fuerza de los promotores con el promotor del CMV-IE, que impulsaba el mismo gen que los constructos que contenían PBREM, que se incluye en cada experimento.

5 Las transfecciones con PB1-MinTk-EPO se realizaron como se describió anteriormente con la excepción de que la EPO se secreta en el medio. Por lo tanto, se recogió el medio y se midió la concentración de EPO de acuerdo con las instrucciones del fabricante (kit ELISA humano de eritropoyetina (EPO) ab119522, Abcam) utilizando un ensayo ELISA. Se transfirieron 50 μ L de medio a pocillos de una microplaca prelavados y se mezclaron con 50 μ L de anticuerpo conjugado con biotina 1x. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se lavaron los pocillos, se añadieron 100 μ L de Estreptavidina-HRP y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se lavaron los pocillos y luego se agregaron 100 μ L de solución de sustrato TMB. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. La reacción enzimática se detuvo mediante la adición de 100 μ L de solución de parada y se leyó la absorbancia a 450 nm. La concentración de EPO se calculó con respecto a la curva estándar de EPO preparada a partir de estándares de ensayo con concentración de EPO conocida.

El constructo PB1-MinTK se clonó en el vector pGL4.10 utilizando los sitios de restricción KpnI y NcoI. Esto coloca a los promotores directamente más adelante del gen reportero de la luciferasa de luciérnaga. El constructo PB1-MinTK contiene el potenciador de 51 pb y el promotor mínimo MinTK del gen de la timidina quinasa del herpes.

20 Resultados:

La expresión de luciferasa del constructo PB1-MinTK en la Figura 1A mostró que había muy poca actividad de luciferasa medible del promotor cuando las células fueron tratadas con vehículo (DMSO). Esta actividad corresponde a una expresión con fugas del promotor. La adición de 50 nM o 150 nM de TCPOBOP produce una fuerte inducción del promotor, con una inducción medida de hasta 6 veces. La adición de 250 nM de TCPOBOP no provocó una respuesta de este promotor, lo que sugiere que podrían haberse activado mecanismos de control homeostático para evitar la sobrecarga de la célula. Por lo tanto, el constructo PB1-MinTK se induce mediante la adición de TCPOBOP en células Huh7. La inducción es ajustable, dependiendo de la concentración de TCPOBOP, pero disminuye a concentraciones más altas.

30 En la Figura 1B, la expresión de luciferasa del constructo PB1-MinTK en presencia de CAR y 150 nM de TCPOBOP es alta como se vio previamente en la Figura 1A. Sin embargo, cuando las células se transfectan con PB1-MinTK, pero no con CAR, no hay actividad medible cuando se agrega 150 nM de TCPOBOP. Esto se puede explicar por la ausencia de un receptor al que se une TCPOBOP, cuando no hay CAR presente. Por lo tanto, la inducción depende de CAR e indica un proceso altamente específico del hígado.

35 En conjunto, estos resultados muestran que el constructo PB1-MinTk es inducible mediante la adición de TCPOBOP en células Huh7, la inducción es ajustable, la inducción depende de CAR y que la expresión de un único elemento es suficiente para impulsar el 40% de la expresión del gen CMV-IE.

40 Los datos experimentales que se muestran en la Figura 1A se representan en la Figura 1C como una relación de la expresión de la luciferasa del fuerte promotor viral CMV-IE. Esto demuestra que la expresión de luciferasa de un elemento del PBREM vinculado con el promotor MinTK es suficiente para impulsar el 40% de la expresión de luciferasa del promotor del CMV-IE. La Figura 1C también muestra que no hay expresión de luciferasa del constructo PB1-MinTK en ausencia de CAR.

45 Luego se utilizó el promotor PB1-MinTK para impulsar la expresión de la proteína EPO, que es de interés terapéutico. La expresión se impulsó en células Huh7 transfectadas con el promotor PB1-MinTK unido operativamente a la proteína EPO y un plásmido que contenía CAR. Las transfecciones se realizaron como se describió previamente, pero la expresión de EPO fue inducida por el inductor CAR humano CITCO.

Se utilizó CITCO, un inductor de CAR humano, en lugar de TCPOBOP, un inductor de ratón, porque TCPOBOP no activa el CAR humano. Esto significa que TCPOBOP no se puede utilizar en células humanas, que son el objetivo final en el que se utilizará esta invención. Esto también se hizo para garantizar que el elemento del PBREM del ratón pueda ser activado por un CAR humano que se induce con el inductor CAR humano, CITCO.

50 La expresión de EPO del constructo PB1-MinTK después de la transfección en células Huh7 y el tratamiento con DMSO, 0.5 μ M, 1 μ M, 2 μ M y 3 μ M de CITCO se muestra en la Figura 1D. Esta figura muestra que hay muy poca expresión de EPO sin adición del fármaco, pero al agregar hasta 2 μ M de CITCO hay un marcado aumento en la producción de EPO. Esto vuelve nuevamente a la actividad base en la concentración más alta. Esta figura también muestra que la adición de CITCO no cambia la expresión de EPO del promotor del CMV-MP. El nivel general de expresión de EPO de PB1-MinTK en este ejemplo es alrededor del 22% de la expresión de EPO de CMV-IE (datos no mostrados). Esto es diferente al 40% observado previamente con respecto a CMV-IE en la Figura 1C porque CITCO es un inductor más débil de la actividad de CAR que TCPOBOP.

Se utilizó PB1-MinTK para impulsar con éxito la expresión ajustable de luciferasa y EPO.

Ejemplo 2

Luego se utilizó el elemento del PBREM en combinación con otros dos promotores mínimos para probar la inducibilidad y la expresión. PBREM se clonó delante del promotor mínimo del CMV, el promotor MinTK y el promotor mínimo de SV40 y se introdujo en hepatocitos AXOL ARE.

Los hepatocitos Axol Assay-Ready Expanded (ARE) son hepatocitos humanos primarios que se han expandido *in vitro*. Se encuentran disponibles lotes de gran tamaño (hasta 2000 viales), lo que garantiza una fuente confiable, lista para usar y consistente de hepatocitos primarios. Los hepatocitos ARE expresan enzimas CYP, son metabólicamente funcionales, están polarizados y pueden ser infectados por el virus de la hepatitis C. Los hepatocitos AXOL ARE expresan CAR, lo que elimina la necesidad de transfectar con un plásmido que exprese CAR.

Materiales:

- Hepatocitos expandidos listos para el ensayo AXOL (ARE) (Axol, ax3701)
- Medio de descongelación de hepatocitos ARE (Axol, ax3705)
- Medio de mantenimiento de ARE (Axol, ax3710)
- Reactivo de transfección rojo Virimer (Lipocalyx, VR04-02-15)
- Kits de CITCO, luciferasa, β-galactosidasa y BCA como se describe anteriormente

Métodos:

Los hepatocitos ARE se cultivaron y transfectaron como se describe en el manual del fabricante. Se sembraron 200,000 células en 2 mL de medio de cultivo en una placa de 6 pocillos recubierta de colágeno. Las células se incubaron durante 4 h a 37 °C y 5 % de CO₂ para una adhesión suficiente. Se añadieron 200 µL de mezcla de transfección que contenía el ADN a transfectar (PB1-MinTK/PB1-CMV/PB1-SV40 unido operativamente con luciferasa y promotor que contiene β-galactosidasa) y las células se incubaron en un agitador orbital a 100 rpm durante tres horas a 37 °C y 5 % de CO₂. 3 horas después de la transfección, se añadió CITCO a los pocillos apropiados. Las células se incubaron en condiciones estáticas a 37 °C y 5 % de CO₂ durante la noche y por la mañana el medio se reemplazó con medio de mantenimiento de hepatocitos ARE nuevo. La lectura se realizó 24 horas después de la inducción.

Resultados:

La expresión de luciferasa de los constructos PB1-MinTK, PB1-CMV-MP y PB1-SV40-MP en la Figura 2A indica que cada uno de los promotores mínimos apoya la expresión del elemento del PBREM tras la adición de 1 µM de CITCO. La inducción fue alrededor de 7 veces para SV40 y MinTK y 2 veces para el promotor del CMV-IE. Los niveles de expresión para cada uno de los constructos son 20%, 10% y 55% para PB1-MinTK, PB1-CMV y PB1-SV40 respectivamente, en comparación con CMV-IE. El SV40 puede alcanzar la máxima expresión, pero esto tiene como precio un nivel de fondo más alto. El promotor mínimo del CMV muestra poca o ninguna expresión. A partir de estos datos, parece que el constructo original de MinTK puede proporcionar el mejor compromiso entre el nivel de expresión, la inducibilidad y el control estricto (es decir, minimizar la expresión de fondo).

PBREM se puede utilizar para impulsar la expresión inducible en combinación con una variedad de promotores mínimos.

Ejemplo 3

Este experimento se realizó para examinar si la multimerización de los sitios de unión de NR aumentaría posteriormente la actividad del promotor. Por lo tanto, clonamos 2, 3 y 4 repeticiones del elemento del PBREM delante de los promotores mínimos MinTK, CMV y SV40. Una consideración importante en este documento fue el espaciamiento entre los elementos, aquí seguimos la regla general de 5, por la cual los elementos espaciados a intervalos de 5 pb no se obstaculizan estéricamente entre sí. Utilizando el conocimiento interno, obtenido a partir del diseño previo del promotor inducible, clonamos los elementos separados por 20 pb. Estos múltiplos se clonaron en el plásmido pGL4.10 descrito previamente. Luego, estos constructos se probaron en los hepatocitos AXOL ARE como se describió previamente.

Promotor MinTK:

PB1-MinTK, PB1-1-MinTK, PB1-2-MinTK y PB1-3-MinTK contienen 1, 2, 3 y 4 elementos del PBREM respectivamente en combinación con el promotor mínimo MinTK. La expresión de luciferasa de los constructos

PB1-1-MinTK, PB1-2-MinTK y PB1-3-MinTK tras la inducción con 1 μ L de CITCO en la Figura 3C muestra que los multímeros se inducen y aumentan el nivel de expresión. Sin embargo, este aumento en el nivel de expresión sólo se observa hasta 3 copias del elemento del PBREM (PB1-2), ya que la adición de otro elemento parece tener un efecto perjudicial sobre la inducción y el nivel de expresión. Cada multímero se induce a 1.5, 4.1 y 2.66 de CMV-IE respectivamente. Sin embargo, el nivel de inducción es similar al del constructo inicial PB1-MinTK representada aquí como PB1. Esto se debe a un aumento en la actividad de fondo de los promotores. Los resultados se expresan como una relación con CMV-IE. Los resultados son la media de 3 réplicas biológicas.

Promotor mínimo de SV40:

PB1-SV40, PB1-1-SV40, PB1-2-SV40 y PB1-3-SV40 contienen 1, 2, 3 y 4 elementos del PBREM respectivamente en combinación con el promotor mínimo de SV40. La expresión de luciferasa de los constructos PB1-1-SV40, PB1-2-SV40 y PB1-3-SV40 tras la inducción con 1 μ L de CITCO en la Figura 3A muestra que los multímeros son inducidos y de hecho aumentan el nivel de expresión. Sin embargo, como antes, este aumento en el nivel de expresión solo se observa hasta 3 copias del elemento del PBREM, ya que la adición de otro elemento parece tener un efecto perjudicial en la inducción y el nivel de expresión. Cada multímero se induce a 2.6, 3.6 y 2.57 de CMV-IE respectivamente. El nivel de inducción es mayor que el aumento de 6 veces observado con el promotor mínimo de MinTk con una inducción de hasta 9 veces. Nuevamente, hay un aumento en el nivel de expresión de fondo, pero mucho menor que el observado con los promotores CMV-MP como se describe a continuación. Los resultados se expresan como una relación con CMV-IE. Los resultados son la media de 3 réplicas biológicas.

Promotor del CMV:

PB1-CMV, PB1-1-CMV, PB1-2-CMV y PB1-3-CMV contienen 1, 2, 3 y 4 elementos del PBREM respectivamente en combinación con el promotor mínimo del CMV. La expresión de luciferasa de los constructos PB1-1-CMV, PB1-2-CMV y PB1-3-CMV tras la inducción con 1 μ L de CITCO en la Figura 3B muestra que los multímeros son inducidos y de hecho aumentan el nivel de expresión. Sin embargo, como antes, este aumento en el nivel de expresión solo se observa hasta 3 copias del elemento del PBREM, ya que la adición de otro elemento parece no tener efecto en la inducción y el nivel de expresión. Cada multímero se induce a 1.9, 2.67 y 2.67 de CMV-IE respectivamente. El nivel de inducción es menor que el observado con el promotor mínimo de MinTk o SV40, máximo 5 veces. El uso del promotor mínimo del CMV parece aumentar el nivel de expresión de fondo a niveles muy altos y, como tal, puede ser el peor candidato evaluado.

Aumentar el número de elementos del PBREM aumenta el nivel de expresión hasta 3 elementos del PBREM. Aumentar aún más el número de PBREM a 4 da como resultado una menor expresión de luciferasa.

Ejemplo 4

A partir del Ejemplo 3, se decidió tomar PB1-MinTK y PB1-2-MinTk para estudios *in vivo*. Para facilitar esto, las dos construcciones mencionadas anteriormente se clonaron en el vector pAAV (Takara, Clontech) para permitir la preparación de virus AAV. Los insertos se clonaron utilizando la digestión de restricción del plásmido pAAV y la amplificación por PCR de los constructos originales pGL4.10.

Investigamos el efecto de las repeticiones terminales invertidas (ITR) en la actividad de los promotores. Esto se hizo porque hemos observado interferencias de los ITR de AAV en otros proyectos. Para este fin, se transfectaron pAAV-PB1-MinTk y pAAV-PB1-2-MinTk en células primarias Huh7 y ARE como se describió previamente y se evaluó su actividad.

Los resultados de estos experimentos se pueden ver en las Figuras 4A y 4B. Estos gráficos representan la media de 3 réplicas biológicas y muestran que los ITR no afectan el rendimiento de los promotores. La inducción de la expresión de luciferasa a partir del constructo PB1-MinTK y PB1-2-MinTK es comparable entre vectores y tipos de células. Estos constructos son notablemente robustos y la estructura del plásmido parece no tener efecto sobre la actividad.

Ejemplo 5

La expresión de luciferasa de los constructos PB1-MinTK y PB1-2-MinTK en el vector pAAV en los hepatocitos AXOL ARE es inducible por CITCO (1 μ M) pero se reduce después de eliminar CITCO como se muestra en la Figura 5. Esto demuestra que la eliminación del fármaco reduce la actividad del promotor a niveles casi basales.

Ejemplo 6 - Experimentos *in vivo* que utilizan AAV que comprenden la inducción de PB1 y PB1-2

De la solicitud anterior, se seleccionaron los constructos PB1 (elemento del PBREM de ratón único y promotor Min-TK) y PB1-2 (3xPBREM y promotor min-TK) para probarlos *in vivo* en ratones. Esto se realizó de la siguiente manera:

ES 3 021 683 T3

Los constructos AAV PB1 y PB1-2 de la solicitud anterior, secuencias a continuación (SEQ ID NO 49 y 50, Tabla 3), se utilizaron para crear el virus AAV.

Producción de AAV

Día 1:

- 5
- Sembrar células HEK 293-AAV en placas de 15 cm. Para tener una confluencia del 70-80 % el día de la transfección
 - Volumen final en cada placa: 15 mL

Día 2: Preparar la mezcla de transfección:

- 10
- Mezcla de ADN/placa: pDG9 (plásmido de empaquetamiento para AAV9): 10.5 µg/pHGTI (Ad. Plásmido auxiliar): 31.5 µg/plásmido vector: 10.5 µg/ Preparar en DMEM/Optimem sin suero
 - Mezcla de transferencia/placa: PEI: 125 µL/ Preparar en DMEM/Optimem sin suero
 - Añadir la mezcla de ADN a la mezcla de transfección. Mezclar y dejar reposar a temperatura ambiente durante 15-20 minutos.
 - Añadir 3 mL de mezcla de transfección a cada placa gota a gota y distribuir suavemente. Incubar durante 15

Día 3:

- Reemplazar los medios con 15 mL de DMEM suplementado con P/S y 2 % de FCS. Dejar reposar durante 48h.

Día 5:

- 20
- Recoger el sobrenadante y mezclarlo en tubos de 50 mL, 25 mL cada uno. Conservar a -20 °C.
 - Recolectar células: Añadir 5 mL de PBS a cada placa → raspar y recoger en tubos de 50 mL.
 - Para lavar las placas, agregar otro 1 mL de PBS y recoger.
 - Centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos.
 - Retirar el sobrenadante y resuspender las células sedimentadas en 1mL/placa de tampón de lisis TD → 25
- Conservar a -80 °C.

Tratamiento con endonucleasas

Células:

- 30
- Congelar y descongelar los sedimentos 5 veces → ~20 minutos a 37 °C y luego ~20 minutos en hielo seco (o -80 °C).
 - Añadir 25 µL/mL de células de desoxicolato al 20 % (o 50 µL/mL de desoxicolato al 10 %).
 - Añadir 8µL/mL de células de benzonasa.
 - Incubar a 37 °C durante 30 minutos.
 - Centrifugar a 4,000 rpm durante 30 minutos.
 - Filtrar el sobrenadante utilizando filtros de 0.45 µM.
 - Conservar a 4 °C durante un máximo de 24 horas.

Sobrenadante:

- Añadir 2.5 µL/25 mL de sobrenadante de benzonasa.
- Añadir 50 µL/25 mL de sobrenadante de MgSO₄.

ES 3 021 683 T3

- Incubar a 37 °C durante 30 minutos.
 - Centrifugar a 4,000 rpm durante 30 minutos.
 - Filtrar el sobrenadante utilizando filtros de 0.45 µM.
 - Conservar a 4 °C durante un máximo de 24 h.
- 5 Purificación por HPLC
- Colocar ambas líneas en ETOH al 20% → plantilla → lavado del sistema
 - Colocar la línea A en PBS y la línea B en glicina → plantilla → lavado del sistema
 - Colocar la columna en la máquina → ejecución manual → caudal: 5mL/min → Ejecutar durante 25 mL o hasta que la línea UV esté plana.
- 10
- Preparar tubos FACS (10 para células y más para sobrenadante): agregar 30 µL/tubo de Tris → colocar en la máquina para recolectar vectores.
 - Colocar las líneas de desechos en un tubo separado para poder pasarlas nuevamente por la columna.
 - Pasar las muestras (caudal bajo, dependiendo de qué tan rápido sea el sistema y qué tan concentrada esté la muestra; para las células es más lento, para el sobrenadante es más alto).
- 15
- Después de pasar los desechos por la columna, lavar con PBS → caudal: 5mL/min hasta que la línea UV quede plana.
 - Conjunto → tamaño de fracción: 1 mL; Caudal: 1 mL/min; concentración % de B: 100% → ejecutar.
 - Empezar la recolección: Buscar el pico. El pico indica la purificación del vector. Marcar los tubos que contienen estos vectores.
- 20
- Guardar el programa antes de salir.
 - Lavar con PBS → 75 mL, 5mL/min
 - Lavar con Na₃PO₄ (para almacenar la columna) → 75 mL, 5 mL/min
 - Retirar la columna y conservar a 4°C.
 - Lavar la máquina con PBS → plantilla → lavado del sistema
- 25
- Lavar la máquina con 20% ETOH → plantilla → lavado del sistema
 - Colocar ambas líneas en ETOH al 20% y apagar.
 - Añadir 2 L de PBS en un balde grande y colocar el casete de diálisis (Side-A-Lyzer; Thermo Scientific) para su preparación.
- 30
- Recoger los vectores de los tubos FACS marcados usando una jeringa y una aguja y agregarlos al casete de diálisis → retirar el exceso de aire de la membrana, colocar con cuidado el caucho encima del casete y dejarlo flotar en el balde que contiene PBS → dejar toda la noche a temperatura ambiente en un rotor de rotación lenta.
- Al día siguiente:
- 35
- Cebiar la membrana agregando 5 mL de PBS a un filtro centrífugo (Amico Ultra 15; MERCK) → centrifugar durante 5 minutos a 4,000 rpm.
 - Retirar el exceso de PBS del interior de la membrana.
 - Sacar los vectores del casete y cargarlos en la membrana → centrifugar durante 5 minutos a 4,000 rpm.
 - Lavar la membrana con los vectores dentro varias veces, luego recoger en un tubo de centrifuga de 2 mL con filtro de 0.22 µM (Spin-X; COSTAR)
- 40
- Centrifugar durante 3 minutos a 13,000 rpm.
 - Retirar el filtro y tomar alícuotas: 1×100 µL (para inyección), el resto en alícuotas de 10-2 µL.

- Conservar a -80 °C.
- La cuantificación del virus se realizó mediante qRT-PCR con cebadores y sondas para el gen de la luciferasa.

Experimento con ratones

5 El serotipo de AAV elegido fue AAV9 ya que tiene un tropismo por la mayoría de los tejidos y órganos y, por lo tanto, daría una idea de la especificidad de nuestros promotores (evitando problemas de tropismo de AAV). El resultado del experimento fue la actividad de la luciferasa medida visualmente con la 1^{era} lectura a los 5 días después de la inyección. Luego se monitoreó a los ratones semanalmente y después de 35 días, una vez que el vector de control AAV9 con CMV-IE mostró resultados constantes y estables, se estableció una línea base para el perfil de inducción. En este punto se añadió el inductor y se tomaron medidas antes y después de la inducción. Ver a continuación para obtener más detalles.

Ratones:

- Se inyectaron ratones macho adultos CD1 (8 semanas de edad) con un vector AAV9 a través de la vena de la cola.
- Se administró un total de 5×10^{11} copias genómicas del vector/mL por ratón.
- 15 - Se tomaron imágenes de los ratones 5 días después de la inyección. Primero fueron anestesiados y recibieron una inyección intraperitoneal de luciferina (300 µL de stock de luciferina 15 mg/mL). Después de 5 minutos, los ratones fueron colocados en la máquina IVIS y se adquirieron las imágenes.

Imágenes:

- El tiempo de exposición utilizado para las imágenes fue de 1 y 10 segundos.
- 20 - Las imágenes se tomaron una vez a la semana.
- Además, antes de administrar un inductor o represor, se tomaron imágenes de los ratones diariamente durante cuatro días.

Inducción:

- 25 - El inductor (fenobarbital) estaba en una concentración de 5 mg/mL. Los ratones recibieron 10 µL por vía intraperitoneal, es decir, 50 microgramos por ratón (cada ratón pesaba aproximadamente 30 g).

Resultados

30 Los resultados del experimento se pueden ver en la Figura 8. La Figura 8A muestra ratones representativos de cada constructo probado. Se puede ver en este documento que la expresión de PB1 y PB1-2 está confinada al hígado, mientras que el promotor del CMV-IE se expresa en casi todos los tejidos del ratón. Además, a las 0 horas los ratones PB1 y PB1-2 no muestran expresión del gen de la luciferasa, lo que sugiere una expresión estrechamente controlada. Sin embargo, cuando se añade el inductor fenobarbital podemos observar que la expresión tanto de PB1 como de PB1-2 aumenta. Existe cierta variación en las magnitudes y duración de la inducción. Por ejemplo, PB1 induce ~10 veces con una actividad máxima observada a las 9 horas y la inducción se completa a las 24 horas, mientras que PB1-2 tiene un aumento de ~50 veces con una actividad máxima a las 24 horas, y la inducción no se completa hasta 48 horas después de la inyección (Figura 8 B y C). Estos datos corroboran los hallazgos observados en las líneas celulares modelo y demuestran aún más el potencial de uso de este sistema inducible *in vivo*. El sistema tiene un fondo bajo y una buena inducibilidad, incluso cuando el inductor se administra en una dosis 10 veces menor que la recomendada para humanos.

Ejemplo 7 - Variantes de elementos del PBREM

40 Como se discutió anteriormente, el receptor nuclear CAR se une a secuencias de ADN tanto en humanos como en ratones. Como se puede ver en la alineación de secuencias, hay cierta divergencia de secuencia entre las especies. El elemento del PBREM modular de 51 pb se puede dividir en 3 partes distintas (ver la tabla a continuación). 1) La región NR1 (que contiene el elemento NR1) que se cree que es responsable de la mayor parte de la actividad inducible, 2) la región NF1 (que contiene el elemento NF1) que se une a otros receptores nucleares y puede ser responsable de reducir el nivel de fondo en ausencia de CAR activado y 3) la región NR2 (que contiene el elemento NR2) que nuevamente está implicada en la actividad inducible de CAR.

La alineación y delimitación de los componentes que forman el elemento del PBREM se muestra a continuación:

```

Ratón: TCTGFACTTTCCTGACCTTGGCACAGTGCCACCATCAACTTGCCTGACACC 51
Humano ACTGTACTTTCCTGACCTTGAAGAGGTTGGCAGCATGGACTTTCCTGAACCA 51
***** ** * * * * * * * * * *
    
```

(Ratón = SEQ ID NO: 1, Humano = SEQ ID NO: 2)

Tabla 4 - Secuencias del PBREM de ratón y humano:

PBREM de ratón (SEQ ID Nos entre paréntesis)		
Región NR1	Región NF1	Región NR2
TCTGTACTTTCTGACCT (86)	TGGCACAGTGCCACCA (88)	TCAACTTGCCTGACACC (90)
PBREM humano (SEQ ID Nos entre paréntesis)		
Región NR1	Región NF1	Región NR2
ACTGTACTTTCTGACCC (87)	TGAAGAGGTGGCAGCA (89)	TGGACTTTCCTGAACCA (91)

5 En los ejemplos anteriores, las variantes de los promotores utilizados contenían un elemento del PBREM de
 10 ratón. Para confirmar nuestra expectativa de que el elemento del PBREM humano también podría usarse,
 también evaluamos la inducibilidad del PBREM humano; esto es potencialmente relevante porque uno de los
 15 objetivos de este proyecto es proporcionar promotores inducibles para su uso en terapia génica humana, y la
 secuencia humana puede tener algunas ventajas. Además, también evaluamos híbridos humanos y de ratón
 del elemento del PBREM para determinar si podíamos modular o mejorar la inducibilidad y el nivel de fondo de
 los promotores. Estas nuevas combinaciones no se encontrarían en la naturaleza en ningún contexto, y
 probablemente tendrían características novedosas, e.g., nivel de fondo y de inducción. Los constructos se
 probaron en la estructura principal PGL4.10 como se describió anteriormente y se enumeran a continuación en
 la Tabla 2. Estos fueron: NR1x3-Min TK humano (3 x región NR1 humana con promotor mínimo MinTK);
 PBREM-minTK humano (PBREM humano con promotor mínimo MinTK); hNR1-mNFI-hNR2-Min TK (híbrido
 humano ratón humano con promotor mínimo de MinTK); hNR1-mNFI mNR2-Min TK (híbrido humano ratón
 20 ratón con promotor mínimo MinTK); mNR1 hNFI mNR2-Min TK (híbrido ratón humano ratón con promotor
 mínimo MinTK); mNR1 hNFI hNR-Min TK (híbrido ratón humano humano con promotor mínimo MinTK); hPB-
 SV40 (PBREM humano con promotor mínimo de SV40); y MHM-SV40 (híbrido ratón-humano-ratón con
 promotor mínimo de SV40) - SEQ ID NOs: 59 a 66, respectivamente.

20 Estos constructos se probaron en la línea celular estable Huh7 y en hepatocitos primarios como se describió
 previamente. Además de probar los constructos con el activador CAR humano tradicional CITCO, también
 probamos el compuesto natural flavona. Este es un producto GRAS (generalmente considerado seguro) que
 previamente se ha informado que activa CAR humano y podría ser un fármaco útil para su uso en aplicaciones
 25 de terapia génica debido a su naturaleza no tóxica y sus pocos efectos secundarios. Se ha pronosticado que
 CITCO será relativamente inestable *in vivo*, y no hay datos disponibles sobre la seguridad de su uso en
 humanos, por lo que se prefiere su uso solo en cultivos de tejidos. Además, los resultados *in vivo* presentados
 anteriormente utilizaron fenobarbital como inductor. En algunos contextos, el uso de fenobarbital puede ser
 indeseable, incluso en una dosis 10 veces menor que la recomendada (lo que parece posible a la vista de los
 30 datos anteriores). Por lo tanto, la flavona puede ser un inductor más deseable que mitigue cualquier problema
 de seguridad o regulatorio.

Los resultados de estos experimentos se pueden ver en las Figuras 9 y 10. Estas cifras muestran una
 comparación con el PB1 que se probó *in vivo*. Tanto en la línea celular Huh7 que expresa CAR estable (Figura
 9) como en las células primarias (Figura 10), el PBREM humano (hPB) funciona de manera casi idéntica al
 35 PBREM de ratón (PB1), lo que sugiere que son intercambiables con los promotores mínimos Min-TK y SV40.
 De los híbridos evaluados, todos fueron inducibles a un nivel similar con un fondo similar al PB1, excepto el
 híbrido MHM. Este tiene un fondo más bajo y una actividad general más baja, pero tiene una buena inducción,
 lo que sugiere que puede tener un control de expresión más estricto que el constructo PB1; esto fue
 independiente del contexto del promotor mínimo ya que este híbrido con Min-Tk y SV40 mostró resultados
 40 similares. Todos los constructos fueron inducidos por flavona a un nivel similar al CITCO, lo que demuestra que
 este compuesto es de hecho un inductor útil de los constructos PBREM. Un valor ligeramente atípico en estos
 experimentos fue el constructo compuesto por 3x NR1 de PBREM humano. Tiene un fondo relativamente alto
 y sólo se indujo en la línea celular estable y menos en las células primarias.

A partir de estos experimentos se aplicó un enfoque similar a los ejemplos analizados anteriormente. Los
 mejores monómeros, PBREM humano y el híbrido MHM, se multimerizaron y probaron tanto con el promotor
 45 mínimo Min-Tk como con el promotor mínimo de SV40. Las secuencias de estos multímeros se presentan en
 la Tabla 3. Los promotores fueron: 2xhPB SV40 (2x elementos del PBREM humano con promotor mínimo de
 SV40); 2xMHM-MinTK (2x híbrido ratón humano ratón con promotor mínimo de MinTK); 2xMHM-SV40 (2x
 híbrido ratón humano ratón con promotor mínimo de SV40); 3xhPB minTK (3x elementos del PBREM humanos
 con promotor mínimo MinTK); y 3xhPB-SV40 (3x elementos del PBREM humanos con promotor mínimo de
 50 SV40) - SEQ ID NOs: 67 a 71, respectivamente.

La expresión e inducción de estos promotores se evaluó utilizando CITCO y flavona tanto en la línea celular estable que expresa CAR Huh7 como en hepatocitos primarios como se describió previamente.

Los resultados se pueden ver en las Figuras 11 y 12. La comparación aquí es con el PB1-2 de los ejemplos anteriores. Se puede observar que todos los promotores multímeros inducen en alto grado con ambos compuestos y que todos tienen un fondo muy bajo independientemente del promotor mínimo utilizado. Además, pueden tener un mejor desempeño 2xMHM y 3xhPB con todos los niveles de expresión más altos que fueron observados para pB1-2 y niveles de fondo comparables. Esto sugiere que algunos de los nuevos promotores pueden comportarse mejor *in vivo*, y también ofrece más opciones para controlar la expresión génica según sea necesario.

5

10 Secuencias

Tabla 1 - Elementos del PBREM, variantes y partes de los mismos

Nombre	Secuencia (SEQ ID NO)
PBREM (ratón/rata)	<u>TCTGTACTTTCCTGACCTTGGCACAGTGCCACCATCAACTTGCCTGACACC</u> (1)
PBREM (humano)	<u>ACTGTACTTTCCTGACCCTGAAGAGGTGGCAGCATGGACTTTCCTGAACCA</u> (2)
Motivo NR1 de PBREM (ratón/rata)	TGTACTTTCCTGACCT (3)
Motivo NR1 de PBREM (humano)	TGTACTTTCCTGACCC (4)
Secuencia de NR1 3x (ratón)	gatcTCTGTACTTTCCTGACCTTgcatcgatcTCTGTACTTTCCTGACCTTgcatcgatcTCTGTACTTTCCTGACCTTgcatc (5)
Secuencia de NR1 3x (humana)	gatcACTGTACTTTCCTGACCCTgcatcgatcACTGTACTTTCCTGACCCTGgcatcgatcACTGTACTTTCCTGACCCTGgcatc (6)
Motivo NF1 de PBREM (ratón/rata)	TGGCACAGTGCCA (55)
Motivo NF1 de PBREM (humano)	TGAAGAGGTGGCA (56)
Motivo NR2 de PBREM (ratón/rata)	<u>TCAACTTGCCTGACAC</u> (57)
Motivo NR2 de PBREM (humano)	<u>TGGACTTTCCTGAACC</u> (58)

NR1motivo subrayado, motivo NF1 en negrita y motivo NF2 doble subrayado

Tabla 2 - Promotores inducibles que comprenden el elemento del PBREM de ratón

Nombre	Secuencia (SEQ ID NO)
PB1-MinTK	<u>TCTGTACTTTCCTGACCTTGGCACAGTGCCACCATCAACTTGCCTGACACCGATCCGGCCCCGCCAGC</u> GTCTTGTCAATTGGCGAATTCGAACACGCAGATGCAGTCGGGGCGGCGCGGTCCGAGGTCCACT TCGC ATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGACCCCTGCAGCGACCCGCTTAACAGCGTCA ACAGCGTGCCCGAGATCTCGAGGAGCTTGGCGAGATTTTCAGGAGCTAAGGAAGCTAAAC (7)

ES 3 021 683 T3

PB1-CMV-MP	<u>TCTGTACTTTCCTGACCTTGGCACAGTGCCACCATCAACTGCCTGACACCCGCTGGGAGTTCGTAGACG</u> <u>GAGCGATTAATCCATATGCAGGTCTATAAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTAGA</u> <u>TACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGATCGCCACCC (8)</u>
PB1-SV40-MP	<u>TCTGTACTTTCCTGACCTTGGCACAGTGCCACCATCAACTGCCTGACACCCGCTGGGAGTTCGTAGACG</u> <u>GACTAGCCCGGGCTCGAGATCTGCGATCTGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAAC</u> <u>TCCGCCATCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCGCCATTCTCCGCCCATCGTGACTAATTTTTTTT</u> <u>ATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTT</u> <u>GAGGCCATAGGCTTTGCAAAAAGCTTGGCATTCCGGTACTGTTGGTAAAGCCACCC (9)</u>
PB1-MinTK y EPO	<u>GGCCTAACTGGCCGGTACTCTGTACTTTCCTGACCTTGGCACAGTGCCACCATCAACTGCCTGACACC</u> <u>GATCCGGCCCCGCCAGCGTCTTGTCATTGGCGAATTCGAACACGCAGATGCAGTCGGGGCGCGCG</u> <u>GTCCGAGGTCCACTTCGCATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGACCCTGCAGCGA</u> <u>CCCGCTTAACAGCGTCAACAGCGTGCCGAGATCTCGAGGAGCTTGGCGAGATTTTCAGGAGCTAAG</u> <u>GAAGCTAAACATGGGGTGCACGAATGTCCTGGCTGGCTGTGGCTTCTCCTGTCCCTGCTGTGCTCCC</u> <u>TCTGGGCTCCAGTCTGGGCGCCCCACCGCCTCATCTGTGACAGCCGAGTCTGGAGAGGTACC</u> <u>TCTTGGAGGCCAAGGAGGCCGAGAATATCACGACGGGCTGTGCTGAACACTGCAGCTTGAATGAGAA</u> <u>TATCACTGTCCAGACACCAAGTAAATTTCTATGCCTGGAAGAGGATGGAGGTCGGGCAGCAGGCC</u> <u>GTAGAAGTCTGGCAGGGCTGGCCCTGCTGTCGGAAGCTGCTCGGGGCCAGGCCCTGTTGGTCA</u> <u>ACTCTTCCAGCCGTGGGAGCCCTGCAGCTGCATGTGGATAAAGCCGTCAGTGGCTTCGCAGCCCTC</u> <u>ACCACTCTGCTTCGGGCTCTGGGAGCCAGAAAGGACCATCTCCCTCCAGATGCGGCCCTCAGCTGC</u> <u>TCCACTCCGAACAATCACTGCTGACACTTCCGCAAACCTTCCGAGTCTACTCCAATTTCTCCGGGGA</u> <u>AAGCTGAAGCTGTACACAGGGGAGGCTGCAGGACAGGGACAGATGATCTAGAGTCGGGGCGGCC</u> <u>GGCCGCTTCGAGCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAAGTGAATGCAGTG</u> <u>AAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAA</u> <u>CAAGTT (19)</u>
PB1-1-MinTk (2xPBREM)	<u>TCTGTACTTTCCTGACCTTGGCACAGTGCCACCATCAACTGCCTGACACCCATTACTCGCATCCATTCT</u> <u>CTCTGTACTTTCCTGACCTTGGCACAGTGCCACCATCAACTGCCTGACACCCGCTGGGAGTTCGTAGAC</u> <u>GGAGATCCGGCCCCGCCAGCGTCTTGTCATTGGCGAATTCGAACACGCAGATGCAGTCGGGGCGGC</u> <u>GCGGTCCGAGGTCCACTTCGCATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGACCCTGCA</u> <u>GCGACCCGCTTAACAGCGTCAACAGCGTGCCGAGATCTCGAGGAGCTTGGCGAGATTTTCAGGAGC</u> <u>TAAGGAAGCTAAAC (10)</u>
PB1-2-MinTk (3xPBREM)	<u>TCTGTACTTTCCTGACCTTGGCACAGTGCCACCATCAACTGCCTGACACCCATTACTCGCATCCATTCT</u> <u>CTCTGTACTTTCCTGACCTTGGCACAGTGCCACCATCAACTGCCTGACACCCGACTGAAGGTCTCAA</u> <u>TCGTCTGTACTTTCCTGACCTTGGCACAGTGCCACCATCAACTGCCTGACACCCGCTGGGAGTTCGTAG</u> <u>ACGGAGATCCGGCCCCGCCAGCGTCTTGTCATTGGCGAATTCGAACACGCAGATGCAGTCGGGGCG</u> <u>GCGCGGTCCGAGGTCCACTTCGCATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGACCCTGC</u> <u>AGCGACCCGCTTAACAGCGTCAACAGCGTGCCGAGATCTCGAGGAGCTTGGCGAGATTTTCAGGAG</u> <u>CTAAGGAAGCTAAAC (11)</u>
PB1-3-MinTk	<u>TCTGTACTTTCCTGACCTTGGCACAGTGCCACCATCAACTGCCTGACACCCATTACTCGCATCCATTCT</u> <u>CTCTGTACTTTCCTGACCTTGGCACAGTGCCACCATCAACTGCCTGACACCCGACTGAAGGTCTCAA</u> <u>TCGTCTGTACTTTCCTGACCTTGGCACAGTGCCACCATCAACTGCCTGACACCCGACTGGGAGTTCGTAG</u> <u>CAATATCTGTACTTTCCTGACCTTGGCACAGTGCCACCATCAACTGCCTGACACCCGCTGGGAGTTCGT</u> <u>AGACGGAGATCCGGCCCCGCCAGCGTCTTGTCATTGGCGAATTCGAACACGCAGATGCAGTCGGGG</u> <u>CGGCGCGTCCGAGGTCCACTTCGCATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGACCCT</u> <u>GCAGCGACCCGCTTAACAGCGTCAACAGCGTGCCGAGATCTCGAGGAGCTTGGCGAGATTTTCAGG</u> <u>AGCTAAGGAAGCTAAAC (12)</u>
PB1-1-SV40	<u>TCTGTACTTTCCTGACCTTGGCACAGTGCCACCATCAACTGCCTGACACCCATTACTCGCATCCATTCT</u> <u>CTCTGTACTTTCCTGACCTTGGCACAGTGCCACCATCAACTGCCTGACACCCGCTGGGAGTTCGTAGAC</u> <u>GGACTAGCCCGGGCTCGAGATCTGCGATCTGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAA</u> <u>CTCCGCCATCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCGCCATTCTCCGCCCATCGTGACTAATTTTTTT</u> <u>TATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTT</u> <u>GGAGGCCATAGGCTTTTGCAAAAGCTTGGCATTCCGGTACTGTTGGTAAAGCCACCC (13)</u>
PB1-2-SV40	<u>TCTGTACTTTCCTGACCTTGGCACAGTGCCACCATCAACTGCCTGACACCCATTACTCGCATCCATTCT</u> <u>CTCTGTACTTTCCTGACCTTGGCACAGTGCCACCATCAACTGCCTGACACCCGACTGAAGGTCTCAA</u> <u>TCGTCTGTACTTTCCTGACCTTGGCACAGTGCCACCATCAACTGCCTGACACCCGCTGGGAGTTCGTAG</u> <u>ACGGACTAGCCCGGGCTCGAGATCTGCGATCTGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCT</u> <u>AACTCCGCCATCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCGCCATTCTCCGCCCATCGTGACTAATTTTTT</u> <u>TTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTT</u> <u>TTGGAGGCCATAGGCTTTTGCAAAAGCTTGGCATTCCGGTACTGTTGGTAAAGCCACCC (14)</u>

ES 3 021 683 T3

PB1-3-SV40	TCTGTA CTTT CCTGACCTTGGCACAGTGCCACCATCAACTTGCCTGACACCCATTACTCGCATCCATTCTCTCTGTA CTTT CCTGACCTTGGCACAGTGCCACCATCAACTTGCCTGACACCGCACTGAAGGTCCTCAA T CGTCTGTA CTTT CCTGACCTTGGCACAGTGCCACCATCAACTTGCCTGACACCGCTGACCTCCTGCCAGCAATATCTGTA CTTT CCTGACCTTGGCACAGTGCCACCATCAACTTGCCTGACACCGCTGGGAGTTCGTAGACGGACTAGCCCGGGCTCGAGATCTGCGATCTGCATCTCA ATT AGTCAGCA ACC ATAGTCCCGCC CCT AACTCCGCCCATCCCGCCC CT AACTCCGCCCAGTTCGGCC ATT CTCCGCCCCATCGCTGACTAATTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGC TTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTTGCAAAAAGCTTGGCATTCCGGTACTGTTGGTAAAGCCACCC (15)
PB1-1-CMV	TCTGTA CTTT CCTGACCTTGGCACAGTGCCACCATCAACTTGCCTGACACCCATTACTCGCATCCATTCTCTCTGTA CTTT CCTGACCTTGGCACAGTGCCACCATCAACTTGCCTGACACCGCTGGGAGTTCGTAGACGGAGCGATTAATCCATATGCAGGTCTATAAAGCAGAGCTCGTTT AGTGA ACCCTCAGATCGCC TAGATACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGATCGCCACCC (16)
PB1-2-CMV	TCTGTA CTTT CCTGACCTTGGCACAGTGCCACCATCAACTTGCCTGACACCCATTACTCGCATCCATTCTCTCTGTA CTTT CCTGACCTTGGCACAGTGCCACCATCAACTTGCCTGACACCGCACTGAAGGTCCTCAA T CGTCTGTA CTTT CCTGACCTTGGCACAGTGCCACCATCAACTTGCCTGACACCGCTGGGAGTTCGTAGACGGAGCGATTAATCCATATGCAGGTCTATAAAGCAGAGCTCGTTT AGTGA ACCCTCAGATCGCC TAGATACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGATCGCCACCC (17)
PB1-3-CMV	TCTGTA CTTT CCTGACCTTGGCACAGTGCCACCATCAACTTGCCTGACACCCATTACTCGCATCCATTCTCTCTGTA CTTT CCTGACCTTGGCACAGTGCCACCATCAACTTGCCTGACACCGCACTGAAGGTCCTCAA T CGTCTGTA CTTT CCTGACCTTGGCACAGTGCCACCATCAACTTGCCTGACACCGCTGACCTCCTGCCAGCAATATCTGTA CTTT CCTGACCTTGGCACAGTGCCACCATCAACTTGCCTGACACCGCTGGGAGTTCGTAGACGGAGCGATTAATCCATATGCAGGTCTATAAAGCAGAGCTCGTTT AGTGA ACCCTCAGATCGCC CTAGATACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGATCGCCACCC (18)
NR1x3-MinTK humano	ACTGTA CTTT CCTGACCTGAAGAGACTGTACTTTCTGACCTGAAGAGACTGTACTTTCTGACCTGAAGAGGATCCGGCCCCCGCCAGCGTCTTGT CATT GGCGAATTCGAACACGCAGATGCAGTCGGGGCGCGGGTCCGAGGTCCACTT CGCATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCCTCGAACACCCGAGCGACCTGCAGCGACCCGCTTAACAGCGTCAACAGCGTCCGAGATCTCGAGGAGCTTGGCGAGATTTTCAGGAGCT (59)
PBREM-MinTK humano	ACTGTA CTTT CCTGACCTGAAGAGGTGGCAGCATGGACTTTCTGAACCAGATCCGGCCCCGCCAGCGTCTTGT CATT GGCGAATTCGAACACGCAGATGCAGTCGGGGCGCGGGTCCGAGGTCCACTT CGCATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCCTCGAACACCCGAGCGACCTGCAGCGACCCGCTTAACAGCGTCAACAGCGTCCGAGATCTCGAGGAGCTTGGCGAGATTTTCAGGAGCTAAGGAAGCTAAACATGGAA GATGCCAAAAACATTAAG (60)
hNR1-mNFI-hNR2-MinTK (HMH MinTK)	ACTGTA CTTT CCTGACCTGGCACAGTGCCACCATGGACTTTCTGAACCAGATCCGGCCCCGCCAGCGTCTTGT CATT GGCGAATTCGAACACGCAGATGCAGTCGGGGCGCGGGTCCGAGGTCCACTT CGCATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCCTCGAACACCCGAGCGACCTGCAGCGACCCGCTTAACAGCGTCAACAGCGTCCGAGATCTCGAGGAGCTTGGCGAGATTTTCAGGAGCTAAGGAAGCTAAACATGGAA GATGCCAAAAACATTAAG (61)
hNR1-mNFI mNR2-MinTK (HMM MinTK)	ACTGTA CTTT CCTGACCTGGCACAGTGCCACCATCAACTTGCCTGACACCGATCCGGCCCCGCCAGCGTCTTGT CATT GGCGAATTCGAACACGCAGATGCAGTCGGGGCGCGGGTCCGAGGTCCACTT CGCATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCCTCGAACACCCGAGCGACCTGCAGCGACCCGCTTAACAGCGTCAACAGCGTCCGAGATCTCGAGGAGCTTGGCGAGATTTTCAGGAGCTAAGGAAGCTAAACATGGAA GATGCCAAAAACATTAAG (62)
mNR1-hNFI-mNR2-MinTK (MHM MinTK)	TCTGTA CTTT CCTGACCTTGAAGAGGTGGCACCATCAACTTGCCTGACACCGATCCGGCCCCGCCAGCGTCTTGT CATT GGCGAATTCGAACACGCAGATGCAGTCGGGGCGCGGGTCCGAGGTCCACTT CGCATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCCTCGAACACCCGAGCGACCTGCAGCGACCCGCTTAACAGCGTCAACAGCGTCCGAGATCTCGAGGAGCTTGGCGAGATTTTCAGGAGCTAAGGAAGCTAAACATGGAA GATGCCAAAAACATTAAG (63)
mNR1-hNFI hNR2-MinTK (MHH MinTK)	TCTGTA CTTT CCTGACCTTGAAGAGGTGGCAGCATGGACTTTCTGAACCAGATCCGGCCCCGCCAGCGTCTTGT CATT GGCGAATTCGAACACGCAGATGCAGTCGGGGCGCGGGTCCGAGGTCCACTT CGCATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCCTCGAACACCCGAGCGACCTGCAGCGACCCGCTTAACAGCGTCAACAGCGTCCGAGATCTCGAGGAGCTTGGCGAGATTTTCAGGAGCTAAGGAAGCTAAACATGGAA GATGCCAAAAACATTAAG (64)

ES 3 021 683 T3

hPB-SV40	<u>ACTGTACTTTCTGACCCTGAAGAGGTGGCAGCATGGACTTTCTGAACCAGCTGGGAGTTCGTAGAC</u> GGACTAGCCCGGGCTCGAGATCTGCGATCTGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAA CTCCGCCCATCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCCGCCATTCTCCGCCCATCGCTGACTAATTTTTTT TATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTT GGAGGCCTAGGCTTTTGAAAAAGCTTGGCATTCCGGTACTGTTGGTAAAGCCACCC (65)
MHM-SV40	<u>TCTGTACTTTCTGACCTGAAGAGGTGGCACCATCAACTGCCTGACACCCTGGGAGTTCGTAGAC</u> GGACTAGCCCGGGCTCGAGATCTGCGATCTGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAA CTCCGCCCATCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCCGCCATTCTCCGCCCATCGCTGACTAATTTTTTT ATTTATGhPBCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTT TGGAGGCCTAGGCTTTTGAAAAAGCTTGGCATTCCGGTACTGTTGGTAAAGCCACCC (66)
2xhPB SV40	<u>ACTGTACTTTCTGACCCTGAAGAGGTGGCAGCATGGACTTTCTGAACCACATTACTCGCATCCATTC</u> TCACTGTACTTTCTGACCCTGAAGAGGTGGCAGCATGGACTTTCTGAACCAGCTGGGAGTTCGTAG ACGGACTAGCCCGGGCTCGAGATCTGCGATCTGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCT AACTCCGCCCATCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCCGCCATTCTCCGCCCATCGCTGACTAATTTTT TTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTT TGGAGGCCTAGGCTTTTGAAAAAGCTTGGCATTCCGGTACTGTTGGTAAAGCCACCC (67)
2xMHM- MinTK	<u>TCTGTACTTTCTGACCTGAAGAGGTGGCACCATCAACTGCCTGACACCATTACTCGCATCCATTCT</u> CTCTGTACTTTCTGACCTGAAGAGGTGGCACCATCAACTGCCTGACACCCTGGGAGTTCGTAGA CGGAGATCCGGCCCCGCCAGCGTCTTGTATTGGCGAATTCGAACACGCAGATGCAGTCGGGGCGG CGCGGTCCGAGGTCCACTT CGCATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGACCTTGCA GCGACCCGCTTAACAGCGTCAACAGCGTCCCGCAGATCTCGAGGAGCTTGGCGAGATTTTCAGGAGC TAAGGAAGCTAAAC (68)
2xMHM- SV40	<u>TCTGTACTTTCTGACCTGAAGAGGTGGCACCATCAACTGCCTGACACCATTACTCGCATCCATTCT</u> CTCTGTACTTTCTGACCTGAAGAGGTGGCACCATCAACTGCCTGACACCCTGGGAGTTCGTAGA CGGACTAGCCCGGGCTCGAGATCTGCGATCTGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTA ACTCCGCCCATCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCCGCCATTCTCCGCCCATCGCTGACTAATTTTTT TTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTT TGGAGGCCTAGGCTTTTGAAAAAGCTTGGCATTCCGGTACTGTTGGTAAAGCCACCC (69)
3xhPB- minTK	<u>ACTGTACTTTCTGACCCTGAAGAGGTGGCAGCATGGACTTTCTGAACCACATTACTCGCATCCATTC</u> TCACTGTACTTTCTGACCCTGAAGAGGTGGCAGCATGGACTTTCTGAACCAGCACTGAAGGTCCCTC AATCGACTGTACTTTCTGACCCTGAAGAGGTGGCAGCATGGACTTTCTGAACCAGCTGGGAGTTCG TAGACGGAGATCCGGCCCCGCCAGCGTCTTGTATTGGCGAATTCGAACACGCAGATGCAGTCGGG GCGGGCGGTCCGAGGTCCACTT CGCATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGACC CTGCAGCGACCCGCTTAACAGCGTCAACAGCGTCCCGCAGATCTCGAGGAGCTTGGCGAGATTTCA GGAGCTAAGGAAGCTAAAC (70)
3xhPB-SV40	<u>ACTGTACTTTCTGACCCTGAAGAGGTGGCAGCATGGACTTTCTGAACCACATTACTCGCATCCATTC</u> TCACTGTACTTTCTGACCCTGAAGAGGTGGCAGCATGGACTTTCTGAACCAGCACTGAAGGTCCCTC AATCGACTGTACTTTCTGACCCTGAAGAGGTGGCAGCATGGACTTTCTGAACCAGCTGGGAGTTCG TAGACGGACTAGCCCGGGCTCGAGATCTGCGATCTGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCC CCTAACTCCGCCCATCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCCGCCATTCTCCGCCCATCGCTGACTAAT TTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGC TTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGAAAAAGCTTGGCATTCCGGTACTGTTGGTAAAGCCACCC (71)

Los elementos del PBREM están subrayados; el promotor mínimo está en negrita; las secuencias genéticas están doblemente subrayadas.

ES 3 021 683 T3

Tabla 3 – Constructos y otras secuencias

Nombre	Secuencia (SEQ ID NO)
Plásmido original pAAV-ZsGreen	<p>AGCGCCAATACGAAACCGCCTCTCCCCGCGGTTGGCCGATTCAATGACAGCTGGCACGACAGG TTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACC CCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACAC AGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTGCCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGG CCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTGGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGC GCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTCTATCGATATCAAGCTTTAATAGTAATCAAT TACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTACGGTAAATGGCCCGC CTGGTGACCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCATAGTAACGCCA ATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCA AGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATG CCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCAT GGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGT CTCACCCCAATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGGTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGT AACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAG CTGGTTAGTGGATATCCTAAGGGCCAGCCGGCCGAATCCCGCCGGGAACGGTGCATTGGAAC GCGGATCCCGTGCCAAGAGTACGTAAGTACCGCCTATAGAGTCTATAGCCCAAAAAATGCTT TCTTCTTTAATATACTTTTTTGTATCTTATTTCTAATACTTTCCCTAATCTCTTTCTTCAGGGCAATA ATGATACAATGTATCATGCCTTTTGCACCATTTCTAAGAATAACAGTGATAATTTCTGGGTTAAGGCA ATAGCAATATTTCTGCATATAAATTTCTGCATATAAATTTGTAAGTATGTAAGAGTTTCATATTGCT AATAGCAGCTACAATCCAGTACCATTCTGCTTTTATTTTATGGTTGGGATAAGGCTGATTATTCTGA GTCCAAGCTAGGCCCTTTGCTAATCATGTTACATACCTTTATCTTCTCCACAGCTCCTGGGCAACGT GCTGCTGTGTGCTGCCCCATCACTTTGGCAAAGAATTGGGATTCGCGAGAATTCGCCACCATGGCC CAGTCCAAGCACGGCCTGACCAAGGAGATGACCATGAAGTACCGCATGGAGGGCTCGTGGACGGC CACAAGTTCGTGATCACCGGCGAGGGCATCGGCTACCCCTTCAAGGGCAAGCAGGCCATCAACCTGT GCGTGGTGGAGGGCGGCCCTTGCCTTCGCCGAGGACATCTTGTCCGCGCCTTCATGTACGGCAAC CGCGTGTACCCGAGTACCCCAAGGACATCGTCGACTACTTCAAGAACTCCTGCCCGCCGGCTACAC CTGGGACCGCTCCTTCTGTTGAGGACGGCGCGGTGTGCATCTGCAACGCCGACATCACCGTGAGCG TGGAGGAGAAGTGCATGTACCACGAGTCCAAGTTCTACGGCGTGAACITCCCGCCGACGGCCCCGT GATGAAGAAGATGACCGACAACCTGGGAGCCCTCCTGCGAGAAGATCATCCCCGTGCCAAGCAGGGC ATCTTGAAGGGCGAGTGTGACATGTACCTGCTGCTGAAGGACGGTGGCCGCTTGCCTGCCAGTTG ACACCGTGTACAAGGCCAAGTCCGTGCCCGCAAGATGCCGACTGGCACTTCATCCAGCACAAGCTG ACCCGCAGGACCGCAGCGACGCCAAGAACCAGAAGTGGCACCTGACCGAGCACGCCATCGCCTCCG GCTCCGCTTGCCTGATAAGGATCCACGGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCCAGTGCCTCTCCTGGC CCTGGAAGTTGCCACTCCAGTGCCACCAGCCTTGTCTAATAAAATTAAGTTGCATCATTGTCTGA</p>

	<p>CTAGGTGCCTTCTATAATATTATGGGGTGGAGGGGGTGGTATGGAGCAAGGGGCAAGTTGGGAA GACAACCTGTAGGGCCTGCGGGTCTATTGGGAACCAAGCTGGAGTGCAGTGGCACAATCTTGGCTC ACTGCAATCTCCGCCCTCTGGGTTCAAGCGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTTGTTGGGATTCCAG GCATGCATGACCAGGCTCAGCTAATTTTGTGTTTTTGGTAGAGACGGGGTTTACCATATTGGCCAG GCTGGTCTCCAACCTCCTAATCTCAGGTGATCTACCCACCTTGGCCTCCCAAATGTCTGGGATTACAGGC GTGAACCACTGCTCCCTTCCCTGTCCTATCGATAGATCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACT CCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGACCAAAGGTCGCCGACGCCGGGCTTTGC CCGGGCGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCTGCAAGGCAGCTTGGCACTGCGCGTCTGTTT TACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCG CCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGG CGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTCTCCTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATACGTCAAAG CAACCATAGTACGCGCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGA CCGCTACACTGGCAGCGCCTAGCGCCGCTCCTTTCGCTTCTTCCCTCCTTCTCGCCACGTTCCGCC GGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTATAGGGTCCGATTTAGTGCTTACCGCACCTC GACCCCAAAAACCTGATTTGGGTGATGTTTACGTAGTGGGCCATGCCCTGATAGACGGTTTTTCG CCCTTTCAGCTTGGAGTCCAGTCTTTAATAGTGGACTCTGTTCCAACTGGAACAACACTCAACCC TATCTCGGGCTATCTTTTATTATAAGGGATTTGCCGATTTCCGGCCTATTGGTTAAAAATGAGCT GATTTAACAAAAATTAACGCGAATTTAACAAAAATTAACGTTTACAATTTATGGTGCCTCTCAGT ACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTG ACGGGCTTGTCTGCTCCCGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGT AGAGGTTTTACCGTCATACCGAAACGCGGAGACGAAAGGGCCTCGTATACGCTATTTTTATAG GTTAATGTCATGATAAATGTTTTCTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGAAATGTGCGCGGAAC CCCTATTTGTTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGATCCGCTCATGAGACAATAACCTGATAAAT CTCAATAATATTGAAAAAGGAAGATGATGATTAACAATTTCCGTGTCGCCCTTATCCCTTTTTTG CGGCATTTGCCCTCCTGTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAG TTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAAGTGGATCTCAACGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCC CGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGA CGCCGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACAG TCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAAATATGCAGTGTGCCATAACCATGAG TGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGTTTTTGC ACAACATGGGGGATCATGTAAGTGCCTTGTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAA CGACGAGCGTGACACCACGATGCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACCTGGCGAA CTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACT TCTGCGCTCGGCCCTCCGGCTGGTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGGAGCGTGGTCTC GCGGTATCATTGACGACTGGGCGCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGG GAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCAT TGGAACGTGTCAGACCAAGTTACTCATATATACTTATGATTGATTTAAAACCTCATTTTAATTTAAA GGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTAACGTGAGTTTTCGTTCCACT GAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTGAGATCCTTTTTTTCGCGGTAATCTGCT GCTTGCAAAACAAAAAACCCGCTACCCAGCGGTGGTTTGTGGCGGATCAAGAGTACCAACTCTT TTTTCCGAAGGTAAGTGGCTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATCTGTTCTTAGTGTAGCCGTAGTT AGGCCACCACTCAAGAACTCTGTAGCACCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAAGTGGC TGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTCTTACCGGGTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCG CAGCGTCCGGCTGAACGGGGGTTCTGTGCACACGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAA CTGAGATACCTACAGCGTGAAGTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGG TATCCGGTAAGCGGCAGGGTGGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCGCTG GTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTCGCCACTCTGACTTGAGCGTCGATTTTGTGATGCTCGTCAGG GGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCTTTTACGTTTCTGCGCTTTTGTGCGCTT TTGCTCACATGTTCTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCTTTGAGTGAGC TGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAAGTGCAGGAGGAAAGCGGAAG (48)</p>
<p>pAAV-PB1- MinTk</p>	<p>TGCCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTGGGC GACCTTTGGTCCCGGCCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACT AGGGGTTCTATCGATATCAAGCTTCTGTACTTTCCTGACCTTGGCACAGTGCCACCATCAACTTGCCT GACACCGATCCGGCCCCCGCCAGCGTCTTGTATTGGCGAATTCGAACACGCGAGATGCAGTCCGGGC GGCGCGTCCGAGGTCCACTTCGCATATTAAGGTGACGCGTGTGGCCTCGAACACCGAGCGACCTG CAGCGACCCGTTAACAGCGTCAACAGCGTCCCGCAGATCTCGAGGAGCTTGGCGAGATTTTCAGGA GCTAAGGAAGCTAAACATGGAAGATGCCAAAACATTAAGAAGGGCCAGCGCCATTTACCCACTC GAAGACGGGACCGCGGCGAGCAGCTGCACAAAECATGAAGCGCTACGCCCTGGTGGCCGGCACCC ATCGCCTTACCGACGCACATATCGAGGTGGACATTACCTACGCCGAGTACTTCGAGATGAGCGTTCG</p>

GCTGGCAGAAGCTATGAAGCGCTATGGCTGAATACAAACCATCGGATCGTGGTGTGCAGCGAGAAT
AGCTTGCAGTTCITCATGCCCGTGTGGGTGCCCTGTTTCATCGGTGTGGCTGTGCCCCAGCTAACGA
CATCTACAACGAGCGCGAGCTGCTGAACAGCATGGGCATCAGCCAGCCCACCGTCTATTCTGTGAGC
AAGAAAGGGCTGCAAAAGATCCTCAACGTGCAAAAGAAGCTACCGATCATACAAAAGATCATCATCA
TGGATAGCAAGACCGACTACCAGGGCTTCCAAAGCATGTACACCTTCGTGACTTCCCATTTGCCACCC
GGCTTCAACGAGTACGACTTCGTGCCCGAGAGCTTCGACCCGGACAAAACCATCGCCCTGATCATGAA
CAGTAGTGGCAGTACCGGATTGCCAAGGGCTAGCCCTACCGCACCGCACCCTTGTGTCCGATTCA
GTCATGCCCGCGACCCCATCTTCGGCAACCCAGATCATCCCCGACACCGCTATCCTCAGCGTGGTCCAT
TTCACCACGGCTTCGGCATGTTACCACGCTGGGCTACTTGATCTGCGGCTTCGGGTCGTGCTCATGT
ACCGCTTCGAGGAGGACTATTCTTGCAGCTTGAAGACTATAAGATTCAATCTGCCCTGCTGGTG
CCCACACTATTTAGCTTCTTCGCTAAGAGCACTCTCATCGACAAGTACGACCTAAGCAACTGCACGAG
ATCGCCAGCGGGGGCGCCGCTCAGCAAGGAGGTAGGTGAGGCGGTGGCCAAACGCTTCCACCTA
CCAGGCATCCGCGAGGCTACGGCCTGACAGAAACAACCCAGCGCCATTCTGATCACCCCGAAGGGG
ACGACAAGCCTGCGCAGTAGGCAAGGTGGTCCCTTCTCGAGGCTAAGTGGTGGACTTGGACAC
CGGTAAGACTGGGTGTGAACCAGCGCGGGAGCTGTGCGTCCGTGGCCCATGATCATGAGCGGC
TAGCTTAAACACCCCGAGGCTACAAACGCTCTCATCGACAAGGACGGCTGGCTGCACAGCGCGACA
TCGCCTACTGGGACGAGGACGAGCACTTCTTCATCGTGACCCGGCTGAAGAGCCTGATCAATACAA
GGGCTACCAGGTAGCCCGACCGAAGTGGAGAGCATCCTGCTGCAACACCCCAACATCTTCGACGCC
GGGTTCGCGCCCTGCCGACGACGATGCCGGCAGCTGCCCGCGAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG
GGTAAAACCATGACCGAGAAGGAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG
CTGCGCGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG
AGATCCGCGAGATTCTCATTAAAGGCAAGAAGGGCGGCAAGATCGCCGTGTAATCGCGAGAATTCTC
TAGAGTGCACACTAGTGGGATCCACGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCAAGTGCCTCTCTGGCC
CTGGAAAGTTCACACTCCAGTGCACCCAGCCCTTGCCTAATAAAAATTAAGTTGCATCATTTTGTCTGAC
TAGGTGTCTTCTATAATATTATGGGGTGGAGGGGGTGGTATGGAGCAAGGGGCAAGTTGGGAAG
ACAACCTGTAGGGCCTGCGGGTCTATTGGGAACCAAGCTGGAGTGCAGTGGCACAATCTTGGCTCA
CTGCAATCTCCGCTCCTGGGTTCAAGCGATTCTCTGCTCAGCCTCCCGAGTTGTTGGGATTCCAGG
CATGCATGACCAGGCTCAGCTAATTTTTGTTTTTGGTAGAGACGGGGTTTACCATATTGGCCAGGC
TGGTCTCAACTCCTAATCTCAGGTGATCTACCCACCTTGGCCTCCAAATTGCTGGGATTACAGGCGT
GAACCACTGCTCCCTTCCCTGTCCTTATCGATAGATCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCC
CTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGCGACCAAAGTTCGCCCCGACCGCCGGGCTTTGCC
GGGGCGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGGCAGCTTGGCACTGGCCGTGTTTTA
CAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACTAATCGCCTTGACAGCACATCCCCCTTTCGCG
AGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCGTGAATGGCG
AATGGCGCTGATGGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATACGTCAAAGCA
ACCATAGTACGGCCCTGTAGCGCGCATTAAAGCGCGGGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG
GCTACACTTGCACGCGCCCTAGCGCCCGCTCTTTTCGCTTCTTCCCTTCTTCTCGCCACGTTTCGCG
GCTTTCGCCGTCAAGCTCAAACTCGGGGCTCCCTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTACGGCACCTCG
ACCCCAAAAACCTGATTTGGGTGATGGTTCAGTGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGC
CCTTTGACGTTGGAGTCCAGTCTTTAATAGTGGACTCTTGTCCAACTGGAAACAACACTCAACCT
ATCTCGGGCTATTCTTTGATTTATAAGGGATTTTCCGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTG
ATTTAACAAAAATTAACCGAATTTAACAAAAATTAACGTTTACAATTTATGTTGCACTCTCAGTA
CAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACCCCGCAAACCCCGTGCACGCGCCCTGA
CGGGCTTGTCTGCTCCCGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCA
GAGGTTTTACCGTCATACCGAAACGCGGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCATTTTTATAGG
TTAATGTGATGATAAATGGTTTTCTAGACGTGAGTGGCACTTTTCCGGGAAATGTGGCGGGAACC
CCTATTTGTTTTTTTTCTAAATACATTCAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCCTGATAAATGC
TTCAATAATTGAAAAAGGAAGATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGC
GGCATTTTGCCTTCTGTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTT
GGGTGCACGAGTGGTTACATCGAAGTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCCGCC
GAAGAAGTTTTCAATGATGAGCACTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGATTATGAC
GCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCCGCCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCACT
CACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGT
GATAACACTGCGGCCAACTTACTTGTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCCTTTTTTGGCA
CAACATGGGGGATCATGTAACCTGCTTGTGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATAACCAAC
GACGAGCGTGCACCCAGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAACTATTAACCTGGCGAAC
TACTTACTAGCTTCCCGCAACAATAAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCCTT
CTGCGCTCGGCCCTTCCGCTGGCTGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAAGCGTGGTCTCG
CGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGA

	<p>GTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTG GTAAGTGTGACACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTCATTTTTAATTTAAAAGG ATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCTGTTCCACTGA GCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGC TTGCAAAACAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGTTTTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTT CCGAAGETAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTAGTGTAGCCGTAGTTAGG CCACCACTCAAGAAGCTGTAGCACCGCTACATACCTCGCTCGTAATCCTGTTACCAGTGGCTGC TGCCAGTGCCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCAGGATAAGGCGCAG CGGTGCGGCTGAACGGGGGTTCTGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTG AGATACTACAGCGTGTAGCTATGAGAAAGCGCCAGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTAT CCGGTAAGCGGCAGGGTCCGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCTGTA TCTTTATAGTCTGTGCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGG GCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGTGCGCTTTT CTCACATGTTCTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCCTTTGAGTGTAGTGA TACCGTCTGCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAAGTGAAGGAGGAAAGCGGAAAGCGCC AATACGAAACCGCCTCTCCCGCGCCTTGGCCGATTCTTAATGAGCTGGCACGACAGGTTCCCG ACTGAAAGCGGGCAGTGAAGCGAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTATTAGGACCCCGAGC TTTACACTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGGAAATGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAA CAGCTATGACCATGATTACGAAT (49)</p>
<p>pAAV-PB1-2- MinTk</p>	<p>GCCTG CAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCAAAGCCCGGCGTGGGGCG ACCTTTGGTCGCCCGGCTCAGTGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCATCACTA GGGGTCTATCGATATCAAGCTTTTCTGCGCTAACTGGCCGGTACTCTGTACTTTCTGACCTTGG CACAGTGCCACCATCAACTTGCCTGACACCCATTACTCGCATCCATTCTCTGTACTTTCTGACCTTG GCACAGTGCCACCATCAACTTGCCTGACACCCGACTGAAGGTCCTCAATGCTGTACTTTCTGACCT TGGCAGAGTGCCACCATCAACTTGCCTGACACCGCTGGGAGTTCGTAGACGGAGATCCGGCCCCGCC AGCGTCTTGTCAATGGCGAATTCGAACACGCGAGATGCAAGTGGGGCGCGCGGTCCGAGGTCCACTT CGCATATTAAGGTGACGCGTGTGGCTCGAACACCGAGCGACCTGCAGCGACCCGCTTAACAGCGT CAACAGCGTGCCGAGATCTCGAGGAGCTTGGCGAGATTTTCAGGAGTAAGGAAGCTAAACATGGA AGATGCCAAAAACATTAAGAAGGGCCAGCGCCTTCTACCCACTCGAAGACGGGACCGCGCGGAG CAGCTGCACAAAGCCATGAAGCGCTACGCCCTGGTCCCGGCACCATCGCCTTACCAGCGCACATAT CGAGGTGGACATTACCTACGCCGAGTACTTCGAGATGAGCGTTCGGCTGGCAGAAGCTATGAAGCGC TATGGGCTGAATACAAACCATCGGATCGTGGTGTGCAGCGAGAATAGCTTGCAGTTCCTCATGCCCGT GTTGGGTGCCCTGTTTCATCGGTGTGGCTGTGCCCCAGCTAACGACATCTACAACGAGCGCGAGCTG CTGAACAGCATGGGCATCAGCCAGCCACCGTCTGATTCTGTGAGCAAGAAAGGGCTGCAAAAGATCC TCAACGTGCAAAAGAAGCTACCGATCATAAAAAGATCATCATATGGATAGCAAGACCGACTACCAG GGCTTCCAAAGCATGTACACCTTGTGACTTCCATTGTCACCCCGCTTCAACGAGTACGACTTCGTG CCCGAGAGCTTGCACCGGGACAAAACCATCGCCCTGATCATGAACAGTAGTGGCAGTACCGGATTGC CCAAGGCGTAGCCCTACCGCACCGCACCGCTTGTGTCCGATTAGTCATGCCCGGACCCCATCTTC GGCAACCAGATCATCCCGACACCGCTATCCTCAGCGTGGTCCATTTACCACGGCTTCGGCATGTTCC ACCACGCTGGGCTACTTGTCTGCGCTTTCGGGTCTGTCTCATGTACCCTTCCAGGAGGAGCTATT CTTGCAGCTTGCAGACTATAAGATTCAATCTGCCCTGCTGGTGGCCACACTATTTAGCTTCTTCGC TAAGAGCACTCTCATCGACAAGTACGACCTAAGCAACTTGACAGAGATCGCCAGCGCGGGGGCGCCG CTCAGCAAGGAGGTAGGTGAGGCCGTGGCCAAACGCTTCCACTACCAGGCATCCGCCAGGGCTACG GCCTGACAGAAACAACCGCCATTCTGATCACCCCGAAGGGGACGACAAGCTTGGCGAGTAGG CAAGGTGGTGCCTTCTCGAGGCTAAGGTGGTGGACTTGGACACCGGTAAGACTGGGTGTGAAC CAGCGCGGCGAGCTGTGCGTCCGTGGCCCATGATCATGAGCGGCTACGTTAAACACCCCGAGGCTA CAAACGCTCTCATCGACAAGGACGGCTGGCTGCACAGCGGCGACATCGCCTACTGGGACGAGGACGA GCACTTCTTTCATCGTGGACCGGCTGAAGAGCCTGATCAAATACAAGGCTACAGGTAGCCCCAGCC GAACTGGAGAGCATCCTGCTGCAACACCCCAACATCTTCGACGCGGGGTCGCCGCTGCCCGACG ACGATGCCGCGGAGCTGCCCGCCGAGTCTGCTGCTGGAAACACGGTAAACCATGACCGAGAAGG AGATCGTGGACTATGTGGCCAGCCAGGTTACAACCGCAAGAAGCTGCGCGGTGGTGTGTTGTTGTT GGACGAGTGCCTAAAGGACTGACCGGCAAGTTGGACGCCGCAAGATCCGGAGATTCTCATTAAAG GCCAAGAAGGGCGCAAGATCGCCGTETAATCGCGAGAATCTCTAGAGTGCACACTAGTGCGGATC CACGGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCAAGTGCCTCTCTGGCCCTGGAAGTTGCCACTCCAGTGGCC ACCAGCCTTGTCTAATAAAAATTAAGTTGCATCATTTGTCTGACTAGGTGCTCTATAATATTATGG GGTGGAGGGGGTGGTATGGAGCAAGGGGCAAGTTGGGAAGACAACCTGTAGGGCCTGCGGGGTC TATTGGGAACCAAGCTGGAGTGCAGTGGCACAATCTTGGCTCACTGCAATCTCCGCTCCTGGGTTCA AGCGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTTGTTGGATTCCAGGCATGCATGACCAAGGCTCAGCTAAT</p>

ES 3 021 683 T3

	<p>TTTTGTTTTTTGGTAGAGACGGGGTTTACCATATTGCCAGGCTGGTCTCCAACCTCTAATCTCAGG TGATCTACCCACCTTGGCCTCCCAAATTGCTGGGATTACAGGCGTGAACCACTGCTCCCTCCCTGTCC TTATCGATAGATCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCAC TGAGGCCGGGCGACCAAAGTTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCCTCAGTGAGCGAGCG AGCGCGCAGCTGCCTGCAGGCAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGCTGACTGGGAAAACC CTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAG GCCCCGACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTT TCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCGCATACGTCAAAGCAACCATAGTACGCGCCCTGTAGC GGCGCATTAAAGCGCGGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCAGCGCCCTAG CGCCCGCTCCTTTCGCTTCTCCCTTCTTCTCGCCACGTTCCGCCGCTTCCCGTCAAGCTCTAAAT CGGGGGCTCCCTTAGGGTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTTGGG TGATGTTACGATAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGTTTTTCGCCCTTTCGCTTGGAGTCCACGTT CTTAATAGTGGACTCTTGTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGGCTATTCTTTTGATTTA TAAGGGATTTGCCGATTTCCGCTATTGGTTAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTAACGCGAA TTTTAACAAAATTAACGTTTACAATTTTATGGTGCCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGATAG TTAAGCCAGCCCGACACCCGCAACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTGTCTGCTCCCGCATC CGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCGGGGAGCTGCATGTGTAGAGGTTTTACCCGTCATCACCGA AACGCGCAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTT TCTTAGACGTCAGGTGGCCTTTTCGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTTATTTTCTAAATA CATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATATATTGAAAAAGGAA GAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCGCCCTATTCCTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCTGTTTTG CTCACCCAGAAACGCTGGTAAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACAT CGAAGTGGATCTCAACAGCGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGA GCACTTTTAAAGTCTGCTATGTGGCGGTAATTATCCCGTATTGACGCGGGCAAGAGCAACTCGGT CGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGA TGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAATTAC TTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTGACAACATGGGGGATCATGTAAT CGCCTTGATCGTTGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCAGATGC CTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAAGTGGCAACTACTTACTCTAGCTTCCCGCAA CAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACACTTCTGCGCTCGGCCCTCCGGCTG GCTGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTTGACAGACTGGG GCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAA CGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAAGTGCAGACCAAGTTTA CTCATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTT GATAATCTCATGACCAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAA GATCAAAGGATCTTCTGAGATCCTTTTTTCTGCGGTAATCTGCTGCTTGAACAACAAAAAACACC GCTACCAGCGGTGGTTTTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCA GCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACCTTCAAGAACTCT GTAGCACCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAAGTGGCTGCTGCCAGTGCGGATAAGTC GTGTCTTACCGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGTCCGGCTGAACGGG GGGTTCTGTCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACCCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAG CTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTC GGAACAGGAGAGCGCACGAGGAGCTTCCAGGGGAAACCGCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGG TTTTGCCACCTCTGACTTGAAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAA CGCCAGCAACGCGGCCCTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGTGGCTTTTGTCCACATGTTCTTCTGCG TTATCCCCTGATCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCCGA ACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAAACCGCTCTC CCCGCGCTTGGCCGATTCTTAATGCAGCTGACACGACAGGTTTTCCCGACTGGAAAGCGGCGAGTG AGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTACACTTTATGCTTCCGG CTCGTATGTTGTGGAAATGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTAC GAATT (50)</p>
<p>Vector de la estructura principal pGL4.10</p>	<p>GGCCTAACTGGCCGGTACCTGAGCTCGCTAGCCTCGAGGATATCAAGATCTGGCCTCGGCGGCCAAG CTTGGAATCCGGTACTGTTGGTAAAGCCACCATGGAAGATGCCAAAAACATTAAGAAGGGCCAGC GCCATTCTACCCACTCGAAGACGGGACCGCCGGCGAGCAGCTGCACAAAGCCATGAAGCGCTACGCC CTGGTCCCCGGCACCATCGCCTTTACCGACGCACATATCGAGGTGGACATTACCTACGCCGAGTACTT CGAGATGAGCGTTCCGCTGGCAGAAAGCTATGAAGCCCTATGGGCTGAATACAAACCATCGGATCGTG GTGTGCAGCGAGAATAGCTTGCAGTCTTCATGCCCGTGTGGGTGCCCTGTTTCATCGGTGTGGCTGT GGCCCCAGCTAACGACATCTACAACGAGCGCGAGCTGCTGAACAGCATGGGCATCAGCCAGCCACC GTCGTATTCGTGAGCAAGAAAGGGCTGCAAAAGATCCTCAACGTGCAAAAAGAGCTACCGATCATA</p>

	<p>AAAAGATCATCATGATAGCAAGACCGACTACCAGGGCTTCCAAAGCATGTACACCTTCGTGACT TCCCATTGCCACCCGGCTTCAACGAGTACGACTTCGTGCCGAGAGCTTCGACCCGGGACAAAACCAT CGCCCTGATCATGAACAGTAGTGGCAGTACCGGATTGCCAAGGGCGTAGCCCTACCGCACCAGCACC GCTTGTGTCGATTCACTCATGCCCGGACCCCATCTTCGGCAACCAGATCATCCCCGACACCGCTATC CTCAGCGTGGTGCCATTTACCACGGCTTCGGCATGTTACCACGCTGGGCTACTTGATCTGCGGCTTT CGGGTCTGTCATGATCCGCTTCGAGGAGGAGCTATTCTTGGCAGCTTGAAGACTATAAGATTCA ATCTGCCCTGCTGGTGCCACACTATTTAGCTTCTTCGCTAAGAGCACTCTCATCGACAAGTACGACCT AAGCAAATTGCACGAGATCGCCAGCGGGCGGGCGCCGCTCAGCAAGGAGGTAGGTGAGGCCGTGGC CAAACGCTTCCACCTACCAGGCATCCGCCAGGGCTACGGCCTGACAGAAACAACCAGCGCCATTCTGA TCACCCCGAAGGGGACGACAAGCCTGGCGCAGTAGGCAAGGTGGTGCCTTCTCGAGGCTAAGGT GGTGGACTTGGACCCGGTAAGACACTGGGTGTGAACCAGCGCGGGCAGCTGTGCGTCCGTGGCCC CATGATCATGAGCGGCTACGTTAACAACCCGAGGCTACAAAACGCTCTCATCGACAAGGACGGCTGG CTGCACAGCGGCGACATCGCCTACTGGGACGAGGACGAGCACTTCTCATCGTGGACCCGGCTGAAGA GCCTGATCAAATACAAGGGCTACCAGGTAGCCCCAGCGAACTGGAGAGCATCTGCTGCAACACC CAACATCTTCGACCGCGGGTTCGCGGCTGCCGACGAGTGGCGGAGCTGCCGCGCAGTCCCGCCGAGTC GTCGTGCTGGAAACCGTAAAACCATGACCGAGAAGGAGATCGTGGACTATGTGGCCAGCCAGGTTA CAACCGCAAAGAAGTGCAGCGGTGGTGTGGTTCGTTGGACGAGGTGCTAAAGGACTGACCGGCAA GTTGGACGCCCGAAGATCCGCGAGATTCTCATTAAAGGCCAAGAAGGGCGGCAAGATCGCCGTGAA TAATCTAGAGTCGGGGCGGGCGGCTTCGAGCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGAC AAAACCAACTAGTAATGCAAGTGAATAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTG TAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCTTTTTATGTTTCAGGTTTCAGG GGGAGGTGTGGGAGGTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTAAATCGATAAGGATCC GTCGACCGATGCCCTTGAGAGCCTTCAACCCAGTCAGCTCCTTCGGTGGGGCGGGGCATGACTATC GTCGCGCACTTATGACTGTCTTCTTATCATGCAACTCGTAGGACAGGTGCCGCGAGCGCTCTCCGC TTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTCGGCTGCCGCGAGCGGTATCAGCTCAAAAGG CGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTAGCAAAAAGGCCAGC AAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGTGGCTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGA GCATCACAATAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAGATACCAGGCG TTTCCCTGGAAGCTCCCTCGTGGCTCTCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCT TTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTG TTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCAGCAACCCCGCTTCCAGCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAAC TATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGAT TAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACT AGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTACTC TTGATCCGGCAAACAACCCAGCTGGTAGCGGTGTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCA GAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAAAAC TCAGTTAAGGGATTTGGTATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATAAAAA TGAAGTTTTAAATCAATCTAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGCGGCCGCAATGCTAAAC CACTGCAAGTGGTTACCAGTCTTGTAGTCACTGAGGACCCGATCTCAGCGATCTGCCTATTTGTTGCTCC ATAGTGGCTGACTCCCCGTCGTGTAGTCACTACGATTCGTGAGGGCTTACCATCAGGCCCGCAGCGC AGCAATGATCCGCGAGAGCCGCTTCAACCGCCCGGATTTGTCAGCAATGAACAGCCAGCAGGG AGGGCCGAGCGAAGAAGTGGTCTGCTACTTTGTCGCGCTCCATCCAGTCTATGAGTCTGCTGCTGA TGCTAGAGTAAGAAGTTCGCCAGTGAAGTTCGAAGAGTTGTGGCCATTGCTACTGGCATCGTG GTATCACGCTCGTTCGGTATGGCTTCGTTCAACTCTGTTCCAGCGGTCAAGCCGGGTACACATG ATCACCATATTGAAGAAATGCACTGAGTCTTACGGGCTCCGATCGTTGTGCAAGTAAGTTGG CCGCGGTGTTGTCGCTCATGGTAATGGCAGCACTACAAATCTCTTACCCTATGCCATCCGTAAGAT GCTTTTCCGTGACCGGCGAGTACTCAACCAAGTCTTTTTGTGAGTAGTATACCGGCGACCAAGCTGC TCTTGCAGCGCTTATACGGGACAAACCCGCGCACATAGCAGTACTTTGAAAGTGTCTATCATCGG GAATCGTCTTCGGGGCGGAAAGACTCAAGGATCTTCCGCTATTGAGATCCAGTTCGATATAGCCCA CTCTTGCACCCAGTGTATCTTCAAGCATCTTTACTTTACCAGCGTTCGGGGTGTGCAAAAACAGGCA AGCAAAATGCCGCAAAGAGGGAAATGAGTGCACACGAAATGTTGGATGCTCATACTCGCTCTTTT CAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTACTAGTACGCTCTCAAGGATAAGTAAGTAATTAAGGTA CGGGAGGTATTGGACAGGCCGCAATAAAATATCTTATTTTATTACATCTGTGTGTTGTTTTTTGTG TGAATCGATAGTACTAACAATACGCTCTCCATCAAAAACAAACGAAACAAAACAACTAGCAAAAATAGG CTGTCCCAAGTGAAGTGCAGGTGCCAGAACATTTCTCT (51)</p>
<p>Promotor comparativo CMV-IE</p>	<p>GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCAATTAGTTCATAGCCCATATATGG AGTTCCGCGTTACATAACTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTG ACGTCAATAATGACGTATGTTCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTCCATTGACGTCAATGGGTGGA GATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGA CGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTG GCAGTACATCTACGTATTAGTACGCTATTACCATGGTATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGC GTGGATAGCGGTTTACTCACGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTGTTT TGGCACCAAAATCAACGGGACTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCAATTGACGCAAAATGGGCGG TAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCT (52)</p>

ES 3 021 683 T3

<p>Control de transfección de β-galactosidasa pcDNA6.0</p>	<p>GACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAG TTAAGCCAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTCGCTGAGTAGTGC GCGAGCAAAATTTAAGC TACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGC TTCCGCGATGTACGGGCCAGATACCGCTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTA CGGGGTCACTTACATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTACGGTAAATGGCCCCGCT GGCTGACCGCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAAT AGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAG TGATCATATGCCAAGTACGCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCCGCAAAACCTTGGCCCC AGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGG TGATGCGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTC AAGTCTC CACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGGTGGCACAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTGCTAA CAACTCCGCCCATTTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCT CTCTGGCTAACTAGAGAACCCTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGAC CCAAGCTGGTAGCGTTAAACTTAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGGAA TTTGCAGATCGAAACGATAGATCGCTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTTGGCCCC ACCCAACCTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCAC CGATCGCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCTTTGCTGTTTTCCGGCACCAG AAGCGGTGCCGGAAGCTGCTGGAGTGGCATCTTCTGAGGCCGATACTGCTGCTGCCCTCAA CTGGCAGATGCACGTTACGATGCGCCCATCTACACCAACGTGACCTATCCCATACGGTCAATCCGC CGTTTTGCCACGGAGAATCCGACGGGTTTACTCGCTCACATTTAATGTTGATGAAAGCTGGCTAC AGGAAGGCCAGACGCGAATATTTTGTATGGCGTTAACTCGGCGTTTCATCTGTGGTGCAACGGGCG CTGGTGGTTACGGCCAGGACAGTCTTTGCCGTCTGAATTTGACCTGAGCGCATTTTTACGGCCCG GAGAAAACCGCCTCGCGGTGATGGTGTCTGCGCTGGAGTGACGGCAGTTATCTGGAAAGATCAGGAT GTGGCGGATGAGCGGCATTTCCGTGACGTCTCGTTGCTGCATAAACCGACTACACAAAATCAGCGATT TCCATGTTGCCACTCGCTTAAATGATGATTTACGCCGCGCTGACTGGAGGCTGAAGTTCAGATGTGC GGCGAGTTGCGTACTACCTACGGGTAAACAGTTCTTTATGGCAGGGTGAACCGCAGGTCGCCAGCG GCACCGCGCCTTTCCGGCGTGAAATATCGATGAGCGGTGGTGTATGCCGATCGCGTCACACTACGT CTGAACGTCGAAAACCGAACTGTGGAGCGCGAAATCCCGAATCTCTATCGTGGCGGTGGTTGA ACTGCACCCGCCGACCGCACGCTGATTGAAGCAGAAGCCTGCGATGTCGGTTTTCCGGCAGGTGCGGATT GAAAATGGTCTGCTGCTGAACGGCAAGCCGTTGCTGATTGAGGCGTTAACCGTCACGAGCATC ATCCTCTGCATGGTCAGGTCAATGGATGAGCAGACGATGGTGACGGATATCCTGCTGATGAAGCAGAA CAACTTTAACCGCGTGGCTGTTCCGATTATCCGAACCATCCGCTGTGGTACACGCTGTGCGACCGCTA CGGCCTGTATGTGGTGGATGAAGCCAATATTGAAACCCACGGCATGGTGCCAATGAATCGTCTGACC GATGATCCGCGCTGGCTACCGCGATGAGCGAACGCGTAACGCGAATGGTGACGCGCATCGTAATC ACCCGAGTGTGATCATCTGCTCGCTGGGGAATGAATCAGGCCACGGCGCTAATCACGACGCGCTGTA TCGCTGGATCAAATCTGTCGATCCTCCCGCCGGTGCAGTATGAAGGCGGGGAGCCGACACCACG GCCACCGATATATTTGCCCGATGTACGCGCGCGTGGATGAAGACCAGCCCTTCCCGGCTGTGCCGAA ATGGTCCATCAAAAAATGGCTTTGCTACCTGGAGAGACGGCGCCCGCTGATCCTTTGCGAATACGCC ACCGATGGGTAACAGTCTTGGCGGTTTTGCTAAATACTGGCAGGCGTTTCGTCAATCCTCCCGTTTA CAGGGCGGCTTCTGCTGGGACTGGGTGGATCAGTCTGATTAAATATGATGAAAACGGCAACCCGT GGTGGCTTACGGCGGTGATTTGGCGATACGCCAAGCATCGCCAGTTCTGTATGAACGGTCTGGTC TTTCCGACCGCACGCCGATCCAGCGCTGACGGAAAGCAAAACACCAGCAGCAGTTTTCCAGTTCCG TTTATCCGGGCAAAACCATCGAAGTACCAGCGAATACCTGTTCCGTCATAGCGATAACGAGCTCCTGC ACTGGATGGTGGCGCTGGATGGTAAGCCGCTGGCAAGCGGTGAAGTGCCTCTGGATGTCGCTCCACA AGGTAACAGTTGATTGAACTGCCTGAACTACCGCAGCCGGAGAGCGCCGGCAACTCTGGCTCACA GTACGCGTAGTGCAACCGAACCGACCGCATGGTCAGAAGCCGGGCACATCAGCGCTCGCAGCAG TGGCGTCTGGCGGAAAACCTCAGTGTGACGCTCCCCGCGCGTCCACGCCATCCCGCATCTGACCAC CAGCGAAATGGATTTTGCATCGAGCTGGGTAATAAGCGTTGGCAATTTAACCGCCAGTCAGGCTCTC TTTACAGATGTGGATTGGCGATAAAAACCAACTGCTGACCGCGCTGCGCGATCAGTTCACCCGTGCA CCGCTGGATAACGACATTGGCGTAAGTGAAGCGACCCGCATTGACCCTAACCGCTGGGTCGAACGCT GGAAGGCGCGGGCCATTACCAGGCCGAAGCAGCGTTGTTGCAAGTGCACGGCAGATACACTTGCTG ATGCGGTGCTGATTACGACCGCTCACGCGTGGCAGCATCAGGGGAAAACCTTATTTATCAGCCGAA AACCTACCGGATTGATGGTAGTGGTCAAATGGCGATTACCGTTGATGTTGAAGTGGCGAGCGATACA CCGCATCCGGCGCGGATTGGCTGAACTGCCAGCTGGCGCAGGTAGCAGAGCGGGTAAACTGGCTC</p>
--	--

GGATTAGGGCCGCAAGAAAACCTATCCCGACCGCCTTACTGCCGCCTGTTTTGACCGCTGGGATCTGCC
 ATTGTCAGACATGTATACCCCGTACGCTTCCCGAGCGAAAACGGTCTGCGCTGCGGGACGCGCGAAT
 TGAATTATGCCCCACACCAGTGGCGCGGCGACTTCCAGTTC AACATCAGCCGTACAGTCAACAGCAA
 CTGATGGAAACCAGCCATCGCCATCTGCTGCACGCGGAAGAAGGCACATGGCTGAATATCGACGGTT
 TCCATATGGGGATTGGTGGCGACGACTCCTGGAGCCCGTCAGTATCGGCGGAATTCAGCTGAGCGC
 CGGTCGCTACCATTACCAGTTGGTCTGGTGTCAAAAAGCGGCCGCTCGAGGTCACCCATTCEAAGGTA
 AGCCATCCCTAACCCCTCTCCCGGTCTCGATTCTACGCGTACCGGTATCATCACCATCACCATTTAGT
 TTAACCCGCTGATCAGCCCTGACTGTGCCCTTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGCCCTCCCGGTG
 CCTCCTTGACCCGGAAGGTGCCACTCCACTGTCCTTCTAATAAAAATGAGGAAATTCATCGCAT
 TGTCTGAGTAGGTGTCAATCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACGCAAGGGGGAGGATTGG
 GAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACAGC
 TGGGGCTCTAGGGGGTATCCCAACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGGGGTGGTGGTTA
 CGCGCAGCGTGACCGTACACTTGGCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTCTCCCTCCTTCT
 CGCCACGTTCCCGGCTTCCCGCTCAAGCTCAAACTCGGGGCTCCCTTTAGGATTCGAACTTAGTGC
 TTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACCTGATTAGGGTGTGTTTACAGTAGTGGGCCATCGCCCTGAT
 AGACGGTTTTTCGCCCTTGACGTTGGAGTCCAGGTTCTTAATAGTGGACTCTGTTCCAAACTGGAA
 CAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATCTTTGATTTATAAGGGATTTGCCGATTCGGCTATTGGTT
 AAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTAACCGGAATTAATCTGTGGAATGTGTGTCAAGTTAGGGTG
 TGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACC
 AGGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAG
 CAACCATAGTCCCGCCCTTCCCGCTCAAGCTCAAACTCCCGCCCTAACTCCCGCCAGTTCGCGAATTCGCGC
 CCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGACAGAGGCGGAGGCGCCTCTGCCTCTGAGCTATTCAGAA
 GTAGTGAGGAGGCTTTTTGGAGGCTAGGCTTTTCAAAAAGCTCCCGGGAGCTTGATATCCATTT
 TCGGATCTGATCAGCACGTGTTGACAATTAATCATCGGCATAGTATATCGGCATAGTATAATACGACA
 AGGTGAGGAACATAACCATGGCCAAGCCTTTGTCTCAAGAAGAATCCACCCTCATTGAAGAGCAAC
 GGCTACAATCAACAGCATCCCCATCTCTGAAGACTACAGCGTCCGACGCGCAGCTCTCTAGCGACG
 GCCGCATCTTACTGGTGTCAATGTATATCATTTTACTGGGGACCTTGTGCAGAACTCGTGGTGTG
 GGCAGTGTCTGCTGCGGACGCTGGCAACCTGACTTGTATCGTCCGATCGGAAATGAGAACAGGG
 GCATCTTGAGCCCTGCGGACGCTGCCACAGGTGCTTCTCGATCTGCATCCTGGATCAAAGCCATA
 GTGAAGGACAGTGATGGACAGCCGACGCGAGTTGGGATTCGTGAATTGCTGCCCTGGTTATGTGT
 GGGAGGGCTAAGCACTTCGTGGCCGAGGAGCAGGACTGACAGTGTACGAGATTCGATTCCACCG
 CCGCCTTCTATGAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCGCGCTGGATGATCCTCCAGCGC
 GGGGATCTATGCTGGAGTCTTCGCCCCACCCAACTGTTTATTGACGCTTATAATGGTTACAAATAA
 AGCAATAGCATCACAAATTCACAAATAAGCATTTTTTCACTGCAATCTAGTTGTGGTTTGCCAAAC
 TCAATCAATGTATCTTATCATGTCTGTATACCGTCCGACCTAGCTAGAGCTTGGCGTAAATCATGT
 AGCTGTTTTCTGTGTGAATTTGTTATCCGCTCACAAATCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGT
 GTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTC
 CAGTGGGAAACCTGTCTGTCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGAGAGCGGTTTGGC
 GTATTTGGGCGCTTTCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGCTCGCGGAGCG
 GTATCAGCTCACTCAAAGCGGTAATACGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCGAGGAAAGAAC
 TGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGGTGGCTTTTCCATAG
 GCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGA
 CTATAAAGATACCAGGCCTTCCCTGGAAAGCTCCCTCGTGCCTCTCTGTTCCGACCTTCCCGCTT
 ACCGGATACCTGTCCGCTTCTCCCTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTACGCTGTAGGTAT
 CTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGCTCAGCCCGACCG
 CTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGTAGTCCAACCCGTAAGACACGACTTATCGCCACTGCGCAGC
 AGCCACTGGAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAAGTGGTG
 GCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCG
 GAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTG
 AAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTCTACGGGGTCTGA
 CGCTCAGTGGAAACGAAAACCTACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTCAAAAAGGATCTTACCT
 AGATCCTTTAAATAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATAGTAAACTTGGTCTGACA
 GTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTGTTTATCCATAGTTGCGT
 ACTCCCCGCTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATAC
 CGCGAGACCCAGCTCACCAGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCCGGAAGGGCCGAGCG
 CAGAAGTGGTCTGCAACTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTCCCGGAAGCTAGAGTAA
 GTAGTTCCGCAATTAATAGTTTGCAGCAACGTTGTTGCCATTCTACAGGCATCTGGTGTACACGCTG
 CGTTTGGTATGGCTTATTAGCTCCGCTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGT
 GCAAAAAGCGGTTAGCTCCTCGGTCTCCGATCGTTGTGCAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCA

	<p>CTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTTACTGTGCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTG GTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTGCCCGCGCTCA ATACGGGATAATACCGCGCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGAAAAACGTTCTTCGGG GCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGACCCAACT GATCTTCAGCATCTTTACTTTCACCCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAAATGCCGCA AAAAAAGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATCTCTCCTTTTTCAATATTATTGAAG CATTTATCAGGGTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGATTTAGAAAAATAAACAAATAGG GGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAAGTGCCACCTGACGTC (53)</p>
<p>pGL4.10-CMV- MP-EPO</p>	<p>GGCCTAACTGGCCGGTACCCTGCGACGATATCGGATCCAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAA CCGTCAGATCGCCTAGATACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGATCGCCACCATGGGGGT GCACGAATGCTCTGCCTGGCTGTGGCTTCTCCTGTCCCTGCTGTGCTCCCTCTGGGCTCCACGTCCT GGGCGCCACCACGCTCATCTGTGACAGCGAGTCTGGAGAGGTACCTCTTGGAGCCAAAGGAG GCCGAGAAATACAGACGGGCTGTGCTGAACACTGCAGCTTGAATGAGAATGACTGCTCCAGACA CCAAAGTTAATTTCTATGCCTGGAAGAGGATGGAGGTCGGGCGAGCAGGCCGTAGAAGTCTGGCAGG GCCTGGCCCTGCTGCGAAGCTGCTCCTGCGGGGCCAGGCCCTGTTGGTCAACTTCTCCAGCCGTGG GAGCCCTGCAGCTGCATGTGGATAAAGCCGTCAGTGGCCTTGCAGCCTCACCCTCTGCTTCGGGC TCTGGGAGCCAGAAAGGAAGCCATCTCCCTCCAGATGCGGCGCTCAGCTGCTCCACTCGAACAAATCA CTGCTGACACTTTCCGAAACTTCTCCGAGTCTACTCCAATTTCTCCGGGAAAGCTGAAGCTGTACA CAGGGGAGCCTGCAGGACAGGGGACAGATGATCTAGAGTCGGGGCGGCCGGCCGCTTCAGCAG ACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAACCAACTAGAATGCAAGTGAAAAAAATGCTTTATT TGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAAACAAGTTAACAAAC AATTGCATTCATTTATGTTTCAGGTTGAGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTAAAGCAAGTAAACCT CTACAAATGTGGTAAAATCGATAAGGATCCGTCGACCGATGCCCTTGAGAGCCTTCAACCCAGTCAGC TCCTTCCGTTGGGCGCGGGCATGACTATCGTCGCGCACTTATGACTGTCTTCTTATCATGCAACTC GTAGGACAGGTGCCGCGAGCGCTTCTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGTTCGGC TCGCGGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGTAATACGGTATCCACAGAATCAGGGGATAACGC AGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGTGCGC GTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAA ACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCTTGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGA CCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTCTCCCTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCAC GCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGTCTGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGGT CAGCCCGACCGCTGCGCTTATCCGTTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATC GCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTC TTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCC AGTTACCTTCGAAAAAGAGTTGAGTCTTGTATCCGGCAAACAACCCAGCTGGTAGCGGTGGTT TTTTTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTCTA CGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAG GATCTTCACCTAGATCCTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACT TGGTCTGACAGCGGCCGCAAACTGTAACCACTGCAGTGGTTACCAGTCTTGTATCAGTGAAGCACC GATCTCAGCGATCTGCCTATTTCTGTTCTGTCATAGTGGCTGACTCCCGTCTGTAGATCACTACGAT TCGTGAGGGCTTACCATCAGGCCCCAGCGCAGCAATGATGCCGCGAGAGCCGCTTACCAGGCCCC GATTTGTAGCAATGAACAGCCAGCAGGGAGGGCCGAGCGAAGAAGTGGTCTGCTACTTTGTCCG CCTCCATCCAGTCTATGAGCTGCTGTGATGCTAGAGTAAGAAGTTCGCCAGTGAAGTATTTCCGA AGAGTTGTGGCCATTGCTACTGGCATCGTGGTATCACGCTCGTCTCGGTATGGCTTCAACTCT GGTTCCAGCGGTCAAGCCGGTACATGATACCCATATTATGAAGAAATGCAGTCAGCTCCTTAGG GCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCGGTGTTGTCGCTCATGGTAATGGCAGCACTACACA ATTCTCTTACCGTATGCCATCCGTAAGATGCTTTCCGTGACCGGCGAGTACTCAACCAAGTCTGTTT GTGAGTAGTGTATACGGCGACCAAGCTGCTCTTCCCGGCGTCTATACGGGACAACACCGCGCCACAT AGCAGTACTTTGAAAGTGTCTCATATCGGGAATCGTTCTTCCGGGCGGAAAGACTCAAGGATCTTGC GCTATTGAGATCCAGTTCGATATAGCCACTCTTGACCCAGTTGATCTTCAGCATCTTTACTTTACC AAGCTTTCCGGGTGTGCAAAAACAGGCAAGCAAAATGCCGAAAGAAGGGAATGAGTGCAGACGCA AAATGTTGGATGCTCATACTCGTCTTTTTCAATAATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTACTAGTACGCT CTCAAGGATAAGTAAGTAATATTAAGGTACGGGAGGTATTGGACAGGCCGCAATAAAATATCTTTATT TTCAATACATCTGTGTGTTGTTTTTGTGTAATCGATAGTACTAACATACGCTCTCCATCAAAAACAA ACGAAACAAAACAACTAGCAAAATAGGCTGTCCCGTGCAGTGCAGGTGCCAGAACATTTCTCT (54)</p>

REIVINDICACIONES

1. Un vector de terapia génica que comprende un casete de expresión, comprendiendo el casete de expresión un promotor inducible sintético específico del hígado unido operativamente a un gen, comprendiendo el promotor inducible sintético específico del hígado un elemento regulador en cis (CRE) que es capaz de unirse y activarse por un heterodímero de CAR y RXR, en donde el CRE que es capaz de unirse y activarse por un heterodímero CAR-RXR comprende o consiste en una variante funcional de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2, en donde la variante funcional de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2 comprende una de las siguientes secuencias:

- [TGTACTTTCCTGACCN-S]_n (SEQ ID NO: 29);
- [CTGTACTTTCCTGACCN-S]_n (SEQ ID NO: 30); y
- [NCTGTACTTTCCTGACCNTG-S]_n (SEQ ID NO: 31),

10 donde S es un espaciador opcional y n es de 1 a 5, opcionalmente de 2 a 4, y preferiblemente 3.

2. El vector de terapia génica de la reivindicación 1, en el que la variante funcional de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2 comprende una de las siguientes secuencias:

- TGTACTTTCCTGACCN-S-TGTACTTTCCTGACCN (SEQ ID NO: 32);
- TGTACTTTCCTGACCN-S-TGTACTTTCCTGACCN-S-TGTACTTTCCTGACCN (SEQ ID NO: 33);
- CTGTACTTTCCTGACCN-S-CTGTACTTTCCTGACCN (SEQ ID NO: 34);
- CTGTACTTTCCTGACCN-S-CTGTACTTTCCTGACCN-S-CTGTACTTTCCTGACCN (SEQ ID NO: 35); y
- NCTGTACTTTCCTGACCNTG-S-NCTGTACTTTCCTGACCNTG (SEQ ID NO: 36); y
- NCTGTACTTTCCTGACCNTG-S-NCTGTACTTTCCTGACCNTG-S-NCTGTACTTTCCTGACCNTG (SEQ ID NO: 37).

donde S es un espaciador opcional, y/o

15 donde la variante funcional de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2 comprende una de las siguientes secuencias:

- TCTGTACTTTCCTGACCCTTG-S-TCTGTACTTTCCTGACCCTTG-S-TCTGTACTTTCCTGACCCTTG (SEQ ID NO: 38); o
- ACTGTACTTTCCTGACCCTG-S-ACTGTACTTTCCTGACCCTG-S-ACTGTACTTTCCTGACCCTG (SEQ ID NO: 39),

donde S es un espaciador opcional.

3. El vector de terapia génica de cualquier reivindicación anterior que comprende una pluralidad de CRE que son cada uno capaces de ser unidos y activados por un heterodímero de CAR y RXR, que comprende opcionalmente 2 o 3 CRE que son cada uno capaces de ser unidos y activados por un heterodímero de CAR y RXR, y/o

20 en donde el promotor inducible sintético específico del hígado comprende un módulo regulador en cis (CRM) que comprende o consiste en una de las siguientes secuencias:

- NCTGTACTTTCCTGACCNTGNNNNNGTGNCANCATNNACTTNCCTGANNON-S-NCTGTACTTTCCTGACCNTGNNNNNGTGNCANCATNNACTTNCCTGANNON (SEQ ID NO: 42); y
- NCTGTACTTTCCTGACCNTGNNNNNGTGNCANCATNNACTTNCCTGANNON-S-NCTGTACTTTCCTGACCNTGNNNNNGTGNCANCATNNACTTNCCTGANNON-S-NCTGTACTTTCCTGACCNTGNNNNNGTGNCANCATNNACTTNCCTGANNON (SEQ ID NO: 43).

25 donde S es un espaciador opcional, y/o

una de las siguientes secuencias:

- TCTGTACTTTCCCTGACCTTGGCACAGTGCCACCATCAACTTGCCTGACACC-S-
TCTGTACTTTCCCTGACCTTGGCACAGTGCCACCATCAACTTGCCTGACACC (SEQ ID
NO: 44);
- TCTGTACTTTCCCTGACCTTGGCACAGTGCCACCATCAACTTGCCTGACACC-S-
TCTGTACTTTCCCTGACCTTGGCACAGTGCCACCATCAACTTGCCTGACACC-S-
TCTGTACTTTCCCTGACCTTGGCACAGTGCCACCATCAACTTGCCTGACACC (SEQ ID
NO: 45);
- ACTGTACTTTCCCTGACCTGAAGAGGTGGCAGCATGGACTTTCCCTGAACCA-S-
ACTGTACTTTCCCTGACCTGAAGAGGTGGCAGCATGGACTTTCCCTGAACCA-S-
ACTGTACTTTCCCTGACCTGAAGAGGTGGCAGCATGGACTTTCCCTGAACCA (SEQ ID
NO: 46); y
- ACTGTACTTTCCCTGACCTGAAGAGGTGGCAGCATGGACTTTCCCTGAACCA-S-
ACTGTACTTTCCCTGACCTGAAGAGGTGGCAGCATGGACTTTCCCTGAACCA (SEQ ID
NO: 47);

donde S es un espaciador opcional.

4. El vector de terapia génica de cualquier reivindicación anterior que comprende un CRE que puede unirse y activarse mediante un heterodímero de CAR y RXR unido operativamente a un promotor mínimo o promotor proximal, opcionalmente

en donde el promotor mínimo es el promotor mínimo de la timidina quinasa de HSV (MinTK), el promotor mínimo de CMV (CMVmp) o el promotor mínimo de SV40 (SV40mp), y/o

que comprende una secuencia de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NOs: 10 a 18, 59 y 67 a 71, o variante funcional de cualquiera de las mismas, opcionalmente

- 10 que comprende una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 68, la SEQ ID NO: 69, la SEQ ID NO: 70 o la SEQ ID NO: 71, o variante funcional de cualquiera de las mismas.

5. El vector de terapia génica de cualquier reivindicación anterior en el que el gen codifica una proteína o ARN, opcionalmente

- 15 en donde el gen codifica un producto de expresión terapéutica, preferiblemente una proteína terapéutica adecuada para su uso en el tratamiento de una enfermedad o condición asociada con la expresión génica aberrante en el hígado, opcionalmente

- 20 en donde el gen codifica una nucleasa específica del sitio, como una meganucleasa, una nucleasa de dedo de zinc (ZFN), una nucleasa basada en efector de tipo activador de la transcripción (TALEN) o el sistema de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR-Cas).

6. El vector de terapia génica de cualquier reivindicación anterior que es un vector viral, tal como un vector retroviral, lentiviral, adenoviral o viral adenoasociado (AAV), o un plásmido.

- 25 7. Un casete de expresión que comprende un promotor inducible sintético específico del hígado unido operativamente a un gen, comprendiendo el promotor inducible sintético específico del hígado un CRE que es capaz de unirse y activarse por un heterodímero de CAR y RXR de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, opcionalmente

en donde el gen no es un gen reportero, y/o en donde el gen codifica un producto de expresión terapéutico.

- 30 8. Un promotor inducible sintético específico del hígado que comprende una secuencia de acuerdo con una cualquiera de las SEQ ID NOs: 7 a 18 y 59 a 71, o variante funcional de una cualquiera de las mismas, en donde el promotor inducible sintético específico del hígado está de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

9. Un virión recombinante que comprende un vector de terapia génica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, un casete de expresión de acuerdo con la reivindicación 7 o un promotor de acuerdo con la reivindicación 8.

10. Una composición farmacéutica que comprende un vector de terapia génica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, un casete de expresión de acuerdo con la reivindicación 7, un promotor de acuerdo con la reivindicación 8 o un virión de acuerdo con la reivindicación 9.

5 11. Una célula que comprende un vector de terapia génica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, un casete de expresión de acuerdo con la reivindicación 7, un promotor de acuerdo con la reivindicación 8 o un virión de acuerdo con la reivindicación 9, opcionalmente en donde la célula es una célula hepática, opcionalmente una célula hepática en cultivo celular o una célula hepática que está presente en el hígado de un sujeto.

10 12. Un vector de terapia génica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, un casete de expresión de acuerdo con la reivindicación 7, un promotor de acuerdo con la reivindicación 8, un virión de acuerdo con la reivindicación 9 o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10 para su uso en el tratamiento de una enfermedad, preferiblemente una enfermedad asociada con la expresión génica aberrante en el hígado.

15 13. Un método para producir un producto de expresión, preferiblemente un producto de expresión terapéutico, en células, preferiblemente células hepáticas, comprendiendo el método:

- proporcionar células que comprenden un casete de expresión que comprende un promotor inducible sintético específico del hígado unido operativamente a un gen, comprendiendo el promotor inducible sintético específico del hígado un elemento regulador en cis (CRE) que es capaz de unirse y activarse por un heterodímero de CAR y RXR, en donde el promotor inducible sintético específico del hígado está de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6; y

20

- administrar a dichas células un inductor que es capaz de inducir la expresión del producto de expresión del gen unido operativamente al promotor inducible en dicho casete de expresión, opcionalmente

que comprende mantener dichas células hepáticas en condiciones adecuadas para la expresión del producto de expresión del gen, y/o

25 en donde el inductor comprende uno o más agentes seleccionados de la siguiente lista:

fenobarbital (PB); un compuesto flavonoide, e.g., flavona, crisina, baicaleína o galangina; 1,4-Bis[2-(3,5-dicloropiridiloxi)]benceno (TCPOBOP); 6-(4Clorofenil)imidazo[2,1-b][1,3]tiazol-5-carbaldehído-O-(3,4-diclorobencil)oxima (CITCO); Acetaminofén; Buprenorfina; Fenitoína; Carbamazepina; Ácido valproico; Artemisinina y derivados; Clorpromazina; Efavirenz; Nevirapina; Rilpivirina; Etravirina; Diazepam; Ciclofosfamida; Ifosfamida; Cerivastatina; Simvastatina; Lovastatina; sulfonamidas sustituidas; Tiazolidin-4-ona; Estradiol; Estrona y análogos; 17 α -etnil-3;17 β -estradiol (EE2); deshidroepiandrosterona (DHEA); 5 β -pregnano-3,20-diona; Dietilestilbestrol; Extracto de ginkgo biloba; Galangina; crisina; baicaleína; Sulfuro de dialilo; Ácido elágico; Resveratrol; Escualestatina-1; Bilobalida; Triclocarbano; Triclosán; Diclorodifeniltricloroetano (DDT); Dieldrina; Metoxicloro; Metoflutrina; Permetrina; Piretrinas; Sulfoxaflor; Ftalato de dietilhexilo (DEHP); Ciproconazol; Fluconazol; Propiconazol; FL81; Fosfato de tri-p-metilfenilo (TMPP); UM104; y UM145 o

30

35

uno o más agentes seleccionados de la siguiente lista:

fenobarbital (PB); un compuesto flavonoide, e.g., flavona, crisina, baicaleína o galangina; Acetaminofén; Buprenorfina; Fenobarbital; Fenitoína; Carbamazepina; Ácido valproico; Artemisinina y derivados; Clorpromazina; Efavirenz; Nevirapina; Rilpivirina; Etravirina; Diazepam; Ciclofosfamida; Ifosfamida; Cerivastatina; Simvastatina; lovastatina; sulfonamidas sustituidas; y Tiazolidin-4-ona, y/o que comprende opcionalmente dejar de administrar el inductor, variar la concentración del inductor administrado a las células con el tiempo y/o introducir el casete de expresión sintético específico del hígado en la célula.

40

14. Un método para producir un producto de expresión, comprendiendo el método las etapas de:

45 a) proporcionar una población de células eucariotas, preferiblemente células animales, más preferiblemente células de mamíferos y más preferiblemente células hepáticas, que comprende un casete de expresión que comprende un promotor inducible sintético específico del hígado unido operativamente a un gen, comprendiendo el promotor inducible sintético específico del hígado un elemento regulador en cis (CRE) que puede unirse y activarse mediante un heterodímero de CAR y RXR, en donde el promotor inducible sintético específico del hígado está de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6;

50

b) cultivar dicha población de células; y

c) administrar a dicha población de células un inductor que es capaz de inducir la expresión del producto de expresión del gen unido operativamente al promotor inducible en dicho casete de expresión; y

d) recuperar el producto de expresión.

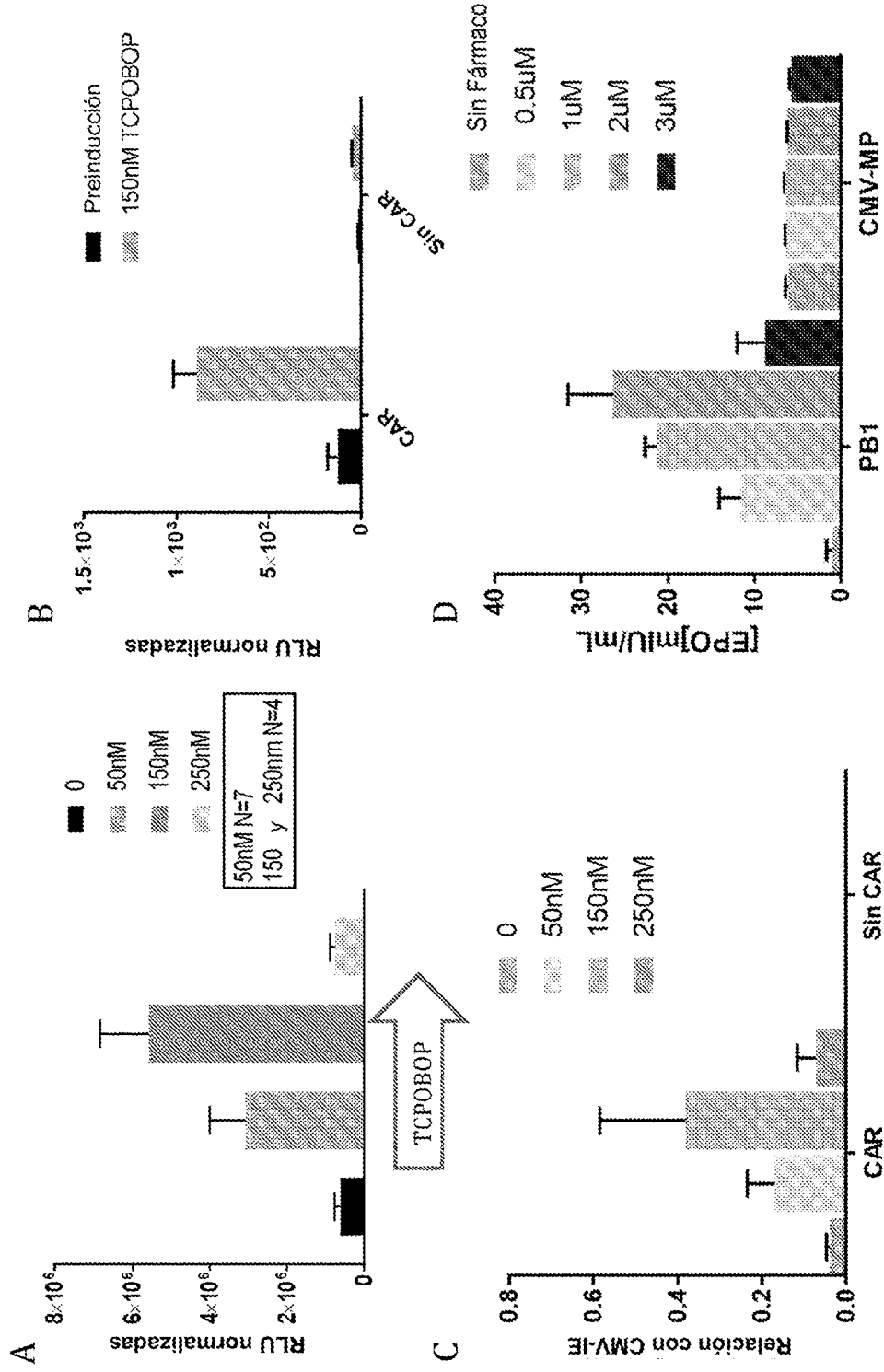


Figura 1

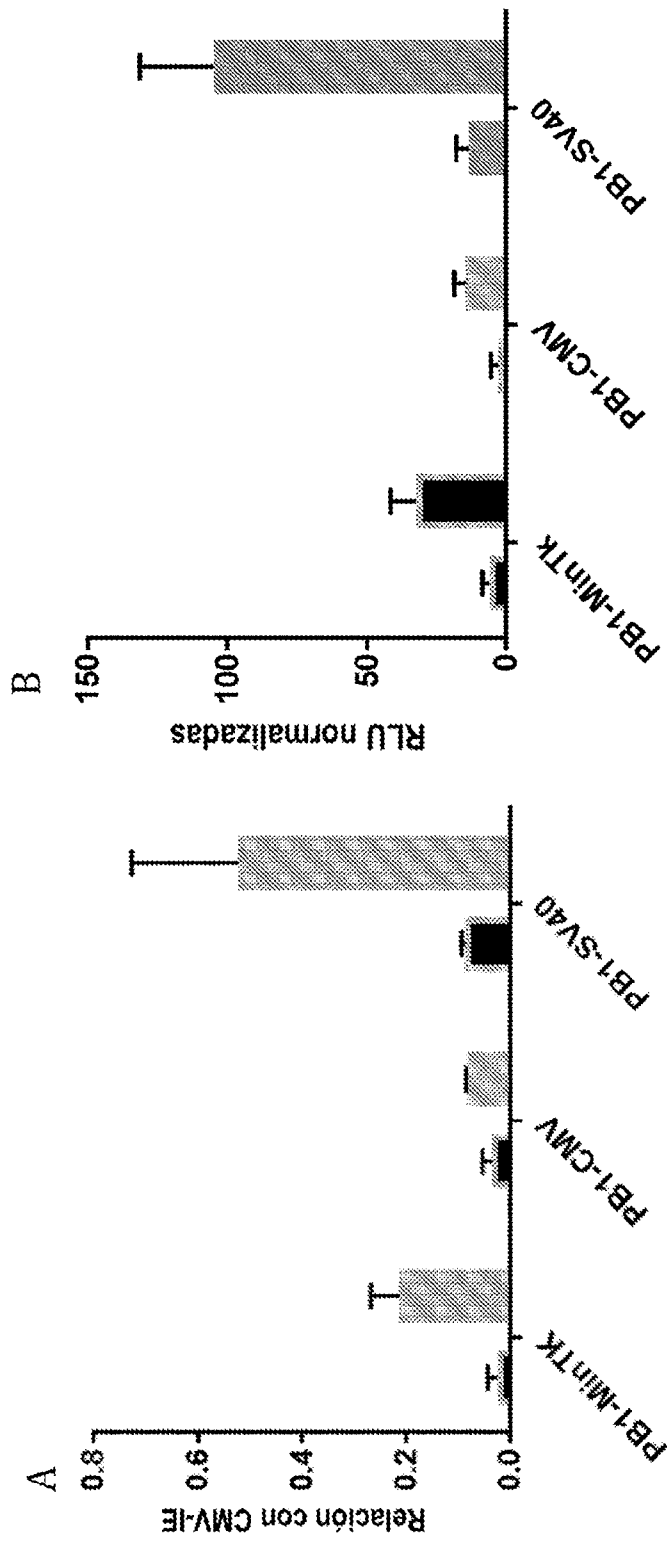


Figura 2

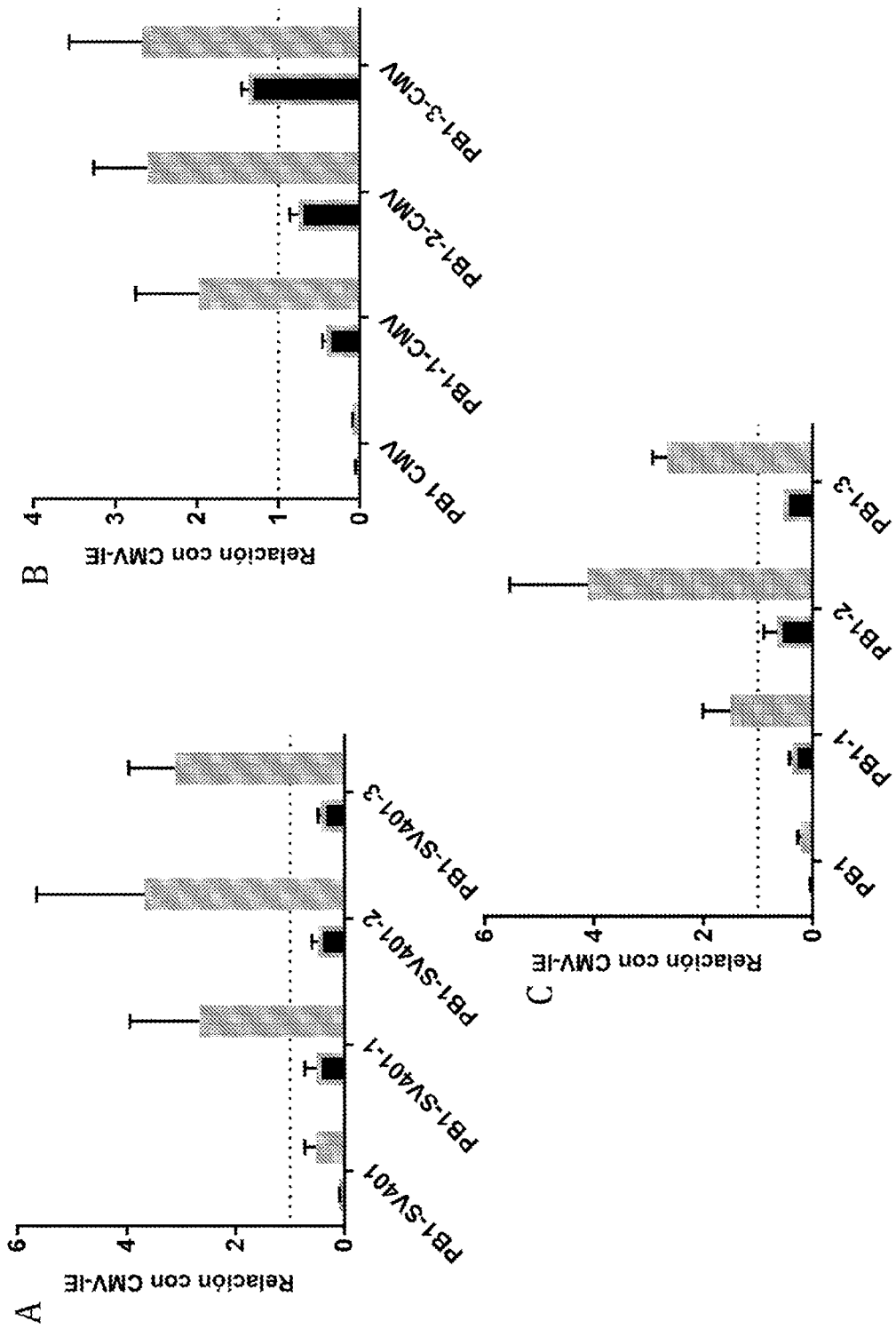


Figura 3

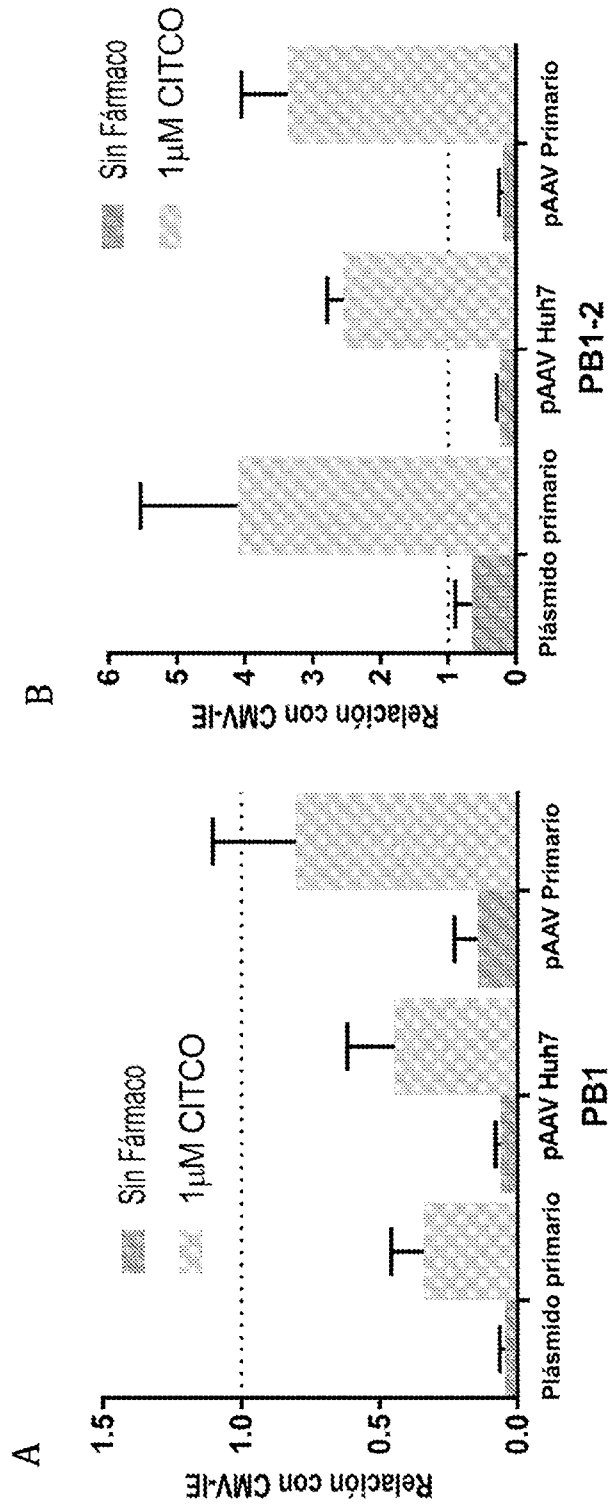


Figura 4

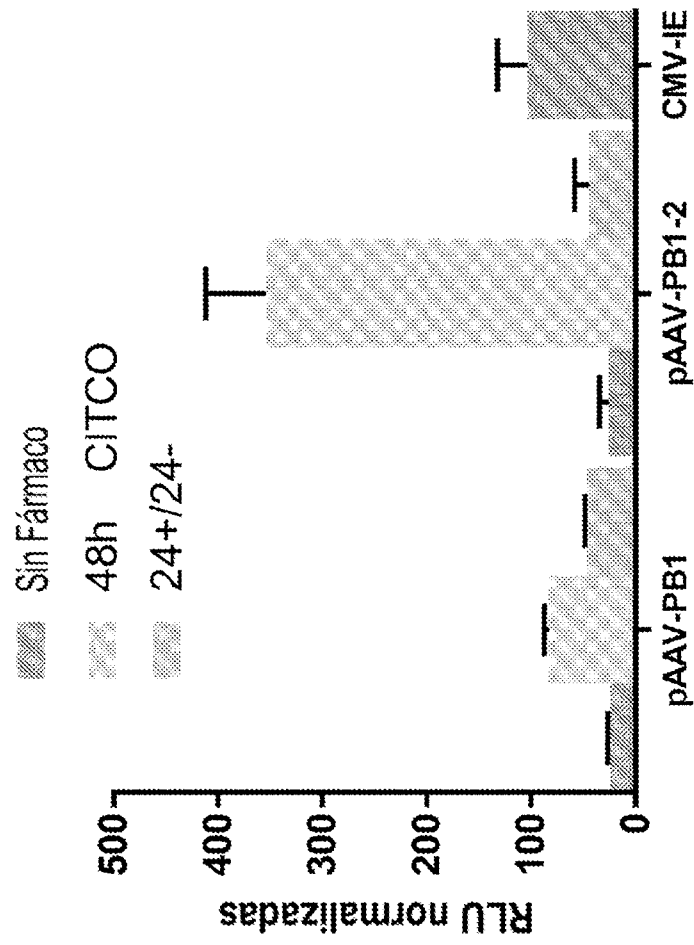


Figura 5



POTENCIADOR DE RATÓN CYP2B10 DE 51 PB

Figura 6

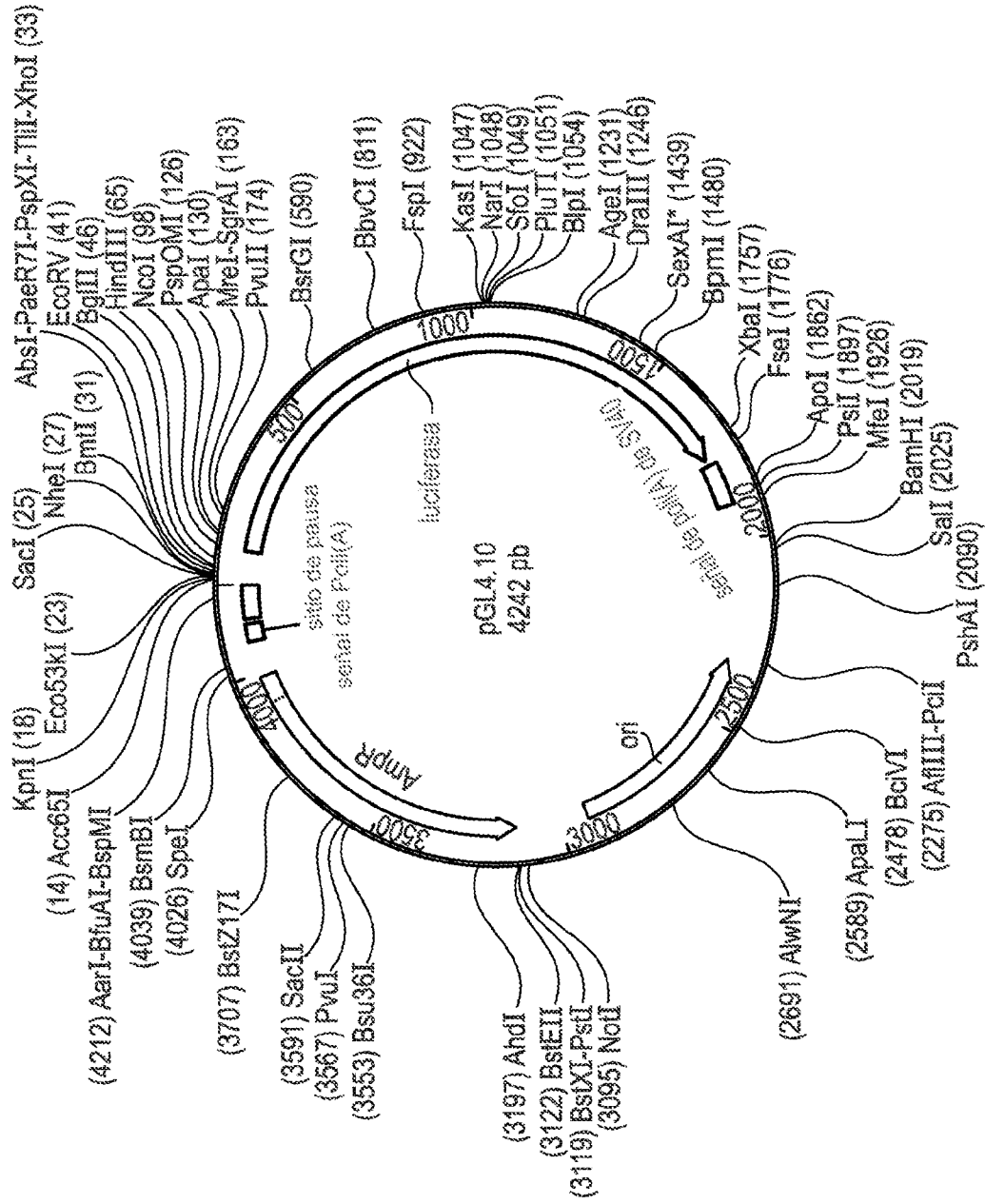


Fig. 7

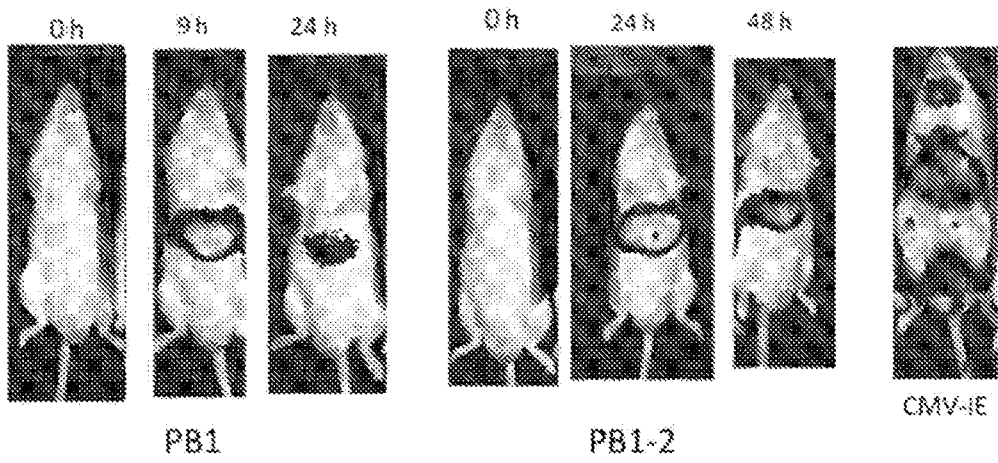


Figura 8A

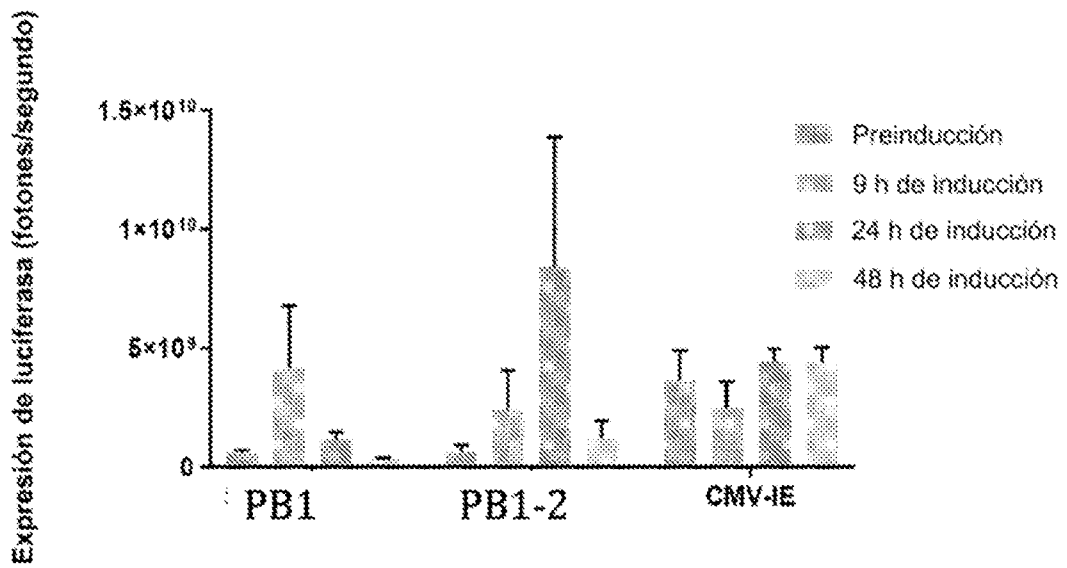


Figura 8B

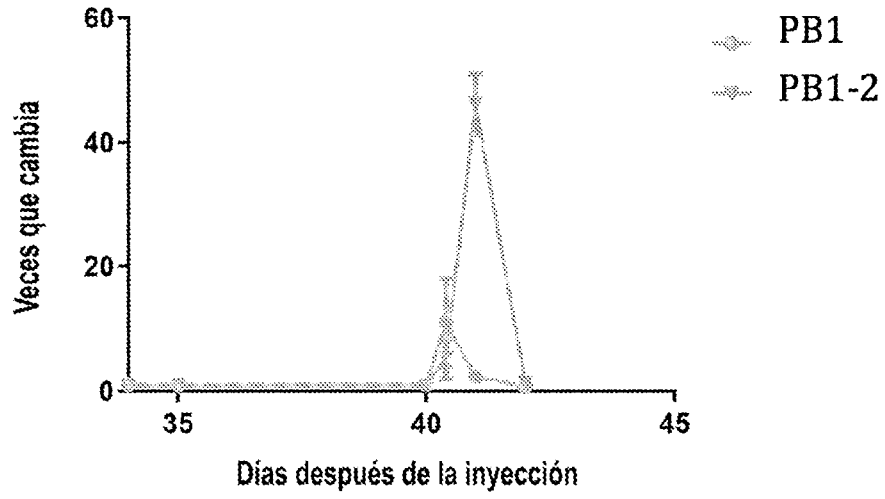


Figura 8C

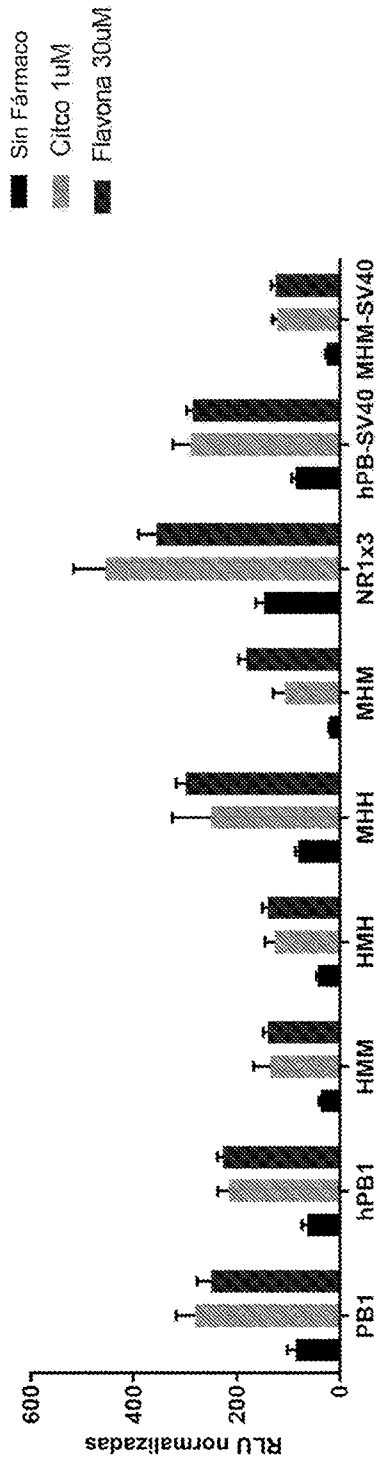


Figura 9

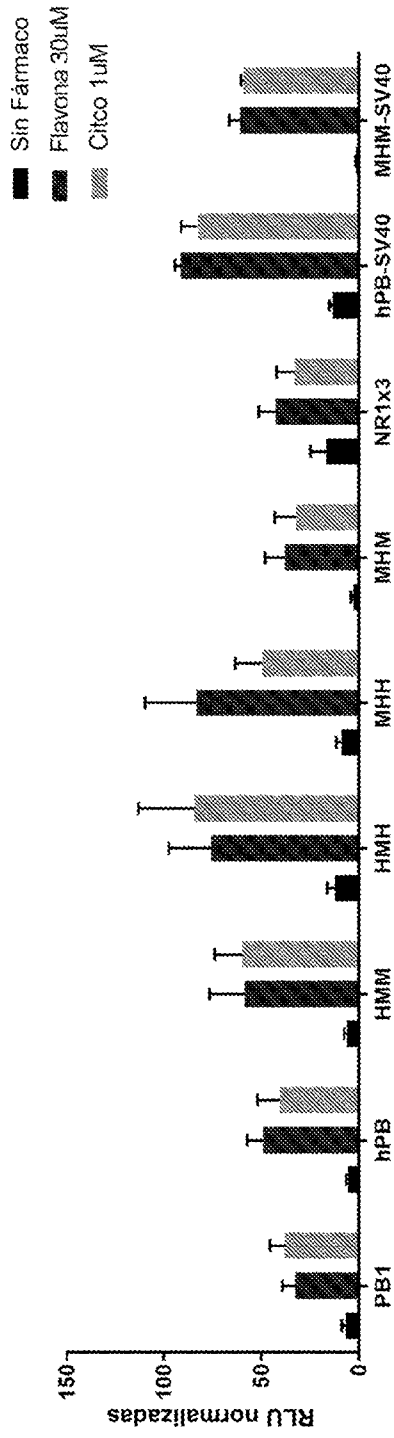


Figura 10

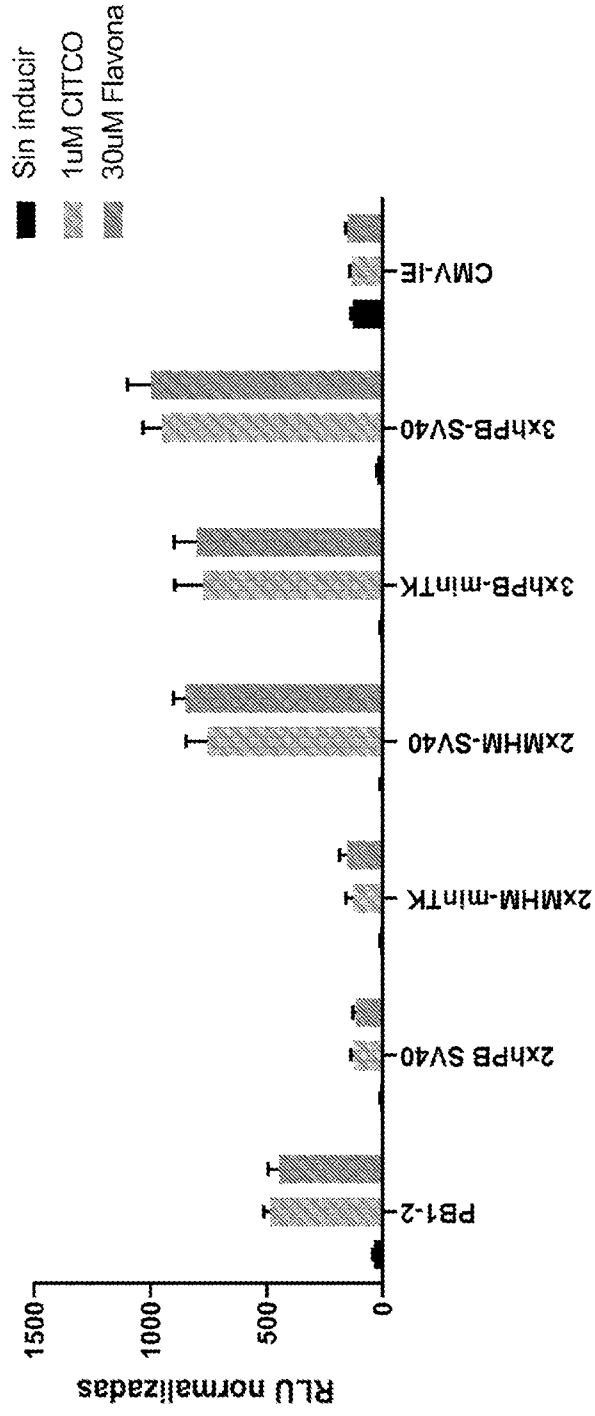


Figura 11

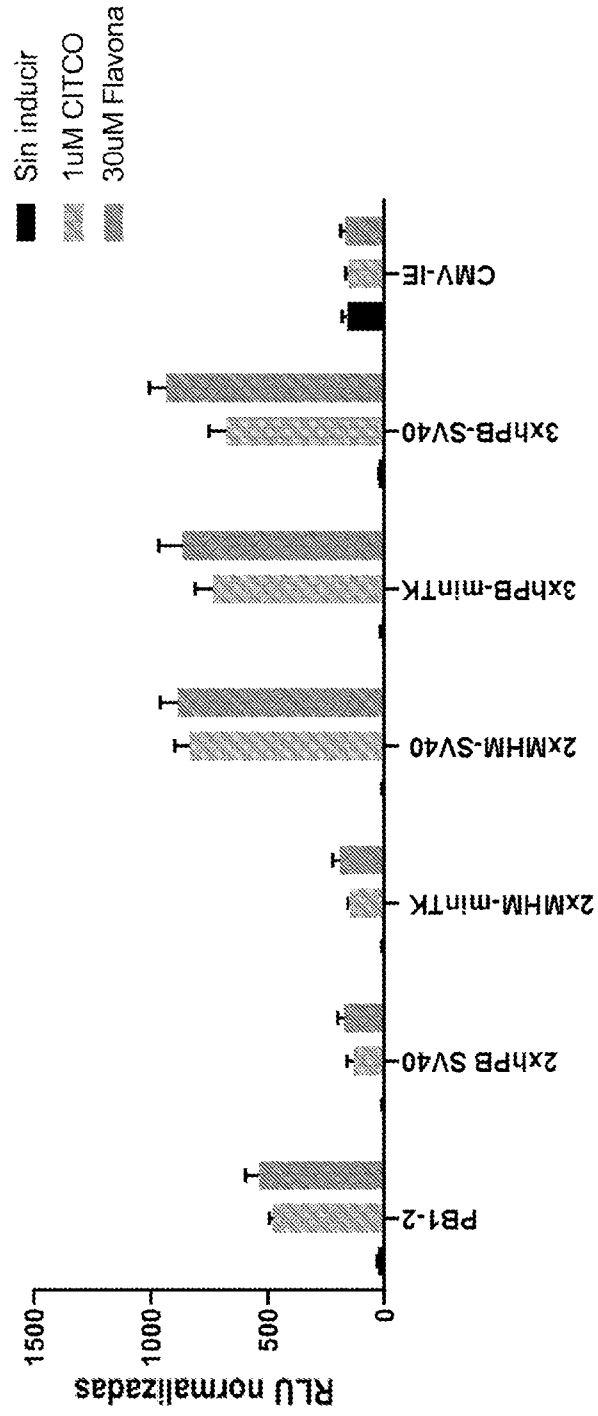


Figura 12